



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**EFFECTO DE DOS ETIL-CARBAMATOS SOBRE CULTIVOS CELULARES DE *Rhipicephalus*
microplus, CÉLULAS HepG2 y CÉLULAS VERO**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
OMAR ESCOBAR CHAVARRÍA

TUTOR PRINCIPAL
DR. FERNANDO ALBA HURTADO. (FES-Cuautitlán)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA. (FES-Cuautitlán)

DRA. RAQUEL COSSÍO BAYÚGAR. (INIFAP)

Cuautitlán Izcalli, Edo. De México, Agosto 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres Rene Escobar y Carmen Chavarría por todo el amor, cariño, amor, apoyo y sobre todo por no dejar de creer en mí. A mis hermanos Rene Escobar y Xóchitl Escobar por su comprensión. Y a todas las personas que me alentaron a seguir.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas para recibir la educación y preparación que me ha permitido continuar con mi superación académica.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme la beca que me ha permitido realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Fernando Alba Hurtado por la confianza que me brindo para realizar este trabajo, por el apoyo total y por los consejos que me permitieron salir adelante en esta travesía.

Al M en C Cesar Cuenca Verde que no solo fue un apoyo fundamental en el laboratorio como técnico académico, sino por tus acciones y confianza puedo llamar amigo.

A la Dra. Raquel Cossío Bayúgar por el gran empeño brindado para realizar este trabajo, así como por la oportunidad que me brindo para poder trabajar en su laboratorio y por la calidez con la que me recibió.

A la Dra. Patricia Ramírez Noguera por su participación en mi comité tutorial y en el desarrollo de este trabajo, por guiarme en momentos difíciles y ayudarme a resolver múltiples dificultades.

A los miembros del jurado: Dr. Alejandro Benítez Guzmán, Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate y Dr. Rodolfo Lagunés Quintanilla, que enriquecieron este trabajo

I

con sus observaciones, me brindaron las facilidades para mejorar este trabajo y se comportaron de manera fraternal.

A la Dra. Guadalupe Prado Ochoa por su apoyo, consejos que me permitieron superarme académica y personalmente.

A los amigos y compañeros que del laboratorio que tuve la fortuna de conocer Ricardo, Tabata, Maribel, Adolfo Verónica, Alejandro y Sandra.

A Clarissa Rodríguez por alegrar mis días, por todo el cariño, confianza y comprensión que me ayudaron a superarme como persona y me motivaron a dar lo mejor de mí.

Al grupo de amigos y conocidos del INIFAP: Cesar, Mayra Marvin, Estefan y Hugo por todo el apoyo y fraternidad.

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

Al Dr. Marco Antonio Muñoz por sus consejos.

Esta investigación fue financiada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM con la clave PAPIIT-UNAM IN222316.

Índice

Abreviaturas	8
Resumen.....	10
1. Introducción	11
2. Generalidades de Rhipicephalus microplus.....	12
2.1. Importancia económica	13
2.2. Ciclo de vida.	13
3. Métodos de control	15
3.1. Métodos de control no químicos.....	15
3.2. Método de control químico	17
4. Resistencia	18
5. Etil-4-bromofenilcarbamato y Etil-4-clorofenilcarbamato como alternativa para el control de la garrapata R. microplus.	19
6. Muerte celular.....	21
6.1. Tipos de muerte celular	22
6.2 Técnicas de detección de apoptosis	25
7. Cultivos celulares	26
7.1. Tipos de cultivos	26
7.2. Diferencias entre cultivos primarios y líneas celulares	27
7.3. Cultivos de mamífero	28
7.4. Cultivos de garrapata.....	29
8. Justificación	31
9. Hipótesis	32
10. Objetivos	33
11. Materiales y métodos	34
12. Resultados.	42
13. Discusión.....	61
14. Conclusiones.	68
15. Bibliografía	69

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Rhipicephalus microplus</i>	15
Figura 2. Técnicas de detección de apoptosis.....	26
Figura 3. Diagrama del diseño experimental.....	41
Figura 4. Gráfica de absorbancia corregida contra concentración de carbamato, en los diferentes tipos celulares tratados con concentraciones logarítmicas crecientes del LQM 919 y LQM 996.	45
Figura 5. Fotografías de células en cultivo.....	50
Figura 6. Imágenes de prueba de TUNEL en células HepG2.	51
Figura 7. Imágenes de prueba de TUNEL en células VERO.	52
Figura 8. Imágenes de prueba de TUNEL en células Bm-sus..	53
Figura 9. Imágenes de prueba de TUNEL en células de glándula salival de <i>R. microplus</i>	54
Figura 10. Imágenes de prueba de TUNEL en células de intestino de <i>R. microplus</i>	55
Figura 11. Imágenes de prueba de TUNEL en células de ovario de <i>R. microplus</i>	56
Figura 12. Absorbancia de lisados de células HepG2 expuestas a 0.6mM del LQM 919 y LQM 996 incubadas con Ac-DEVD-pNA.....	57
Figura 13. Absorbancia de lisados de células VERO expuestas a 0.6mM del LQM 919 y LQM 996 incubadas con Ac-DEVD-pNA.....	58
Figura 14. Absorbancia de lisados de células Bm-sus expuestas a 0.6mM del LQM 919 y LQM 996 incubadas con Ac-DEVD-pNA.....	58
Figura 15. Absorbancia de lisados de células de glándula salival de <i>R. microplus</i> , expuestas a 0.6mM del LQM 919 y LQM 996 incubadas con Ac-DEVD-pNA.....	59
Figura 16. Absorbancia de lisados de células de intestino de <i>R. microplus</i> , expuestas a 0.6mM del LQM 919 y LQM 996 incubadas con Ac-DEVD-pNA.....	59
Figura 17. Absorbancia de lisados de células de ovario de <i>R. microplus</i> , expuestas a 0.6 mM del LQM 919 y LQM 996 incubadas con Ac-DEVD-pNA.	60

Índice de tablas

Tabla 1. principales diferencias entre los cultivos primarios y las líneas celulares.	28
Tabla 2. Carbamatos utilizados en el trabajo (Pérez-González et al., 2014).....	34
Tabla 3. Absorbancia corregida de diferentes tipos celulares expuestos al LQM 919 y LQM 996.....	46
Tabla 4. Porcentaje de viabilidad de los diferentes tratamientos con los carbamatos LQM 919 y LQM 996, sobre diferentes tipos de cultivos celulares.	47

Abreviaturas

AChE	Acetilcolinesterasa.
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianzas
APAF-1	Factor-1 de proteasa activadora de apoptosis.
ATCC	Colección de Cultivos Tipo Americano.
ATP	Adenosín trifosfato
Ca ²⁺	Ion calcio
CENID- PAVET	Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DEVD-pNA	Aspartato-Glutamato-Valina-Aspartato-Paranitroanilina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ENDO G	Endonucleasa G
FAO	Organización de la Agricultura Alimentaria de las Naciones Unidas
FADP	Flavin adenin dinucleótido
FESC	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
GABA	Ácido γ -aminobutírico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
L-15	Leibovitz (medio)
LQM 919	Etil-4 bromeofenil-carbamato
LQM 996	Etil-4-clorofenil-carbamato
MEM	Medio mínimo esencial
Mg ²⁺	Ion magnesio

|

mM	Mili molar
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
nm	Nanometros
SFB	Suero Fetal Bovino
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral- α
TUNEL	Marcaje del extremo dUTP transferasa desoinucleotidil terminal (<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling</i>)
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
Z-VAD	N-benciloxycarbonil-Valina-Alanina-Aspartato

Resumen

Los carbamatos LQM 919 y LQM 996, son moléculas que afectan a la garrapata *R. microplus*, causando mortalidad en estadios de larva y alterando la oviposición y eclosión cuando se aplica sobre hembras adultas. En estudios previos, nuestro grupo de investigación ha demostrado que estos carbamatos tienen una baja afinidad por la acetilcolinesterasa y son de baja toxicidad aguda y subcrónica para mamíferos. Se desconoce el mecanismo de acción por el cual actúan estas moléculas, así como los daños que genera sobre cultivos celulares por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar los daños que generan los etil-carbamatos LQM 919 y LQM 996 sobre diversos cultivos celulares y si existe alguna diferencia en los efectos que ocasionan en células de mamífero y células de garrapata. Se evaluó el efecto del LQM 919 y LQM 996 sobre la disminución de la viabilidad a diversos tipos de cultivos celulares (HepG2, VERO, Bm-sus, cultivos primarios de glándula salival, intestino y ovario de garrapata), a diversas concentraciones (0.0006 mM, 0.006 mM, 0.06 mM y 0.6 mM), utilizando la prueba de presto blue y la prueba de azul tripán. Posteriormente, se evaluó el efecto de la concentración de 0.6 mM para generar apoptosis sobre los tipos celulares anteriormente mencionados, utilizando la técnica de TUNEL por inmunofluorescencia y detección de caspasa 3 espectrofotométricamente. El presente estudio se observa que el LQM 919 y el LQM 996 tienen un efecto proporcional entre el aumento de la concentración y la disminución de la viabilidad, la concentración de 0.6 mM fue la única estadísticamente diferente ($p > 0.05$) con respecto a los testigos, en todos los tipos celulares y en ambos carbamatos. En las pruebas de detección de apoptosis se observó la presencia de células apoptóticas por la prueba de TUNEL, y el aumento de caspasa 3 en la mayoría de los tipos celulares tratados con 0.6 mM del LQM 919 y el LQM 996. En este trabajo se demostró que los carbamatos evaluados disminuyen la viabilidad de las células en cultivo a la concentración de 0.6 mM, además de que son capaces de inducir apoptosis tanto en células de mamífero como en células de garrapata.

1. Introducción

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos que parasitan mamíferos, pájaros, reptiles y anfibios en todas las regiones de la tierra. Éstas transmiten patógenos que afectan a los animales y a los humanos, provocando un impacto mundial (Anderson y Magnarelli, 2008; Barker y Murrell, 2008). Entre las enfermedades que transmiten las garrapatas se encuentran: Borreliosis, Anaplasmosis, Coxielosis, Rickettsiosis, Erliquiosis y Babesiosis. Las garrapatas son importantes vectores, en transmisión de enfermedades en los humanos ocupan el segundo lugar solo después de los mosquitos, mientras que en los animales son el principal vector de enfermedades. (Peter et al., 2005) .

Entre las garrapatas que afectan animales *Rhipicephalus microplus* es la más importante en áreas tropicales y subtropicales ya afecta al ganado bovino generando pérdidas por más de 18 billones cada año (Grisi et al., 2014; Prado-Ochoa et al., 2014b). El método más efectivo de control de esta garrapata es el uso de productos químicos, sin embargo, existen reportes de la presencia de garrapatas resistentes a los ixodicidas comerciales, por lo que la generación de nuevos productos es una alternativa para su control (Soberanes-Céspedes et al., 2002; Pérez-González et al., 2014).

Los carbamatos etil-4-bromofenilcarbamato (LQM 919) y etil-4-clorofenilcarbamato (LQM 996) son moléculas diseñadas y sintetizadas en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Angeles et al., 2000), estos carbamatos afectan los parámetros reproductivos de *R. microplus*, causando retraso en el desarrollo de los ovarios, formación de vacuolas en células del ovario, alteraciones de la vitelogénesis, generando de apoptosis en células ováricas, disminución en el corion de los ovocitos y daño de los ovocitos

generados. Aunque el mecanismo por el cual se llevan a cabo estos fenómenos aún es desconocido, el hallazgo de las células de los pedicelos en apoptosis y las alteraciones morfológicas de los ováricos son indicativos la capacidad de generar muerte celular en las células de garrapata (Prado-Ochoa et al., 2014a; Prado-Ochoa et al., 2014b)..

El uso de células en cultivo es un método útil para estudios de citotoxicidad, así como para entender daño celular y mecanismo de acción de diversas moléculas, por lo que, para el estudio de los carbamatos LQM 919 y LQM 996 el uso de diversos cultivos celulares de mamíferos y garrapata proporcionarán información sobre la toxicidad, daño celular y susceptibilidad a estos carbamatos (Cossío-Bayugar et al., 2002; Bell-Sakyi et al., 2007).

2. Generalidades de *Rhipicephalus microplus*

La garrapata *R. microplus* es un ectoparásito hematófago que afecta principalmente al ganado bovino, aunque también puede encontrarse en animales silvestres como el venado cola blanca (Alonso-Díaz et al., 2006; Temeyer et al., 2012). Esta garrapata afecta ganado en regiones tropicales y subtropicales en México y el mundo. Genera daños directos, al ejercer una acción traumática, tóxica infecciosa y expoliatriz hematófaga, así como daños indirectos, por retraso en el crecimiento de los animales y por su papel como vector de *Anaplasma* sp. y *Babesia* sp. (Gallardo y Morales, 1999; Alonso-Díaz et al., 2006; Guerrero et al., 2014).

2.1. Importancia económica

Se estima el 80 % de los bovinos en el mundo están expuestos a ser infestados por *R. microplus*. Esta garrapata tiene la capacidad de ingerir de 1 a 3 mL de sangre durante su desarrollo, lo que en infestaciones masivas produce anemia, disminución de los parámetros productivos del ganado bovino y daño de pieles, además de que puede transmitir anaplasmosis y babesiosis, enfermedades que pueden provocar la muerte en el ganado. Lo anterior produce grandes pérdidas económicas a las que se les suman gastos generados por el control y tratamiento de la garrapata (Rodrigues y Leite 2013; Guerrero et al., 2014).

Se estima que en el 2013, en México cerca de 25 millones de cabezas de ganado bovino están en riesgo de ser infestadas por *R. microplus*, en las cuales esta garrapata puede ocasionar la reducción de 90.24 L de leche por animal lo que genera pérdidas económicas cercanas a los 69 millones de dólares, mientras que en ganado de carne, una garrapata puede generar la pérdida de 1.18 a 1.37 g por día, que dependiendo del número de garrapatas en la infestación y la raza del animal, se pueden estimar pérdidas económicas superiores a los 504 millones de dólares. En conjunto las pérdidas económicas causadas por la afectación de ganado de carne y leche en México es cercana a los 573 millones de dólares anualmente (Rodríguez-Vivas et al., 2017).

2.2. Ciclo de vida.

R. microplus es un parásito monóxeno con un ciclo de vida directo el cual presenta cuatro estadios evolutivos: huevo, larva, ninfa y adulto. El ciclo de

|

vida se divide en fase no parásita, fase de encuentro como se muestra en la figura 1 (Gallardo y Morales, 1999; Gazca, 2007)

La fase no parásita involucra varios periodos: preovposición, oviposición y eclosión. La preovposición es un periodo que dura de 3 a 9 días e inicia cuando la hembra repleta de sangre se separa del hospedero y se deja caer al suelo, donde se refugia en un sitio protegida de los rayos del sol para iniciar la oviposición. La oviposición dura entre 9 y 34 dependiendo de las condiciones ambientales, en este periodo cada garrapata puede llegar a poner entre 1500 y 4500 huevos, posterior a esto los huevos se incuban y las larvas eclosionan de estos en un periodo de entre 20 y 120 días. Las larvas se mantienen de su vitelo y por geotropismo negativo suben a lo alto de los pastos para entrar en contacto con el hospedero, bajo estímulos como vibración, calor y dióxido de carbono (Gallardo and Morales, 1999; Gazca, 2007).

La fase de encuentro abarca el tiempo en el cual las larvas situadas en la vegetación tienen contacto con el hospedero, suben a éste y lo parasitan, insertando su hipostóma sobre la piel del hospedero, después de un periodo de entre 5 y 8 días las larvas mudan a ninfas y del día 13 al 25 es posible encontrar garrapatas adultas sobre el hospedero, en promedio la fase parásita dura entre 21 a 23 días (Gallardo y Morales, 1999; Gazca, 2007).



Figura 1. Ciclo de vida de *Rhipicephalus microplus* (Iturbe-Requena 2014).

3. Métodos de control

Los métodos de control de garrapatas se clasifican en químicos y no químicos, siendo los métodos químicos los más utilizados (Soberanes-Céspedes et al., 2002).

3.1. Métodos de control no químicos

Los métodos no químicos son aquellos que engloban las medidas para controlar las garrapatas que no utilizan productos químicos. Existen varias alternativas en este tipo de control, entre las que se encuentran los siguientes:

-Uso de razas resistentes. Las razas cebuinas presentan de un 10 a 20% menos garrapatas que el ganado de razas europeas, ya que el ganado cebuino

presenta mayor espesor de la piel, mayor cantidad de linfocitos y mayor liberación de histamina (Jonsson, 2006).

-Control biológico. Existen diversos microorganismos que pueden llegar a ser patógenos para las garrapatas, como son hongos entomopatógenos (*Beauveria* sp y *Metarhizium* sp.), bacterias (*Cedecea lapagei* y *Enterobacter agglomerans*) y nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditidae* spp. y *Steinernematidae* spp.), los cuales tienen una alta eficiencia *in vitro* pero limitaciones *in vivo* por las condiciones medioambientales (Ojeda-Chi et al., 2011; Rodríguez-Vivas et al., 2014).

-Tipo de vegetación. Existen plantas forrajeras como *Melinis minutiflora*, que tiene la capacidad de secretar oleorresinas volátiles en los tricomas de la hoja y tallos que son capaces repeler larvas de garrapata. Pastos como *Andropogon gayanus* y *Brachiaria brizanta* tienen vellosidades finas que pueden atrapar u obstaculizar a las larvas de garrapatas impidiendo que estas suban a la punta de los pastos, disminuyendo de esta manera la cantidad de larvas que infestan al ganado (Del Hoyo et al., 2013; Fernandez-ruvalcaba et al., 2004; Wilson et al., 1989).

-Vacunas. Actualmente existe en el mercado la vacuna Gavac® para el control de garrapatas, ésta contiene el antígeno recombinante Bm86, el cual es una glicoproteína expresada en células intestinales de la garrapata, por lo que el efecto se da hasta que la garrapata ingurgita sangre del hospedero y requiere la aplicación periódica de la vacuna para mantener el efecto protector. En la mayoría de los estudios la vacuna ha sido probada junto con ixodicidas y en periodos de 8 años ha probado disminuir el uso de estos en un 82 %.(Valle et al., 2004; Castro-Janer et al., 2010; Cunha, Andreotti y Leite, 2011).

3.2. Método de control químico

El método químico para el control de *R. microplus* consiste en la aplicación de sustancias con un efecto ixodicida, con el fin de controlar a esta garrapata (Rodríguez-Vivas et al., 2014; Escobar-Chavarría, 2014).

En México se utilizan como ixodicidas más de 50 productos químicos, los cuales de acuerdo a sus características químicas y mecanismos de acción se han clasificado en los siguientes 6 grupos (Rodríguez-Vivas et al., 2014).

