



“Por un Desarrollo
Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Maestría en Ciencias en Sanidad Vegetal

Trabajo de Tesis

Infección y colonización de *Metarhizium anisopliae* sensu lato, Méchnikov y Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) en huevos y adultos de la garrapata *Rhipicephalus microplus*, Canestrini (Acari: Ixodidae)

Autor

Ing. Juan José Oporta López

Asesores

Dr. Arnulfo Monzón Centeno

Dr. César Mora Hernández

Managua, Nicaragua

Agosto, 2022



“Por un Desarrollo
Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Maestría en Ciencias en Sanidad Vegetal

Trabajo de Tesis

Infeción y colonización de *Metarhizium anisopliae* sensu lato, Méchnikov y Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) en huevos y adultos de la garrapata *Rhipicephalus microplus*, Canestrini (Acari: Ixodidae)

Autor

Ing. Juan José Oporta López

Asesores

Dr. Arnulfo Monzón Centeno

Dr. César Mora Hernández

Presentado a la consideración del Honorable Comité
Evaluador como requisito final para optar al grado de
Maestro en Ciencias

Managua, Nicaragua

Agosto, 2022

Hoja de aprobación del Comité Evaluador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el Honorable Comité Evaluador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

Maestro en Ciencias en Sanidad Vegetal

Miembros del Comité evaluador

Dr. Edgardo Jiménez Martínez
Presidente

MSc. Víctor Ramón Monzón Ruíz
Secretario

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz
Vocal

Lugar y Fecha: _____ 4 de agosto, 2022, Managua, Nicaragua

DEDICATORIA

A Dios por el regalo de la vida

A mi familia

A mis amigos

Juan J Oporta López

AGRADECIMIENTO

En este camino vivido he sentido alegría, tristeza, fracasos, el deseo de seguir a pesar de las dificultades, queriendo cumplir con mis sueños, por eso le doy gracias a Dios, ese ser infinito que está siempre presente. Al contemplar la maravilla de planeta en el que estamos, no podría causarnos más asombro de su perfección.

La ciencia sin dudas es un motor que nos impulsa a comprender, a vivir la vida de una manera diferente comprendiendo, o llegándonos a sentir parte de la naturaleza, que no somos ajena a ella; gracias a esas personas que me han ayudado a comprender y aportado a mi vida, gracias a mis padres René y Guillermina, gracias por cada enseñanza, cada gesto, sin su apoyo hubiera sido más difícil, gracias por estar siempre. A mis abuelitos Juan y Rosa, personas mágicas. Mi tía Judith, gracias siempre por tu amistad incondicional.

La naturaleza nos regaló hermanos: esos seres con quienes se comparte hasta el pensamiento, gracias por ser maravillosos, Estebana, Guillermina, René, Jeaneth, los amo. Gracias a los amigos que son como hermanos. La amistad en un sentimiento que nace y crece a medida que los organismos interactúan, gracias Henry Vega, David Vega, Anner Velázquez, Elian Jarquín, Ana Matamoros, su compañía y apoyo siempre fue de lo mejor, se les aprecia.

A mi amigo y maestro Prof. Arnulfo Monzón, por guiarme en este proceso, revisar los experimentos y resultados, realizar las revisiones metodológicas y la mejora de éstas, así como en las gestiones para la realización del proceso histopatológico. Gracias por su amistad, por las buenas pláticas y momentos compartidos.

Al Prof. César Mora, por su enseñanza de disección de garrapatas e identificación taxonómica, gestiones y apoyo en la realización de los experimentos, así como en los análisis correspondientes.

A mi gran amiga Prof. Isabel Herrera; gracias por su amistad, por toda su ayuda y consejos brindados, por los momentos compartidos llenos de risa y entusiasmo.

A mis maestros del programa de maestría. Prof. Ulises Blandón, Prof. Edgardo Jiménez, Prof. Martha Zamora, gracias por sus enseñanzas, consejos, las pláticas y momentos amenos que compartimos.

Al director de la Universidad Nacional Agraria-Juigalpa, Prof. Jorge Sobalvarro, gracias por su buena amistad, y por la disponibilidad del laboratorio de biología, lugar donde realice parte de mi investigación.

Al Profesor Noel Duarte responsable de investigación en la UNA-Juigalpa, por su amistad y apoyo brindado.

Al Profesor Julio Mercado ^{qepd} del laboratorio de patología de la UNAN-León, por su ayuda y amabilidad para la realización de los cortes histológicos de la garrapata.

Al Profesor William Jirón del departamento de medicina veterinaria de la UNAN-León, por sus enseñanzas con los experimentos en ratones, así como en el procesado de los cortes histológicos.

A la Profesora Adriana Troyo de la Facultad de Microbiología, de la UCR, Costa Rica, por su amistad, e invitación para compartir resultados de mi investigación.

Juan J Oporta López

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
3.1 Garrapatas en el ganado bovino	5
3.2 Sistema reproductor de <i>R. microplus</i>	8
3.2.1 Ovario	10
3.2.2 Oviductos	10
3.2.3 Útero y vagina cervical:	11
3.2.4 Glándula accesoria lobular:	11
3.3 Sistema respiratorio	11
3.3.1 Tráquea	11
3.4 Sistema circulatorio	12
3.5 Sistema digestivo	13
3.5.1 Faringe	13
3.5.2 Intestino	13
3.5.3 Túbulos de malpighi	14
3.5.4 Glándulas salivales	14
3.6 Generalidades del control microbiano	14
3.6.1 Hongos en el control microbiano de plagas agrícolas y veterinarias	17
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 Ubicación del estudio	21
4.2 Colecta de muestras	21

4.3 Infección y colonización de <i>M. anisopliae</i> en <i>R. microplus</i>	21
4.3.1 Microscopia de luz compuesta, para el estudio de infección y colonización de <i>M. anisopliae</i> en <i>R. microplus</i>	21
4.3.2 Examinación mediante microscopía de luz estereoscópica	23
4.3.3 Histopatología de la infección y colonización de <i>M. anisopliae</i> en <i>R. microplus</i>	23
4.3.4 Tinción de los cortes	24
4.4. Capacidad de adhesión de conidios en el tegumento de la garrapata <i>R. microplus</i>	25
4.5 Colonización de la hemolinfa de <i>R. microplus</i> por <i>M. anisopliae</i>	26
4.5.1 Infección de <i>M. anisopliae</i> en ovario y ovocitos de <i>R. microplus</i>	26
4.5.2 Histopatología de la infección y colonización por <i>M. anisopliae</i> en huevos de <i>R. microplus</i>	28
4.6 Variables evaluadas	28
4.7 Recolección de datos	29
4.8 Análisis de datos	29
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1 Infección y colonización de <i>M. anisopliae</i> en <i>R. microplus</i>	30
5.1.1 Examinación mediante microscopía de luz estereoscópica	30
5.2 Capacidad de adhesión de <i>M. anisopliae</i> en la cutícula de <i>R. microplus</i>	34
5.3 Microscopia de luz compuesta, para el estudio de infección y colonización de <i>M. anisopliae</i> en <i>R. microplus</i>	35
5.4 Infección de <i>M. anisopliae</i> en ovario y ovocitos de <i>R. microplus</i>	40
5.5 Colonización de la hemolinfa de <i>R. microplus</i> por <i>M. anisopliae</i>	44
5.6. Histopatología de la infección y colonización de <i>M. anisopliae</i> en <i>R. microplus</i>	46
5.6.1 Histopatología de la infección y colonización por <i>M. anisopliae</i> en huevos de <i>R. microplus</i>	50
VI. CONCLUSIONES	55
VII. RECOMENDACIONES	56
VIII. LITERATURA CITADA	57

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Metodología empleada para la prueba de capacidad de adhesión	26
2. Progresión de signos externos de la Infección por <i>M. anisopliae</i> en <i>R. microplus</i>	31
3. Garrapatas tratadas con agua destilada estéril	32
4. Adhesión de conidios de <i>M. anisopliae</i> en la cutícula de <i>R. microplus</i>	33
5. Adhesión y germinación de conidios de <i>M. anisopliae</i> sobre <i>R. microplus</i>	36
6. Microfotografía del tegumento de <i>R. microplus</i>	37
7. Microfotografía del proceso de infección de <i>M. anisopliae</i> en <i>R. microplus</i>	38
8. Huevo de <i>R. microplus</i> infectado con <i>M. anisopliae</i> 8 días después de la oviposición	40
9. Huevos de <i>R. microplus</i> infectados y dañados por efecto del parasitismo de <i>M. anisopliae</i>	41
10. Ovario y ovocitos en desarrollo, no infectados por <i>M. anisopliae</i> .	42
11. Estructuras fúngicas e inmunogénicas encontradas en la hemolinfa de <i>R. microplus</i>	46
12. Cutícula de <i>R. microplus</i> adulta sin infección por <i>M. anisopliae</i>	47
13. Corte histológico de <i>R. microplus</i> infectada con <i>M. anisopliae</i>	49
14. Tejido intestinal con presencia de hifas fúngicas	50
15. Sección transversal de un huevo de garrapata	49
16. Sección transversal de huevos de garrapata	53

RESUMEN

Las garrapatas son el principal ectoparásito que afecta al ganado bovino. El hongo *Metarhizium anisopliae* constituye una alternativa ecológica a los plaguicidas químicos, además es un organismo modelo para estudiar las interacciones artrópodos-hongos, y un recurso de genes para la biotecnología. El parasitismo en huevos y adultos de la garrapata *Rhipicephalus microplus* por *M. anisopliae*, fue estudiado usando técnicas básicas de inoculación, histopatología, tinción y microscopía. Las garrapatas se inocularon con 1×10^8 conidios/ml, mediante el método de inmersión; y se mantuvieron en cámara húmeda a 24°C. Se realizó prueba de adhesión de conidios en órganos externos de *R. microplus*, mediante un lavado con tween 80 al 0,05%; se extrajo hemolinfa y ovarios de adultos de *R. microplus*. Los huevos ovipositados se observaron con microscopio óptico a los 8 y 15 días después de la ovoposición. Los adultos y huevos se procesaron para histología mediante microtomo, y posterior análisis al microscopio. Se encontró conidios de *M. anisopliae* adheridos en el área ventral, patas, áreas intersegmentales y setas de la garrapata. El porcentaje de conidios adheridos al tegumento de *R. microplus* fue 98%; la germinación inició entre las 14 y 18 horas después de la inoculación, los conidios formaron apresorios y se percibió un halo extracelular, que degradaba el tegumento. Se evidenció la penetración de *M. anisopliae* en patas de *R. microplus* aproximadamente a las 36 horas después de la inoculación. En la hemolinfa se encontró blastosporas en gemación, e hifas de *M. anisopliae*. Los ovarios presentaron colonización por hifas de *M. anisopliae*. Los huevos fueron colonizados por *M. anisopliae*, la membrana perdió su integridad a medida que la infección por el hongo avanzaba, los huevos no eclosionaron; se encontró células gigantes, hifas y conidiogénesis de *M. anisopliae* en la membrana externa del huevo. La histopatología reveló la desorganización celular de los órganos de *R. microplus*. Estos resultados demuestran el parasitismo de *M. anisopliae* sobre huevos y adultos de *R. microplus*. El daño ocasionado a dos estados del ciclo biológico de *R. microplus*, abre camino a la generación de nuevos garrapaticidas de origen microbianos, amigables con el medio ambiente e inocuos a la salud animal y humana.

Palabras clave: histopatología, control microbiano, infección fúngica, parasitismo, garrapata del bovino.

ABSTRACT

Ticks are the main ectoparasite that affects cattle. The fungus *Metarhizium anisopliae* is an ecological alternative to chemical pesticides, a model organism for studying arthropod-fungal interactions, and a gene resource for biotechnology. The parasitism in eggs and adults of the tick *Rhipicephalus microplus* by *M. anisopliae*, was studied using basic techniques of inoculation, histopathology, staining and microscopy. Ticks were inoculated with 1×10^8 conidia/ml, using the immersion method; and were kept in a wet chamber at 24°C. Conidia adhesion test was performed in external organs of *R. microplus*, by washing with 0.05% tween 80; adults of *R. microplus* were processed to remove hemolymph and ovaries. The oviposited eggs were observed under an optical microscope at 8 and 15 days after oviposition. Adults and eggs were processed for histology by microtome, and subsequent analysis under the microscope. Conidia of *M. anisopliae* were found attached to the ventral area, legs, intersegmental areas and hairs of the tick. The percentage of conidia adhered to the integument of *R. microplus* was 98%; germination began between 14 and 18 hours after inoculation, the conidia formed appressoria and an extracellular halo was perceived, which degraded the integument. The penetration of *M. anisopliae* in *R. microplus* legs was evidenced at approximately 36 hours after inoculation. In the hemolymph were found blastospores in budding, and hyphae of *M. anisopliae*. *M. anisopliae* hyphae colonized the ovaries. The eggs were colonized by *M. anisopliae*, the membrane lost its integrity as the fungus infection progressed, the eggs did not hatch; giant cells, hyphae and conidiogenesis of *M. anisopliae* were found in the outer membrane of the egg. Histopathology revealed cellular disorganization of *R. microplus* organs. These results demonstrate the parasitism of *M. anisopliae* on eggs and adults of *R. microplus*. The damage caused by *M. anisopliae* to two states of the biological cycle of *R. microplus*, opens the way to the generation of new microbial pesticides, friendly to the environment and harmless to animal and human health.

Keywords: histopathology, microbial control, fungal infection, parasitism, bovine tick.

I. INTRODUCCIÓN

Las plagas repercuten en la producción de alimentos de origen vegetal y animal. En la producción vegetal ocasionan la pérdida de más del 40% del suministro mundial de alimentos; lo que genera una amenaza a la seguridad alimentaria y a los medios de subsistencia rurales en todo el planeta, así como precios más altos para los consumidores (FAO, 2015; Merillon y Ramawat, 2012). Las transformaciones que experimenta la cubierta vegetal de la Tierra, como la deforestación y la desertificación, pueden incrementar la vulnerabilidad de las plantas y los animales ante las plagas y las enfermedades (FAO, 2015).

Para combatir la proliferación de artrópodos plagas es común el uso de plaguicidas sintéticos, lo cual podría propiciar el incremento de residuos de plaguicidas y medicamentos veterinarios en el suministro de alimentos. Las garrapatas son artrópodos, comunes en las regiones tropicales y subtropicales, donde ocasionan pérdidas considerables para la ganadería (Dantas-Torrez, 2019; Grisi et al., 2014), siendo *Rhipicephalus microplus* (Acari:Ixodidae) Canestrini, 1888 (Barker y Murell, 2008; Murell y Barker, 2003) la principal garrapata y ectoparásito artrópodo del ganado bovino, debido a que su alimentación es exclusivamente hematófaga, y su principal hospedero es el bovino (NCBI Taxonomy browser, 2015; Quiroz, 1990; Núñez et al., 1982).

Son comunes las muertes de ganado atribuibles a la anemia como resultado de la infestación con *R. microplus*. Las hembras ingurgitadas aumentan su peso entre 100 y 200 veces, pero la cantidad real de sangre ingerida es mucho mayor que esto, ya que la sangre se concentra, y el fluido se excreta en la saliva (Kemp et al., 1982).

Para controlar las garrapatas es necesario el uso de plaguicidas; los cuales en su mayoría tienen altos grados de toxicidad y persistencia, esto provoca que los alimentos carezcan de inocuidad, llegando a provocar problemas de salud en los consumidores y daños al medio ambiente (FAO, 2015). Los efectos negativos en la salud, que se han asociado con los plaguicidas químicos, usados para el control de garrapatas son: dermatológicos, neurológicos, gastrointestinales, cancerígenos, respiratorios, reproductivos y endocrinos (World Health Organization, 1990; Semchuk et al., 1992; Sanborn et al., 2007; Alewu y Nosiri, 2011).

Una alternativa a los plaguicidas químicos y los problemas derivados de su uso es el control biológico (Leo et al., 2008). Ciancio y Mukerji (2008), sostienen que, el control biológico es el uso de la naturaleza y / o organismos modificados, genes o productos genéticos para regular o reducir plagas en favor de poblaciones humanas, animales, y cultivos agrícolas, además de proteger a otros organismos benéficos. Los hongos entomopatógenos son empleados en control biológico de artrópodos plagas, actuando como plaguicidas de contacto (Arruda et al., 2005).

Metarhizium anisopliae es un hongo entomopatógeno que se encuentran entre los hongos más abundantes aislados de suelos, con títulos que alcanzan 10^6 conidios por gramo en pastizales (Sant et al., 2019). Gao et al., (2011) afirman que “*Metarhizium* spp son alternativas ecológicas a los insecticidas químicos, como sistemas modelo para estudiar las interacciones entre insectos y hongos, y como un recurso de genes para la biotecnología” (p.1). *Metarhizium* se ha utilizado en estudios sobre la evolución del sistema inmunológico y patógenos humanos emergentes (Gottar et al., 2006; Lu y Leger, 2016).

Además de la prolífica producción de enzimas y metabolitos, *Metarhizium* está relacionado con sus amplias opciones de estilo de vida y un metabolismo extremadamente flexible, que les permite vivir en diversas condiciones ambientales, con nutrientes escasos (Rangel et al., 2008) y en presencia de compuestos letales para otros microbios (Roberts y Leger, 2004).