Organofosforados: Son esterres del ácido fosfórico y de sus derivados, actúan inhibiendo enzimas con actividad esterasa, la más importante es la acetilcolinesterasa, lo que genera una acumulación de acetilcolina que lleva a la alteración del impulso nervioso, parálisis y muerte de las garrapatas (Fernández et al., 2010).

Piretroides sintéticos: Los piretroides son moléculas químicas sintéticas, análogas de la piretrinas. Estos tienen un efecto sobre el transporte de sodio a las membranas nerviosas, lo que lleva a parálisis y muerte (Narahashi, 1971).

Amidinas: Las amidinas son moléculas sintéticas derivadas de aminas, son antagonistas de los receptores de octopamina en parásitos, lo que provoca una hiper-excitabilidad de las garrapatas, seguida de la muerte (Beyer y Walter, 1987).

Fenilpirazoles: Un grupo de moléculas de acción prolongada. Éstas tienen un efecto antagonista sobre el receptor GABA, interfiriendo con los canales de cloro de las membranas, impidiendo la transferencia de iones y la transmisión de impulsos nerviosos (Devine et al., 2008).

Reguladores del crecimiento: Su principal exponente es el fluorazon, el cual es un inhibidor de la quitina en los artrópodos. Esta molécula difunde en la sangre del hospedero de donde es ingerida por el artrópodo, impidiéndole la muda de larvas y ninfas, los huevos ovipositados por garrapatas adultas tratadas no eclosionan (FAO, 2017).

Lactonas macrocíclicas: Son moléculas complejas derivadas de la fermentación de actinomicetos. Las lactonas macrocíclicas se dividen en dos grandes familias, avermectinas e ivermectinas. Las lactonas macrocíclicas ejercen su efecto antiparasitario al incrementar la permeabilidad de la membrana a los iones cloruro con la consecuente hiper-polarización y parálisis de la musculatura del parásito con lo cual producen la muerte (Rodríguez-Vivas et al., 2010).

4. Resistencia

El uso excesivo y desregulado de productos químicos en el control de garrapatas ha generado la selección de garrapatas resistentes a dichos productos, las cuales son cada vez más difíciles de controlar. La resistencia se define como la capacidad adquirida de individuos de una población que les permite sobrevivir a dosis de químicos que generalmente son letales para un individuo normal (Alonso-Díaz et al., 2006).

Existen diversos procesos que explican de manera general los mecanismos de resistencia, entre estos se encuentra la modificación de la conducta del parásito para evitar el contacto con el ixodicida o la modificación de los componentes del exoesqueleto para facilitar o dificultar el paso de diferentes

moléculas, principalmente por la modificación en la concentración de lípidos (Alonso-Díaz et al., 2006).

Las garrapatas pueden desarrollar mecanismos de defensa más finos, como la resistencia metabólica, en la cual se da un aumento en la producción de enzimas o complejos proteicos con actividad detoxificante, como son la glutatión-s-transferasa, algunas esterasas y carboxilasas, además de algunos citocromos, otro mecanismo son mutaciones en genes en los sitios blanco de los pesticidas haciéndolos menos afines a los pesticidas o generando modificaciones de los receptores proteicos (Alonso-Díaz et al., 2006; Araque et al., 2014; Guerrero et al., 2014).

5. Etil-4-bromofenilcarbamato y Etil-4-clorofenilcarbamato como alternativa para el control de la garrapata *R. microplus*.

El grupo de trabajo del laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), UNAM, diseñó y sintetizó un amplio grupo de carbamatos (Angeles et al., 2000). Estas moléculas han sido probadas para evaluar su acción antibacteriana sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Enterobacter aerogenes* y *Helicobacter pylori* (Bernal, 2000) y como antiparasitarios sobre *Hymenolepis nana*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* (Ordaz-Pichardo et al., 2005).

Prado-Ochoa et al. (2013) evaluaron 17 carbamatos sintetizados en la FESC, como agentes ixodicidas. Entre estos los carbamatos etil-4-bromofenilcarbamato (LQM 919) y etil-4 clorofenilcarbamato (LQM 996), afectaron la oviposición de huevos hasta en un 65% y la eclosión de larvas hasta en un 100% en pruebas *in vitro*. Estudios posteriores mostraron que estas

|

moléculas también tienen una alta eficacia (98%) en pruebas *in vivo* en las que se trataron diferentes estadios de garrapatas aislados en mangas sobre bovinos, se observó mortalidad de larvas y ninfas además de la disminución de la oviposición y eclosión de huevos provenientes de hembras adultas tratadas (Iturbe-Requena, 2014).

Se realizaron pruebas de toxicología determinando la toxicidad oral aguda y dérmica de los carbamatos LQM 919 y LQM 996 en ratas y se calculó la dosis letal 50 que fue 300-2000 mg/kg por vía oral y mayor a 5000 mg/kg por vía dérmica, con esto se demostró la baja toxicidad de los carbamatos. En pruebas de toxicidad subcrónica se observaron alteraciones en hematocrito, porcentaje de reticulocitos, enzimas hepáticas y creatinina; éstos efectos fueron reversibles al suspender el tratamiento (Prado-Ochoa et al., 2014a; Prado-Ochoa et al. 2014b).

Al realizar estudios de genotoxicidad y citotoxicidad realizadas sobre ratas Wistar tratadas con los LQM 919 y LQM 996, se observó que una dosis entre 12.5 y 50 mg/kg por día durante 90 días incrementan significativamente el número de micronúcleos y eritrocitos policrómicos en sangre periférica, pero este efecto es reversible después de 21 días de suspender el tratamiento. Además que concentraciones de 0.3 mM de carbamatos sobre cultivos de linfocitos incrementan el número de células en primera división de metafase y disminuyen el porcentaje de células en la tercera división de metafase, lo que indica un aumento del ciclo celular o un arresto celular (Prado-Ochoa et al., 2016)

La efectividad de los carbamatos de nueva síntesis en pruebas sobre garrapatas susceptibles y resistentes impulsaron a evaluar el mecanismo por el cual actúan. A diferencia de los carbamatos convencionales, el LQM 919 y el LQM

996 tienen una baja afinidad por la acetilcolinesterasa (AChE), por lo que se infiere que el mecanismo de acción es diferente, sin embargo en estudios histológicos y morfológicos se observó la disminución del desarrollo del ovario de hembras tratadas, además de alteración en el tamaño y forma de los ovocitos, presencia de células con núcleos picnóticos, vacuolación del epitelio ovárico, disminución del corion, alteraciones ultra-estructurales y apoptosis de células del pedicelo sugieren que estas moléculas pueden generar procesos de peroxidación o daños en la estructura de algunas células de las garrapatas que llevan a procesos de muerte celular (Escobar-Chavarría, 2014;. Prado-Ochoa et al., 2014c).

6. Muerte celular

Existen daños y alteraciones celulares que pueden dar indicios de muerte celular. La muerte celular es un proceso que puede iniciar con alteraciones reversibles que al llegar a un punto de no retorno se tornan irreversibles. El proceso de muerte puede estar mediado por múltiples fenómenos como la activación masiva de caspasa, pérdida del potencial de membrana, pérdida total de la integridad de la membrana mitocondrial externa o exposición de fosfatidilserina (Kroemer et al., 2009).

Los primeros criterios utilizados para identificar la muerte celular fueron morfológicos, algunas de las alteraciones celulares asociadas a la muerte fueron: daño en la membrana celular, formación de vacuolas en toda la célula y lisis celular. Actualmente la identificación bioquímica y molecular son la manera propuesta por el comité de nomenclatura de muerte celular para identificar y clasificar la muerte celular (Kroemer et al., 2009; Galluzzi et al., 2012).

6.1. Tipos de muerte celular

Existen diversos mecanismos de muerte celular, a continuación, se muestra la clasificación de los tipos de muerte celular más relevantes:

Apoptosis: El término apoptosis deriva del griego *apóptōsis* y hace referencia a la caída de las hojas de los árboles en el otoño; este término fue acuñado por Kerr, Willie y Currie en 1972, quienes describieron los aspectos morfológicos de la muerte celular. La apoptosis es un proceso mediado por caspasas que son cistein-proteasas con un sitio de corte en residuos de aspartato, dicho proceso se caracteriza por la retracción de pseudopodos, reducción del volumen celular (Picnosis), condensación de la cromatina y fragmentación nuclear. Existen sub-clasificaciones para la apoptosis, dependiendo la vía por la cual se lleve a cabo (Kam y Ferch, 2000; Elmore, 2007; Kroemer et al., 2009).

La apoptosis extrínseca es ampliamente usada para definir procesos de apoptosis desencadenados por señales externas que activan receptores específicos en la membrana de las células. La apoptosis extrínseca es iniciada por la unión de ligandos como CD95 y CD95-Ligando (FAS/FASL), Factor de Necrosis Tumoral y Factor de Necrosis Tumoral -relacionado con el ligando inductor de apoptosis (TNF- α /TRAIL). La unión ligando receptor genera una modificación en una porción conservada de los receptores, llamados dominios de muerte, lo cual promueve el reclutamiento de proteínas intracelulares que llevan a la auto-catálisis y activación de la pro-caspasa 8 o de la pro-caspasa 10 (Elmore, 2007; Galluzzi et al., 2012).

La apoptosis intrínseca puede ser desencadenada por una gran cantidad de condiciones que incluyen daño al ADN, estrés oxidativo, exceso de Ca^{+2} en el citosol, hipoxia, radiación, acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico y otras. Las vías de señalización que llevan a apoptosis

por vía intrínseca son amplias y heterogéneas, sin embargo todas convergen en la mitocondria donde se da una pérdida del potencial de membrana y permeabilidad de la membrana mitocondrial, esto se regula por proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas (Elmore, 2007; Galluzzi et al., 2012). La permeabilización de la membrana externa de la mitocondria es el punto de no retorno en la apoptosis intrínseca; fenómeno mediado por proteínas pro-apoptóticas formadoras de poros de la familia BCL-2, como BAK y BAX o puede ser resultado de un fenómeno conocido como transición de permeabilidad mitocondrial, que se origina en el espacio intermembranal debido a la apertura de un complejo multiproteico conocido como complejo del poro de transición de permeabilidad. Independientemente del modo en el que inicie la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria, se afecta el potencial de membrana, cesa la síntesis de ATP, se liberan al citoplasma: las proteínas del factor inductor de apoptosis y endonucleasa G, citocromo C y especies reactivas de oxígeno, lo que amplifica la señal de apoptosis. El citocromo C participa con APAF-1 y dATP en la formación del apoptosoma, que activa la caspasa 9 que a su vez activa a la caspasa 3 que es la caspasa efectora. El factor inductor de apoptosis y la endonucleasa G permean al núcleo en donde fragmentan al ADN, independientemente de las caspasas (Elmore, 2007; Kroemer et al., 2009; Galluzzi et al., 2012).

Necrosis: Por años la necrosis ha sido definida como un proceso de muerte accidental, desregulado; sin embargo, reportes recientes sugieren que la necrosis es un proceso de muerte celular que juega un papel en múltiples procesos fisiológicos y patológicos. Existen múltiples factores que inducen necrosis, entre los que se encuentran la inducción de alquilación por daño en el ADN, excito-toxinas, el ligando a receptores de muerte bajo ciertas

circunstancias, cuando se inhiben caspasas (en especial la caspasa 8) con ARN o fármacos provocan que algunas proteínas como las RIP1 y RIP3 no se degraden, las cuales llevan a la muerte por necrosis (Kroemer et al., 2009).

La necrosis ha sido caracterizada en microscopia electrónica, por la aparición de organelos hinchados en el citoplasma y pérdida de la membrana plasmática de las células. Mientras que bioquímicamente, en la necrosis hay una disminución en la producción de energía, se pierde la integridad de la membrana celular, se destruye el ADN de forma aleatoria, se genera un proceso de estimulación del sistema inmune por parte de las células que mueren y se libera el factor de crecimiento derivado de hepatoma. En el proceso de necrosis están involucradas proteasas no caspasas como las efectoras de la autólisis de la célula entre las que se encuentran la catepsina y la calpaína (Zong y Thompson, 2006).

Autofagia: Es un proceso que no siempre culmina en muerte celular; considerado como mecanismo celular de defensa inmune de células frente a patógenos o como un mecanismo de reciclaje de componentes celulares con fines de obtener nutrientes. El proceso de autofagia como muerte celular está ligado a la generación masiva de autofagosomas que lisan los organelos celulares (Deretic et al., 2015; Galluzzi et al., 2012).

Catástrofe mitótica: Es un proceso de muerte celular que es desencadenado por aberraciones en la mitosis o en fases subsecuentes. Después de las aberraciones mitóticas, las células frecuentemente exhiben alteraciones nucleares como micronúcleos y multinúcleos, que son considerados como marcadores de catástrofe mitótica. La muerte celular en la catástrofe mitótica puede desencadenar procesos de apoptosis o de necrosis, por lo que estrictamente no es un mecanismo de ejecución de muerte celular, pero dadas

|

sus características específicas del momento en el que se da este suceso, se clasifica dentro de los procesos de muerte celular (Galluzzi et al., 2012).

6.2 Técnicas de detección de apoptosis

Existen diversos mecanismos de detección de muerte celular, en particular para la detección de apoptosis. Las descripciones morfológicas de los procesos de muerte celular son la manera más económica y utilizada para la descripción de apoptosis (Elmore, 2007). Recientemente se han validado diversas técnicas bioquímicas y moleculares para detección de apoptosis, entre las que se encuentran técnicas de estimación de fragmentación de ADN, detección de componentes membranales o intracelulares característicos de la apoptosis (Elmore, 2007; Sharma et al., 2012).

La identificación de fragmentación de ADN se puede medir por la técnica de TUNEL, por el uso de anticuerpos o por el uso de sondas, con esto se busca probar la integridad del ADN. La medición de Anexina V es una técnica ampliamente usada para evaluar la presencia de fosfolípidos en la membrana (fosfatidilserina) la cual se expresa en el lado exterior de la membrana en procesos de apoptosis tempranos. Finalmente, la detección de moléculas característica de la cascada de apoptosis como la detección de caspasas. En la figura 2 se resumen los métodos de detección de apoptosis (Sharma et al., 2012).

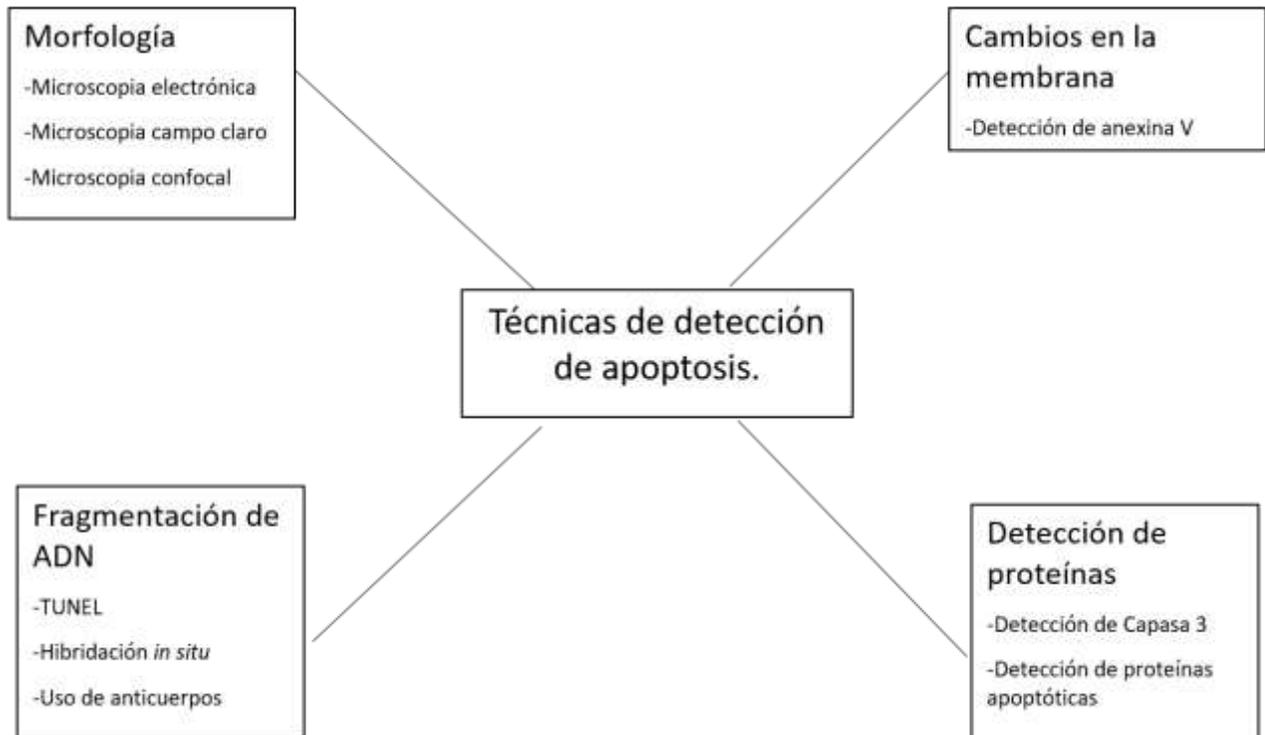


Figura 2. Técnicas de detección de apoptosis. Modificado de Sharma et al. (2012)

7. Cultivos celulares

El término cultivo celular hace referencia al crecimiento y mantenimiento de células de un órgano, tejido o derivadas de estos, manteniéndolas *in vitro* bajo condiciones de presión, humedad, temperatura y nutrición constantes, además libres de patógenos. Una característica importante de los cultivos celulares es la conservación de las propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas de las células que se cultivan (Castaño, M. E., y Zapata, 2016)

7.1. Tipos de cultivos

Existen diferentes clasificaciones para los cultivos celulares, las cuales consideran el tipo de crecimiento que tienen las células, así como el origen y tiempo que se pueden mantener *in vitro*.

Cultivos primarios

Son cultivos derivados directamente de un órgano o tejido, que conservan las características morfológicas y fisiológicas de estos. Los cultivos primarios suelen ser inicialmente heterogéneos (conformados por una mezcla de células que conformaban el tejido), pero bajo procesos de selección se puede llegar a obtener un tipo celular específico. Los cultivos celulares primarios se pueden mantener *in vitro* por un tiempo finito, aunque se pueden manipular bajo un proceso de transformación y así mantenerlos indefinidamente en cultivo (Cossío-Bayuggar et al., 2011).

Líneas celulares

Son células con características genéticas y morfológicas diferentes a las células de las que derivaron y son mantenidas en pases continuos. Pueden ser resultado de la transformación de un cultivo primario, aisladas de tejido embrionario o aisladas de tumores. Estas líneas celulares pueden crecer y propagarse indefinidamente (Cossío-Bayuggar et al., 2011), en su mayoría han sido probadas bajo diversos protocolos para determinar sus características particulares (Kaur y Dufour, 2012).

7.2. Diferencias entre cultivos primarios y líneas celulares

Los cultivos primarios no tienen alteraciones genéticas que modifiquen las características originales de las células, lo que los hace excelentes modelos para pruebas de toxicología, evaluación de metabolitos, generación de vacunas, etc. Sin embargo, el uso de cultivos primarios implica riesgos como la reproducibilidad de pruebas al ser los cultivos generados constantemente, el tardado tiempo de división y la variabilidad que se genera derivada del donador del tejido del cual provienen las células.

Por su parte las líneas celulares representan un grupo homogéneo de células que bajo las mismas condiciones se comportan de forma similar, lo que aumenta la reproducibilidad de las pruebas realizadas con estos, los protocolos estandarizados para aprovechar las características de cada línea celular y su corto tiempo de replicación la vuelven ideales para pruebas de toxicidad, modelos de investigación, producción biotecnológica y generación de tejidos sintéticos. Las líneas celulares también cuentan con desventajas como la pérdida de algunas funciones del tejido original, la generación de mutaciones espontáneas debido a la alta replicación y transformación de su genoma (Kaur y Dufour, 2012). En la tabla 1 se muestran las principales diferencias entre cultivos primarios y líneas celulares.

Tabla 1. Principales diferencias entre los cultivos primarios y las líneas celulares.

Propiedades	Cultivos Primarios	Líneas celulares
Tiempo de vida y proliferación	Finita (limitada a un bajo número de divisiones celulares)	Infinita cuando se maneja adecuadamente (alto número de divisiones celulares)
Variabilidad	La variabilidad puede depender de los donadores y del protocolo de generación.	Mínima variabilidad
Integridad genética	Similar a la del tejido del que se extrajo.	Se pueden generar mutaciones a medida que se dividen las células.
Relevancia biológica (cercanía al modelo <i>in vivo</i>)	Características similares a las del tejido del que derivan las células.	Pueden perderse características del tejido original.
Facilidad de uso	Requiere optimizar las condiciones del cultivo y manejarlo cuidadosamente.	Buena si están establecidos los protocolos para la línea celular.
Tiempo de uso	Requieren más tiempo y se obtienen menos células.	Se requiere poco tiempo para tener un abundante número de células.

7.3. Cultivos de mamífero

Los cultivos de tejidos iniciaron a finales del siglo XIX, cuando en 1885 Wilhem Roux mantuvo células de embrión de pollo en solución salina, desde este momento se dieron avances en el desarrollo de medios de cultivo,

técnicas de esterilización y métodos de aislamiento de células. En la actualidad se cuenta con líneas celulares de más de 150 especies animales y cerca de 4000 derivadas de tejidos humanos (ATCC, 2017).

Células VERO: Es una línea celular derivada de riñón del mono verde (*Cercopithecus arthiops*), fueron depositadas en The Global Bioresource Center (ATCC) por Hann y Rhim en 1962. Estas son células con morfología epitelial y son adherentes. Las células vero requieren de Medio Mínimo Esencial de Eagle's suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), a 37⁰ C y 5% CO₂. Estas células se han utilizado para el estudio de verotoxinas, para pruebas de toxicidad, para realizar transfección, para el mantenimiento y estudio de diversos virus y micoplasma, etc. (ATCC, 2017).

Células HepG2: Son células derivadas de carcinoma hepatocelular que afectó a un hombre caucásico de 15 años, fue tipificada en 1983. La línea celular cuenta con morfología epitelial y no es tumorigénica. Para su mantenimiento necesita de Medio Mínimo Esencial de Eagle's suplementado con 10% de SFB, a 37⁰ C y 5% CO₂. Esta línea celular produce una gran cantidad de proteínas y es ampliamente utilizada para procesos de transfección (ATCC, 2017).

7.4. Cultivos de garrapata

La generación de cultivos celulares de artrópodos es un avance que permite el estudio de enfermedades transmitidas por vectores. Existen más de 40 líneas celulares derivadas de 13 garrapatas duras. Estos cultivos son ampliamente utilizados para el estudio de interacción de enfermedades transmitidas por garrapatas. Los usos de cultivos celulares de garrapata se han incrementado y en la actualidad sirven como modelos para el estudio de enfermedades, evaluación de procesos fisiológicos de artrópodos y estudios de fenómenos de

resistencia a ixodicidas (Cossío-Bayuggar et al., 2002; Bell-Sakyi et al., 2007b).

Línea celular embrionaria de *R. microplus*

Actualmente existen diversas líneas celulares derivadas de garrapatas, la mayoría son generadas a partir de embriones. Entre las líneas celulares derivadas de *R. microplus* se encuentran la BME-CTV-4, BME-CTV-5, BME-CTV-6, BmVIII-SCC, Bm-Sus, etc. La mayoría son mantenidas con un medio de cultivo compuesto por medio Leivobitz-15 (L-15), Medio Mínimo Esencial con sales de Hank's (MEM), 20% de SFB y caldo tripsina fosfato, a 28 °C y 5% CO₂ (The Pirbright Institute, 2017; Holman, 1981; Cossio-Bayugar y Miranda-Miranda 2007).

Cultivos primarios de glándula salival, intestino y ovario.

Los cultivos primarios de garrapata se generan a partir de órganos de garrapata adulta sin repletar (glándulas salivales, intestino y ovario). Las células de estos órganos son disgregadas enzimáticamente. Las células son mantenidas en un medio de cultivo compuesto L-15, MEM, 20% de SFB y caldo tripsina fosfato, a 28 °C y 5% CO₂. Los cultivos primarios tienen un tiempo mínimo de 20 días para diferenciarse y una duración promedio de 4 semanas (Mosqueda et al., 2008; Cossío-Bayuggar et al., 2011).

8. Justificación

El método químico es el más eficaz para el control de *R. microplus*, aunque el uso excesivo de estos productos generó una alta presión para seleccionar garrapatas con resistencia a diferentes familias de ixodicidas comerciales, esto en conjunto a la ineficacia de los métodos de control biológico, ha creado la necesidad del desarrollo de nuevos productos eficaces para el control de las garrapatas. Los nuevos etil-carbamatos desarrollados y probados en la FES-Cuautitlán son una alternativa para el control de garrapatas, los carbamatos LQM 919 y LQM 996 tienen una eficacia superior al 99% tanto en pruebas *in vitro* como *in vivo* sobre garrapatas susceptibles y resistentes a organofosforados, amidinas y piretroides (Pérez-González et al., 2014; Prado-Ochoa et al., 2013; Iturbe-Requena, 2014). El mecanismo de acción de estos carbamatos es independiente de la inhibición de las acetilcolinesterasas, por lo que no genera resistencia cruzada con otros carbamatos o con organofosforados, además, de ser de baja toxicidad en mamíferos (Prado-Ochoa et al., 2014a). Estudios previos realizados por nuestro grupo han mostrado que estos carbamatos afectan el desarrollo de ovocitos de hembras repletas y les producen daños sugerentes de apoptosis. Se desconoce si daños similares se pueden presentar en otros tipos celulares de las garrapatas o en células de mamíferos, por lo que en este estudio se pretende evaluar si estos carbamatos pueden inducir procesos de apoptosis en células embrionarias, de glándulas salivales, intestino y ovarios de garrapatas y en células de mamíferos mantenidas en cultivos celulares.

|

9. Hipótesis

Debido a que los carbamatos LQM 919 y LQM 996 producen *in vivo* daño a células de ovario de garrapata y son de baja toxicidad para mamíferos, entonces el grado de daño celular *in vitro* producido por los mismos carbamatos es mayor en células de garrapata que en células de mamíferos.

10. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de dos etil-carbamatos de nueva síntesis sobre la viabilidad y la inducción de procesos apoptóticos en diferentes tipos celulares de *R. microplus* y de mamíferos mantenidos en cultivos celulares.

Objetivos particulares

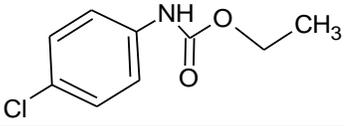
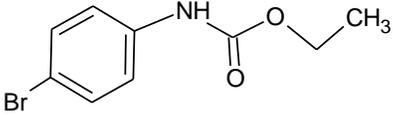
- ❖ Obtener y mantener cultivos primarios de glándulas salivales, intestino y ovarios de *R. microplus*.
- ❖ Medir la viabilidad de las células de los cultivos primarios de *R. microplus*, células de la línea HepG2, VERO y Bm-sus en presencia de los etil-carbamatos.
- ❖ Determinar si los etil-carbamatos evaluados inducen apoptosis en las células de los cultivos primarios de *R. microplus*, HepG2, VERO y Bm-sus.

11. Materiales y métodos

Etil-carbamatos

Los carbamatos que se utilizaron en este proyecto 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%. En la tabla 2 se muestran los carbamatos empleados para esta investigación.

Tabla 2. Carbamatos utilizados en el trabajo (Pérez-González et al., 2014).

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

Estandarización de cultivos primarios de *R. microplus*.

Para realizar los cultivos primarios de órganos de garrapatas se modificaron los protocolos de Cossío-Bayúgar et al. (2011). Se evaluaron cuatro variantes del protocolo reportado para la obtención de los cultivos primarios con los que

|

se trabajó. Las variantes analizadas fueron: número de garrapatas utilizadas para realizar los cultivos y los días pos-infestación en el que se seleccionaron.

En la primera variante se utilizaron 40 garrapatas de la cepa “Media Joya”, 18 días pos-infestación. En la segunda variante del protocolo se ocuparon 40 garrapatas de la misma cepa 20 días pos-infestación, para la tercera variante de la prueba se utilizaron 100 garrapatas de la cepa media joya, del día 18 pos-infestación. La última variante del protocolo se realizó con 100 garrapatas de la cepa media joya del día 20 pos- infestación.

Las garrapatas obtenidas bajo todos los protocolos fueron procesadas de la siguiente forma. Las garrapatas adultas no repletas fueron lavadas con agua corriente y posteriormente con cloruro de benzalconio al 10%, posteriormente se realizó la disección de las garrapatas con ayuda de un microscopio estereoscópico y se separaron los intestinos, ovarios y glándulas salivales, manteniendo los órganos en solución salina de Hank adicionada con 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 0.25µg/mL de anfotericina B. Los intestinos, glándulas salivales y los ovarios fueron tratados con tripsina, colagenasa I y colagenasa II, respectivamente.

Los intestinos se lavaron con solución de Hank sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , centrifugando a 110 g por tres minutos, tres veces, desechando el sobrenadante, posteriormente se adiciono tripsina al 0.25% diluida en solución de Hank sin Ca^{2+} y Mg^{2+} durante 30 min a 4 °C y luego 2 h a 37 °C. Para las glándulas salivales y los ovarios de las garrapatas colectadas se adicionaron 50 U/mL de colagenasa I y 50 U/mL de colagenasa II diluidas en solución de Hank con Ca^{2+} y Mg^{2+} , respectivamente, se incubaron por 2.5 horas a 37 °C.

|

Después de cada uno de los diferentes tratamientos, las células en suspensión se pasaron por un filtro de 70 μm . Las células obtenidas de los diferentes tejidos fueron cultivadas a 32°C con 5% de CO_2 , en medio de crecimiento, conformado por partes iguales de medio L-15 y MEM, suplementado con 20% de SFB, 10% de caldo tripsina fosfato, 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina y 0.25 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B siguiendo los protocolos de Cossío-Bayúgar et al. (2011).

Cultivos primarios de garrapata

Para poder sembrar el doble de células que las obtenidas en la última variante de experimentación, se utilizaron 250 garrapatas adultas no repletas del día 20 pos-infestación. Las garrapatas fueron lavadas y tratadas como se describió en el protocolo de estandarización de cultivos primarios. Las células fueron mantenidas en cajas de 24 pozos hasta su diferenciación y tratamiento.

Los cultivos primarios se obtuvieron de órganos de garrapatas *R. microplus* pertenecientes a la cepa “media joya” la cual es susceptible a los ixodidas convencionales. 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.

Líneas celulares

Las líneas celulares HepG2 y VERO fueron proporcionadas por la Dra. Patricia Noguera Ramírez, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Ambas líneas se mantuvieron en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la FES-Cuautitlán, utilizando Medio Eagle Modificado por Dulbecco’s suplementado con 10% de SFB, estreptomicina (100mg/mL) y penicilina (100 U/mL).

La línea celular embrionaria de *R. microplus* se trabajó por un convenio con el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) a través del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) en el laboratorio de artrópodos a cargo de la Dra. Raquel Cossío Bayúgar. Esta línea celular proviene de embriones de garrapatas susceptibles a ixodicidas y fue nombrada Bm-sus (Cossío-Bayúgar y Miranda-Miranda, 2007). La línea celular Bm-sus fueron mantenidas con medio L-15 suplementado con 5% SFB, 10% caldo triptosa fosfato, estreptomicina (100 mg/mL) y penicilina (100 U/mL). Las células se mantuvieron a 32°C en botellas para cultivo de 25 cm² en una atmosfera de 5% de CO₂ (Cossio-Bayugar y Miranda-Miranda, 2007; Pohl et al., 2014).

Tratamiento de las células

Cada uno de los diferentes tipos celulares (cultivos primarios de los órganos de *R. microplus*, HepG2, VERO y Bm-sus), fueron sembradas en placas de 24 pozos, tratadas por triplicado con los carbamatos LQM 996, LQM 919 en concentraciones crecientes logarítmicas (0.0006mM, 0.006mM, 0.06mM, 0.6mM) y disueltos en DMSO al 0.4%, como testigos tres pozos fueron tratados con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 25mM, tres pozos más sólo llevaron disolvente (DMSO al 0.4%) y a tres pozos sólo se les agregó el medio de cultivo. Durante los tratamientos las células fueron tratadas con Medio sin SFB, y la prueba se realizó por duplicado para cada tipo celular.

Ensayo con Presto-Blue

El ensayo con Presto-Blue se basa en la reducción de la rezasurina, el cual es un colorante azul y evaluó la capacidad de las células para realizar respiración aerobia. Este colorante es reducido principalmente por NADH deshidrogenasa

|

y NADPH deshidrogenasa, estas reducen la rezasurina de color azul a resofurina de color rosa el cual puede ser detectado por espectrofotometría o por medición de fluorescencia. La prueba se realizó sembrando células en placas de 24 pozos y realizando tratamientos como se describe en el apartado “tratamiento de células” durante 48 horas. Las células obtenidas fueron lavadas con PBS, posteriormente se agregaron 500 μ L de PBS y 15 μ L de colorante Presto-Blue a cada pozo, se incubaron las placas a 37°C por 30 min (todos los cultivos de garrapata se incubaron por 90 min), posteriormente se tomaron 200 μ L de la solución de cada pozo y se colocaron en una placa de 96 pozos y se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 595 nm.

Prueba de TUNEL

Esta prueba se llevó a cabo con el kit DeadEnd^{MT}Fluorometric TUNEL System (Promega), el cual es utilizado para medir la fragmentación de ADN en células apoptóticas, al incorporar dUTP-marcado con fluoresceína en las terminaciones 3-OH de los fragmentos de ADN por medio de la acción de una enzima desoxinucleotidiltransferasa. La fluorescencia de las células se evaluó por microscopia de fluorescencia.

Se sembraron células sobre portaobjetos y se expusieron con los diversos tratamientos (LQM 996, LQM 919, y testigos) durante 48 horas, posteriormente cada uno de los portaobjetos fue lavado con PBS 1x. Las células en los portaobjetos fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 25 min a 4 °C, después se permeabilizaron con una solución de 0.2% Triton en PBS durante 5 min, se enjuagaron las laminillas con PBS y se agregó una mezcla de nucleótidos marcados con fluoresceína (FITC) y la enzima desoxinucleotidiltransferasa terminal (rTdT), utilizando las concentraciones que indica el protocolo del fabricante. Las laminillas se taparon con un

|

plástico (coverslip) y se protegieron de la luz, se incubaron a 37 °C por 60 min, posteriormente la reacción se detuvo con la solución SCC 2X, la solución fue retirada por tres lavados con PBS. Las laminillas se secaron y se montaron con glicerol adicionado con DAPI diluido 2:5000, Las laminillas se sellaron y se observaron en un microscopio de fluorescencia (FITC) utilizando el filtro azul para observar la fluoresceína a 480 nm y el filtro de luz ultravioleta para observar el DAPI a 365 nm. Como control positivo se utilizaron células tratadas con DNAsas, mientras que el testigo negativo correspondió a células no tratadas.

Determinación de caspasa 3

Se utilizó el Kit CaspACE™ Assay (Promega) para determinar la actividad de las caspasas 3. Para esta prueba se lisaron con una solución de lisis del KIT y el método de congelación descongelación, las células (cultivos primarios, HepG2, VERO, Bm-sus) previamente tratadas con los carbamatos durante 48 horas. El lisado celular fue centrifugado a 15000 g por 25 min, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó el contenido de proteínas por la técnica de Bradford. Se agregaron 20 µg de proteína en de 20 µL de buffer de caspasas, en una placa de polipropileno de 96 pozos, posteriormente se agregó Ac-DEVD-pNA como indica el fabricante y se incubó a 37° C por 4 hrs. Se midió la absorbancia a 405 nm. Para conocer la concentración se realizó una curva patrón con para-nitroanilina (p-Na).. Como control positivo se utilizó H₂O₂ a 50 mM, como control negativo se utilizaron muestras sin tratamiento y muestras tratadas el inhibidor de caspasas Z-VAD.

Análisis estadístico.

El análisis de los datos obtenidos de las pruebas de presto blue, azul tripán y caspasa 3, se utilizó una prueba de ANOVA, con una prueba de Tukey, como prueba de diferencia de medias, con un nivel de confianza del 95%.