M. anisopliae han demostrado ser muy promisorio en el control de *R. microplus* (Leo et al., 2008). En Nicaragua, Oporta, (2017), evaluó *M. anisopliae*, en el control de *R. microplus* bajo condiciones de laboratorio; encontró que *M. anisopliae* causaba mortalidad mayor al 90% en teleoginas. El conocimiento limitado, sobre las interacciones *M. anisopliae*- garrapata, es uno de los factores que limitan la aplicación práctica en bovinos y pasturas.

Esta investigación dilucidó mediante técnicas de microscopía e histología el proceso infeccioso: adhesión, germinación, penetración, así como las lesiones ocurridas en los tejidos de *R. microplus* ocasionadas por *M. anisopliae*. El objetivo de esta investigación fue generar información sobre el proceso infeccioso y la interacción hongo-garrapata, la cual podrá ser utilizada en el desarrollo de estrategias de control microbiano, dentro de un programa de manejo integrado de garrapatas, mediante hongos entomopatógenos, como alternativa al uso de garrapaticidas químicos.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Generar información sobre el proceso infeccioso y la interacción, del hongo *Metarhizium anisopliae* y la garrapata *R. microplus*, para el desarrollo de estrategias de control microbiano, como alternativa al uso de garrapaticidas sintéticos.

2.2 Objetivos específicos

- Describir el mecanismo infectivo del hongo *Metarhizium anisopliae* en la garrapata del bovino *Rhipicephalus microplus*.
- Cuantificar la capacidad de adhesión de *M. anisopliae* en el tegumento de *R. microplus*.
- Determinar las patologías infringidas por *M. anisopliae* en huevos y adultos de *R. microplus* mediante histopatología.

III. MARCO DE REFERENCIA

La productividad de los cultivos está en riesgo debido a la incidencia de patógenos y plagas animales. Entre los cultivos, el potencial de pérdida total de plagas en todo el mundo varía de 25 a 40%. Globalmente, enormes pérdidas de los cultivos son causados por las enfermedades de las plantas, que pueden ocurrir desde el momento de la siembra de la semilla en el campo, cosecha y el almacenamiento (Merillon y Ramawat, 2012).

Evidencias históricas importantes de enfermedades en las plantas son la hambruna irlandesa debido al tizón tardío de la papa (Irlanda, 1845), hambre de Bengala debido a la mancha marrón del arroz (India, 1942) y la roya del café (Sri Lanka, 1967). Tales epidemias habían dejado su efecto en la economía de los países afectados y una cicatriz profunda en los recuerdos de la civilización humana (Merillon y Ramawat, 2012).

Las enfermedades de las plantas causan amenazas económicas a la agricultura convencional y sistemas orgánicos. La mayoría de las enfermedades infecciosas de las plantas tienen sus características propagación y síntomas. La comprensión de estas características ayuda en posibles estrategias de control; evaluar el impacto económico y las consecuencias socioeconómicas de su difusión (Merillon y Ramawat, 2012).

Los efectos de las enfermedades van desde síntomas leves a catástrofes en qué grandes áreas de cultivos alimenticios se destruyen. Catorce plantas de cultivo proporcionan la mayor parte de alimentos para el consumo humano, que es probable que estén infestados de cualquiera de los principales patógenos de plantas, incluidos virus, bacterias, oomicetos, hongos, nematodos, y plantas parásitas (Merillon y Ramawat, 2012).

Las plagas de las plantas, que son insectos, patógenos y malezas, siguen siendo una de las mayores limitaciones para la producción agrícola y de alimentos. Para combatir estas plagas muchas veces se necesita usar plaguicidas, que pueden producir serios efectos secundarios en la salud humana y el medio ambiente, en particular en la población rural pobre, que no puede permitirse el uso de compuestos menos tóxicos ni cuenta con equipo para aplicar estas sustancias o de protección (FAO, 2015; Moosavi-Reza y Zare, 2012).

Habrá que crear nuevas prácticas agrícolas, diferentes cultivos y variedades de los animales, así como desarrollar los principios del manejo integrado de plagas para contribuir a frenar la propagación de éstas. Los gobiernos tal vez tengan que contemplar la introducción de agentes biológicos para combatir las plagas o el uso de cultivos y variedades pecuarias resistentes a las plagas y las enfermedades (FAO, 2015).

Los agentes de control microbiano tienen un efecto importante en la regulación de las poblaciones de plagas, organismos que incluyen hongos, bacterias, virus y nematodos tienen actividad antagonista contra plagas invertebradas. El proceso de desarrollo de los agentes biológicos, incluye el aislamiento e identificación de agentes microbianos asociados con los invertebrados parásitos, especialmente en suelos supresivos (Moosavi-Reza y Zare, 2012).

3.1 Garrapatas en el ganado bovino

En este planeta hay muchas formas de vida. Independientemente de cómo las llamemos, estas entidades existen y descienden de algún lugar, ya sea de una sola célula o de un organismo multicelular (Dantas-Torres, 2018). Organismos parásitos, de hábitos alimenticios hematófagos, de importancia médica y veterinaria como son las garrapatas (Dantas-Torrez, 2019; Grisi et al., 2014), se originaron en la Era Paleozoica (Sonenshine y Roe, 2013), durante el Carbonífero tardío o el Pérmico temprano, en la porción Africana del supercontinente de Gondwana, probablemente como parásitos de sin psidos o di psidos (Mans et al., 2011; Mans et al., 2012; Chitimia-Dobler et al., 2016).

Evidencia fósil indica que los linajes evolutivos de las garrapatas divergieron en la Era Mesozoica (Chitimia-Dobler et al., 2016; Peña y de la Fuente, 2018). Las garrapatas duras y las garrapatas de la nueva familia extinta Deinocrotonidae, se alimentaban de sangre de dinosaurios emplumados, hace 99 millones de años (Peñalver et al., 2017).

Las garrapatas son ectoparásitos obligados, su alimentación es exclusivamente hematófaga sea cual fuere la familia, el género o la especie, en animales de sangre fría como de sangre caliente (N n ez et al., 1982; Quiroz, 1990; NCBI Taxonomy browser, 2015).

Al igual que los insectos, ar as, ácaros y crustáceos, las garrapatas pertenecen al Phylum Arthropoda, el cual se divide en dos Subphylum: Mandibulata y Chelicerata. Las garrapatas

pertenecen a la Clase Arachnida (dentro del Subphylum Chelicerata); estas carecen de antenas, tienen el cefalotórax y abdomen fusionados; presentan cuatro pares de patas, al igual que las arañas y escorpiones, con excepción del estado larval, en el cual poseen solo tres pares de patas (Núñez et al., 1982; NCBI Taxonomy browser, 2015; Estrada, 2015).

Según Burger et al., (2014) las garrapatas son plagas muy importantes; el costo de control de las garrapatas y de las enfermedades que estas transmiten al ganado bovino, ha sido estimado entre \$ 13.9 -18.7 billones anualmente. De acuerdo con Suárez et al., (2007) el 80 % del ganado bovino del mundo está infestado con garrapatas.

La garrapata *R. microplus*, provoca heridas en la piel (estas predisponen a miasis), anemias, baja condición física, alteraciones reproductivas, disminuye la producción de leche y carne, muerte, parálisis, es agente transmisor y reproductor de hemopatógenos, que provocan tristeza parasitaria en bovinos y ovinos (Nari, 1995; Mora-Hernández, 1998; Suarez et al., 2007; FAO, 2010; Cordón, 2012; Rodríguez et al., 2014; Burger et al., 2014).

Un animal infestado con más de 30 *R. microplus* adultas, ya es perjudicado productivamente (Almada, 2015), es común encontrar animales parasitados por cientos e incluso miles de garrapatas (Manzano et al., 2012).

Según Rodríguez et al., (2014), la pérdida de peso de un bovino parasitado por garrapatas del género *Rhipicephalus*, se calcula en 0.26 kg/garrapata/año y se ha observado que animales infestados con garrapatas, reducen su consumo de alimento (4.37 kg), en comparación con animales no expuestos a garrapatas (5.66 kg).

El grado de infestación está en relación con las lluvias, las altas temperaturas y la carga animal, la fase parasitaria que cumple en el animal tiene una duración de 22 días aproximadamente y cada hembra ovípara alrededor de 4 500 huevos, los que tardan en eclosionar como mínimo 20 días, así en el norte de Uruguay y Argentina es factible encontrar entre 2 y 3 generaciones de garrapatas al año, mientras que en México y América Central es común ver hasta 7 generaciones al año. El control parasitario es más complejo cuantas más generaciones de garrapatas hay en el año (Almada, 2015; Villar, 2012).

En Nicaragua las muertes en bovinos por hemopatógenos transmitidos por garrapatas, se calculan en 60%, en carne las pérdidas van de 15 a 40 kg, y en leche ocurre una merma de 0.3 litros/día por animal (Cordón, 2012), resultados iguales se reportan en Brasil, donde se pierden, por efecto de garrapatas 90. 24 litros por vaca en lactación (Rodrigues y Leite, 2013). En promedio, cada *R. microplus* hembra, es responsable de la pérdida de 0,25 a 1,37g de peso corporal en el ganado bovino (Jonsson, 2006).

El método de control más utilizado actualmente para *R. microplus* es el químico. Entre las principales familias de garrapaticidas sintéticos se encuentran los organofosforados, piretroides, amidinas, fenilpirazolonas, carbamatos y lactonas macrocíclicas, los cuales tienen como efecto común en la garrapata, alterar la transmisión del impulso nervioso en la unión sináptica, mediante diferentes mecanismos de acción que afectan los neurotransmisores o los canales iónicos que intervienen en ella (Domínguez y Cruz, 2014; Díaz, 2012; Ojeda et al., 2011).

La resistencia a garrapaticidas es el mayor problema para controlar esta plaga, dada la disponibilidad cada vez menor de nuevos compuestos acaricidas (Nari, 2011), sumado a esto, los efectos sobre la salud y el medio ambiente de los garrapaticidas químicos, surge la necesidad de un nuevo concepto en el manejo de garrapatas. Este nuevo concepto debe basarse en una reducción drástica de la aplicación de plaguicidas químicos; que genere beneficios a la salud, el medio ambiente y la economía (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016).

El uso irracional del control químico, ha conllevado a que las garrapatas presenten resistencia generalizada a los acaricidas (Almada, 2015; Domínguez y Cruz, 2014; Díaz, 2012; Ruvalcaba, 2009; Acosta et al., 2007; FAO, 2003).

La resistencia ocurre, cuando las mutaciones que se efectúan de manera natural, le permiten a una proporción de la población (alrededor de 1 en 1 000 000 de individuos) resistir y sobrevivir a los efectos de los plaguicidas (Domínguez *et al.*, 2010; FAO, 2003).

Entre los garrapaticidas usados en Nicaragua para el control de garrapatas están: el fipronil (formulación puor on) Amitraz, cipermetrin, Diclorvos y clorpirifos, e inyectables como las lactonas macrocicliclicas, ivermectina, abamectina, doramectina y eprinomectina (formulación puor on). El fipronil de la clase fenilpirazoles ha sido catalogado como carcinógeno por la

Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), produce genotoxicidad y daños al ADN, en células de la médula ósea y linfocitos en ratas (Badgujar et al., 2016).

Los garrapaticidas organofosforados tienen efectos negativos en la salud animal y humana, ya que disminuyen la secreción de insulina y alteran el metabolismo celular de grasas, carbohidratos y proteínas (Karami-Mohajeri y Abdollahi, 2011).

Los plaguicidas organofosforados generan enfermedades cardiovasculares (Hung et al., 2015), efectos negativos en el sistema reproductor masculino (Miranda-Contreras et al., 2013), desarrollo mental retrasado y problemas generalizados del desarrollo en niños (Eskenazi et al., 2007). Clorpirifos afecta la función mitocondrial, promueve la obesidad y la enfermedad del hígado graso (Wang et al., 2021).

La amidina Amitraz, es citotóxico a células del cúmulo y produce apoptosis y deterioro en la maduración de ovocitos en bovinos (Nikoloff et al., 2021), mientras que la doramectina induce efectos citotóxicos y genotóxicos en linfocitos y células del cúmulo en bovinos (Anchordoquy et al., 2018). Además de los problemas de salud pública, el uso irracional de garrapaticidas y altas infestaciones de garrapatas, han propiciado la generación de garrapatas que resisten dosis de plaguicidas (Rosario-Cruz et al., 2009).

Además, una alta exposición ocupacional, accidental o intencional a plaguicidas puede llevar a hospitalización y muerte (Gunnell et al., 2007; Alewu y Nosiri, 2011). Se ha detectado residuos de plaguicidas en leche materna, existe preocupación por la exposición prenatal y sus efectos en la salud de los niños (Damgaard et al., 2006; Lu et al., 2015; Pirsheh et al., 2015).

3.2 Sistema reproductor de *R. microplus*

El Sistema reproductor del gonandro (**macho**) se inicia con un par de testículos de aspecto alargado, que se extienden desde la cercanía del cerebro, hasta aproximadamente el borde posterior de la coxa del cuarto par de patas. Los testículos se continúan en un par de vasos deferentes, los cuales antes de desembocar en la abertura genital, se transforman en sendos conductos eyaculadores (Nuñez et al., 1982).

Según Oliver Jr (1974), la producción del esperma se divide en 4 fases: **1.** Mitosis de la espermatogonia; **2.** Aumento de tamaño y diferenciación de los espermátocitos primarios; **3.** Doble división meiótica y desarrollo parcial de la espermátide; **4.** Diferenciación, y desarrollo final de la espermátide en esperma maduro, luego de ser transferidos a la hembra, esto es, aumento de su longitud y activación fisiológica de los mismos.

La estructura del sistema genital de la teleogina (hembra), consiste en un solo ovario tubular en forma de U en la región posterior del cuerpo (De la vega et al., 2012). El ovario de aspecto alargado, se ubica próximo a la vesícula excretora, extendiéndose en ambos lados del idiosoma, para continuarse en un par de oviductos. La vagina se divide en dos porciones: la cervical, en la cual desembocarán ambos oviductos, y la vestibular que continuará hasta la abertura genital. En relación directa con la porción cervical de la vagina se ubica el receptáculo seminal (Arthur, 1960).

En esta misma porción de la vagina y por delante del receptáculo, se emplazan de manera angulosa un par de glándulas accesorias, cuyo contenido se vuelca en la vagina lubricándola y facilitando de ese modo el pasaje de los huevos (Nuñez et al., 1982).

La cópula se inicia con la ubicación del macho por debajo de la hembra, tratando de ubicar inmediatamente la abertura genital de la hembra. En general, ambos quedan en contacto con sus porciones ventrales, ubicando el macho su primer par de patas entre el primero y segundo par de la hembra y el resto en forma correlativa (Nuñez et al., 1982).

Feldman-Muhsam y Borut (1971) afirman que el macho ubica su capítulo en ángulo recto con respecto a la abertura genital de la hembra, penetrando únicamente, los quelíceros sin sus vainas; si el cuarto artejo de los palpos en los machos estuviera ausente, la cópula no ocurriría.

Luego de algunos minutos de producida la cópula, comienza a expulsarse el espermátóforo (conjunto de espermátides rodeados por una cápsula que transfiere el macho a la hembra durante la cópula) y sale primero el bulbo del mismo, siendo cubierto por un líquido incoloro (Arthur, 1962); para luego, a través de las contracciones de los conductos eyaculadores, continuar saliendo el cuello y la capsula, compuesta esta última por el endo y el ectoespermátóforo en cuyo interior se encuentra las espermátides (Nuñez et al., 1982).

Luego de que el espermátforo se adhiere a la abertura genital de la hembra, el endoespermátforo ya dentro de la vagina, se evagina del ectoespermátforo, permaneciendo este en la superficie para posteriormente perderse. Si la hembra no copula, la misma no completa su alimentación (Nuñez et al., 1982).

A medida que los huevos salen por la vagina, toman contacto en forma transitoria con la denominada glándula de Gené, ubicada por debajo del escudo dorsal y cuyo conducto excretor se abre en la base del capítulo. Esta glándula elimina una sustancia lipídica, que aglutina a los huevos y los protege de la desecación (Nuñez et al., 1982).

3.2.1 Ovario

Según Saito et al. (2005), el ovario de la garrapata *R. microplus* está compuesto por una luz, delimitada por una pared de pequeñas células epiteliales con núcleos redondeados. Los ovocitos de varios tamaños y en diferentes etapas de desarrollo permanecen unidos al ovario a través de un pedicelo celular hasta completar la etapa V. Luego, se liberan en la luz y desde allí hacia el exterior. Los ovocitos se clasifican de I a VI, de acuerdo con la apariencia del citoplasma y presencia de la vesícula germinal, gránulos de yema y corion.

3.2.2 Oviductos

En ambas terminaciones del ovario hay dos tubos delgados plegados, el diámetro de los oviductos oscila entre 75 y 140 μm en las hembras alimentadas hasta 48 horas; se fusionan debajo del receptáculo seminal para formar el oviducto o útero común (Till, 1961).

Durante la alimentación las células oviductuales proliferan y aumentan de tamaño para ubicarse en forma columnar. Los núcleos basales son generalmente amplios en posición central, aunque en algunas partes donde las células están muy apiñadas que parecieran situarse a diferentes niveles, los núcleos son ovales de forma esférica, ricos en cromatina y el citoplasma es finalmente granular (Till, 1961).

La parte basal del citoplasma muestra una apariencia algo estriada, algunas veces en el lumen se puede observar tejido granular y espermátforo, estos últimos viajan del receptáculo seminal donde han estado almacenados desde el tiempo del apareamiento, hacia el ovario, en el cual espera al ovocito, que se encuentra más próximo a la madurez (Till, 1961).

3.2.3 Útero y vagina cervical:

El útero se comunica con la vagina cervical mediante un tubo muscular plegado epitelial: llamado tubo de conexión. En la vagina cervical, además del útero, convergen el receptáculo seminal, las glándulas accesorias tubulares (TAG) y la vagina vestibular. La vagina cervical es muy pequeña, el desprendimiento del receptáculo seminal y el útero, en la vagina forman un ángulo inferior a 90°, y el receptáculo seminal está completamente por encima del útero. Este hecho podría facilitar el camino a los espermioforos, para encontrar el rumbo hacia los oviductos y ovario (De la Vega et al., 2012).

3.2.4 Glándula accesoria lobular:

Es un agrandamiento del epitelio vaginal vestibular que produce una secreción que sirve de capa de impermeabilización inicial para los huevos y también es la fuente más probable de la feromona sexual (Kaufman, 2004; Sonenshine, 1991;).

3.3 Sistema respiratorio

La respiración de las garrapatas se logra a través de un sistema traqueal. En todas las ninfas y adultos, el par de espiráculos se abren por las placas peritremáticas, las cuales yacen lateroventralmente en cada lado del cuerpo de la garrapata, posterior al par de coxa IV (Nuñez et al., 1982).

Las placas estigmáticas, son una formación rígida de la cutícula, se ubican por detrás de las coxas del cuarto par de patas y presentan una forma oval. Los espiráculos están presentes en las ninfas y en los estadios adultos, mientras que, en los estados larvarios el intercambio gaseoso se realiza por la vía cutánea (Nuñez et al., 1982).

3.3.1 Tráquea

según Balashov (1972). El espiráculo está provisto con un mecanismo de cierre, bajo control de nervios, los cuales se abren dentro de la cavidad auricular respiratoria, la cual se estrecha en el principal tronco traqueal.

Del tronco principal surgen ocho troncos traqueales los cuales dan lugar a ramificaciones secundarias a todas partes del cuerpo, las que terminan en ramificaciones o traquéolas que

oxigenan densamente a todos los órganos internos. Histológicamente las tráqueas de garrapatas son similares a la de los insectos, y su línea cuticular está cubierta por una capa filiforme en forma de espiral engrosada anillada, semejante a proglótidos (Balashov, 1972).

De ubicación excéntrica en la misma placa, aparece una zona ligeramente pigmentada que se denomina mácula y que a su vez coincide con la abertura externa de la hostia. Alrededor de la mácula y dentro de la superficie ligeramente cóncava de la placa estigmática, se puede apreciar una serie de orificios de tamaño variado. Estos orificios, además de estar intercomunicados desembocan en un espacio amplio que se ubica por debajo de la hostia y que precisamente se denomina espacio subostial, el cual se continúa en una especie de conducto conocido con el nombre de atrio (Nuñez et al., 1982).

Según Nuñez et al., (1982) el atrio está delimitado por una pared dorsal y otra ventral, las cuales a su vez tienen movimientos gracias a un músculo propio. Estos movimientos contribuyen a regular el intercambio gaseoso. Según Arthur (1960), a partir del atrio se distribuyen las siguientes tráqueas dispersas a ambos lados del idiosoma:

1. Anterior, que se ramifica para penetrar en cada una de las patas y al cerebro.
2. Media- anterior, que llega hasta las glándulas salivales y al aparato genital;
3. Dorso posterior, que es la ubicación de dos pequeñas ramificaciones que en forma conjunta con una quinta lateroposterior, llegan a la porción posterior del idiosoma.

3.4 Sistema circulatorio

Atraves de la hemolinfa circulan tanto los materiales para digerir, como los que serán excretados. Teniendo en cuenta lo que establece Krantz (1978), esta sustancia incolora contiene tres tipos principales de células: 1. Pequeños proleucocitos con un gran núcleo (5 -7.6 μm); 2. Hemocitos ovales y basófilos (10-20 μm) conteniendo glucógeno.3. Hemocitos ameboides y eosinofilos (12-25 micrómetro (μm)).

La hemolinfa circula por el organismo gracias a las pulsaciones del corazón, el cual se extiende desde el extremo anterior hasta los dos tercios posteriores del idiosoma. El corazón está suspendido en el hemocele por un grupo de músculos extrínsecos, todos ellos insertados en la

pared dorsal del idiosoma, y en el otro extremo dos pares de ellos se insertan en las paredes laterales, y un par entre la ostia (Arthur, 1962).

De esta manera, la contracción de este grupo de músculos va a terminar el movimiento diastólico del corazón, mientras que, debido a la contracción de las paredes musculares del mismo, se establecerá la sístole (Arthur, 1962).

A partir del corazón y hacia adelante en dirección al cerebro se extiende una aorta dorsal no muscular, formando el seno periganglionar al dilatarse en las cercanías de aquel. A partir de este sitio continúa en forma de seno hasta la porción posterior de la faringe, rodeando en su trayecto a los nervios que inervan el capítulo y el esófago (Arthur 1962).

3.5 Sistema digestivo

En la cara superior del hipostoma existe un surco recubierto por una membrana que constituye, juntamente con las vainas externas de los quelíceros hacia dorsal, la abertura bucal. Inmediatamente hacia caudal se encuentra el lóbulo labral o labrum, que separa la cavidad faríngea del salivarium, siendo este último el sitio final por donde pasa la saliva una vez que es secretada por las glándulas salivales, y el cual sirve como reservorio (Nuñez et al., 1982).

3.5.1 Faringe

es un órgano desarrollado plenamente para la succión. Presenta sus paredes firmemente esclerosadas y unidas estrechamente a una membrana. Los músculos que intervienen en los movimientos de la cavidad faríngea son dos dilatadores laterales de gran desarrollo; dos dilatadores dorsales más pequeños que los anteriores; dos dilatadores ventrales, y por último un grupo muscular que constituye el musculo constrictor y que alterna su funcionamiento con los músculos dilatadores (Nuñez et al., 1982).

3.5.2 Intestino

Mora-Hernández (1998), afirma que la pared del intestino de *R. microplus*, está constituida por células epiteliales y que su estructura y función varía de acuerdo al grado de alimentación y con las fases de desarrollo del ciclo biológico. En cortes histológicos del intestino se encuentran

células basales, secretoras, basofílicas y digestivas. Los tipos de células que persisten después de la muerte son las basofílicas.

Según Balashov (1972), la organización celular del intestino está compuesta por una membrana basal, cubierta de fibras musculares longitudinales y circulares formando varias capas; mientras que el epitelio intestinal está compuesto por tres tipos de células: células de reserva, digestivas y secretoras .

Externamente, los ciegos intestinales poseen en sus paredes fibras musculares, dispuestas en forma longitudinal y transversal, que son los responsables de los movimientos ameboides que presentan estos elementos durante el periodo de alimentación de la garrapata, permitiendo así la distribución de la sangre en el tracto digestivo y poniéndola en contacto con las enzimas necesarias para facilitar su digestión. Hacia caudal el estomago se continúa con la vesícula excretora, antes de abrirse en la abertura del nefrostoma (Nuñez et al., 1982).

3.5.3 Túbulos de malpighi

Estructuralmente está conformado por células epiteliales aplanadas cuboidales de tamaño medio, los túbulos miden entre 50 y 70 μm de diametro y son translúcidos, en ellos se procesa bioquímicamente la síntesis y excreción de guanina, como producto metabólico final del nitrógeno (Balashov, 1972).

3.5.4 Glándulas salivales

Son estructuralmente, constituidos de varios alveolos: piramidal y varios tipos de células secretoras, los límites entre las células individuales son debilmente distinguible en microscopía óptica. Las células piramidales se encuentran en la mitad anterior de la glándula, tiene forma de pera o poligono irregular (Balashov, 1972).

3.6 Generalidades del control microbiano

El control microbiano se puede definir como el uso de patógenos de insectos para la supresión de plagas. El objetivo de los programas de control microbiano es eliminar o reducir una población plaga por debajo de un nivel económicamente perjudicial (Vega y Kaya, 2012).

El control microbiano implica el uso de (hongos, bacterias, nematodos y virus) patógenos para el control de plagas artrópodos y microbianas; el cual, aplicándose eficientemente, logra un manejo sostenible en la protección Zoo y Fitosanitaria, es amigable con el medio ambiente e inocuo a la salud humana (Merillon y Ramawat, 2012; Reza-Moosavi y Zare, 2012; Vega y Kaya, 2012; Shapiro et al., 2012; Lecuona, 1996; Tanada, 1959; Steinhaus, 1957a).

Sin embargo, Lòpez-Llorca et al. (2008), sostienen que, con el advenimiento de la biotecnología, este concepto debe redefinirse, como el uso de la naturaleza y organismos modificados, genes o productos genéticos para regular o reducir plagas en favor de poblaciones humanas, animales, y cultivos agrícolas, además de proteger a otros organismos benéficos.

Las enfermedades de los insectos se registraron hace más de 2000 años. El estudio de la epizootiología cruza múltiples intereses dentro de la patología de insectos. La epizootiología es la base para estudiar la fluctuación de la enfermedad en las poblaciones naturales de insectos desde una perspectiva ecológica. Sin embargo, la principal motivación de muchos patólogos de insectos no es el estudio de los niveles de enfermedades naturales, si no el uso de enfermedades para suprimir las poblaciones de insectos plagas (Vega y Kaya, 2012).

La atención del hombre a las enfermedades en los insectos se centró primero en las enfermedades del gusano de seda y la abeja, la Emperatriz See-ling-shee (Siling-chi), "la primera y legítima" consorte del Emperador Hoang-tee (Hoangti), notó gusanos de seda enfermos entre los que ella cuidaba en los apartamentos imperiales (Vega y Kaya, 2012; Lord, 2005; Steinhaus, 1956).

Este comienzo histórico de la sericultura práctica ocurrió aproximadamente 2700 años antes del tiempo de Cristo; mientras que los estudios experimentales en patología de insectos comenzaron con la abeja melífera y el gusano de seda, sobre todo con el trabajo de Agostino Bassi y Louis Pasteur. Bassi transmitió *Cordyceps bassiana* artificialmente a gusanos de seda y otras especies (Vega y Kaya, 2012; Lord, 2005; Steinhaus, 1956).

Bassi en 1835 observó que la hemolinfa de las larvas infectadas con *C. bassiana* era tóxica para las larvas sanas, sugirió el uso de infusiones de huevos infectados para controlar las orugas, sugiriendo oblicuamente el uso de microbios (Vega y Kaya, 2012; Lord, 2005; Steinhaus, 1956).

Aparentemente no apareció la propuesta formal publicada de control microbiano hasta 1874, cuando John LeConte incluyó el enfoque en sus amplias recomendaciones en la revista de entomología económica en los Estados Unidos. Aproximadamente en ese momento, Pasteur sugirió que se aplicara pebrina (microsporidia) para el control de la filoxera de la uva, pero la idea no se tomó en cuenta (Steinhaus, 1957).

La idea de usar patógenos para combatir plagas surgió del reconocimiento gradual de que eran contagiosos, y que la mortalidad que ocurría en las epizootias naturales podría contribuir al control de plagas. De Reaumur en 1726, fue el primero en observar un parásito microbiano en una larva. Agostino Bassi (1773-1856), elucidó el agente etiológico y demostró la capacidad infecciosa del hongo *Cordyceps bassiana* en el gusano de la seda, *Bombix mori* (Vega y Kaya, 2012; Lord, 2005; Steinhaus, 1956).

Mientras los estadounidenses estaban experimentando con la levadura, el microbiólogo ruso, Elie Metchnikov, centró su atención en el escarabajo del grano, *Anisoplia austriaca*. Su observación de que los ciclos de población del escarabajo correspondieron a brotes de enfermedades, lo llevaron a buscar patógenos cerca de Odessa en Ucrania, donde encontró bacterias, un nematodo y un hongo, al que se refirió como muscardina verde (*Entomophthora anisopliae*), ahora conocido como *M. anisopliae* (Steinhaus, 1956).

Elie Metchnikov sugirió que se aplicaran cadáveres de insectos muertos por hongos y el suelo recogido de locales epizooticos, dispersando conidios en campos infestados de escarabajos (Steinhaus, 1956). Después de encontrar *M. anisopliae* en otras regiones de Rusia y en el curculionidae de la remolacha azucarera (*Cleonus punctiventris*), en el que estimó una mortalidad del 40%, descubrió que los conidios podrían ser producidos económicamente en puré de cerveza esterilizada (Steinhaus, 1956).

En 1924 Speare notó una destrucción de grandes poblaciones del ácaro, de la roya de los cítricos (*Phyllocoptruta oleivora*) (Ashmead) en pomelo, en Florida-EE. UU. Este efecto se atribuyó a la presencia del hongo *Hirsutella thompsonii* (Leo et al., 2008), mientras que d'Herelle en 1911, se acredita con el primer reconocimiento de una epizootia bacteriana en insectos y el primer intento de usarlos en el control microbiano (Tanada, 1959).

La Agencia de Protección Ambiental de EE. UU, considera que los plaguicidas microbianos en comparación con los plaguicidas químicos sintéticos, tienen una toxicidad muy baja para los seres humanos y otros vertebrados, una rápida descomposición que conduce a una reducción de los residuos y la contaminación ambiental, y una alta especificidad de especies que conduce a una reducción de los efectos no objetivo (Leahy et al., 2014).

En el uso de los micoacaricidas contra las garrapatas se hace hincapié en la aplicación tópica, el entorno de la piel del hospedero y cómo mejorar el rendimiento de los patógenos en este entorno (Leo et al., 2008).

3.6.1 Hongos en el control microbiano de plagas agrícolas y veterinarias

Los hongos habitan el planeta desde hace unos 2 400 millones de años (McLoughlin, 2017), desempeñan un papel crucial en los ecosistemas naturales (Leger y Wang, 2020); actúan como antagonistas de patógenos de plantas, colonizadores de la rizósfera, endófitos (Vega et al., 2009) y son responsable de una gran proporción de las enfermedades que afectan a los artrópodos (Leger y Wang, 2020).

Los hongos que ocasionan enfermedades en los artrópodos son conocidos como hongos entomopatógenos; son capaces de degradar, penetrar y asimilar la cutícula del artrópodo, utilizando una combinación de enzimas degradantes y presión mecánica (Butt et al., 2016; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013). Según Suh et al., (2001) la entomopatogenicidad evolucionó independientemente en Cordycipitaceae, Clavicipitaceae y Ophiocordycipitaceae (Sordariomycetes: Hypocreales), estos entomopatógenos se agrupan entre: fitopatógenos, endófitos y micoparásitos, estrechamente relacionados y consistentes con transiciones repetidas (cambio de hospedador) entre plantas, hongos y artrópodos hospedadores.

Los hongos entomopatógenos utilizan la trehalosa como alimento. La trehalosa es el azúcar clave para la nutrición de los artrópodos. El agotamiento de trehalosa en los insectos enfermos por hongos, significa que un insecto infectado, está siendo muerto de hambre durante las etapas finales del desarrollo de los hongos (Humber, 2008).

El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, Hypocreales: Clavicipitaceae (NCBI, 2020), comprende un clado monofilético con el patógeno de nematodos *Pochonia*

chlamydosporia; se encuentra distribuido globalmente, y puede pasar de asociaciones beneficiosas con plantas (colonizadores de la rizósfera y endófitos de raíces), a asociaciones patógenas con protistas, nematodos y artrópodos (Leger y Wang, 2020).

M. anisopliae y *M. acridum* han estado a la vanguardia de los esfuerzos para desarrollar alternativas de control microbiano frente a los insecticidas químicos, en los programas agrícolas y de control de vectores de enfermedades (Sant et al., 2019; Butt et al., 2016).

Los plaguicidas microbianos basados en hongos entomopatógenos se integran fácilmente en el creciente mercado de alimentos orgánicos certificados (Arthurs y Dara, 2019), y las plagas pueden desarrollar una resistencia más lenta a los plaguicidas microbianos que a los plaguicidas químicos (Dubovskiy et al., 2013). Uno de los programas de control microbiano más exitosos ocurre en Brasil, donde cada año, se tratan dos millones de hectáreas de caña de azúcar, con *M. anisopliae* para controlar el salivazo (Sant et al., 2019).

El impacto ecológico de *M. anisopliae* y su potencial como agente de biocontrol ha sido mejorado por el descubrimiento de que coloniza las raíces de las plantas donde puede actuar simultáneamente como biofertilizante y bioplaguicida para impulsar el crecimiento de las plantas (Hu y Leger, 2002).