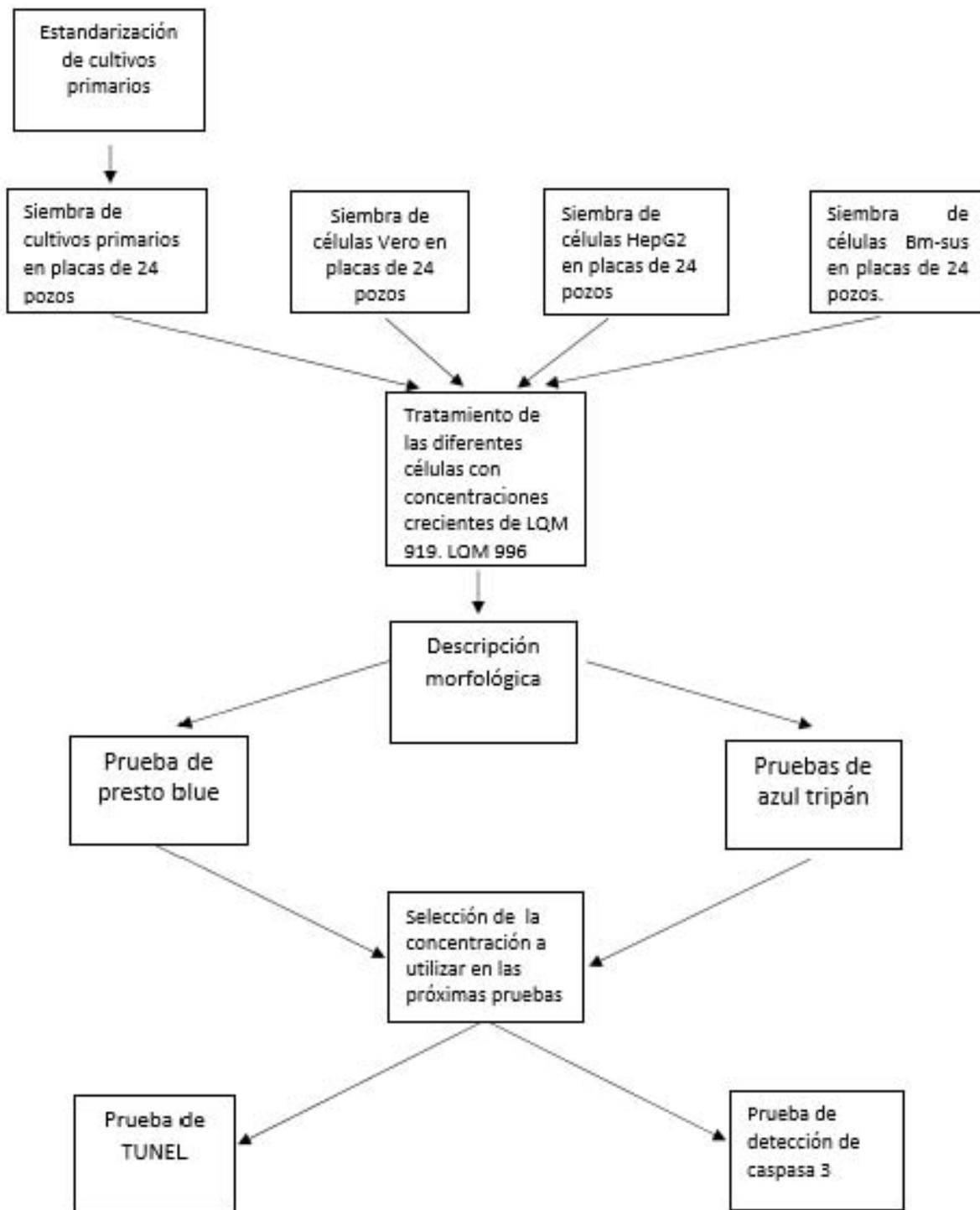


Figura 3 Diagrama del diseño experimental.

12. Resultados.

Cultivos primarios de garrapata

Al realizar la estandarización de cultivos primarios de células de *R. microplus* encontramos que las células obtenidas de 40 garrapatas el día 18 pos-infestación, las glándulas salivales presentaban células gran tamaño, los intestinos no repletos de sangre fueron el órgano más abundante, y los ovarios estaban no desarrollados. Y pequeños. Las células obtenidas de estos órganos fueron heterogéneas y en cantidad de $4.02 \times 10^3/\text{mL}$ para células de ovario, $5.01 \times 10^3/\text{mL}$ para células de glándula salival y $5.48 \times 10^3/\text{mL}$ para células de intestino. Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos, sembrando medio mililitro del total de células obtenidas por pozo, estas sufrieron una degeneración en un periodo aproximado de una semana, ya que nunca se adhirieron a la placa y las células en suspensión se lisaron.

En la obtención de células de 40 garrapatas del día 20 pos-infestación, encontramos glándulas salivales de tamaño pequeño, el intestino fue el órgano más abundante y en pocos casos tenía presencia de sangre, los ovarios se encontraron de tamaño grande y desarrollado. Las células obtenidas de estas garrapatas fueron heterogéneas y en cantidad de $5.12 \times 10^3/\text{mL}$ para células de ovario, $3.01 \times 10^3/\text{mL}$ para células de glándula salival y $5.90 \times 10^3/\text{mL}$ para células de intestino. Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos, sembrando medio mililitro del total de células obtenidas por pozo y tuvieron un lapso de vida aproximado de tres semanas, algunas células se adhirieron a la placa, a partir del día 15 después de sembrarlas, pero la mayoría permaneció en suspensión, las células que permanecieron en el sobrenadante se fueron deteriorando, siendo las células adheridas las últimas en ser afectadas.

|

En la obtención de células de 100 garrapatas del día 18 pos-infestación. Las células obtenidas de estas garrapatas fueron heterogéneas y en cantidad de, $4.8 \times 10^4/\text{mL}$ para células de glándula salival, $6.40 \times 10^4/\text{mL}$ para células de intestino y $3.2 \times 10^4/\text{mL}$ para células de ovario. Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos, sembrando medio mililitro del total de células obtenidas por pozo. Las células permanecieron en suspensión por más de cuatro semanas sin sufrir alteraciones aparentes, pero las células no se adhirieron a la superficie celular.

La obtención de células de 100 garrapatas del día 20 pos-infestación. Las células fueron abundantes ($2.98 \times 10^4/\text{mL}$ células de glándula salival, $6.02 \times 10^4/\text{mL}$ células de intestino y $3.8 \times 10^4/\text{mL}$ células de ovario) y las células fueron sembradas en placas de 24 pozos, sembrando medio mililitro del total de células obtenidas por pozo. Un porcentaje menor al 50% de las células sembradas se adhirieron, las de intestino a partir de la primera semana, las de glándula salival a partir del día 15 y las células de ovario a partir del día 20, las células en suspensión no se degeneraron considerablemente y permanecieron así por dos meses.

Prueba de presto blue.

En la figura 4 y la tabla 3 se presenta la absorbancia obtenida en el ensayo de presto blue sobre los diferentes tipos celulares tratados con diferentes concentraciones de LQM 919 y LQM 996. Se observó un efecto dosis dependiente, es decir a mayor concentración del carbamato menor absorbancia. En todos los tipos celulares a dosis de 0.6 mM de ambos carbamatos (LQM 919 y LQM 996) se observó una menor absorbancia ($p < 0.05$) en comparación con las células del mismo tipo cultivadas en ausencia de los carbamatos. No se observaron diferencias ($p > 0.05$) en la

|

absorbancia entre las células HepG2 y las células intestinales. En la mayoría de las concentraciones de ambos carbamatos, las células HepG2 y las células intestinales de garrapatas presentaron una mayor absorbancia ($p < 0.05$) que las células VERO, Bm-sus, ovario y glándula salival. En las tres concentraciones más altas del carbamato LQM 919, las células de glándula salival presentaron menor ($p < 0.05$) absorbancia que el resto de tipos celulares. Con excepción de células del intestino de garrapatas, la absorbancia del resto de los tipos celulares tratados con H_2O_2 fue menor ($p < 0.05$) que las células de los mismos tipos que fueron cultivadas en presencia de las diferentes concentraciones de ambos carbamatos.

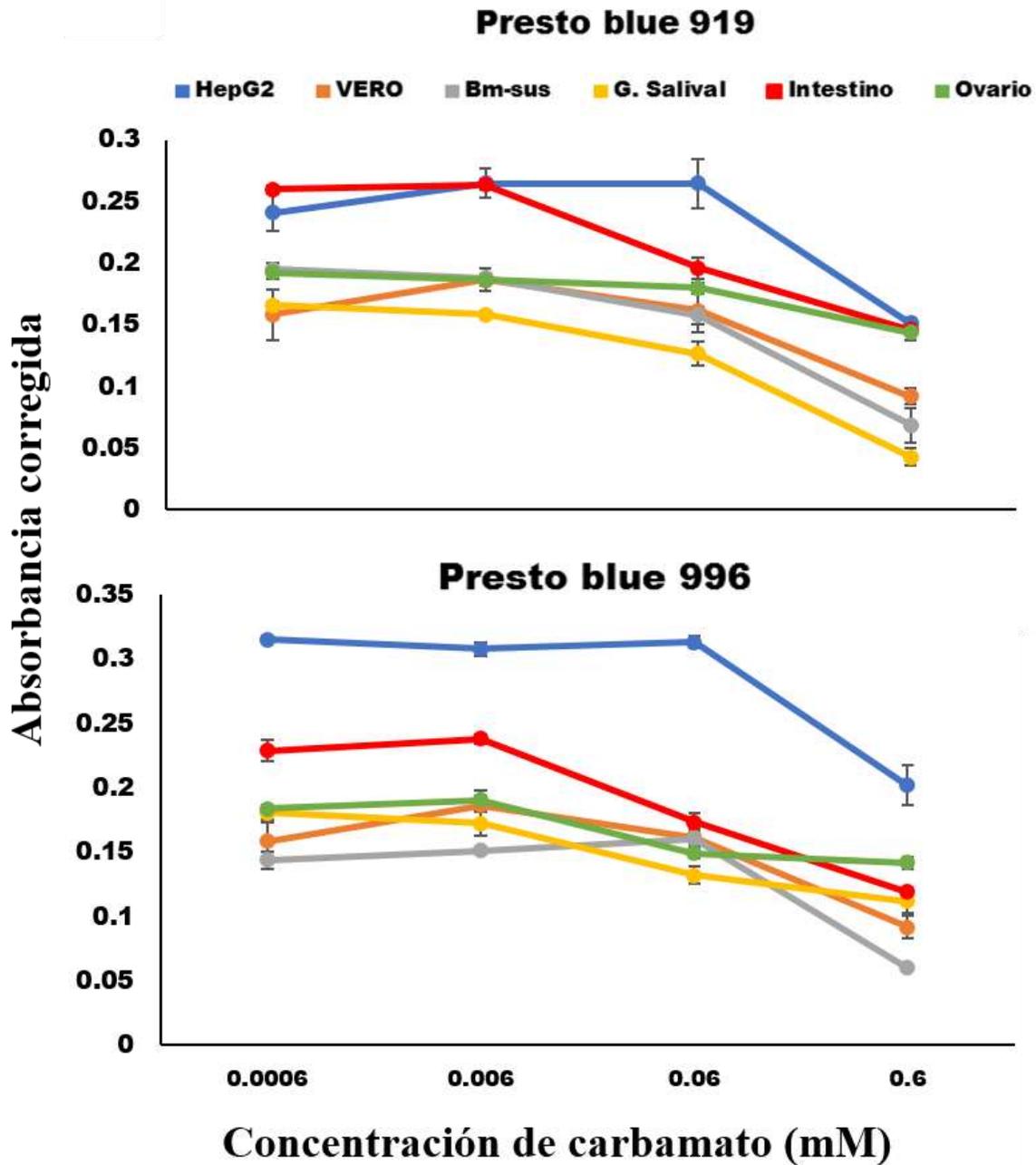


Figura 4. Gráfica de absorbancia corregida contra concentración de carbamato, en los diferentes tipos celulares tratados con concentraciones logarítmicamente crecientes del LQM 919 y LQM 996. El gráfico superior muestra los resultados del tratamiento con el LQM 919 y el inferior los resultados del tratamiento con el LQM 996.

|

Tabla 3. Absorbancia corregida de diferentes tipos celulares expuestos al LQM 919 y LQM 996.

	0.0006mM	0.006.M	0.06mM	0.6mM	S. T.	DMSO	H₂O₂
HepG2-919	0.93±0.015a	0.92±0.011a	0.92±0.019a	0.82±0.004b	0.91±0.006a	0.90±0.010a	0.58±0.013b
HepG2-996	0.93±0.002a	0.92±0.004a	0.93±0.004a	0.81±0.015b	0.91±0.006a	0.90±0.010a	0.58±0.013b
VERO-919	0.26±0.020a	0.23±0.009a	0.26±0.017a	0.33±0.006b	0.22±0.016a	0.25±0.010a	0.37±0.008b
VERO-996	0.24±0.015a	0.24±0.012a	0.26±0.007a	0.34±0.001b	0.22±0.016a	0.25±0.010a	0.37±0.008b
Bm-sus-919	0.82±0.005a	0.80±0.003a	0.78±0.009a	0.68±0.006b	0.78±0.003a	0.77±0.002a	0.66±0.010b
Bm-sus-996	0.76±0.007a	0.77±0.002a	0.78±0.003a	0.68±0.002b	0.78±0.003a	0.77±0.002a	0.66±0.010b
C.P. Glándula salival-919.	0.74±0.002a	0.73±0.003a	0.70±0.009b	0.62±0.006c	0.77±0.003	0.78±0.002	0.63±0.014c
C. P. Glándula salival-996.	0.76±0.006a	0.75±0.009a	0.71±0.007b	0.69±0.009c	0.77±0.003	0.78±0.002	0.63±0.014c
C.P. intestino919	0.84±0.003a	0.84±0.004a	0.77±0.008a	0.72±0.003b	0.87±0.003a	0.86±0.003a	0.79±0.006a
C.P. intestino996	0.87±0.008a	0.81±0.009a	0.81±0.007a	0.75±0.004b	0.87±0.003a	0.86±0.003a	0.79±0.006a
C.P. ovario-919	0.77±0.003a	0.76±0.004a	0.76±0.008a	0.72±0.003b	0.79±0.002a	0.78±0.003a	0.69±0.006b
C.P. ovario-996	0.76±0.002a	0.77±0.003a	0.72±0.004a	0.71±0.005b	0.79±0.002a	0.78±0.003a	0.69±0.006b

Resultados de viabilidad con azul tripán

En la tabla 4 se presenta la viabilidad medida por conteo con el colorante azul tripán de los diferentes tipos celulares tratados con las diferentes dosis de carbamatos LQM 919 y LQM 996. Se observó una disminución de la viabilidad celular al aumentar la concentración de los carbamatos, en todos los tipos celulares, las células cultivadas con 0.6 mM de ambos carbamatos tuvieron una menor viabilidad ($p<0.05$) que las cultivadas con otras concentraciones.

Tabla 4. Porcentaje de viabilidad de los diferentes tratamientos con los carbamatos LQM 919 y LQM 996, sobre diferentes tipos de cultivos celulares.

	0.0006mM	0.006mM	0.06mM	0.6mM	S. T.	DMSO	H2O2
HepG2-919	98.1±6.8a	98.7±5.5a	96.8±3.5a	70.0±3.9b	98.9±9.2a	99.6±7.9a	45.5±10.6b
HepG2-996	98.1±3.8a	98.1±3.8a	97.6±2.9a	74.9±9.3b	98.9±9.1a	99.5±7.4a	45.5±10.6b
VERO-919	99.4±4.5a	99.0±3.0a	98.2±4.7a	67.5±6.2	99.7±3.3a	98.8±6.6a	53.2±5.8b
VERO-996	97.2±5.1a	97.8±4.5a	96.2±9.3a	70.8±8.4	99.7±3.3a	98.8±6.6a	53.2±5.8b
Bm-sus-919	97.9±4.7a	97.5±6.7a	97.38±4.1a	68.43±5.0	98.6±10.9a	98.9±16.0a	45.7±.6.6^b
Bm-sus-996	99.5±1.8a	98.3±5.1a	98.52±5.7a	75.5±7.2	98.6±10.9a	98.9±16.0a	45.7±.6.6b
C.P. Glándula salival-919.	94.5±8.1a	94.72±8.2a	74.1±7.2b	54.5±6.0	95.2±7.5a	95.1±8.4a	40.3±7.4b
C.P. Glándula salival-996.	94.0±7.5a	94.0±7.1a	72.3±6.8b	59.62±4.5	95.2±7.5a	95.1±8.4a	40.3±7.4b
C.P. intestino-919	97.4±4.2a	97.4±4.6a	88.7±7.1a	66.4±5.5	98.34±6.5a	91.4±4.9a	72.4±5.6b
C.P. intestino-996	97.6±6.3a	97.4±6.9a	97.6±5.8a	71.9±6.4	98.34±6.5a	91.4±4.9a	72.4±5.6b
C.P. ovario-919	92.78±6.0a	96.00±4.5a	95.8±16.2a	72.0±8.3b	93.15±16.8a	95.87±9.8a	47.51±7.02b
C.P. ovario-996	90.8±10.7a	95.28±7.3a	76.03±6.7a	71.7±12.2b	93.15±16.8a	95.87±9.8a	47.51±7.02b

Morfología celular

En la figura 5 se presentan fotografías al microscopio de cultivos de células tratadas con 0.6 mM de LQM 919 y el LQM 996. La figura 5A presenta células HepG2 que no recibieron tratamiento, en la figura 5B se presentan células HepG2 tratadas con 0.6 mM de LQM 919. En éstas se observan cambios en la morfología de las células, abundantes vacuolas, pérdida de la confluencia celular y desprendimiento celular. La figura 5C presenta células HepG2 tratadas con 0.6 mM de LQM 996, en las que se observa disminución de la confluencia celular, desprendimiento celular y detritos celulares indicativos de lisis. La figura 5D representa células VERO que no recibieron

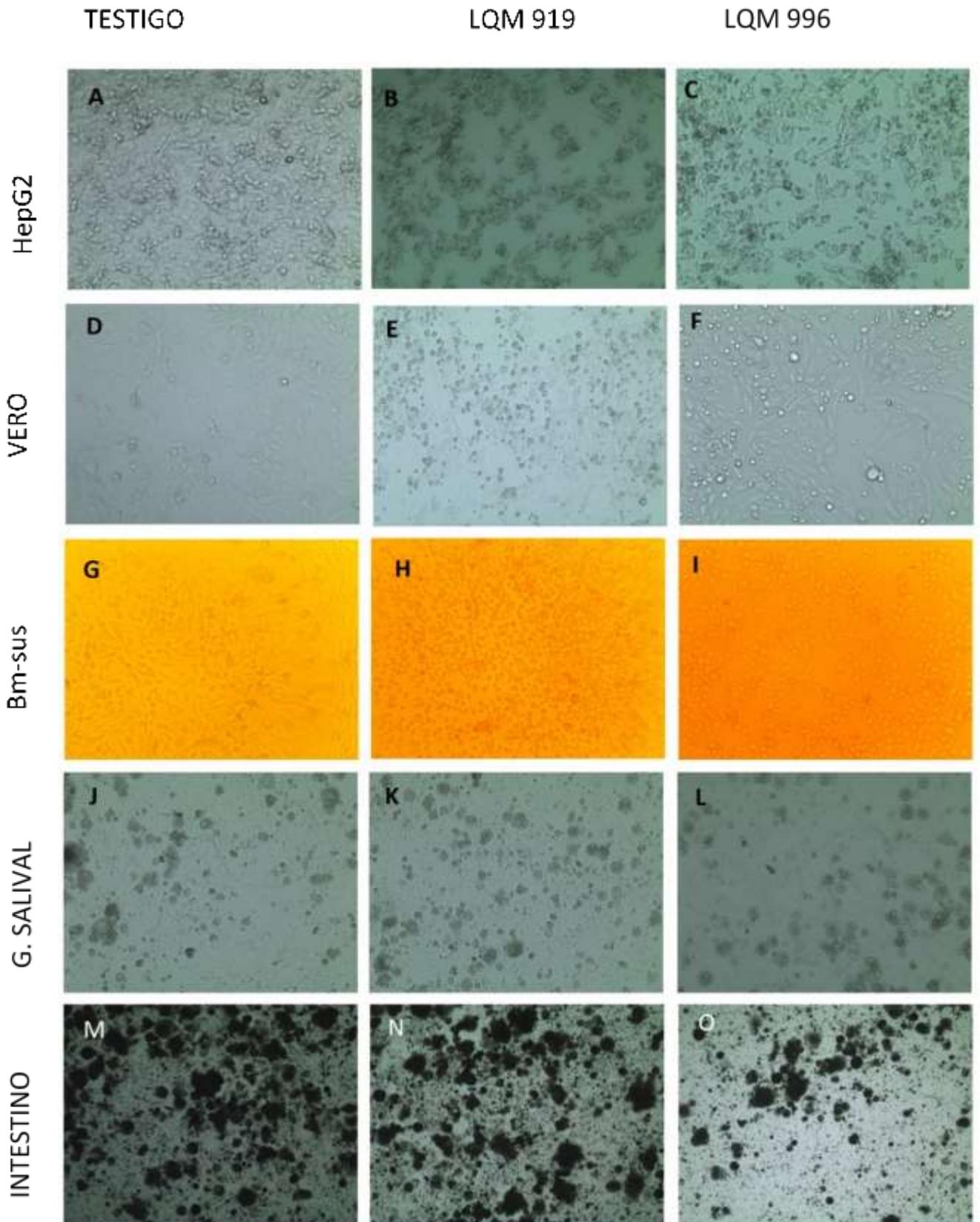
|

tratamiento con carbamatos, la imagen 5E corresponde a células VERO tratadas con el LQM 919, donde se observan células desprendidas y con disminución de tamaño, lo que lleva a pérdida de la monocapa celular. 5F muestra células VERO tratadas con el LQM 996, éstas presentan desprendimiento celular y ligera vacuolización de las células que permanecen en monocapa.