M. anisopliae ha evolucionado con muchas familias de genes expandidos de proteasas, quitinasas, citocromo P450, policétido sintetasas y sintetasas peptídicas no ribosómicas para la degradación de la cutícula, la desintoxicación y la biosíntesis de toxinas que pueden facilitar su capacidad de adaptarse a entornos heterogéneos (Leger y Wang, 2020).

Metarhizium spp produce una secuencia de enzimas durante la penetración, comenzando con lipasas y citocromo P450 que se dirigen a componentes epicuticulares, y luego diversas proteasas promiscuas que solubilizan proteínas procuticulares. Las subtilisininas ayudan en los procesos de infección de *M. anisopliae* al degradar las cutículas del hospedero, proporcionar nutrición y desactivar péptidos antimicrobianos que podría haberse importado de bacterias mediante transferencia horizontal de genes (Leger y Wang, 2020).

Según Rodríguez et al., (2014) se han desarrollado 171 micoplaguicidas, alrededor del mundo, de los cuales únicamente tres productos contienen *M. anisopliae* para el control de garrapatas.

Los hongos son patógenos naturales de garrapatas, con sus propiedades adhesivas, y su capacidad de digerir la cutícula, pueden constituir un ingrediente adecuado de los bioacaricidas (Lonc et al., 2014).

Los hongos que han sido evaluados para el control de garrapatas son; *I. fumosorosea* (Oporta, 2017; Angelo et al., 2012; Gindin et al., 2001), *C. bassiana* (Oporta, 2017; Sônia et al., 2012; Ren et al., 2012) y *M. anisopliae* (Oporta, 2017; Quinelato et al., 2012; Schrank y Vainstein., 2010), los cuales han demostrado tener potencialidad para el control de distintas fases de desarrollo de la garrapata (huevo, larva, ninfa y adulto) tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. A baja temperatura y baja humedad, pueden parasitar la garrapata a través del nefrostoma, estas se ven afectadas por micelios fúngicos y por sus toxinas (Samish y Rehacek, 1999).

El proceso infeccioso de los hongos entomopatógenos en la garrapata inicia con la adherencia del conidio en el cuerpo de ésta, continuando con la formación de un tubo germinativo y formación del apresorio, el cual inicia la fase de penetración, rompe y atraviesa la cutícula, las hifas crecientes alcanzan el hemocele, éstas se diferencian en blastosporas para evadir el sistema inmune de la garrapata y luego regresan a su formación hifal, ocurriendo la colonización de los órganos internos. Las hifas emergen a la superficie del espécimen muerto y se forman conidióforos, en los cuales se producen los conidios (Schrank y Vainstein., 2010).

El avance del control de garrapatas basado en aplicaciones de hongos entomopatógenos requiere un conocimiento profundo del proceso patogénico y sus características correspondientes durante todas las etapas de desarrollo. Los entornos naturales en los que las garrapatas ovipositan son relativamente favorables para la infección por hongos. La mayoría de las garrapatas ixódidas protegen sus huevos sensibles, al ponerlas en cohortes grandes, en áreas bien protegidas, por ejemplo: debajo de piedras, hojas, arena profunda y grietas (Ment et al., 2010).

El hongo *M. anisopliae* causa un porcentaje muy alto de mortalidad del huevo y reduce drásticamente su incubabilidad. Además, muchas de las larvas recién nacidas están contaminadas con conidios de huevos infectados y a menudo mueren en varios días (Ment et al., 2010).

M. anisopliae no causa efectos colaterales en los animales de sangre caliente ni al medio ambiente; se han realizado estudios en los que se demuestra que sólo exhibe toxicidad en células de insectos y no en células humanas, bacterias o protozoarios, *M. anisopliae* cepa Ma2 no causa efecto de patogenicidad, toxicidad o alergia y no se observan pérdidas del apetito, diarrea, ni muerte en ratas cepa *Wistar* y en condiciones de campo afecta específicamente a sus hospederos blanco, reduciendo la posibilidad de afectar a otros organismos presentes en el campo (Ojeda *et al.*, 2011).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del estudio

La presente investigación es de tipo experimental, se estudió el proceso de infección y colonización del hongo *M. anisopliae* en la garrapata *R. microplus*.

Se realizó en el laboratorio de Hongos Entomopatógenos, de la Universidad Nacional Agraria, en el Laboratorio de Patología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN León, y en el Laboratorio de Biología de la Universidad Nacional Agraria-Juigalpa, Chontales, durante el periodo 2019-2022.

4.2 Colecta de muestras

Las garrapatas adultas (teleoginas), se obtuvieron siguiendo la metodología utilizada por Oporta (2017) y Alvarado-Artola y Dixon-Méndez (2010); de ganado bovino infestado naturalmente con garrapatas y criado extensivamente en pasturas naturales y sin aplicación de baños ni medicamentos parenterales garrapaticidas previo de 60 días, en la finca San Antonio ubicada en la Comunidad Colonia Rio Rama, Municipio-El Coral Chontales, propiedad del Sr. Juan López Martínez.

En la identificación taxonómica de los especímenes, se utilizó la clave pictórica por Benavidez y López (2005) y la clave dicotómica para la identificación morfológica de familias, géneros y especies de garrapatas, presentada por Dantas-Torres et al. (2019).

4.3 Infección y colonización de *M. anisopliae* en *R. microplus*

El proceso infeccioso en huevos y adultos de la garrapata *R. microplus* por *M. anisopliae*, fue estudiado usando técnicas básicas de inoculación, tinción y microscopía. Se realizó con el objetivo de evidenciar las patologías, que ocurren en los tejidos y órganos de la garrapata *R. microplus*, al ser parasitada por el hongo *M. anisopliae*.

4.3.1 Microscopia de luz compuesta, para el estudio de infección y colonización de *M. anisopliae* en *R. microplus*

En la preparación de las teleoginas para el estudio histopatológico se usó la metodología presentada por Valerio-Garcia et al., (2004). Se utilizaron 9 grupos, compuestos por 10

teleoginas de *R. microplus*. En cada grupo, las teleoginas fueron lavadas con agua destilada estéril y desinfectadas en solución de hipoclorito de sodio al 1%. Los restos de hipoclorito de sodio se eliminaron, enjuagando las teleoginas abundantemente con agua destilada estéril, colocándolas luego en papel filtro estéril para eliminar el exceso de agua.

Las garrapatas adultas se inocularon mediante el método de inmersión durante 1 minuto, en una cabina de bioseguridad Clase 2A, marca Labconco. Se utilizó una concentración de 1×10^8 conidios/ml de *M. anisopliae*, de dos semanas de edad, cultivado en Papa Dextrosa Agar (PDA) en platos Petri de 90 mm, y se mantuvieron en cámara húmeda a 25°C, durante nueve días. La cámara húmeda consistió en papel filtro estéril y humedecido con agua destilada estéril.

Para determinar la concentración de conidios se utilizó la metodología sugerida por Monzón (2001), mediante la cámara Neubauer, contando el número de conidios en los cuadrados secundarios, procediendo a realizar el cálculo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{No. de conidios } x \text{ ml} = \text{No de conidios en el cuadro} * \text{factor de camara} * \\ \text{factor de dilución}$$

Para ajustar la solución a la concentración deseada se usó la fórmula presentada por Lecuona (1996).

$$\frac{Cf \times Vf}{Ci} = Vi$$

Donde:

Cf = concentración final

Vf = volumen final

Ci = concentración inicial

Vi = volumen inicial

Se preparó un grupo testigo de 10 teleoginas, y se manejó de la misma forma que el grupo de histopatología, pero sin realizar inoculación con el hongo.

Las 10 hembras de cada grupo se colocaron en cámara húmeda en condiciones de humedad de 90 % y temperatura de 25 °C. Los tiempos de cosecha de cada grupo de teleoginas y sus respectivos controles, se establecieron en una y 18 horas después de la inoculación y luego cada 24 horas durante siete días.

Después del tiempo establecido las teleoginas se inyectaron por el espiráculo con una jeringa de 1 ml de capacidad, con 100 µl de formol al 10% y se colocaron en tubos eppendorf de 1ml, que contenían formalina al 10%. Las teleoginas se dividieron en dos lotes: uno destinado a la preparación histológica y otra para la microscopía de luz. Cada lote estaba compuesto de cinco teleoginas.

Las garrapatas utilizadas en microscopia de luz compuesta, se les retiró el tegumento y patas, bajo el lente de un estereomicroscopio marca LW Scientific, modelo Z4; con el bisturí, se realizaron cortes del tegumento y de las patas de *R. microplus*, de 0.5 mm², que luego se tiñeron con azul de anilina 1% y se analizaron con el microscopio de luz, marca Motic, modelo Panthera C, en busca de estructuras fúngicas, como conidios y apresorios. Se tomaron microfotografías en el rango de 40x a 1600x, con una cámara Bio vid +1080 HD, en un monitor RCA, UHD 4K.

La revisión se realizó a las 12 horas después de la inoculación y posteriormente, cada 12 horas, durante 96 horas consecutivas. Se registró la presencia de conidios, así como los lugares anatómicos de la presencia de conidios, conidios germinados, crecimiento hifal, y los procesos asociados con la infección de *M. anisopliae* en *R. microplus*.

4.3.2 Examinación mediante microscopía de luz estereoscópica

Las garrapatas inoculadas se muestrearon cada 24 horas con un estereomicroscopio marca LW Scientific, modelo Z4, durante 168 horas, registrando los signos y síntomas presentados por efectos del hongo.

4.3.3 Histopatología de la infección y colonización de *M. anisopliae* en *R. microplus*

Los cortes histológicos se prepararon de acuerdo a Saravia y Vindell (2013) y Valerio-Garcia et al. (2004), de acuerdo a la siguiente metodología:

1. Se lavaron los especímenes con agua destilada y se secaron con papel filtro
2. Se inyectó formalina 10 % PA (puro para análisis) directamente a través de los espiráculos y/o vía anal en las hembras ingurgitadas a una dosis de 50 a 150 µl con una jeringa de 1 ml y una aguja 25 g.

3. Se diseccionó bajo microscopio de disección con 15 X de aumento, usando hojas de bisturí número 11. Comenzando la incisión en el surco marginal, sin pasar por el idiosoma y separar el escudo dorsal de los festones, continuando la incisión en el surco genital hasta el ángulo escapular, luego se separa la capa con ayuda de pinzas de relojero y así exponer los órganos internos para ser conservados nuevamente en formalina 10 % PA.
4. Para deshidratar los tejidos se pasaron por 2 alcoholes al 70 %, 1 alcohol al 80 %, 1 alcohol al 98 % y un alcohol al 100 % y dos parafinas, con 15 minutos entre cada pase.
5. Con la ayuda de la maquina incluidora en parafina, se procedió a la inclusión de los tejidos en cassette que se utilizan para formar bloques de parafina, apoyándose con el mechero para evitar que el tejido se adhiera a las pinzas, las muestras incluidas se refrigeraron por diez minutos para acelerar el proceso de solidificación de la parafina, los tejidos se cortaron de forma transversal y longitudinal.
6. Una vez los tejidos solidificados en los bloques, se procedió a realizar cortes con un grosor de 3 a 5 micras, en el micrótomo marca Shandom y cuchillas de cortar marca Leica.
7. Al finalizar los cortes estos se trasladaron al baño maría a 60 grados, para facilitar su fijación a los porta-objetos, luego los porta objetos se trasladan a un horno a una temperatura de 60 ° C para fijar el tejido y remover el excedente de parafina, por un periodo de 15 a 20 minutos.

4.3.4 Tinción de los cortes

1. Las muestras se sumergieron en xileno tres veces por tres minutos para limpiar el exceso de parafina.
2. Después de lavadas con xileno, las muestras se sumergieron cinco veces durante 5 minutos en alcohol al 100 %.
3. Después se pasaron por hematoxilina por 10 segundos y se enjuagaron con agua, hasta retirar el exceso de hematoxilina

4. Posteriormente se sumergieron en hidróxido de amonio para que la coloración de la hematoxilina no sea retirada por la eosina
5. Las muestras se sumergieron en eosina durante 4 o 5 minutos.
6. Finalmente las muestras se sumergieron tres veces en alcohol al 100% por periodos de dos o tres minutos cada uno.
7. Se colocaron nuevamente al horno a 60 °C por 10 minutos.
8. Para preservar la muestra se aplicó bálsamo de Canadá hasta cubrirla y se colocó sobre un cubre objeto. Después de 10 a 15 minutos de secado las láminas ya estuvieron listas para el microscopio.

Las láminas histológicas se analizaron con la ayuda de un microscopio marca Olympus modelo BX50 Fluorescence y con un microscopio marca Motic, modelo Panthera C. Se registró y describió el daño ocasionado en los órganos y tegumento, así como las diferentes células fúngicas encontradas.

4.4. Capacidad de adhesión de conidios en el tegumento de la garrapata *R. microplus*

Veinte teleoginas se inocularon con 1×10^8 conidios/ml, mediante el método de inmersión; y se mantuvieron en cámara húmeda a 24°C. Se realizó prueba de adhesión de conidios en órganos externos de *R. microplus*, siguiendo la metodología de Wang y Leger, (2007), mediante un lavado con tween 80 al 0.05%.

Después de la incubación durante ocho horas (para inducir la hinchazón de las esporas y el inicio de la germinación), las garrapatas se diseccionaron con la ayuda del estereomicroscopio y se extrajo la cutícula y patas, ver figura 1.; en estos órganos se contó el número de conidios, en cinco campos objetivos, con un microscopio óptico bajo lente objetivo 40X y lente ocular 10X, antes y después de lavar los conidios menos adherentes en Tween 80 al 0.05% durante un minuto. La adherencia de conidios se estimó usando el número promedio de conidios por campo objetivo después del lavado, en comparación con el recuento promedio antes del lavado.

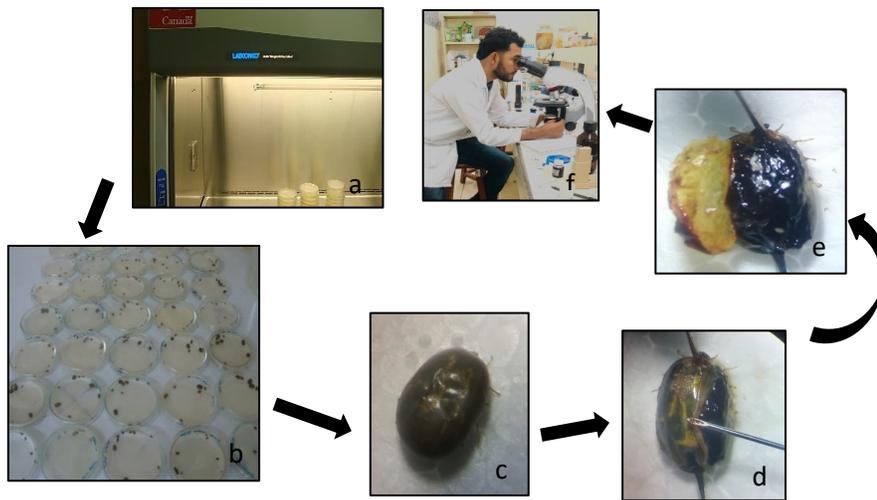


Figura 1. Metodología empleada para la prueba de capacidad de adhesión. a). inoculación, b). incubación. c). Colocar bajo el lente del estereomicroscopio. d). Fijar con alfileres y retirar el tegumento. e). Tegumento retirado. f). Análisis del tegumento con el microscopio

4.5 Colonización de la hemolinfa de *R. microplus* por *M. anisopliae*

Para verificar la presencia de *M. anisopliae* en el hemocele de *R. microplus*, se extrajo hemolinfa de 10 teleoginas, a los cinco o seis días después de inoculadas.

La extracción de la hemolinfa se realizó con ayuda de un microestereoscopio, pinzas, bisturí y vasos capilares.

Se realizó un corte en la coxa del primer par de patas y con un tubo capilar se extrajo la hemolinfa, se colocó en un portaobjeto y se dejó secar durante cinco minutos, luego se aplicó 100 microlitros de la tinción azul de anilina 1%, para teñir estructuras fúngicas.

La muestra se observó con un microscopio óptico, a una magnificación de 64x, 160x, 460x y 1600x, buscando estructuras como blastosporas, conidios e hifas de *M. anisopliae*. Se registró la presencia de cuerpos hifales, blastosporas y hemocitos.

4.5.1 Infección de *M. anisopliae* en ovario y ovocitos de *R. microplus*

Para el diagnóstico de la infección en ovario y ovocitos de *R. microplus* se realizó la inoculación de 10 teleoginas, usando la misma metodología del acápite 4.4. A los 5 o 6 días después de la inoculación con *M. anisopliae*, se procedió a diseccionar las teleoginas, siguiendo la metodología propuesta por Edwards et al. (2009) con algunas modificaciones; a continuación, se describe la metodología.