La imagen 5G muestra células Bm-sus que no recibieron tratamiento con carbamatos. 5H corresponde a células Bm-sus tratadas con LQM 919, estas células presentan una modificación de la morfología epitelial a una morfología redondeada en la mayoría de las células, así como disminución del tamaño de las células y algunas de las células se resuspendieron. 5I presenta células Bm-sus tratadas con el LQM 996 en donde se modifica la morfología de epitelial a redondeada en la mitad de las células, además que se aprecian células con una gran vacuola en su centro.

Las figuras 5J, 5M y 5P corresponde a cultivos primarios de células de glándula salival, intestino y ovarios de garrapata. No se observaron alteraciones apreciables en la morfología de los cultivos primarios de garrapata tratados con 0.6 mM de LQM 919, LQM 996 (figuras 5K, 5L, 5N, 5O, 5Q y 5R) en comparación con las células de los cultivos primarios no tratadas.

I



I

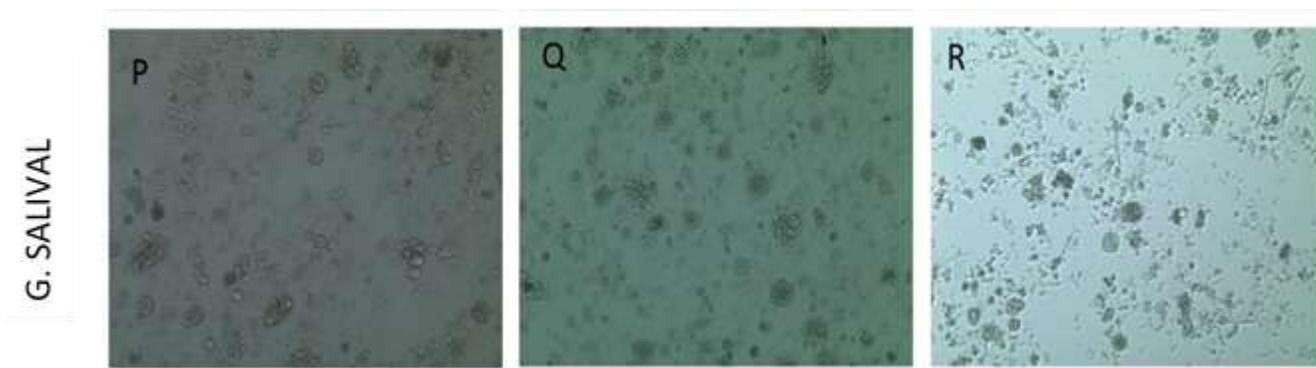


Figura 5. Fotografías de células en cultivo. La columna de la izquierda muestra células no tratadas, la columna de en medio células tratadas con el LQM 919 y la columna de la derecha células tratadas con el LQM 996. Los tipos celulares mostrados corresponden a HepG2, VERO, Bm-sus, Glándula salival, Intestino y ovario. Microscopio invertido 100X

Prueba de TUNEL por inmunofluorescencia

En las figuras 6,-11 se presentan los resultados de la prueba de TUNEL por inmunofluorescencia para la detección de apoptosis, sobre los celulares tratados con 0.6 mM de LQM 919 y LQM 996. La marca de apoptosis se presenta como una marca verde fluorescente en el núcleo celular. Se utilizó DAPI como colorante de contraste para localizar los núcleos (en color azul). En los tratamientos con ambos carbamatos a la concentración de 0.6 mM, se observó la marca de células apoptóticas en todos los tipos de células expuestas al carbamato, en comparación con el grupo control únicamente tratado con el solvente y medio de cultivo.

I

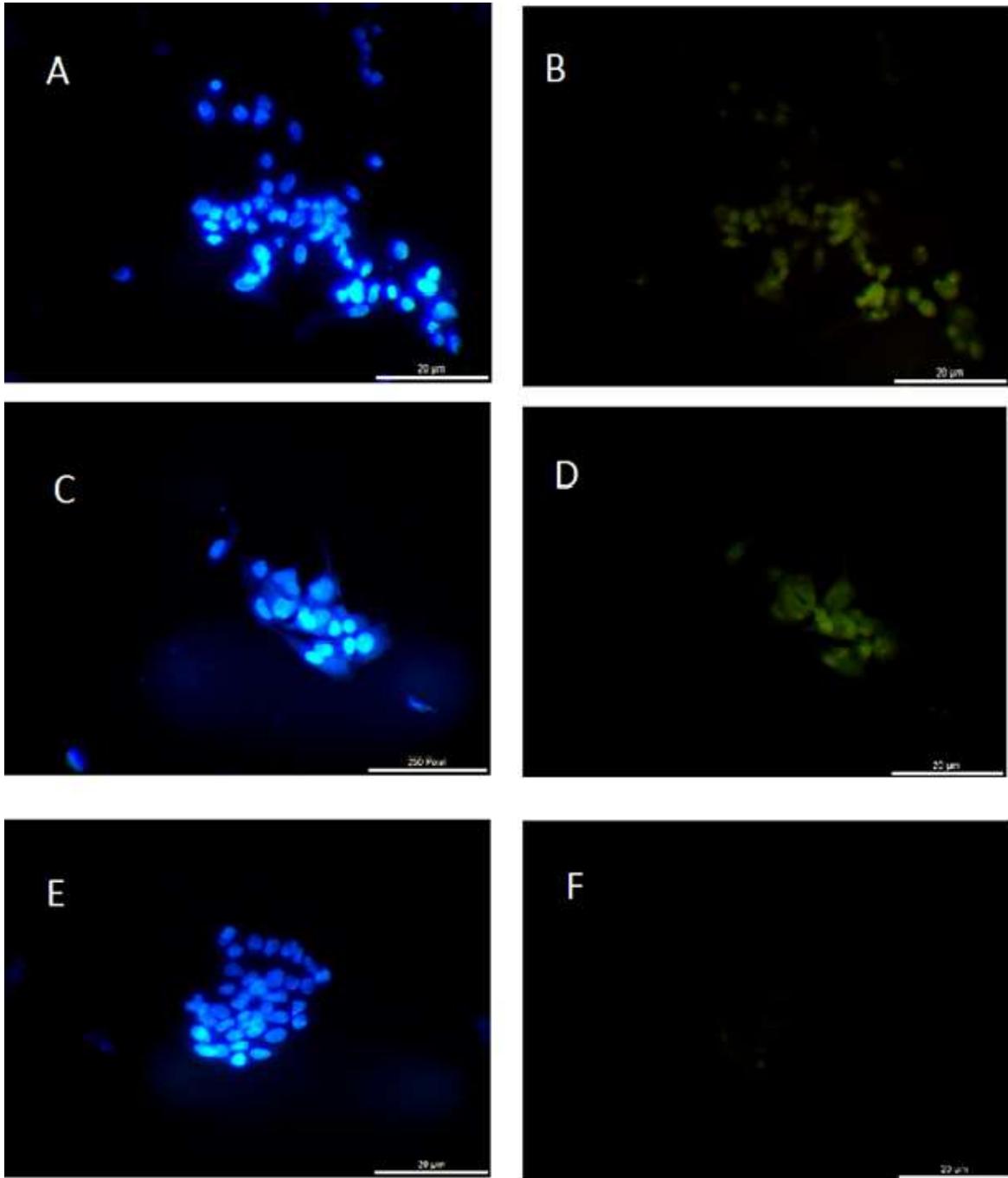


Figura 6. Imágenes de prueba de TUNEL en células HepG2. A) Imágenes de células tratadas con 0.6mM de LQM 919, marcadas con DAPI. B) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 919 marcadas con FITC. C) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 996 marcadas con DAPI. D) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 996 marcadas con FITC. E) Imágenes de núcleos de células sin tratar marcadas con DAPI. F) Imágenes de núcleos de células sin tratar marcadas con FITC.

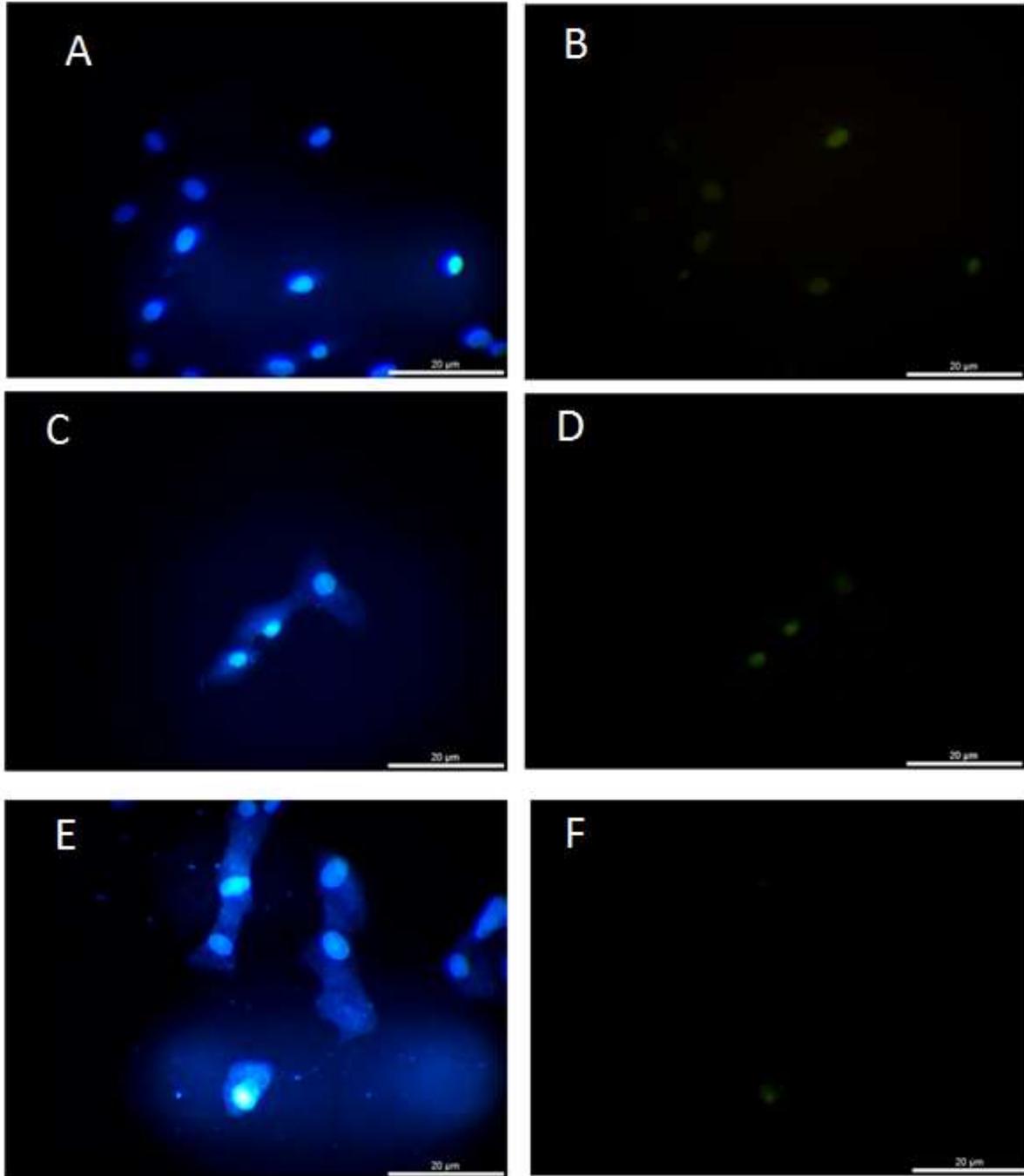


Figura 7. Imágenes de prueba de TUNEL en células VERO. A) Imágenes de células tratadas con 0.6mM de LQM 919, marcadas con DAPI. B) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 919 marcadas con FITC. C) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 996 marcadas con DAPI. D) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 996 marcadas con FITC. E) Imágenes de núcleos de células sin tratar marcadas con DAPI. F) Imágenes de núcleos de células sin tratar marcadas con FITC.

I

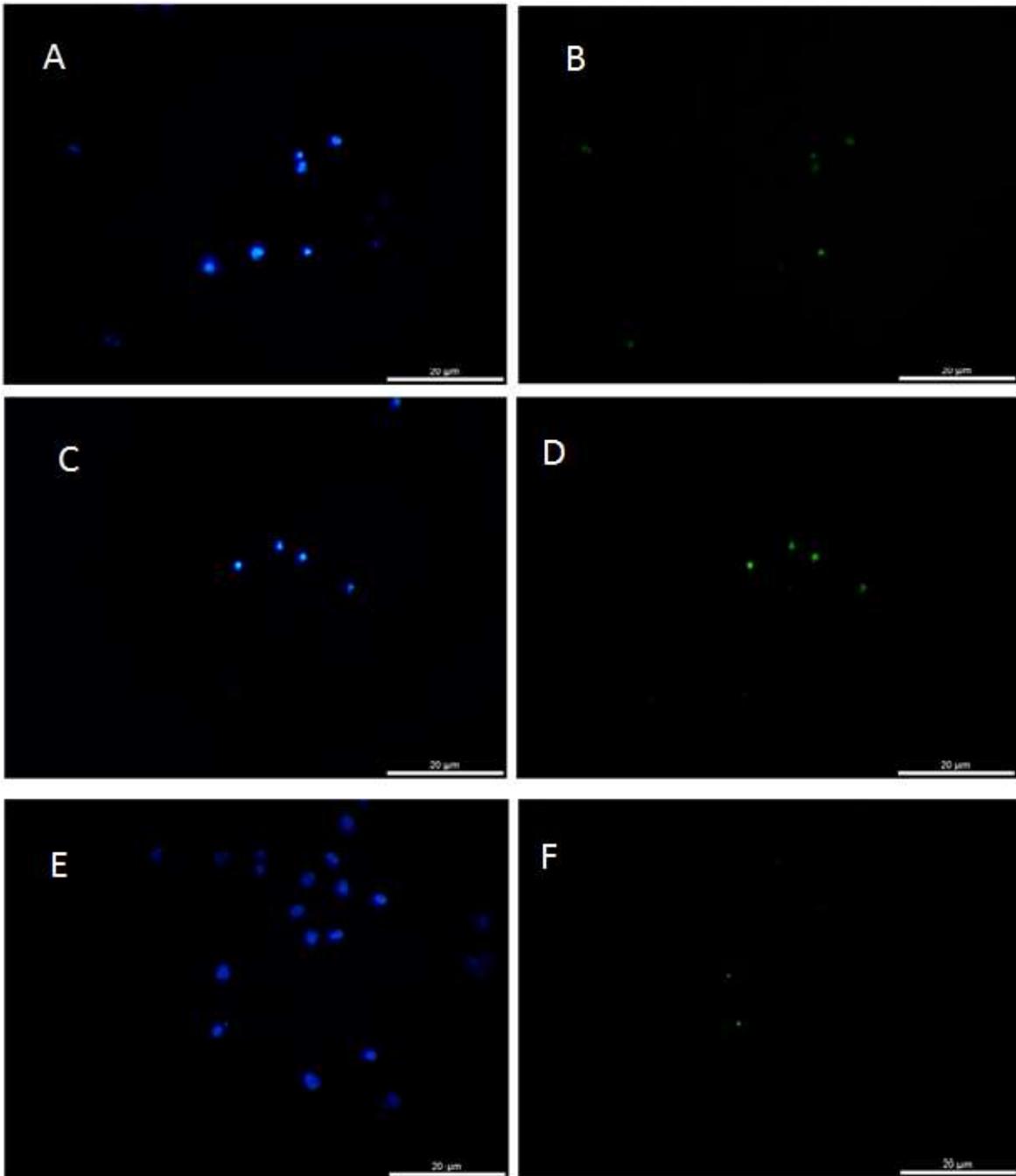


Figura 8. Imágenes de prueba de TUNEL en células Bm-sus. A) Imágenes de células tratadas con 0.6mM de LQM 919, marcadas con DAPI. B) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 919 marcadas con FITC. C) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 996 marcadas con DAPI. D) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 996 marcadas con FITC. E) Imágenes de núcleos de células sin tratar marcadas con DAPI. F) Imágenes de núcleos de células sin tratar marcadas con FITC.

I

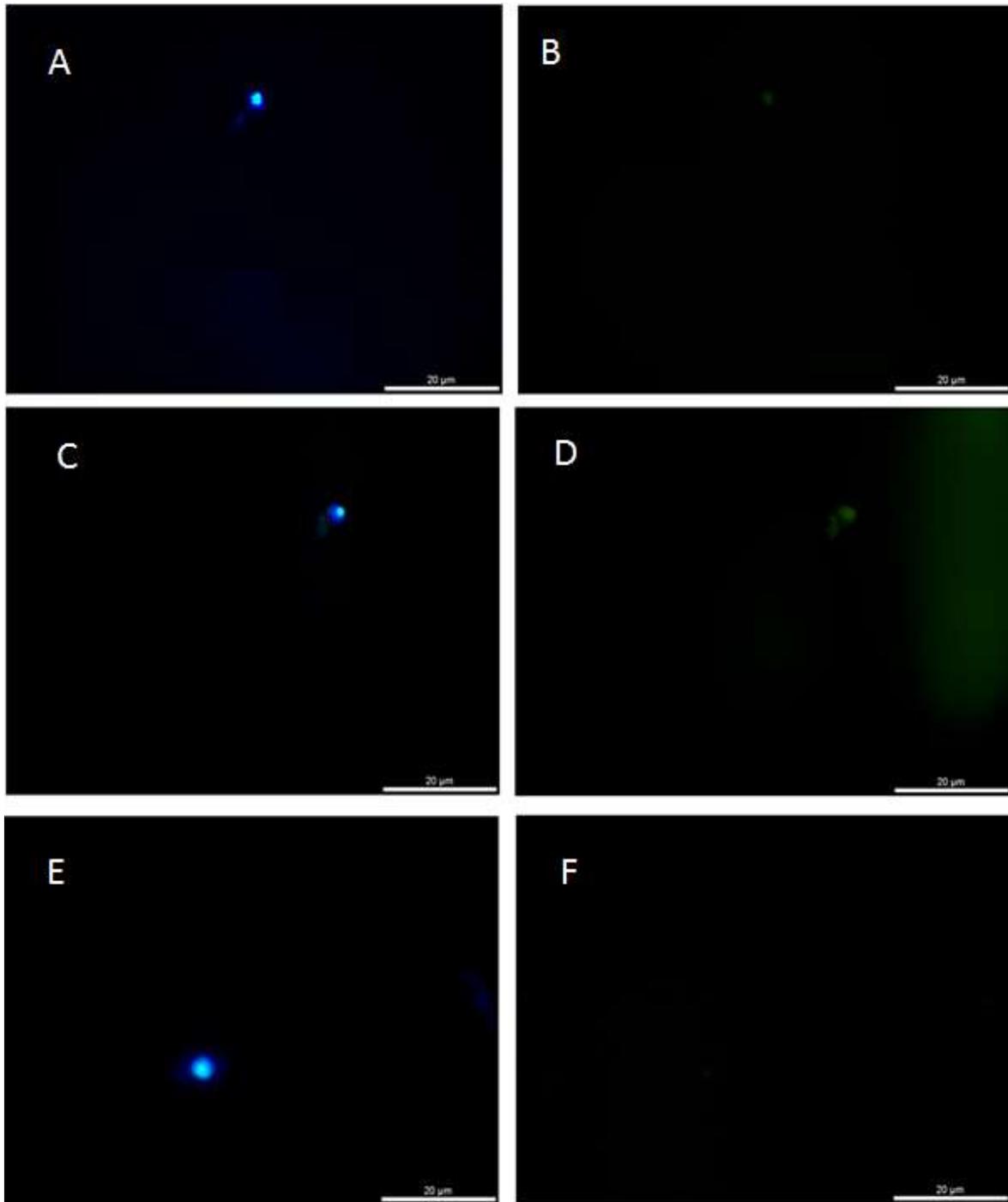


Figura 9. Imágenes de prueba de TUNEL en células de glándula salival de *R. microplus*. A) Imágenes de células tratadas con 0.6mM de LQM 919, marcadas con DAPI. B) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 919 marcadas con FITC. C) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 996 marcadas con DAPI. D) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 996 marcadas con FITC. E) Imágenes de núcleos de células sin tratar marcadas con DAPI. F) Imágenes de núcleos de células sin tratar marcadas con FITC.

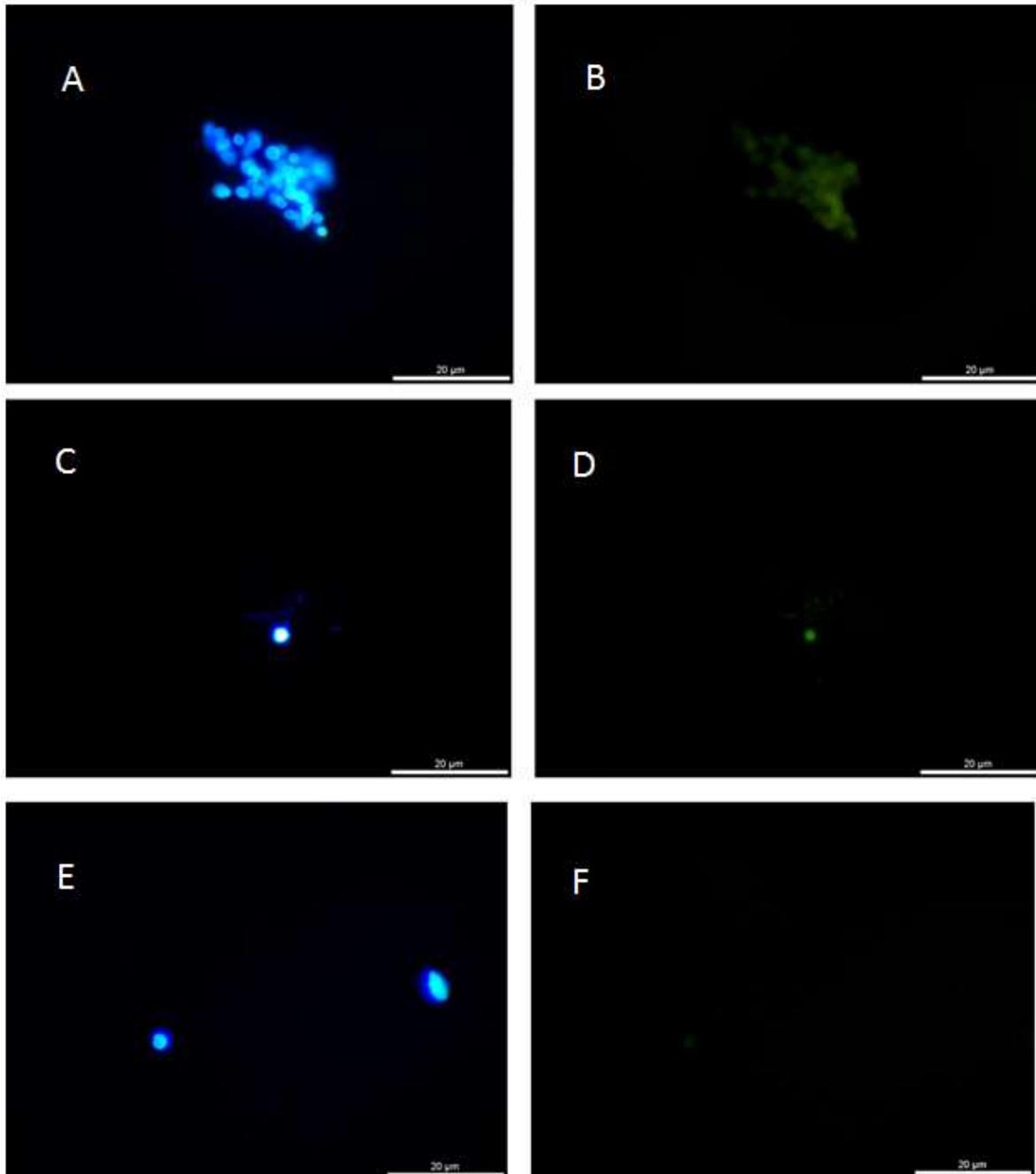


Figura 10. Imágenes de prueba de TUNEL en células de intestino de *R. microplus*. A) Imágenes de células tratadas con 0.6mM de LQM 919, marcadas con DAPI. B) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 919 marcadas con FITC. C) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 996 marcadas con DAPI. D) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 996 marcadas con FITC. E) Imágenes de núcleos de células sin tratar marcadas con DAPI. F) Imágenes de núcleos de células sin tratar marcadas con FITC.

I

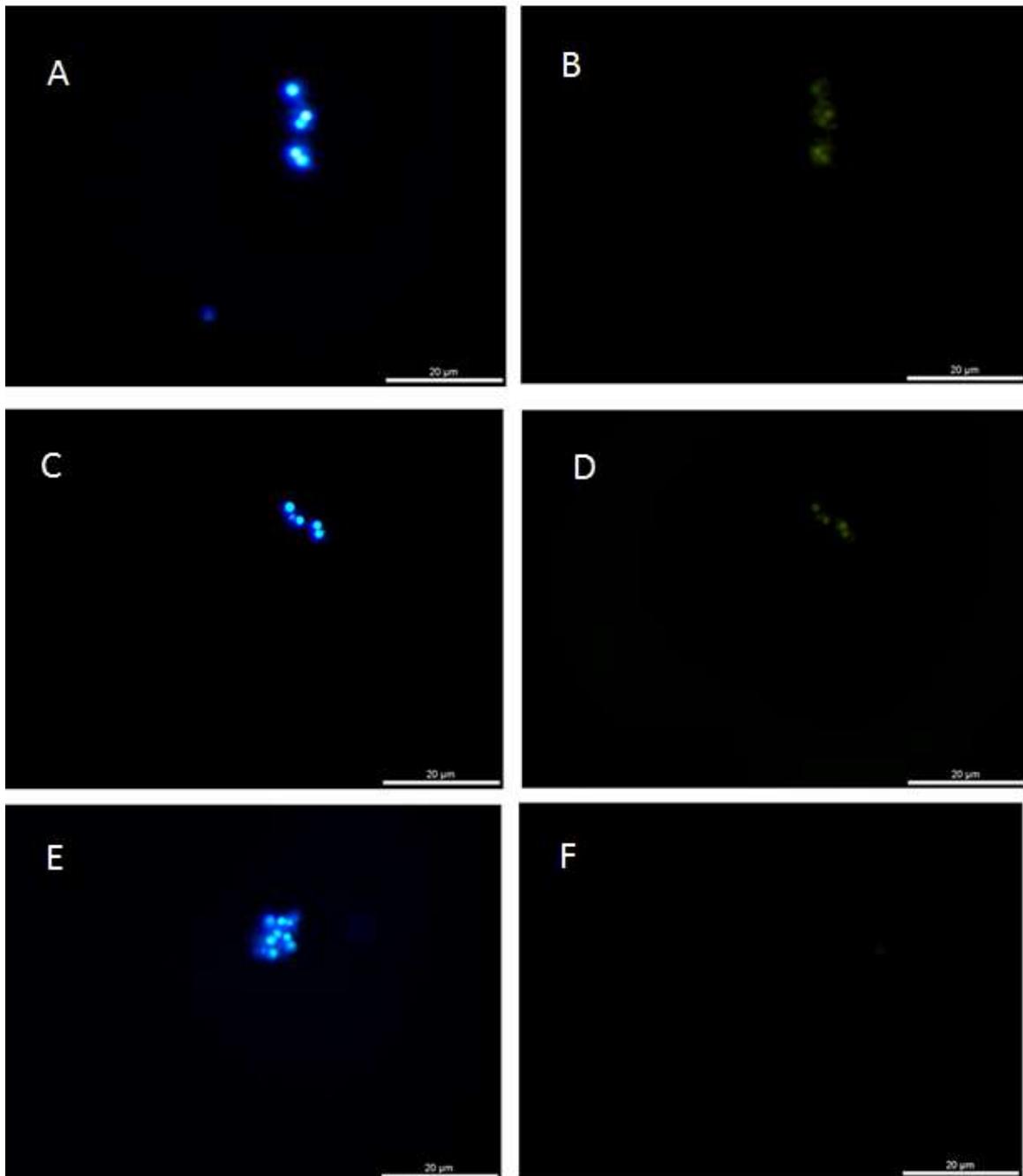


Figura 11. Imágenes de prueba de TUNEL en células de ovario de *R. microplus*. A) Imágenes de células tratadas con 0.6mM de LQM 919, marcadas con DAPI. B) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 919 marcadas con FITC. C) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 996 marcadas con DAPI. D) Imágenes de núcleos de células tratadas con 0.6mM de LQM 996 marcadas con FITC. E) Imágenes de núcleos de células sin tratar marcadas con DAPI. F) Imágenes de núcleos de células sin tratar marcadas con FITC.

Caspasa 3

Los lisados celulares obtenidos de las diversas líneas células (HepG2, VERO, Bm-sus) expuestas al LQM 919 y LQM 996 a una concentración de 0.6 mM tuvieron una mayor cantidad de absorbancia ($p>0.5$) en comparación con los testigos, al detectar p-nitro anilina que fue el indicador de la actividad de caspasa 3 (figuras 12, 13 y 14). Los lisados celulares de los cultivos primarios de glándula salival no existió una diferencia entre la cantidad de absorbancia de las células expuestas a los carbamatos LQM 919 y LQM 996 y el testigo de DMSO (figura 15), mientras que solo los cultivos primarios de intestino y ovario expuestos a 0.6 mM del LQM 919 tuvieron una mayor cantidad de absorbancia observándose diferencia significativa ($p>0.05$) en comparación con los controles (figuras 16 y 17).

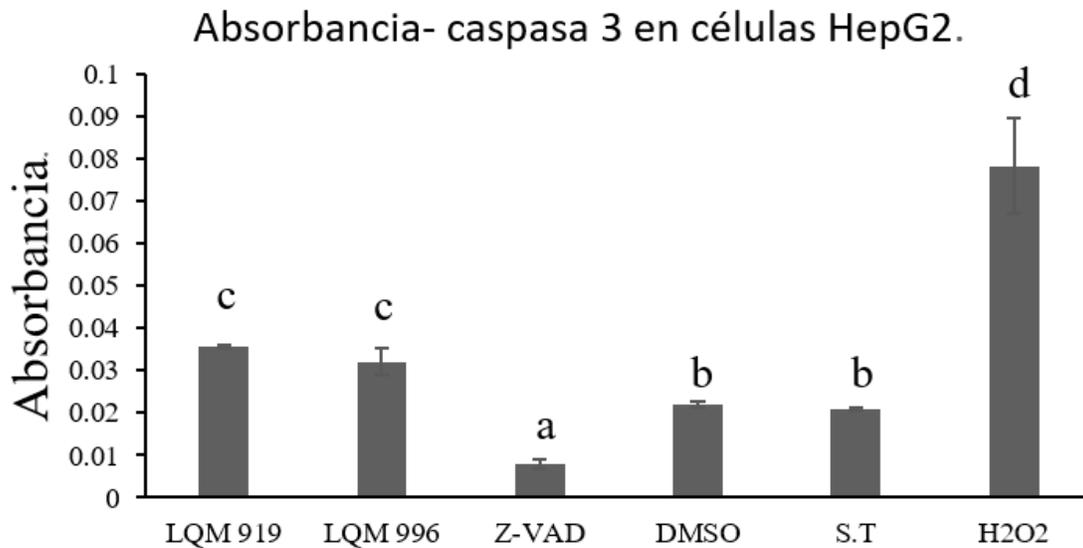


Figura 12. Absorbancia de lisados de células HepG2 expuestas a 0.6mM del LQM 919 y LQM 996 incubadas con Ac-DEVD-pNA. La absorbancia refleja la actividad de la caspasa 3. Letras diferentes indican diferencia estadística ($p<0.05$).

I

Absorbancia-Caspasa 3 en células VERO

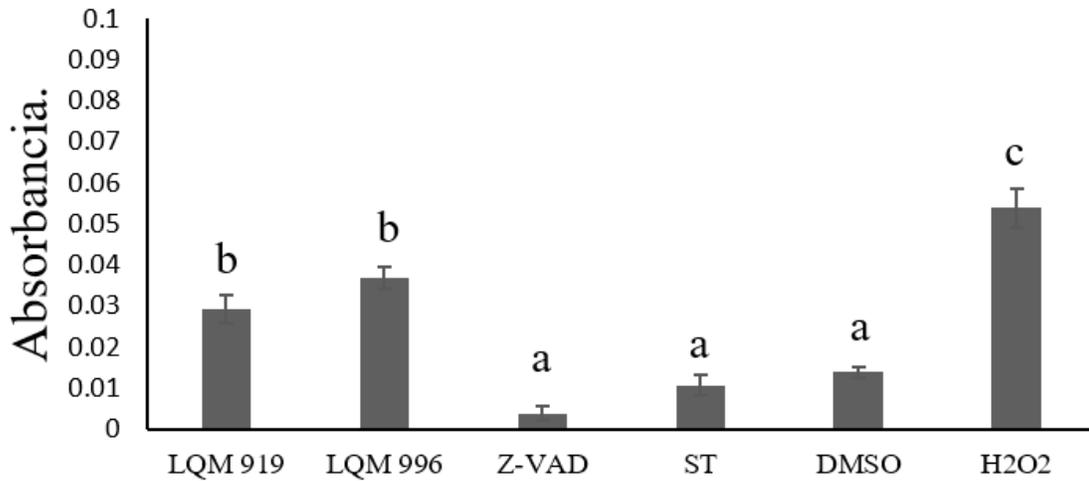


Figura 13. Absorbancia de lisados de células VERO expuestas a 0.6mM del LQM 919 y LQM 996 incubadas con Ac-DEVD-pNA. La absorbancia refleja la actividad de la caspasa 3. Letras diferentes indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

Absorbancia-caspasa 3 en células Bm-sus

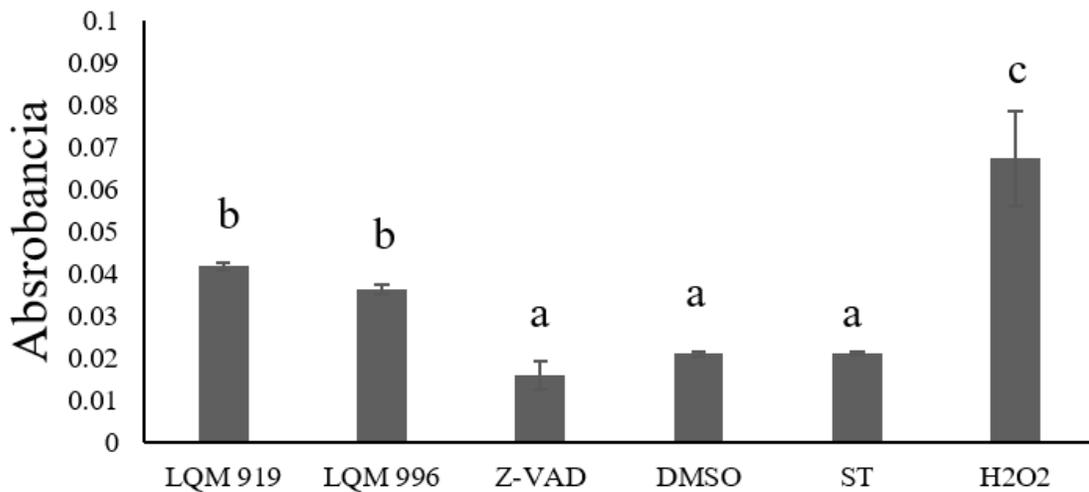


Figura 14 Absorbancia de lisados de células Bm-sus expuestas a 0.6mM del LQM 919 y LQM 996 incubadas con Ac-DEVD-pNA. La absorbancia refleja la actividad de la caspasa 3. Letras diferentes indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