1. Se preparó una placa de Petri de 6 mm, vertiendo parafina derretida en el fondo y se dejó enfriar hasta su solidificación.
2. Se derritió la parafina aplicando calor brevemente al centro de la pequeña placa de Petri llena de parafina, utilizando una cuchara caliente.
3. Una vez que la parafina estuvo tibia y comenzó a derretirse, se sujetó suavemente la garrapata con unas pinzas, presionando sus patas y ventrum en la parafina caliente inmovilizándola y restringiendo sus patas.
4. La garrapata se cubrió con una gota de solución salina tamponada con fosfato (PBS), para evitar la desecación de los tejidos.
5. Se retiró el scutum con un microbisturí cortando primero a través del escudo dorsal en el punto más anterior, justo distal a la base del capítulo.
6. Se continuó cortando alrededor del borde del scutum, insertando el microbisturí en la parte posterior del tegumento, levantando el exoesqueleto dorsal utilizando unas pinzas sostenidas en una mano mientras disecciona cuidadosamente los músculos y el tejido conectivo, conectados con el microbisturí en la otra mano, cortando el dorso y retirándolo por completo.
7. En este punto, el tejido conjuntivo y las tráqueas son evidentes y, por lo general, deben extirparse para observar estructuras más profundas.
8. Observar las glándulas salivales anteriores. Estas son estructuras claras con forma de uva en el extremo proximal de la garrapata. También hay otros conjuntos de glándulas salivales ubicadas cerca del intestino medio.
9. Observar el intestino. El intestino es una estructura en forma de araña de color rojo oscuro.
10. Se pueden observar tráqueas que se originan en las placas espiraculares y deben diferenciarse de los túbulos de Malpighi.
11. Observar los túbulos de Malpighi. Estos túbulos son estructuras claras, delgadas y en forma de tubo que a menudo contienen urea, que aparece blanca dentro de los túbulos. El tejido

conectivo o las tráqueas también pueden parecer blancas, pero son planas y tenues en lugar de tener forma de tubo. Las tráqueas se originan en las placas espiraculares, pero el tejido conectivo a menudo carece de una organización obvia.

12. Observar los ovarios. Aparecen como una estructura en forma de U invertida distal al saco rectal. Luego de obtener los ovarios y ovocitos, estos se colocaron en un portaobjetos y se tiñeron con azul de anilina, para su observación al microscopio con los objetivos de 4 y 10 X.

4.5.2 Histopatología de la infección y colonización por *M. anisopliae* en huevos de *R. microplus*

Los huevos se tomaron de la oviposición de garrapatas inoculadas con *M. anisopliae*. Los huevos colonizados por *M. anisopliae*, se colocaron en portaobjeto y se tiñeron con azul de anilina, para visualizar hifas y o células fúngicas, se observaron al microscopio de luz a 40, 100, 400 y 1000 X.

Además, se tomaron huevos con presencia del hongo, y se colocaron en tubos eppendorf que contenían un ml de formol al 10%, para su preservación y posterior análisis histopatológico. Los cortes histológicos y las tinciones se realizaron a como se explica en los acápite 4.3.3 y 4.3.4. Este mismo procedimiento se realizó con huevos de garrapatas no inoculadas con *M. anisopliae*.

Para el análisis de las láminas histológicas se utilizó un microscopio marca Olympus modelo BX50 Fluorescence y con un microscopio marca Motic, modelo Panthera C. Se registró y describió el daño ocasionado en los huevos infectados, así como las diferentes células fúngicas encontradas en los huevos.

4.6 Variables evaluadas

- a) Tiempo (momento) de germinación del hongo en el cuerpo de la garrapata, después de la inoculación (d.i).
- b) Tiempo (momento) de penetración del hongo en el cuerpo de la garrapata d.i.
- c) tiempo de muerte de la garrapata d.i.
- d) órganos y tejidos de *R. microplus* afectados por *M. anisopliae*
- e) Presencia o ausencia de *M. anisopliae* en los tejidos de *R. microplus*
- f) Parasitismo de *M. anisopliae* en huevos de *R. microplus*

4.7 Recolección de datos

Los datos de la infección y colonización se realizaron al momento del muestreo de las garrapatas inoculadas, registrándose los procesos ocurridos, así como el tiempo en que se presentaban los eventos. De los cortes histológicos se tomo nota de la descripción del daño realizado por *M. anisopliae*.

4.8 Análisis de datos

Los datos de adhesión se cuantificaron y promediaron, el registro de información de infección colonización e histología, se realizo mediante descripción de los eventos ocurridos en la garrapata

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Infección y colonización de *M. anisopliae* en *R. microplus*

5.1.1 Examinación mediante microscopía de luz estereoscópica

Las garrapatas inoculadas con *M. anisopliae* y muestreadas durante 175 h, mostraron signos externos de infección por el hongo. Las garrapatas no infectadas presentaban una cutícula translúcida, a través de la cual se podía ver el movimiento de los túbulos de Malpighi. Este signo vital fue usado para determinar la muerte de la garrapata, estos mismos resultados encontraron (Leemon y Jonsson, 2012), al estudiar la invasión de *M. anisopliae* en *R. microplus*.

Las garrapatas inoculadas con agua destilada estéril, no presentaron infección por hongos e iniciaron la oviposición entre el día dos y tres después del tratamiento, los huevos se aglutinaron formando una masa. Las garrapatas tratadas con el hongo iniciaron la oviposición, sin embargo, esta no se completó, ya que las teleoginas se enfermaron y murieron por efecto del hongo (figura 2. a), evitando que los nutrientes adquiridos durante la alimentación de la garrapata, fuesen usados para su reproducción, este comportamiento se ha observado en garrapatas tratadas con hongos como *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea*, el hongo al afectar los órganos internos de la garrapata, esta disminuye la oviposición y al ocasionar su muerte, la oviposición se interrumpe (Oporta, 2017).

A medida que la infección por el hongo progresaba, la cutícula perdió el brillo y se tornó débil y un líquido emanaba de las lesiones ocasionadas por el hongo, principalmente en las áreas más degradada de la cutícula (figura 2b). Este debilitamiento de la cutícula se debe principalmente a la producción enzimática de quitinasas, lipasas y proteasas, así como el daño mecánico de la presión y alimentación de las hifas del hongo (San-Aw, y Mun-Hue, 2017). Al respecto Leemon y Jonsson (2012), reportaron este fenómeno en garrapatas *R. microplus* inoculadas con *M. anisopliae*; así mismo Arruda et al. (2005) estudiando las alteraciones morfológicas ocurridas en *R. microplus* cuando es colonizada por *M. anisopliae*, encontraron sitios en la cutícula donde se observa una depresión suave en el punto de penetración del apresorio.

En nuestro estudio observamos que las garrapatas inoculadas con *M. anisopliae* la mayoría murieron entre las 120 y 168 horas después de la inoculación. Estos resultados se reportaron por

Oporta (2017), al evaluar la mortalidad en *R. microplus* aplicando diferentes concentraciones de conidios de *M. anisopliae*, y por Leemon y Jonsson (2012), al estudiar los efectos patológicos de *M. anisopliae* en *R. microplus*. Se consideró que las garrapatas habían muerto cuando ocurría el cese del movimiento de los túbulos de Malpighi (Leemon y Jonsson, 2012).

En la cutícula de las garrapatas inoculadas se presentó una emergencia de hifas entre las 120 y 168 horas, a menudo un día anterior de la colonización externa, algunas garrapatas presentaban signos vitales, pasado 24 horas, la proliferación hifal se extendía por todo el cuerpo de la garrapata (figura 2a y 2b). Las hifas presentaban ramificación y entrecruzamiento hasta convertirse en un denso micelio, la conidiogénesis se inició 120 h después de la inoculación.

La conidiogénesis era evidente por la coloración verde que se iba acrecentando en el micelio que cubría el cuerpo de la garrapata (figura 2b). A medida que se producían conidios, el hongo continuaba la alimentación, ya que la garrapata primeramente estaba hinchada, pero transcurridas 36 a 48 horas después de colonizada externamente, era convertida en una momia de aspecto seco y duro y los conidios se agrupaban como en forma de galleta. Al realizar un movimiento mínimo al cuerpo momificado, los conidios fácilmente se desprendían del cuerpo de la garrapata (figura 2c).

Esta fase de alimentación se considera saprofítica, ya que el organismo del que el hongo se alimenta ha muerto, se observa que el hongo absorbe los nutrientes del cadáver, y los utiliza para seguir su reproducción, esto debido al incremento de micelio y esporas presentes en el cadáver de la garrapata (San-Aw y Mun-Hue, 2017). La garrapata totalmente momificada, únicamente se reconocía por la presencia del escudo dorsal, hipostoma y los 4 pares de patas. a diferencia de las garrapatas inoculadas con agua destilada estéril no presentaron infección por hongos y únicamente murieron entre los 3 y 5 días después de finalizada la oviposición (figura 3).

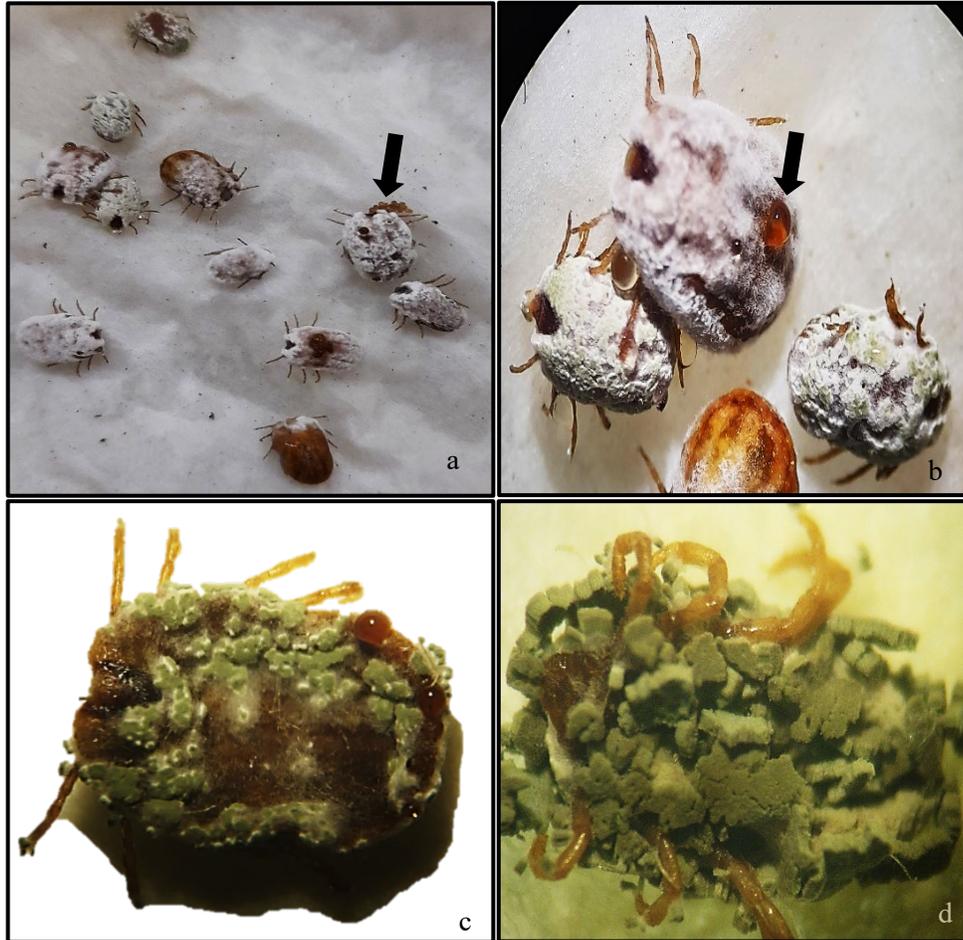


Figura 2. Progresión de signos externos de la Infección por *M. anisopliae* en *R. microplus*. a). Micelio de *M. anisopliae* emergiendo en la cutícula de *R. microplus* y nula o poca oviposición en las hembras infectadas, la flecha señala los pocos huevos ovipositados antes de la colonización. b). Líquido emergiendo del cuerpo de la garrapata debido al debilitamiento de la cutícula. c). inicio de la conidiogénesis. d). Fase reproductiva y saprofitica de *M. anisopliae* que finaliza con la momificación de *R. microplus*.

Las garrapatas inoculadas con agua destilada estéril, iniciaron a ovipositar entre los dos y tres días después de inoculados, sin embargo a los 15 y 18 días luego de la inoculación, algunos especímenes, todavía realizaban oviposición, en la fase de finalización de oviposición, presentaban aspecto sano (figura 3a y 3b) y la totalidad del contenido del cuerpo de la hembra era convertido a huevos, los cuales a medida que se expulsaban se aglomeraban, formando masas, la eclosión de los huevos ocurrió entre los 28 y 30 días después de la inoculación.

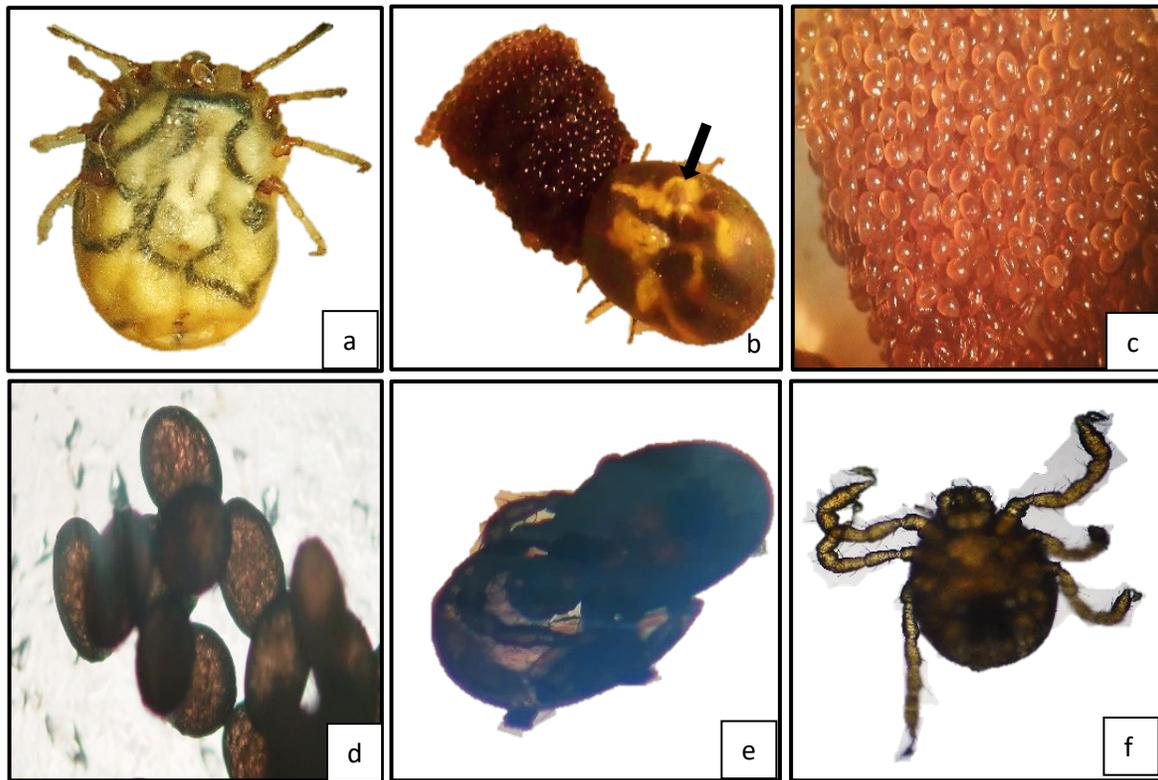


Figura 3. Garrapatas tratadas con agua destilada estéril. a). Garrapata con aspecto sano sin presentar infección por hongos. b). Hembra en plena oviposición y tubos de Malpighi activos. La flecha señala los tubos de Malpighi. c). Masa de huevos de aspecto normal. d). Incubación de huevos y desarrollo embrionario e). Eclosión de huevos y salida de larva. f). Larva emergente de *R. microplus*.

5.2 Capacidad de adhesión de *M. anisopliae* en la cutícula de *R. microplus*

El porcentaje de conidios adheridos al tegumento de *R. microplus* fue del 98%. Los conidios una vez adheridos no se separaron de la cutícula, al contrario, continuaron el desarrollo de su ciclo biológico, como es la geminación, la germinación inicio entre las 14 y 18 horas después de la inoculación. Los conidios se encontraron adheridos en las patas, zonas inter segmentales, área ventral y dorsal de *R. microplus*, ver figura 4b. Hallazgos similares fueron reportados por Arruda et al. (2005), reportaron que los conidios de *M. anisopliae* se adhieren cualquier sitio de *R. microplus*; sin embargo, observaron cierto grado de preferencia en las patas de la garrapata.

La capacidad de adherirse al tegumento de *R. microplus* fue del 98 %, considerándose una alta capacidad de adhesión. Mientras que el número de conidios contados en el campo del microscopio fue de 78.6 y la adhesión de conidios por campo fue del 77.4. De forma general únicamente el 2 % de los conidios adheridos al tegumento fueron removidos por el efecto químico del Tween 80. Consideramos que esta cepa fúngica tiene gran potencial de adhesión.

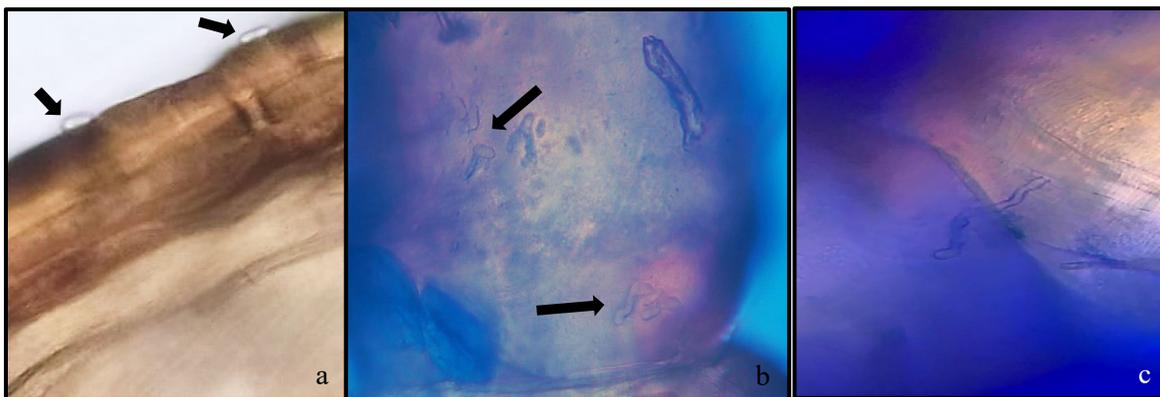


Figura 4. Adhesión de conidios de *M. anisopliae* en la cutícula de *R. microplus* después del lavado con tween 80. A.). Conidios adheridos en el borde de la cutícula, 400X. B.). Conidios germinados y adheridos en la pata de *R. microplus*, 400X. C. conidio germinado y adherido en área intersegmental de una pata de *R. microplus*, 400X.

Wang y Leger. (2007) realizando ensayos de adhesión de conidios de *M. anisopliae* mostraron que más de 90% de los conidios se adhirieron a la cutícula de langosta, Orthoptera: Caelifera , epidermis de cebolla, alas de mosca y epidermis de apio.

M. anisopliae contiene los genes MAD1 y MAD2. Estos genes son los principales responsables de la capacidad de *M. anisopliae* para adherirse a insectos hospederos y superficies de plantas (Wang y Leger, 2007).

La capacidad de un patógeno de artrópodos de adherirse a su hospedero es vital para que tenga éxito en ocasionar la enfermedad. La adhesina MAD1 y las hidrofobinas se encargan de la adherencia a la cutícula. La unión entre el conidio y el tegumento se consolida mediante el mucilago extracelular. Las adhesinas contienen regiones ricas en treonina-prolina que median la adhesión y sitios de anclaje de glicosilfosfatidilinositol que localizan las proteínas en la membrana plasmática (Leger y Wang, 2020).

Wang y Leger (2007) afirman que el gen MAD1 es esencial para que ocurra la adhesión. Según estos autores la expresión de MAD1 permitió que las células de levadura se adhirieran a la cutícula del insecto, mientras que la pérdida de MAD1 en *Metarhizium robertsii* ocasionó disminución de la adhesión a la cutícula del insecto, y además disminución de la germinación y la producción de blastosporas.

El reconocimiento y la adherencia a la superficie del hospedero son los pasos iniciales clave para la colonización. Las interacciones hidrofóbicas mediadas por las hidrofobinas son responsables de la adherencia inicial de los conidios a la cutícula del artrópodo hospedero (Zheng et al., 2012).

A medida que las esporas se hinchan o hidratan antes de la germinación, la capa de hidrofobina se desintegra y se depositan nuevos materiales en la pared celular del hongo (Binneck et al., 2019). Esto coincide con la aparición de MAD1, lo que sugiere que su papel en la adhesión es reemplazar las hidrofobinas con interacciones más estrechas y específicas. El gen MAD1 es indispensable para que se dé una infección de *M. anisopliae* en la garrapata (Wang y Leger, 2007).

5.3 Microscopia de luz compuesta, para el estudio de infección y colonización de *M. anisopliae* en *R. microplus*

El análisis microscópico de luz, permitió ver conidios de *M. anisopliae* adheridos a la cutícula de la garrapata, después de seis horas de inoculadas. Se encontró conidios de *M. anisopliae*

adheridos en el área ventral, patas y setas. Los conidios adheridos, empezaron a germinar entre las 14 y 24 horas después de la inoculación (figura 5). En este sentido Leemon y Jonsson (2012), describieron la adhesión de *M. anisopliae* en *R. microplus*, y reportaron que los conidios se adhieren a la superficie de la garrapata 6 h después de la inoculación,

Cuando las garrapatas se sumergieron en una suspensión de conidios, los conidios se adhirieron fácilmente a la superficie (figura 5a) y se distribuyeron entre las superficies de garrapatas ventrales y dorsales. Aunque los conidios están distribuidos de manera desigual, se observó mayor cantidad de conidios en la superficie de las patas de la garrapata.

Algunos conidios se adhirieron a setas, los cuales germinaron y se enrollaron en la seta, en busca de la cutícula, algunos tubos germinativos parecían estar penetrando directamente en la superficie de la garrapata. A las 48 horas en la zona de penetración se observa cierto mucílago extracelular, mientras que otros mostraron un crecimiento direccional hacia los poros asociados con las setas en la superficie de la garrapata. Al respecto Leemon y Jonsson (2012) indicaron este fenómeno, 24 horas después de la inoculación, además la cutícula de la garrapata debajo del mucílago extracelular que rodea las hifas fúngicas parecía estar erosionada en algunas partes. La diferencia en el tiempo de penetración puede variar dependiendo la patogenicidad y virulencia de cada aislado.

48 horas después de la inoculación, se presentó un crecimiento de hifas en la superficie de la garrapata (figura 7f). Las hifas comenzaron a entrecruzarse para formar agrupaciones, se observaban rodeadas de un mucílago extracelular, Leemon y Jonsson (2012), reportaron este fenómeno al estudiar el proceso de invasión de *M. anisopliae* en *R. microplus*.

Se encontró conidios de *M. anisopliae* adheridos en el área ventral, patas, áreas intersegmentales y setas de la garrapata. los conidios formaron apresorios y produjeron enzimas que degradaron el tegumento. Se evidenció la penetración de *M. anisopliae* en patas de *R. microplus* aproximadamente a las 36 horas después de la inoculación figura 7G.

La invasión de tejidos adyacentes por hifas se observó mediante microscopía óptica confirmando capacidad de *M. anisopliae* para infectar y ocasionar patologías en *R. microplus*.

Los ovarios presentaron colonización por hifas de *M. anisopliae*. Los primeros signos de conidiogénesis se observaron a las 100 horas después de la inoculación.

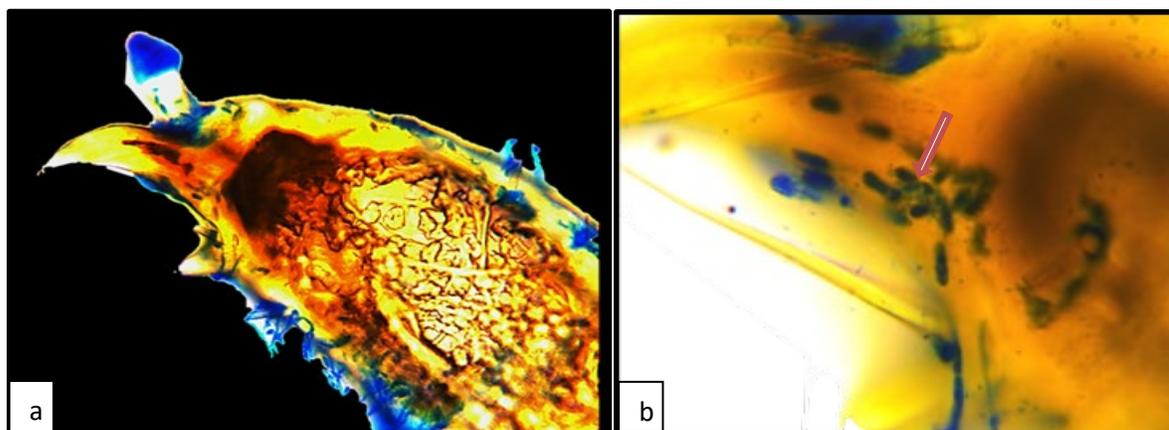


Figura 5. Adhesión y germinación de conidios de *M. anisopliae* a) Conidio adherido en la uña de *R. microplus* 160x. b)) Conidio de *M. anisopliae* germinando en el tarso de *R. microplus* (1600x).

Arruda et al. (2005) estudiaron la interacción de *M. anisopliae* con *R. microplus* y describieron los procesos implicados para que ocurra la infección. El primer paso es la adhesión de conidios a la cutícula, continuando con la germinación de conidios, formación de apresorios y penetración a través de la cutícula.

Veinticuatro horas después de la infección se adhieren conidios y comienza la germinación en la superficie de la garrapata. En este momento, los conidios se diferencian para formar apresorios que ejercen presión mecánica y activan la secreción de enzimas hidrolíticas que conducen a la penetración. Estos resultados son iguales a los encontrados en nuestro estudio. Además, reportaron que la penetración masiva de las hifas en el cuerpo de la garrapata, ocurre 72 h después de la inoculación, y después de 96 h, las hifas comienzan a emerger de la superficie de la cutícula para formar conidios (Arruda et al., 2005).

Todos los parásitos, incluidos los hongos, producen proteinasas para preparar al hospedero infectado, como fuente de nutrientes y para degradar las moléculas de defensa del hospedero (Arruda et al., 2005).



Figura 6. Microfotografía del tegumento de *R. microplus*. El círculo amarillo indica la extrusión de una hifa de *M. anisopliae*, que rompe la cutícula de *R. microplus*, continuando su crecimiento y desarrollo externamente. Magnificación 1600X.

En la figura 6 se observa la extrusión de hifas de *M. anisopliae* del tegumento de *R. microplus*, 5 días después de la infección. Alrededor de las hifas se observa un halo que recuerda la producción enzimática. La cutícula se observa degradada y áreas completamente desnaturalizadas, perdiendo su integridad.

El proceso de infección implica los siguientes eventos: (i) adherencia de las conidios a la cutícula del hospedero a través de una delgada capa mucilaginosa después de 24 h post-infección; (ii) la germinación de las conidios y el desarrollo de un tubo germinal que coloniza la superficie de la cutícula dentro de las 24-48 h posteriores a la infección; (iii) penetración del tubo germinal en la cutícula de la garrapata dentro de las 24-48 h posteriores a la infección; (iv) colonización de la cutícula y aparición del hongo en la superficie cuticular dentro de las 72-96 h posteriores a la infección (Arruda et al., 2005).

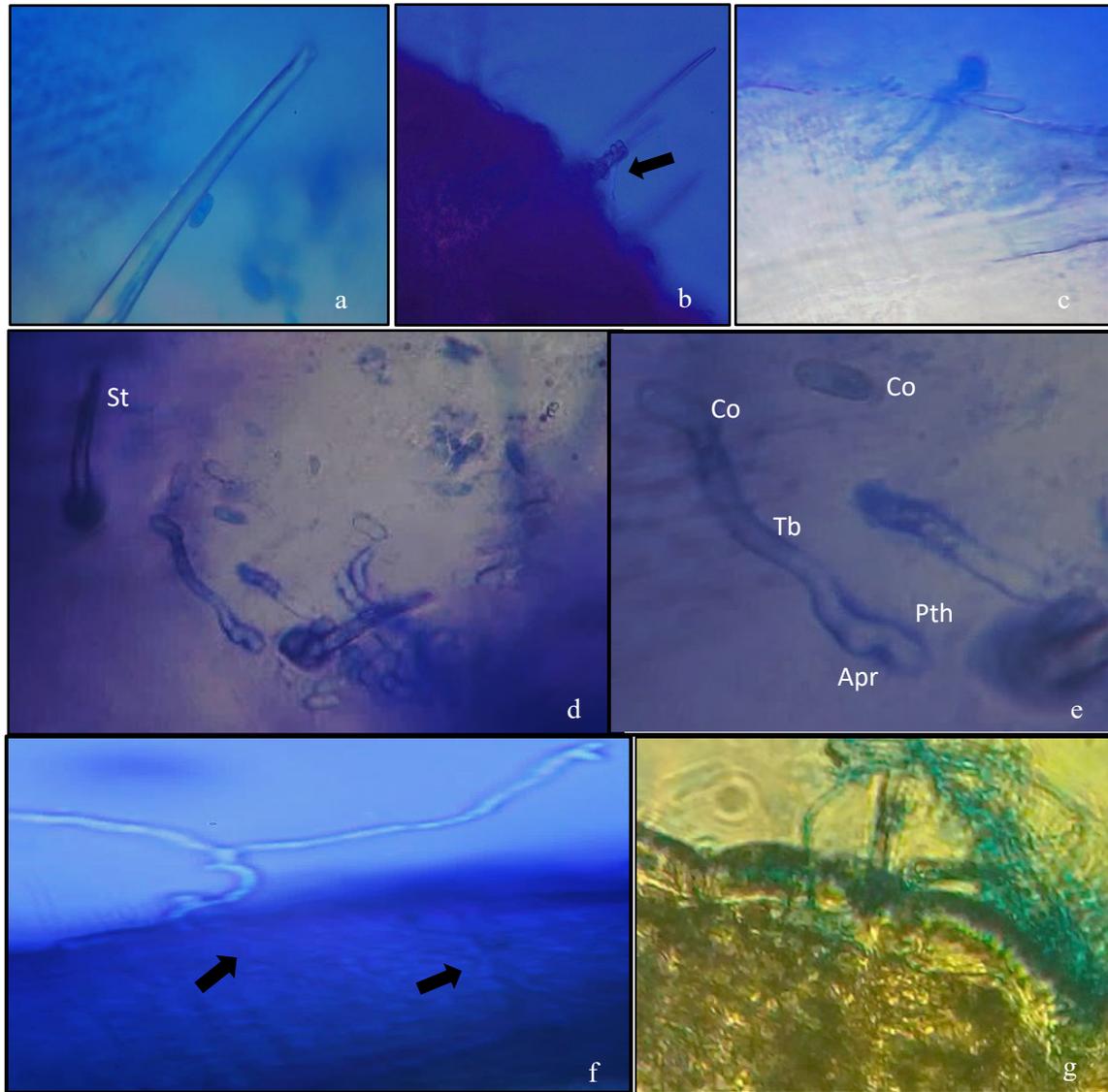


Figura 7. Microfotografía del proceso de infección de *M. anisopliae* en *R. microplus*. a) Adhesión de conidio en una seta. b). Germinación de conidio y enrollamiento en seta, extendiéndose en la cutícula, magnificación 400X. c). Germinación de conidios en el borde de la cutícula y desarrollo del tubo germinativo, 400X. d). Conidios sin germinar y germinados en la cutícula, se observa el mucilago extracelular en el extremo del apesorio. 400X. e.). Crecimiento y penetración en la cutícula. E.). Degradación enzimática y penetración de *M. anisopliae* en el tegumento de *R. microplus*, 1000X. f.). Proliferación hifal en cutícula, horas después de la germinación del conidio. g.). Invasión de hifas de *M. anisopliae* en el tegumento de *R. microplus*. Leyenda. Co: conidio, Apr: apesorio, St: seta, Tb: Tubo germinativo, Mec: mucilago extracelular, Pth: penetración hifal.

5.4 Infección de *M. anisopliae* en ovario y ovocitos de *R. microplus*

Los huevos fueron colonizados por *M. anisopliae*, la membrana perdió su integridad a medida que la infección por el hongo avanzaba (figura 8a), los huevos no eclosionaron (figura 8c y 9a); se encontró células gigantes (figura 9 d y 9e), hifas y conidiogénesis de *M. anisopliae* en el corion del huevo (figura 8a, 8b, 8c y 8d). Estos resultados demuestran el parasitismo de *M. anisopliae* sobre huevos y adultos de *R. microplus*.

Los huevos infectados y colonizados por *M. anisopliae*, presentaron deformación y achatamiento (figura 9c), esto se debe a la extracción de los nutrientes que el huevo contiene, en su lugar ocurrió una reproducción de *M. anisopliae* con abundantes conidios. Los ovarios de *R. microplus* también fueron colonizados por *M. anisopliae*. Al respecto (Ment et al., 2010), al inocular huevos de garrapatas con *M. anisopliae* encontraron que el corion del huevo fue cubierto por una densa capa de células gigantes, de 3 a 7 μm) de largo y de 2 a 6 μm) de ancho, que producían conidióforos en forma de candelabro, y observaron la conidiogénesis en la superficie del huevo entre 7 y 9 días después de la inoculación.

Los ovocitos en desarrollo y huevos en desarrollo embrionario de garrapatas no infectadas con *M. anisopliae*, se desarrollaron completamente, se evidenció la integridad del corion, así como la división de células, hasta el desarrollo del embrión, que presenta 3 pares de patas dentro del huevo ver figura 10. Resultados similares reportó Oporta (2017), huevos que provenían de grupos de garrapatas infectadas con *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea*, estos no eclosionaron y se cubrieron de micelio, mientras que los huevos que provenían de garrapatas no infectadas, lograban eclosionar.