Absorbancia-caspasa 3 en células de glándulas salivales de *R. microplus*

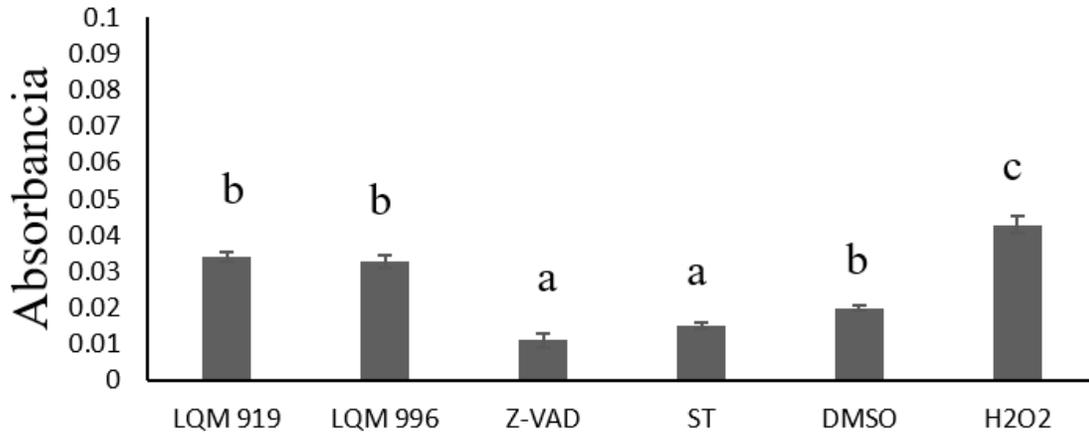


Figura 15. Absorbancia de lisados de células de glándula salival de *R. microplus*, expuestas a 0.6mM del LQM 919 y LQM 996 incubadas con Ac-DEVD-pNA. La absorbancia refleja la actividad de la caspasa 3. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Absorbancia –caspasa 3 en células de intestino de *R. microplus*

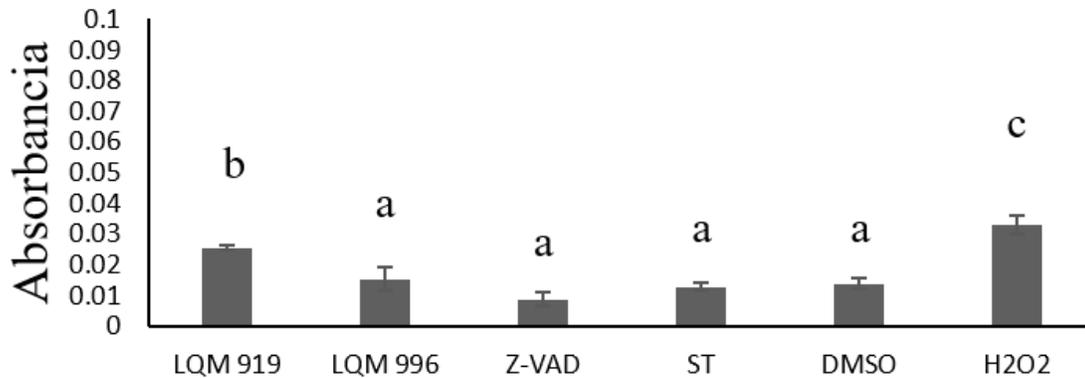


Figura 16. Absorbancia de lisados de células de intestino de *R. microplus*, expuestas a 0.6mM del LQM 919 y LQM 996 incubadas con Ac-DEVD-pNA. La absorbancia refleja la actividad de la caspasa 3. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

|

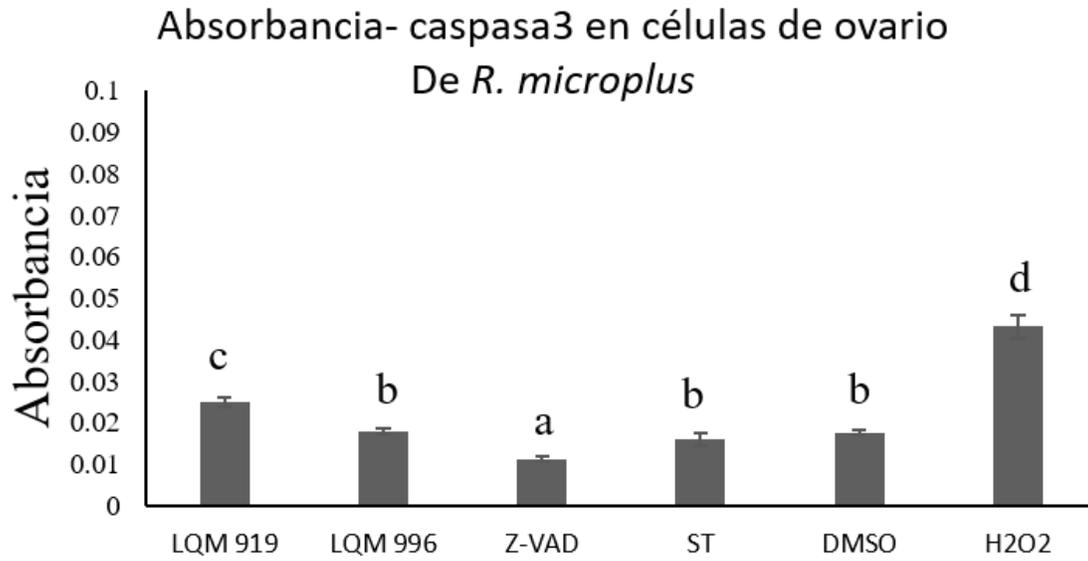


Figura 17. Absorbancia de lisados de células de ovario de *R. microplus*, expuestas a 0.6mM del LQM 919 y LQM 996 incubadas con Ac-DEVD-pNA. La absorbancia refleja la actividad de la caspasa 3. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

13. Discusión.

El uso de plaguicidas para el control de artrópodos en plantas y animales es una práctica común. El amplio uso de estos ha generado altos niveles de exposición en mamíferos y humanos, lo que podría generarles daños, que varían, dependiendo del tiempo de exposición y la cantidad de producto al que fueron expuestos (Ferrer, 2003). Los insecticidas tienen diferentes efectos sobre las células, como citotoxicidad, peroxidación de lípidos, genotoxicidad y muerte celular (Maran et al., 2010; Soloneski et al., 2015a). Los carbamatos LQM 919 y LQM 996 son productos de nueva síntesis para el control de *R. microplus* que han demostrado tener baja toxicidad aguda y subcrónica en ratas, pero no se conocen los daños celulares que pueden generar, así como tampoco se conoce el mecanismo de acción por el cual actúan estos ixodicidas. En este trabajo se demostró que la adición de los carbamatos LQM 919 y LQM 996 a cultivos producen, dependiendo del tipo celular, diferentes grados de daño celular, disminución de la viabilidad y apoptosis.

La prueba de presto blue es una técnica que evalúa la capacidad de las células para reducir resazurina a resofurina, lo cual puede ser detectado colorimétricamente o fluorométricamente. Las enzimas encargadas de la reducción de la resazurina son enzimas mitocondriales que aceptan electrones como NADPH, NADP, FADPH y FADP, así como algunos citocromos, por lo que se relaciona indirectamente, con la capacidad de la célula para reducir el colorante con la viabilidad celular (Boncler et al., 2014). Esta técnica se ha utilizado para evaluar viabilidad en bacterias y cultivos celulares (Lall et al., 2013). En el presente trabajo se encontró que las células tratadas a la concentración de 0.6 mM de ambos carbamatos, en todos los cultivos

celulares utilizados, la absorbancia del sobrenadante fue menor ($p < 0.05$) que en los otros tratamientos y que en las células no tratadas. Lo anterior indica una menor capacidad de las células cultivadas a esta concentración para metabolizar rasazurina a resofurina lo que refleja indirectamente una baja en el metabolismo celular, así como en rutas metabólicas donde se sintetice NADP, NADPH, FADP, FADPH lo que se puede relacionar con una baja de la viabilidad (Präbst et al., 2017).

Todas las células tienen una actividad metabólica distinta y expresan diferentes proteínas que mejoran su capacidad metabolizadora. Las células HepG2 son células derivadas de sarcoma hepático, por lo que tienen un metabolismo elevado, además cuentan con enzimas metabólicas de fase I y II (Hewitt y Hewitt, 2004; Hewitt et al., 2007), mientras que células del intestino de las garrapatas tienen proteínas que favorecen la protección a los agentes oxidantes producidos al almacenar y transformar el hierro contenido en la sangre (Galay et al., 2015). En los resultados obtenidos con el ensayo de presto blue observamos en general una mayor absorbancia en las células HepG2 y cultivos primarios de intestino, incluso en los grupos no tratados con los carbamatos, esto demuestra una mayor capacidad de las células HepG2 y células de intestino de las garrapatas para metabolizar diversos compuestos, entre estos la rezosurina y los carbamatos, en las células de intestino también la capacidad para soportar altas concentraciones de H_2O_2 , lo que concuerda con lo encontrado por Galay et al., (2015).

Los carbamatos LQM 919 y LQM 996 han demostrado en pruebas de inmersión de hembras adultas (*in vitro*) que tienen efecto sobre la cantidad y viabilidad de los huevos producidos, pero no afectan la viabilidad de las hembras de *R. microplus* (Pérez-González et al., 2014; Prado-Ochoa et al.,

2013), sin embargo, en larvas tanto *in vitro* (datos no publicados) como *in vivo*, producen una mortalidad de hasta el 100% (Iturbe-Requena 2014), probablemente esto se deba al tipo de células afectado ya que la importancia y desarrollo que tienen los órganos varían dependiendo del estadio de la garrapatas. En larvas se encuentra principalmente desarrollado el tracto digestivo y las glándulas salivales, en hembras repletas las células ováricas están más desarrolladas, por esta razón se evaluaron la susceptibilidad de diferentes tipos celulares de *R. microplus* a los carbamatos estudiados (De La Vega et al., 2012; García-Fernández et al., 1999; Hernandez, 2000). Utilizando la prueba de presto blue, se observó una menor absorbancia en células de glándula salival tratadas con el LQM 919, comparadas con las demás líneas celulares de garrapata, lo anterior sugiere una mayor susceptibilidad de las células de la glándula salival al LQM 919, esto podría explicar porque el carbamato produce alta mortalidad de larvas, en donde las glándulas salivales son importantes para su alimentación. En contraste, las hembras adultas repletas que ya no se alimentan, las glándulas salivales no son indispensables, incluso se ha reportado que existe degeneración y apoptosis natural en glándulas salivales de hembras repletas durante el periodo de preoviposición (Freitas et al., 2007).

Presto blue es una técnica altamente utilizada para evaluar metabolismo celular, principalmente para evaluar los procesos metabólicos llevados en el interior de la mitocondria, debido a la capacidad de permear del colorante, en su forma reducida y oxidada, además de que la mayoría de las enzimas que metabolizan el colorante se encuentran en mitocondria (Sonnaert et al., 2015). Al realizar la prueba de presto blue en células de garrapata, estas no metabolizaban el colorante en el mismo tiempo que las células de mamífero,

|

pero al aumentar el tiempo de exposición a 1.5 horas estas células podían reducir la resozurina. Lo anterior puede deberse a que las células de garrapata tiene una menor dependencia del metabolismo en mitocondria para obtener energía, como lo reporto Shanahan y O'hagan (1972), que encontraron, que el metabolismo de obtención de energía de *R. microplus* puede depender entre un 20% y un 50% de la vía de las pentosas que es anaeróbico y que no utiliza a las mitocondrias.

La prueba más utilizada para detectar viabilidad es la de tripán azul, esta técnica se basa en la tinción de las células con el colorante azul tripán que puede penetrar las membranas dañadas y tiñe las células, mientras en células con membrana integra no penetra el colorante. En esta prueba se considera las células teñidas como muertas y las células no teñidas como viables (Cossío Bayuggar et al., 2011). Los resultados obtenidos por la prueba de azul tripán mostraron un efecto dosis dependiente, al aumentar la concentración del LQM 919 y el LQM 996 en los cultivos, disminuye la viabilidad celular. A la concentración de 0.6 mM de ambos carbamatos se observó una menor viabilidad ($p < 0.05$) en todos los cultivos celulares. El mayor efecto se observó en las células de los cultivos primarios de glándula salival. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por la prueba de presto blue ya que aunque presto blue mide indirectamente viabilidad, las dos técnicas tienen la capacidad de identificar células vivas (Cossío Bayuggar et al., 2011; Sonnaert et al., 2015).

Los cambios morfológicos son pruebas evidentes de daño celular (Cerón y Troncoso, 2016). Las alteraciones en la morfología de células en cultivo pueden estar dadas por diversos factores, como presencia de patógenos, toxinas, presencia de fármacos o falta de nutrientes (Fitzgerald et al., 1982;

Gácsi et al., 2009). Al exponer las células a diferentes concentraciones de los carbamatos LQM 919 y LQM 996, encontramos que a la concentración de 0.6 mM se observaron evidentes alteraciones morfológicas en todos los cultivos, entre estas alteraciones resaltó el desprendimiento celular, cambio en la morfología de las células, pérdida de la confluencia celular y presencia de vacuolas en las células que no se desprendieron. Las alteraciones observadas, como el cambio de morfología, ocasionadas por los carbamatos LQM 919 y LQM 996 pueden deberse a efectos de daño en alguna estructura del citoesqueleto como se ha descrito con otros carbamatos (De Brabander et al., 1976). Además de las alteraciones anteriormente descritas, la presencia de vacuolas y condensación nuclear como en el caso de las células Bm-sus tratadas con el LQM 996 son características de procesos de apoptosis (Oberhammer et al., 1993; Gácsi et al., 2009; Elmore, 2007).

La prueba de TUNEL es una técnica de estimación de fragmentación de DNA, en la cual se reconstruyen las cadenas de DNA fragmentadas, con nucleótidos marcados y una transcriptasa recombinante (Sharma et al., 2012). La fragmentación del ADN es un proceso característico de las células en apoptosis y puede ser detectado tanto en células de mamífero como en células de *R. microplus* (Freitas et al., 2007). La técnica de TUNEL que utilizamos fue una variante para inmunofluorescencia, con nucleótidos marcados con fluoresceína y se utilizó como colorante de contraste DAPI, el cual se une al DNA en los núcleos y permite ubicarlos dentro de las células. Todas las células tratadas con los carbamatos LQM 919 y LQM 996 (0.06mM) presentaron signos de apoptosis (marcas de fluoresceína verde) en la mayoría de las células. Los resultados obtenidos muestran que los carbamatos LQM 919 y LQM 996 tiene la capacidad de generar apoptosis tanto en células de

|

mamífero como en células de garrapatas. Lo anterior, es similar a los reportes de otros carbamatos como primicarb y zineb (Soloneski et al., 2015b).

Las caspasas son proteasas que se encuentran como zimógenos, que son activados en procesos donde se desencadena la apoptosis y actúan activando otras caspasas en una cascada, siendo la caspasa 3 la enzima efectora por lo que la detección de las caspasas 3 en las células es un indicativo de un proceso apoptótico (Grasl-Kraupp, 1995; Gurtu et al., 1997; Sharma et al., 2012). Freitas et al., (2007) utilizó la detección de caspasas 3 para determinar la presencia de apoptosis en células de diversos órganos de *R. microplus* repletas, durante el periodo de oviposición. En este trabajo se detectó una actividad de caspasa 3 en los lisados de células incubadas con ambos carbamatos a una concentración de 0.6 mM, lo que muestra que ambos carbamatos son capaces de producir apoptosis en células tanto de garrapatas como de mamíferos.

El uso de cultivos celulares como modelos experimentales es una alternativa para el uso de animales de experimentación, que facilita realizar experimentos con un menor costo y con un mayor control sobre las variables (Doke y Dhawale, 2015), sin embargo, no todos los mecanismos que regulan los procesos fisiológicos en animales pueden ser evaluados en cultivos celulares. Los resultados obtenidos en este experimento mostraron que los carbamatos LQM 919 y LQM 996 a concentración de 0.6 mM generaron daños celulares y apoptosis en células de mamífero y en células de garrapata, sin embargo, los resultados observados por Prado-Ocho et al., (2014 a y b) demuestran que el LQM 919 y el LQM 996 tienen baja toxicidad y generan daños reversibles sobre órganos de mamíferos. Lo anterior muestra que estos carbamatos pueden tener el potencial para dañar células de mamíferos, pero al tener estos

|

mecanismos para eliminar o metabolizar potenciales tóxicos en hígado, el daño es menor aun en células potencialmente susceptibles(Waliszewski et al., 1999). En contraste, la apoptosis encontrada en células de *R. microplus* en cultivos celulares concuerda con la apoptosis observada en células de ovario de hembras repletas tratadas con el LQM 996 y LQM 919 (Escobar-Chavarría, 2014). Se requieren estudios posteriores más profundos para determinar mecanismo de acción molecular de estos carbamatos.

14. Conclusiones.

- ❖ Se estandarizaron las condiciones para generar y mantener cultivos primarios de glándulas salivales, intestino y ovarios de *R. microplus*.
- ❖ La viabilidad celular en todos los cultivos tratados con el LQM 919 y el LQM 996 disminuyó significativamente ($p < 0.05$) a la concentración de 0.6 mM.
- ❖ La línea celular HepG2 y las células de cultivo primario de intestino de *R. microplus*, tuvieron, valores más altos de viabilidad, que las demás células en cultivo, tanto en células tratadas con los etil-carbamatos, como en células no tratadas.
- ❖ Las células del cultivo primario de glándula salival fueron más susceptibles que los demás tipos celulares, en tratamientos de 0.06 mM y 0.6 mM.
- ❖ Los carbamatos LQM 919 y LQM 996 a la concentración de 0.6 mM son capaces de inducir apoptosis sobre las líneas celulares HepG2, VERO, Bm-sus y los cultivos primarios de glándula salival, intestino y ovario de *R. microplus*.