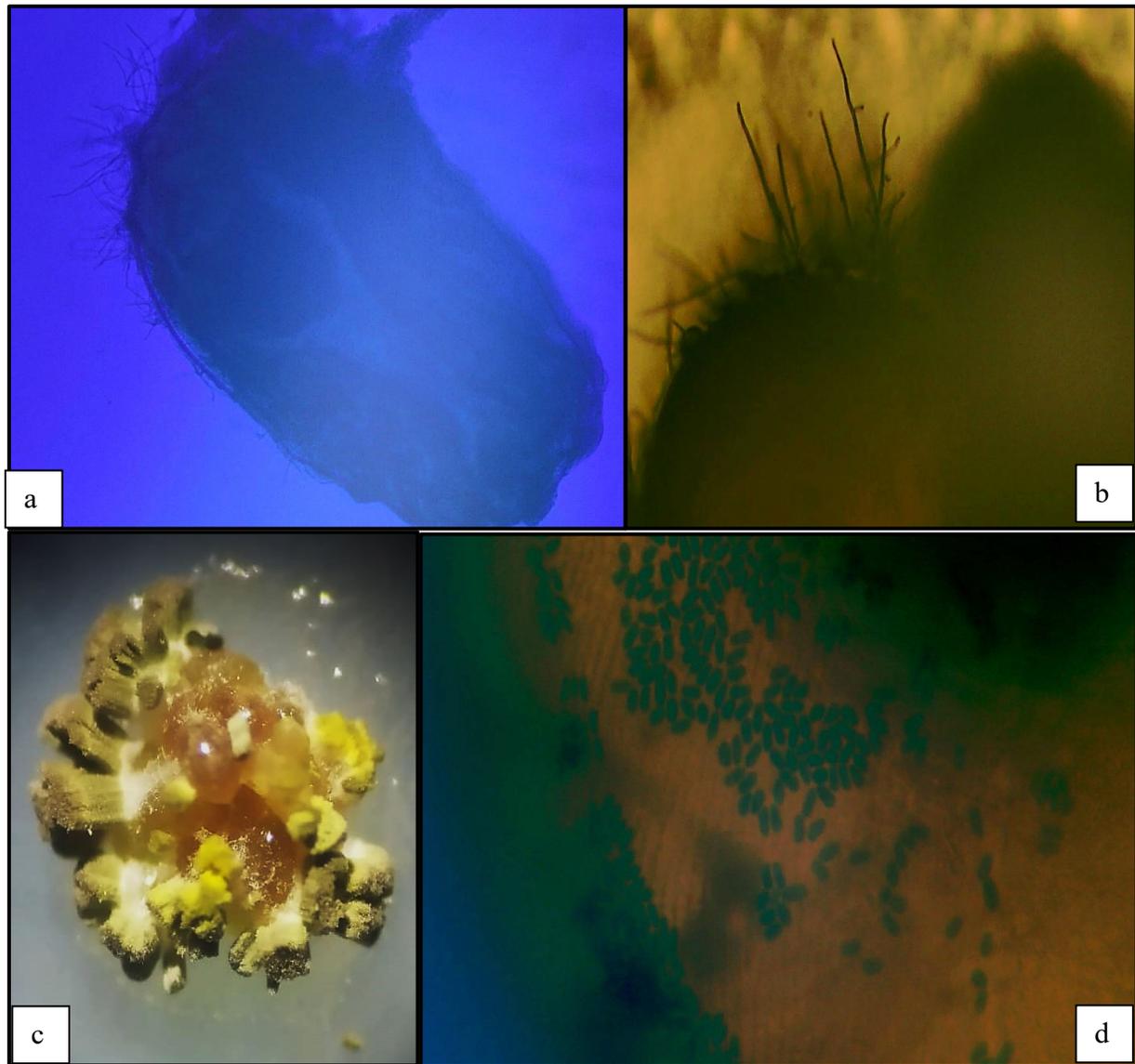


Figura. 8. a). Huevo de *R. microplus* infectado con *M. anisopliae* 8 días después de la oviposición, se observan numerosas hifas que emergen del vitelo y atraviesan el corion 100x. b) Hifas emergiendo del corion del huevo, 400X. c) Masa de huevos colonizada por *M. anisopliae*, se observan aglomeración de conidios en el corion del huevo, 40X. d) Corion del huevo con adhesión de numerosos conidios de *M. anisopliae*, 400X.

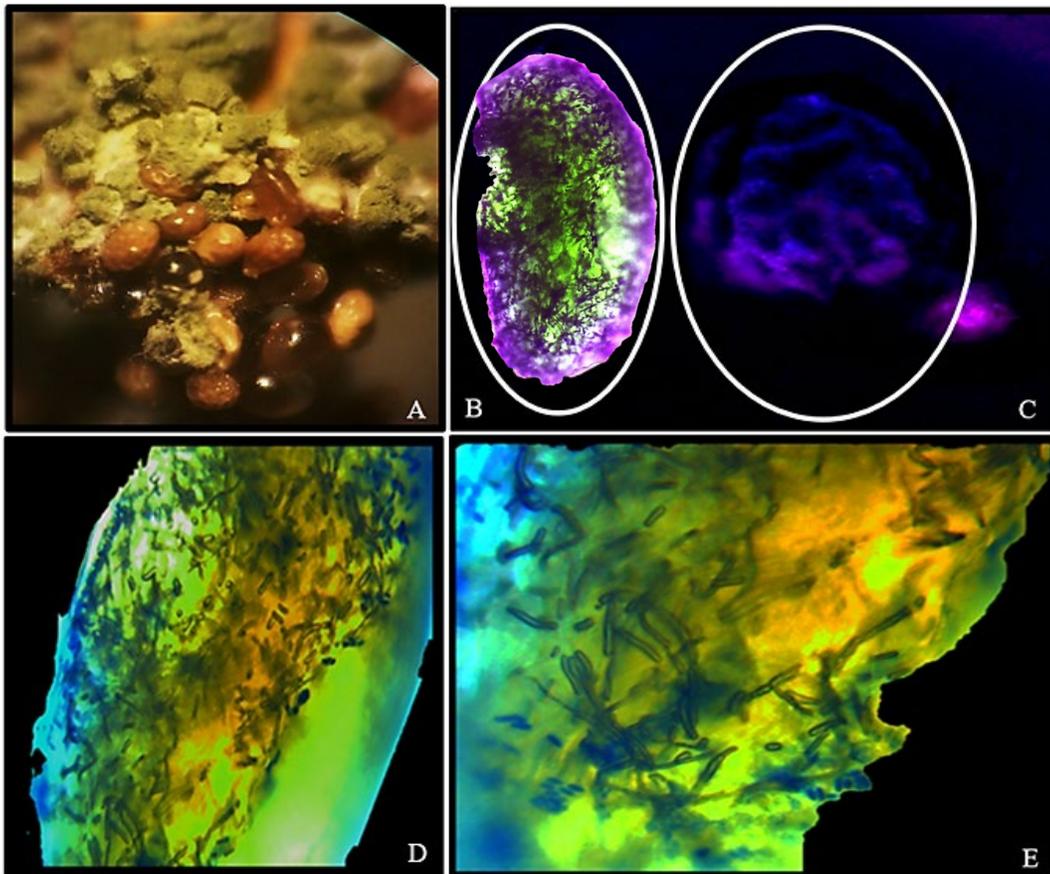


Figura 9. Huevos de *R. microplus* infectados y dañados por efecto del parasitismo de *M. anisopliae*. a) Masa de huevos adherida en la parte anterior de *R. microplus*, presenta huevos afectados y colonizados por *M. anisopliae*, 20 x. b) Huevo totalmente cubierto de hifas, 160X. c) Huevo infectado por *M. anisopliae*, el corion se observa dañado y la totalidad del huevo esta deforme debido a la extracción de nutrientes,160X. d) Células gigantes y conidios de *M. anisopliae* en el corion del huevo, 640X. e) Células gigantes y conidios adheridos al corion del huevo, 1600X.

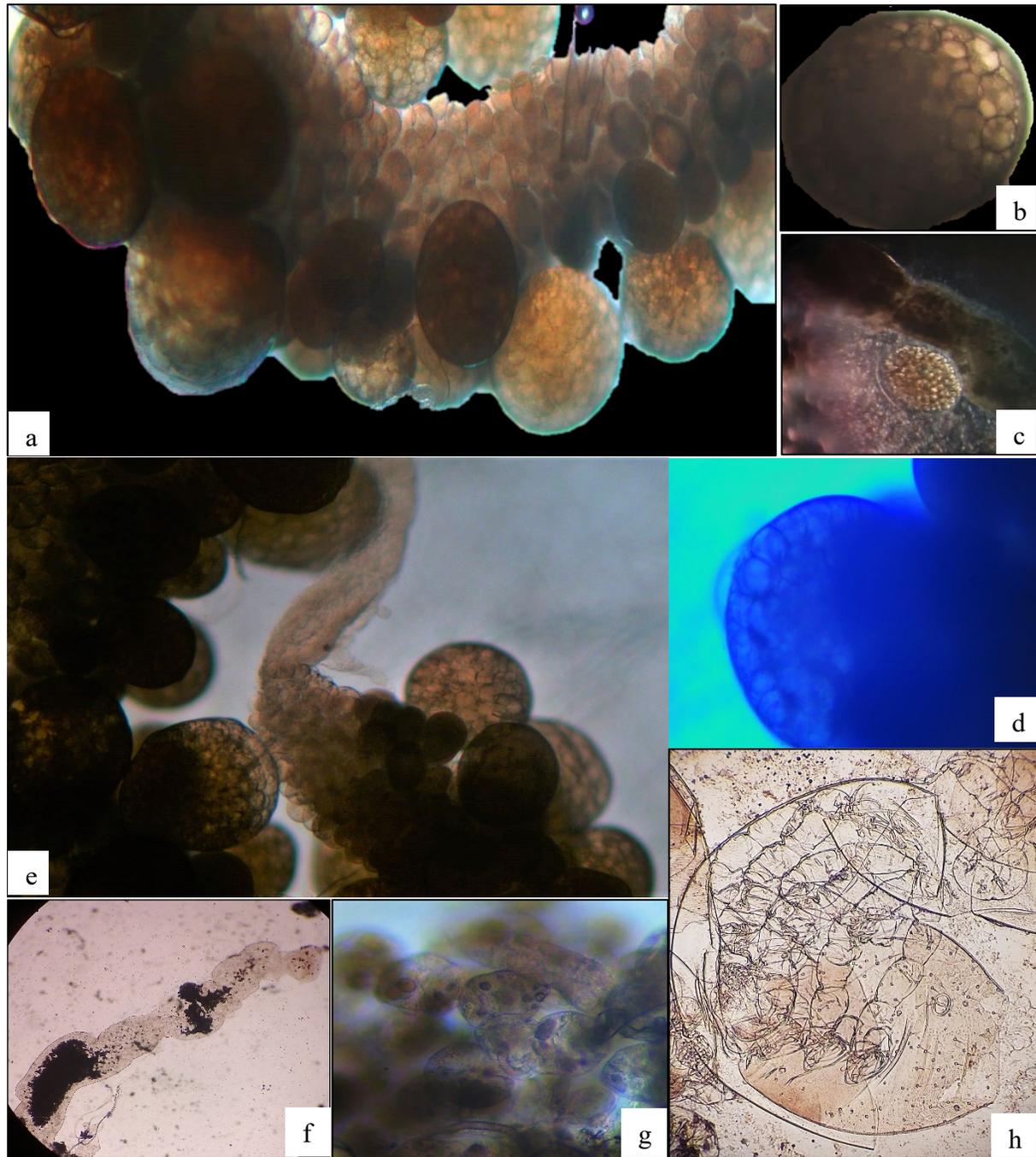


Figura 10. Ovario y ovocitos en desarrollo, no infectados por *M. anisopliae*. a) Ovario sano de *R. microplus* con ovocitos en desarrollo, la membrana celular se observa íntegra, 100X. b) Ovocito en división celular con su membrana externa íntegra, 400x. c). Intestino y ovocito, 100X d) Ovocito teñido con de azul de anilina, no se observan hongos, 100X. e) Ovocitos en desarrollo sin afectación, 100X. f) Intestino de aspecto sano,100X. g) Glándulas salivales de apariencia normal, 400X. h) Huevo embrionado de aspecto normal, próximo a la eclosión.

5.5 Colonización de la hemolinfa de *R. microplus* por *M. anisopliae*

En la hemolinfa extraída de las garrapatas inoculadas con *M. anisopliae*, se observó mediante microscopía de luz de campo claro, estructuras fúngicas, tales como cuerpos hifales y una fase levaduriforme en gemación, llamadas blastosporas, así como hemocitos que son células del sistema inmune de la garrapata, ver figura 11.

Resultados similares se han encontrado en garrapatas adultas de *R. microplus* después de la inyección con conidios y/o blastosporas de *M. anisopliae* (Fiorotti de Paulo et al., 2018), así como en *Galleria mellonella*, infectado con *Beauveria bassiana*, en el que se observó crecimiento de hifas en la hemolinfa de las larvas, además de células del sistema inmunitario como plasmotocitos y granulocitos, entre las 120 y 144 horas (Vertyporokh et al., 2020), (Dostert et al., 2005).

Una respuesta inmune comienza con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Después de llegar a la hemolinfa *M. anisopliae* cambia de hifas a blastosporas; esto permite reducir el número de (PAMP), es decir, minimiza el reconocimiento por parte de los hemocitos, así como sus respuestas de defensas (Tartar et al., 2005). Se ha reportado que las hifas de *M. anisopliae* para evitar ser reconocidas por hemocitos, dependen de un gen MCL1 (Metarhizium collagen likeprotein), y que este se expresa pocos minutos después que el patógeno entra en contacto con la hemolinfa (Wang y Leger, 2006).

En nuestro estudio no se observaron hemocitos encapsulando hifas o blastosporas, ni hifas rodeadas o destruidas por células inmunitarias de la garrapata. El gen MCL1 de *M. anisopliae* codifica una proteína de tres dominios y comprende una región N-terminal hidrófila, cargada negativamente con 14 residuos de cisteína, funcionando como una capa protectora anti adhesiva contra la fagocitosis y la encapsulación, ya que su naturaleza hidrófila con carga negativa lo hace poco atractiva para los hemocitos, además enmascara los componentes estructurales antigénicos de la pared celular de *M. anisopliae* como los B-glucanos (Wang y Leger, 2006).

A pesar de que no se conoce que las garrapatas pueden desarrollar una respuesta inmunitaria adquirida y suplir la necesidad de un sistema inmunológico, estos artrópodos tienen bien desarrollado un sistema inmunitario innato que permite respuestas rápidas y generales, incluido el mediado por células, contra agentes infecciosos (Marmaras y Lampropoulou, 2009). Los

hemocitos son células circulantes de la hemolinfa, un líquido de los invertebrados, análogo a la sangre de los vertebrados. Los hemocitos también se pueden encontrar incorporados en tejidos y en órganos como el cuerpo graso, nefrocitos y glándulas salivales (Sterba et al., 2011).

Los hemocitos son esenciales para los estudios que involucran fagocitosis, nodulación y procesos de encapsulación (Fiorotti de Paulo et al., 2018; Dostert et al., 2005).

La presencia de estructuras reproductivas del hongo en el hemocele de la garrapata nos indica una infección exitosa, el hecho de encontrar dos tipos de estructuras fúngicas nos indica la capacidad del hongo de cambiar de formas en un ambiente estresante, ya que la disponibilidad de oxígeno en el interior de la garrapata es escasa.

La fase levaduriforme que se reproduce con éxito en el interior de la garrapata, ya que, al no tener una pared celular, no es reconocida por los hemocitos como un agente infectante. Además de la producción de toxinas que pueden afectar diferentes órganos y procesos vitales en la garrapata. Después de que *M. anisopliae* ha absorbido el cuerpo graso y la trehalosa, este inicia su fase de producción de hifas y colonización interna en la garrapata.

El éxito de la invasión y colonización de *M. anisopliae* en *R. microplus*, se debe a los mecanismos moleculares, que utiliza para adaptarse al entorno estresante a como es la hemolinfa. Teniendo que superar las barreras de la presión osmótica de la hemolinfa. *M. anisopliae* posee un gen homólogo al osmosensor de levadura SHO1, que está regulado al alza en hemolinfa de insectos y condiciones artificiales de alta presión osmótica. El gen fue designado Mos1 para *Metarhizium osmosensor-omo* proteína (Wang et al., 2008).

Una comprensión de las respuestas inmunitarias inducidas por hongos, identificaría las defensas de los insectos y los factores de patogenicidad de los hongos, que podrían manipularse para acelerar la muerte del hospedero en un escenario de control biológico.