15. Bibliografía

- Alonso-Díaz, M.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Fragoso-Sánchez, H., Rosario-Cruz, R., 2006. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. Arch. Med. Vet. 38, 105–113. doi:10.4067/S0301-732X2006000200003
- Anderson, J.F., Magnarelli, L.A., 2008. Biology of Ticks. Infect. Dis. Clin. North Am. 22, 195–215. doi:10.1016/j.idc.2007.12.006
- Angeles, 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, 141–170. doi:10.1016/S0166-1280(00)00361-4
- ATCC (American Type Culture Collection), 2017. VERO, CCL-81. <https://www.atcc.org/products/all/CCL-81.aspx>
- ATCC (American Type Culture Collection), 2017. HepG2, HB-8065 2017 <https://www.atcc.org/products/all/HB-8065.aspx>
- Araque, A., Ujueta, S., Bonilla, R., Gómez, D., Rivera, J., 2014. Resistencia a acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de algunas explotaciones ganaderas de colombia. U.D.C.A Act. Div. Cient 17, 161–170.
- Barker, S., Murrell, A., 2008. systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. Cambridge University Press.
- Bell-Sakyi, L., Zwegarth, E., Blouin, E.F., Gould, E.A., Jongejan, F., 2007a. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. Trends Parasitol. 23, 450–457. doi:10.1016/j.pt.2007.07.009
- Bell-Sakyi, L., Zwegarth, E., Blouin, E.F., Gould, E.A., Jongejan, F., 2007b. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. Trends Parasitol. 23, 450–457. doi:10.1016/j.pt.2007.07.009
- Bernal Ayala S. I., 2000. Valuacion De Algunos Productos Derivados Del Acido Carbamico Como Agentes Antimicrobianos. UNAM.
- Beyer, H., Walter, W., 1987. Manual de química orgánica. Reverté.

- Boncler M., Rozalski M., Krajewska U., P.A., 2014. Comparison of prestoBlue and MTT assays for cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *J. Pharmacol. Toxicol. Methodol.* 69, 9–16.
- Castaño, M. E., y Zapata, J.C., 2016. *Cultivos celulares*. Fondo Editorial Biogénesis, p. 49–64.
- Castro-Janer, E., Rifran, L., González, P., Piaggio, J., Gil, A., Schumaker, T.T.S., 2010. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by in vitro bioassays. *Vet. Parasitol.* 169, 172–177. doi:10.1016/j.vetpar.2009.12.017
- Cerón, J., Troncoso, J., 2016. Alteraciones de las células de la microglía del sistema nervioso central provocadas por lesiones del nervio facial Facial nerve injuries cause changes in central nervous system microglial cells. *Biomédica* 3636, 619–31619. doi:10.7705/biomedica.v36i4.3259
- Cossio-Bayugar, R., Miranda-Miranda, E., 2007. Heterologous Gene Expression in a Cattle Tick *Rhipicephalus microplus* Embryonic Cell Culture. *Apollo Int. Mag. Art Antiq.* 6, 1214–1218.
- Cossio-Bayugar, R., Wagner, G.G., Holman, P.J., 2002. In Vitro Generation of Organophosphate Resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Cell Lines. *Source J. Med. Entomol. J. Med. Entomol.* 39, 278–284. doi:10.1603/0022-2585-39.2.278
- Cossío Bayuggar, R., Martínez Rojas, C., Miranda Miranda, E., Álvarez Martínez, J.A., Figueroa Millán, J. V., Vega Murguía, C.A., 2011. Cultivo de Células Animales y sus Aplicaciones in vitro.
- Cunha, R.C., Andreotti, R., Leite, F.P.L., 2011. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: expression and characterization of Bm86-CG in *Pichia pastoris*. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 20, 103–110. doi:10.1590/S1984-29612011000200003
- De Brabander, M.J., Van de Velde, R.M.L., Aerts, F.E.M., Borgers, M., Janssen, P.A.J., 1976. The Effects of Methyl [5-(2-Thienylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate, (R 17934; NSC 238159), a New Synthetic Antitumoral Drug Interfering with Microtubules, on Mammalian Cells Cultured in Vitro. *Cancer Res.* 36.
- De La Vega, R., Díaz, G., Galán, M., Fernández, C., 2012. Anatomy and

- histology of the female reproductive system of *Boophilus microplus* (acari: ixodidae). Rev. Salud Anim 34, 1–10.
- Del Hoyo, I.P., Ortega, A.J., González, M.S., Danes, G.A., Olguin, L.J., Ruvalcaba, F.M., Castañeda, U.R., 2013. Rev. Bio Ciencias Julio 2, 140–147.
- Deretic, V., Kimura, T., Timmins, G., Moseley, P., Chauhan, S., Mandell, M., 2015. Immunologic manifestations of autophagy. J. Clin. Invest. 125, 75–84. doi:10.1172/JCI73945
- Devine, G.J., Eza, D., Ogusuku, E., Furlong, M.J., 2008. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas*. Rev Peru Med Exp Salud Publica 25.
- Doke, S.K., Dhawale, S.C., 2015. Alternatives to animal testing: A review. Saudi Pharm. J. 23, 223–229. doi:10.1016/j.jsps.2013.11.002
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol. pathol 35, 495–516.
- Escobar-Chavarría O., 2014. Determinación de apoptosis en células ovariáticas de hembras de *Rhipicephalus microplus* tratadas con carbamatos inhibidores de la reproducción. UNAM.
- FAO, 2017. Fluazuron [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/docrep/W8338E/w8338e09.htm#TopOfPage> (accessed 3.29.17).
- Fernández-ruvalcaba, M., Preciado-de-la Torre, F., Cruz-vázquez, C., García-vázquez, Z., 2004. Anti-tick effects of *Melinis minutiflora* and *Andropogon gayanus* grasses on plots experimentally infested with *Boophilus microplus* larvae. Exp. Appl. Acarol. 32, 293–299.
- Fernández, D.G., Md, A., Mancipe, L.C., Md, G., Fernández, D.C., 2010. intoxicación por organofosforados. Revista 18, 84–92.
- Ferrer A, 2003. Intoxicación por plagicidas. An. Sist. Sanit. Navar. 26, 155–171.
- Fitzgerald, T.J., Repesh, L.A., Oakes, S.G., 1982. Morphological destruction of cultured cells by the attachment of *Treponema pallidum*. Br J VenerDis 58.

- Freitas, D.R.J., Rosa, R.M., Moura, D.J., Seitz, A.L., Colodel, E.M., Friemeier, D., Vaz, I.D.S., Masuda, A., 2007. Cell death during preoviposition period in *Boophilus microplus* tick. *Vet. Parasitol.* 144, 321–327. doi:10.1016/j.vetpar.2006.10.017
- Gácsi, M., Antal, O., Vasas, G., Máthé, C., Borbély, G., Saker, M.L., Györi, J., Farkas, A., Vehovszky, Á., Bánfalvi, G., 2009. Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells. *Toxicol. Vitro.* 23, 710–718. doi:10.1016/j.tiv.2009.02.006
- Galay, R.L., Umemiya-Shirafuji, R., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T., 2015. Iron metabolism in hard ticks (Acari: Ixodidae): The antidote to their toxic diet. *Parasitol. Int.* 64, 182–189. doi:10.1016/j.parint.2014.12.005
- Gallardo, J.S., Morales, J., 1999. *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): Preoviposición, oviposición, incubación de los huevos y geotropismo. *Bioagro* 11, 77–87.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J., Alnermi, E., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M. V, Dawson, T., El-Deiry, W.S., Fulsa, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Molorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D., Shi, Y., Simon, H., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.*
- García-Fernández, Garcia, S.M.L., Schneider, F.L., Severino, A.G., Winkelmann, E.C., 1999. regionalization of oviducts in *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE) and its potential significance for fertilization. *Rev. Bras. Biol* 59, 653–661.
- Gazca, U., 2007. La garrapata *Boophilus microplus* y su manejo en la planicie huasteca, folleto te. ed.
- Graslkkraupp, B., 1995. In situ detection of fragmented DNA (tunel assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note*1. *Hepatology* 21, 1465–1468. doi:10.1016/0270-9139(95)90071-3
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R. de S., Barros, A.T.M. de, Andreotti, R., Cançado, P.H.D., León, A.A.P. de, Pereira, J.B., Villela, H.S., Grisi, L.,

- Leite, R.C., Martins, J.R. de S., Barros, A.T.M. de, Andreotti, R., Cançado, P.H.D., León, A.A.P. de, Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 23, 150–156. doi:10.1590/S1984-29612014042
- Guerrero, F.D., Andreotti, R., Bendele, K.G., Cunha, R.C., Miller, R.J., Yeater, K., Pérez De León, A.A., 2014. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. doi:10.1186/s13071-014-0475-9
- Gurtu, V., Kain, S.R., Zhang, G., 1997. Fluorometric and Colorimetric Detection of Caspase Activity Associated with Apoptosis. *Anal. Biochem.* 251, 98–102. doi:10.1006/abio.1997.2220
- Hernandez, M., 2000. Aspectos generales de la histología de la glándula salival de las garrapatas con énfasis en *Boophilus microplus* (canestrini, 1887). *Ecuentro* 117–127.
- Hewitt, N.J., Gómez Lechón, M.J., Houston, J.B., Hallifax, D., Brown, H.S., Maurel, P., Kenna, J.G., Gustavsson, L., Lohmann, C., Skonberg, C., Guillouzo, A., Tuschl, G., Li, A.P., LeCluyse, E., Groothuis, G.M.M., Hengstler, J.G., 2007. Primary Hepatocytes: Current Understanding of the Regulation of Metabolic Enzymes and Transporter Proteins, and Pharmaceutical Practice for the Use of Hepatocytes in Metabolism, Enzyme Induction, Transporter, Clearance, and Hepatotoxicity Studies. *Drug Metab. Rev.* 39, 159–234. doi:10.1080/03602530601093489
- Hewitt, N.J., Hewitt, P., 2004. Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica* 34, 243–256. doi:10.1080/00498250310001657568
- Holman, P.J., 1981. partial characterization of a unique female diploid. *J. Med. Entomol.* 18, 84–88.
- Iturbe-Reuqena S. L., 2014. Evaluación de la eficacia in vivo de dos carbamatos de nueva síntesis sobre *Rhipicephalus microplus*. UNAM.
- Jonsson, N.N., 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet. Parasitol.* 137, 1–10.

doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.010

- Kam, P.C.A., Ferch, N.I., 2000. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* 55, 1081–1093. doi:10.1046/j.1365-2044.2000.01554.x
- Kaur, G., Dufour, J.M., 2012. Cell lines. Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* 2, 1–5. doi:10.4161/spmg.2.1.19885
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G., 2009. Classification of cell death. *Cell Death Differrecomendations Nomencl. Committe Cell Death* 2009. 16, 3–11.
- Lall, N., Henley-Smith, C.J., De Canha, M.N., Oosthuizen, C.B., Berrington, D., 2013. Viability Reagent, PrestoBlue, in Comparison with Other Available Reagents, Utilized in Cytotoxicity and Antimicrobial Assays. *Int. J. Microbiol.* 2013, 420601. doi:10.1155/2013/420601
- Maran, E., Fernández-Franzón, M., Font, G., Ruiz, M.J., 2010. Effects of aldicarb and propoxur on cytotoxicity and lipid peroxidation in CHO-K1 cells. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1592–1596. doi:10.1016/j.fct.2010.03.030
- Mosqueda, J., Cossío-Bayugar, R., Rodríguez, E., Falcón, A., Ramos, A., Figueroa, J. V., Alvarez, A., 2008. Primary Midgut, Salivary Gland, and Ovary Cultures from *Boophilus microplus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 49–52. doi:10.1196/annals.1428.050
- Narahashi, T., 1971. Mode of Action of Pyrethroids*. *Bull. Org. mond. St. Bull Wld Hlth Org* 44, 337–345.
- Oberhammer¹, F., Wilson², J.W., Dive², C., Morris², I.D., Hickman²⁵, J.A., Wakeling³, A.E., Walker⁴, P.R., Sikorska⁴, M., 1993. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* 12, 3679–3684.
- Ojeda-Chi, M.M., Rodríguez-Vivas, R.I., Galindo- Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., Cruz-Vázquez, C., 2011. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodae) mediante el uso de hongos entomopatogenos *Metarhizium anisopliae* (Hypocreles: Clavicipitaceae). *Review . Rev.*

Mex. ciencias Pecu. 2, 177–192.

- Ordaz-Pichardo, C., Shibayama, M., Villa-Treviño, S., Arriaga-Alba, M., Angeles, E., de la Garza, M., 2005. Antiamoebic and toxicity studies of a carbamic acid derivative and its therapeutic effect in a hamster model of hepatic amoebiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1160–8. doi:10.1128/AAC.49.3.1160-1168.2005
- Pérez-González, I.E., Prado-Ochoa, M.G., Muñoz-Guzmán, M.A., Vázquez-Valadez, V.H., Velázquez-Sánchez, A.M., Avila-Suárez, B.L., Cuenca-Verde, C., Angeles, E., Alba-Hurtado, F., 2014. Effect of new ethyl and methyl carbamates on *Rhipicephalus microplus* larvae and adult ticks resistant to conventional ixodicides. *Vet. Parasitol.* 199, 235–241. doi:10.1016/j.vetpar.2013.07.042
- Peter, R.J., Van den Bossche, P., Penzhorn, B.L., Sharp, B., 2005. Tick, fly, and mosquito control—Lessons from the past, solutions for the future. *Vet. Parasitol.* 132, 205–215. doi:10.1016/j.vetpar.2005.07.004
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., Hübner, H., 2017. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin, in: Gilbert, D.F., Friedrich, O. (Eds.), *Cell Viability Assays: Methods and Protocols*. Springer New York, New York, NY, pp. 1–17. doi:10.1007/978-1-4939-6960-9_1
- Prado-Ochoa, M.G., Abrego-Reyes, V.H., Velázquez-Sánchez, A.M., Muñoz-Guzmán, M.A., Ramírez-Noguera, P., Angeles, E., Alba-Hurtado, F., 2014a. Subchronic toxicity study in rats of two new ethyl-carbamates with ixodicidal activity. *Biomed Res. Int.* 2014, 467105. doi:10.1155/2014/467105
- Prado-Ochoa, M.G., Gutiérrez-Amezquita, R.A., Abrego-Reyes, V.H., Velázquez-Sánchez, A.M., Muñoz-Guzmán, M.A., Ramírez-Noguera, P., Angeles, E., Alba-Hurtado, F., 2014b. Assessment of acute oral and dermal toxicity of 2 ethyl-carbamates with activity against rhipicephalus microplus in rats. *Biomed Res. Int.* 2014, 956456. doi:10.1155/2014/956456
- Prado-Ochoa, M.G., Muñoz-Guzmán, M.A., Abrego-Reyes, V.H., Velázquez-Sánchez, A.M., Lara-Rocha, M., Cuenca-Verde, C., 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. doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.026

Prado-Ochoa, M.G., Muñoz-Guzmán, M.A., Vázquez-Valadez, V.H., Velázquez-Sánchez, A.M., Salazar, A.M., Ramírez-Noguera, P., Angeles, E., Alba-Hurtado, F., 2016. Genotoxicity and cytotoxicity assessment of new ethyl-carbamates with ixodicidal activity. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 807, 8–14. doi:10.1016/j.mrgentox.2016.06.008

Prado-Ochoa, M.G., Ramírez-Noguera, P., Díaz-Torres, R., Garrido-Fariña, G.I., Vázquez-Valadez, V.H., Velázquez-Sánchez, A.M., Muñoz-Guzmán, M.A., Angeles, E., Alba-Hurtado, F., 2014c. The action of two ethyl carbamates on acetylcholinesterase and reproductive organs of *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.* 199, 215–224. doi:10.1016/j.vetpar.2013.10.028

Rodrigues, D.S., Leite, R.C., 2013. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 65, 1570–1572. doi:10.1590/S0102-09352013000500039

Rodríguez-Vivas, R., Arieta-Román, R., Pérez-Cogollo, L., Rosado-Aguilar, J., Ramírez-Cruz, G., 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. doi:10.4067/S0301-732X2010000300002

Rodríguez-Vivas, R.I., Grisi, L., Pérez de León, A.Á., Sliva Villeda, H., Torres-Acosta, J. Felipe de J., Sánchez Fragoso, H., Salas Romero, D., Rosario Cruz, R., Saldiema, F., García Carrasco, D., 2017. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico . Review Evaluación del impacto económico potencial de los parásitos del ganado bovino en México. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu* 8, 61–74. doi:http://dx.doi.org/10.22319/rcmco.v8i1.4305

Rodríguez-Vivas, R.I., Rosado-Aguilar, J.A., Ojeda-Chi, M.M., Pérez-Cogollo, L.C., Trinidad-Martínez, I., Bolio-González, M.E., 2014. Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y Recur. Agropecu.* 1, 295–308.

Shanahan, A.G., O'hagan, J.E., 1972. Enzyme activity of the cytochrome

system of the egg and larva of the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Aust. J. Biol. Sci.* 26, 453-63

Sharma, M., Kumar, R., Dhingra, R., 2012. Apoptosis : Searching for the detection techniques. *Int. J. Biol. Med. Res.* 3, 2305–2308.

Soloneski, S., Kujawski, M., Scuto, A., Larramendy, M.L., 2015a. Carbamates: A study on genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects induced in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Toxicol. Vitro.* 29, 834–844. doi:10.1016/j.tiv.2015.03.011

Sonnaert, M., Papantoniou, I., Luyten, F.P., Schrooten, J.I., Ir, 2015. Quantitative Validation of the Presto Blue Metabolic Assay for Online Monitoring of Cell Proliferation in a 3D Perfusion Bioreactor System. *Tissue Eng. Part C. Methods* 21, 519–29. doi:10.1089/ten.TEC.2014.0255

Temeyer, K.B., Chen, A.C., Davey, R.B., Guerrero, F.D., Howell, J.M., Kammlah, D.M., Li, A.Y., Lohmeyer, K.H., Olafson, P.U., Perez de Leon, A.A., Phillips, P.L., Pound, J.M., Welch, J.B., 2012. Nuevos enfoques para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. Mex. ciencias Pecu.* 3, 25–40.

The Pirbright Institute, n.d. Tick Cell Lines | [WWW Document]. URL https://www.pirbright.ac.uk/tick-cell-lines-views-page?field_tc_line_type_value=hard&species=&origin= (accessed 4.17.17).

Valle, M. rodriguez, Mèndez, L., Valdez, M., Redondo, M., Espinosa, C. montero, Vargas, M., Cruz, R. Ileonart, Barrios, H. perez, Seoane, G., Ramirez, E. serrano, Boue, O., Vigil, J. Iodos, Machado, H., Nordelo, C. borroto, Piñeiro, M. joglar, 2004. Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine GavacTM. *Exp. Appl. Acarol.* 34, 375–382. doi:10.1023/B:APPA.0000049223.92326.02

Waliszewski, S., Aguirre, G.A., Valencia, Q., Infanzon, R., Inflazón, R., 1999. Factores que influyen en la cinética y metabolismo de los plaguicidas. *La Cienc. y el hombre* 21, 23–29.

Wilson, L.J., Sutherst, R.W., Kerr, J.D., 1989. Trapping of Larvae of the Cattle Tick *Boophilus microplus* by *Stylosanthes scabra* under Grazing Conditions. *Aust. J. Agric. Res* 40, 1301–8.

|

Zong, W., Thompson, C.B., 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 20, 1–15. doi:10.1101/gad.1376506.contrast