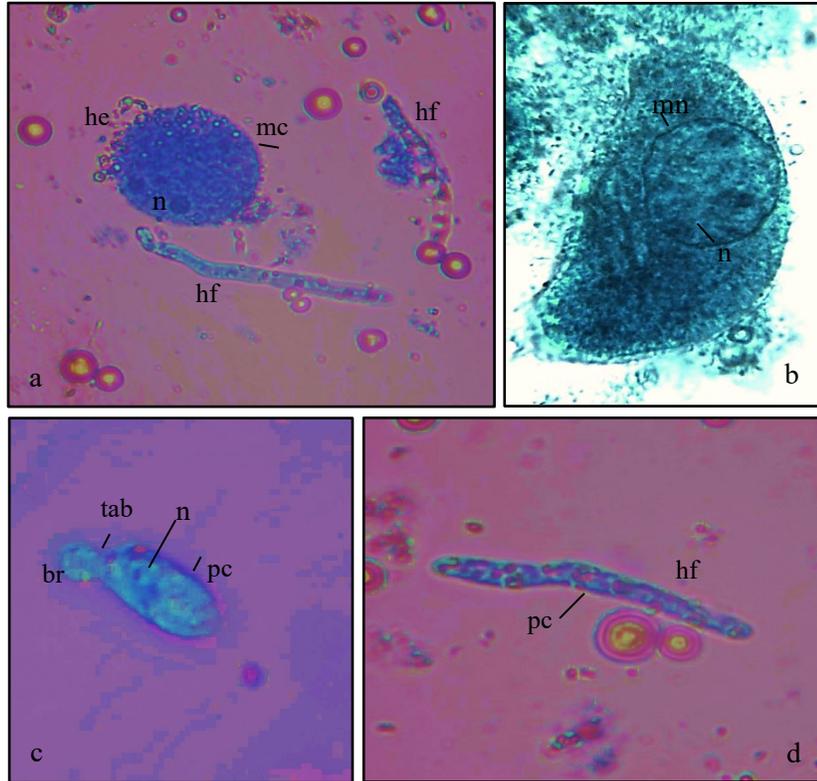


Figura 11. Estructuras fúngicas e inmunogénicas encontradas en la hemolinfa de *R. microplus*. a) Hifas en crecimiento, de aspecto normal y multinucleadas, y hemocito de aspecto normal que conserva su integridad celular, 1000X. b) Hemocito de aspecto normal con gran núcleo 1600 X. c) Célula levaduriforme en gemación 1000X. d) Hifa multinucleada en crecimiento 1000X. Leyenda: tab: tabique, n: núcleo, br: brote, pc: pared celular, hf: hifa, mb: membrana celular, mn: membrana nuclear, he: hemocito.

5.6. Histopatología de la infección y colonización de *M. anisopliae* en *R. microplus*

En las láminas histológicas se logró identificar el tegumento y sus diferentes capas que lo componen. La tinción hematoxilina y eosina resultó ser útil para el diagnóstico y descripción del estado actual del tejido tegumentario, describiéndose la epicutícula, (ecx) exocutícula, (enc) endocutícula, (prc) procutícula, (csc) capa subcuticular, (cp) canal de poros, (ce) células epiteliales, (ctc) células de tejido conectivo, (n) núcleo, (nu) nucléolo y (t) Tráquea, con aspecto normal, sin presentar afectaciones patológicas en las garrapatas del grupo control, figura 12 a y 12b.

Resultados similares encontró Remedío et al., (2014) al estudiar los cambios estructurales que ocurren en el tegumento de hembras de *R. sanguineus* alimentadas completamente.

El tegumento está compuesto, desde el exterior al interior de tres regiones distintas: cutícula, epidermis y tejido conjuntivo, que sirve de soporte a las células epiteliales. Entre la cutícula y la epidermis se encuentra una capa acelular subcuticular. La cutícula es la porción acelular externa del tegumento, que cubre el cuerpo de la garrapata (Remedio et al., 2014).

La cutícula presenta tres capas evidentes: endocutícula, exocutícula y epicutícula, siendo esta última una capa más fina que cubre las dos anteriores, que juntos forman la procutícula.

La procutícula se divide en otras dos capas bien diferenciadas: la endocutícula, cerca de la epidermis, y la exocutícula, en contacto con la epicutícula. La epidermis está compuesta por un epitelio no estratificado con células cúbicas que varía en tamaño según la etapa de alimentación. De los no alimentados a la etapa congestionada, la cutícula no muestra gran variación en su espesor, pero la diferenciación en las capas de la procutícula es más evidente (Remedio et al., 2014).

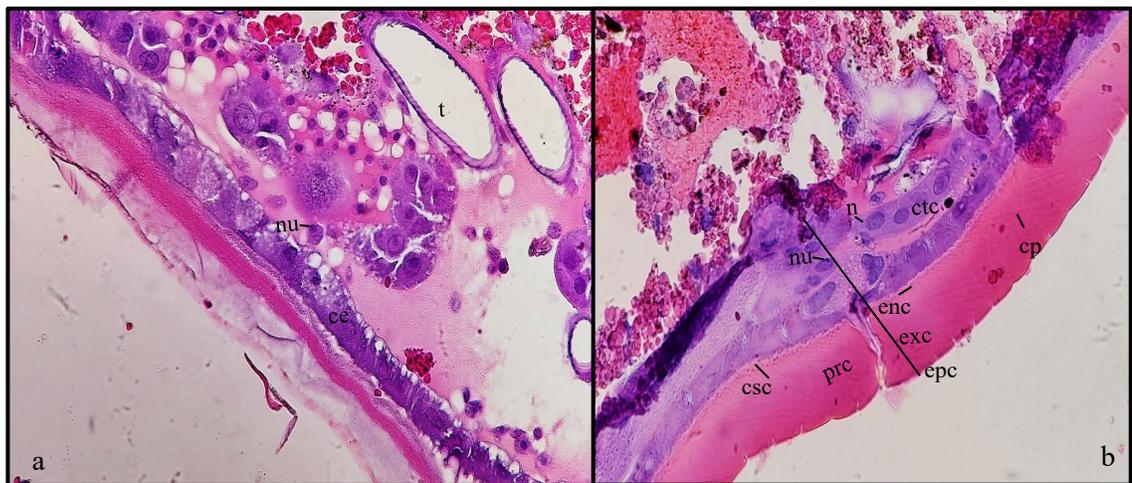


Figura 12. Cutícula de *R. microplus* adulta sin infección por *M. anisopliae*. a y b. corte histológico del tegumento de *R. microplus* (teleogina) teñido con hematoxilina y eosina. Leyendas: (epc) epicutícula, (exc) exocutícula, (enc) endocutícula, (prc) procutícula, (csc) capa subcuticular, (cp) canal de poros, (ce) células epiteliales, (ctc) células de tejido conectivo, (n) núcleo, (nu) nucléolo, (t) Tráquea. Magnificación 400x

En la revisión de los cortes histológicos de garrapatas inoculadas con *M. anisopliae* y teñidos con PAS, encontramos destrucción de la cutícula y afección de los oviductos, así como daños a la estructura basal del intestino, el epitelio intestinal presentaba vacuolización, ver figura 14.

En los tubos de Malpighi, oviductos, glándulas salivales y cutícula, se observó desorganización celular debido a daños causados por hongo, *M. anisopliae* atravesó la cutícula y colonizó la totalidad del cuerpo interno de la garrapata, mediante crecimiento hifal, ver figura 13.

Resultados similares reportaron Valerio-García et al., (2004), al estudiar el efecto de *M. anisopliae* en garrapatas *R. sanguineus*. Después de la penetración el hongo invadió el cuerpo de la garrapata, aparentemente sin preferencia a tejidos específicos. Entre las lesiones de los tejidos internos reportaron, la ruptura la pared intestinal y la fuga de contenido del hemocele.

Los conidios de *M. anisopliae* se encontraron adheridos en la cutícula se observan de color rosa. La invasión de la cutícula del huésped se produce por penetración directa. Después de formar las estructuras de penetración, el hongo atraviesa la epicutícula y se desarrolla en la transición entre el epi- y las procutículas. observamos la ruptura de epicutícula, una masa de hifas esclerotizada deforma por completo la estructura de la cutícula, alterando su composición, como lo evidencia la alteración de su tinción PAS.

Arruda et al. (2005) describieron que el crecimiento denso de las hifas, dentro de la procutícula y entre éste y la epicutícula causan una desorganización extensa de las capas de la cutícula, con una intensa invasión de la cavidad del cuerpo.

Pathak y Kulshrestha. (1998) describieron en *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) infectadas por *Aspergillus flavus*, que los órganos afectados fueron el tubo digestivo, los cuerpos grasos, las fibras musculares, los túbulos de Malpighi y las células neurosecretoras cerebrales y que la luz del canal alimentario (lumen) estaba totalmente ocupada por las hifas 60 h después de la infección. Schneider et al. (2013) observaron que el micelio de *M. anisopliae* en lepidópteros, cubre todo el interior del cuerpo del hospedero en 72 h, formando una masa de hifas además de la degradación de los tejidos de la pupa.

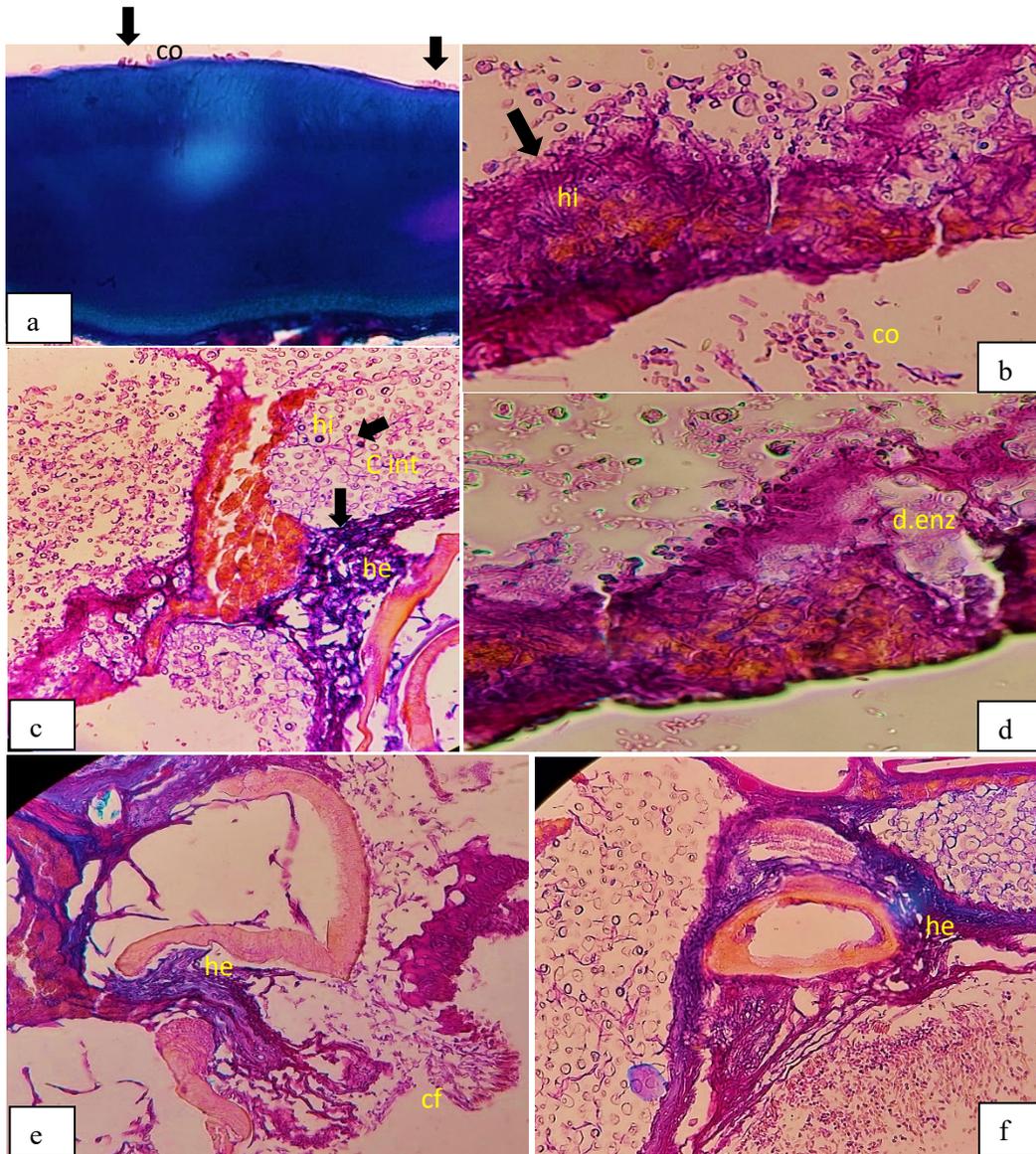


Figura 13. Corte histológico de *R. microplus* infectada con *M. anisopliae*. a) Conidios adheridos a la cutícula 12 horas después de la inoculación. b) Hifas que atraviesan y destruyen la estructura del tegumento, perdiendo su integridad, se observa abundantes conidios. c) Hifas colonizando tubos de Malpighi, corte cuticular fuertemente invadido de hifas compactas que reemplazan el tejido tegumentario, se observa interacción del contenido intestinal con hifas. d) Degradación enzimática de la cutícula y colonización fúngica. e) Crecimiento hifal y posterior conidiogénesis, se observa conidióforo y la esclerotización hifal. f) En los espacios menos esclerotizados se observan hifas libres y conidios, mientras que en las áreas más esclerotizadas se observa un patrón de invasión y esclerotización de las hifas fúngicas, reemplazando la estructura tegumentaria. Magnificación 400X. 5 días después de la inoculación. Leyenda. Conidios: co, hifas: hi, hifas esclerotizadas: he, contenido intestinal: c int, degradación enzimática: d.enz, conidióforo: cf.

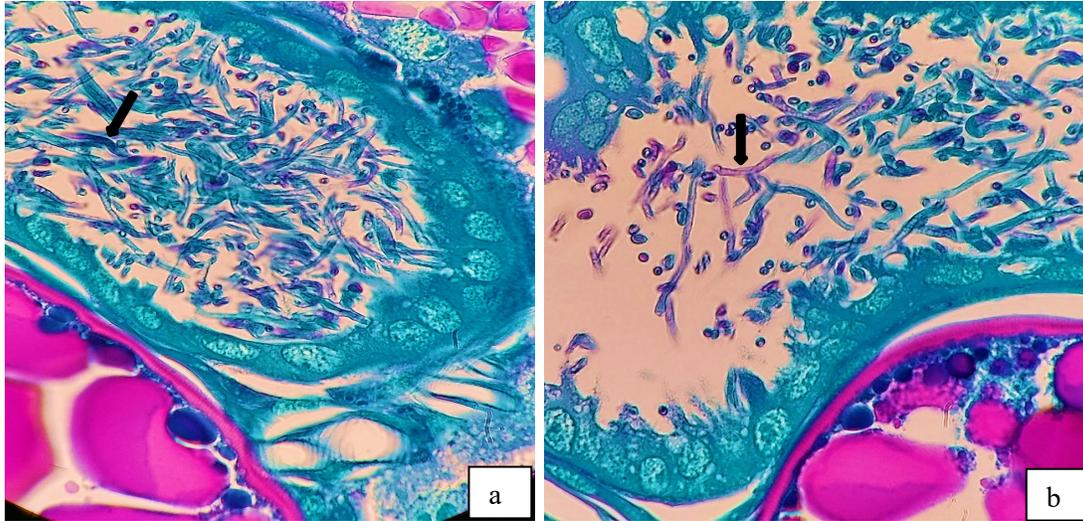


Figura 14. Tejido intestinal con presencia de hifas fúngicas. a) Hifas en el espacio intestinal, la flecha señala las hifas. 400 X. b) Hifas en espacio intestinal 1000X. Tinción PAS

5.6.1 Histopatología de la infección y colonización por *M. anisopliae* en huevos de *R. microplus*

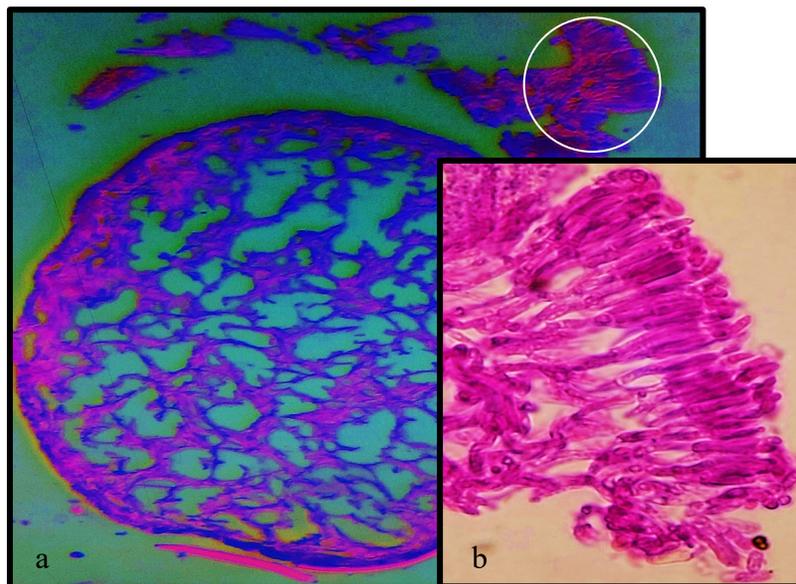


Figura 15. Corte transversal de un huevo de garrapata *R. microplus* infectado con *M. anisopliae*, tinción ácido periódico pash. a) Hifas presentes en el huevo teñidas de coloración rosa, reemplazan el contenido interno del huevo y en la membrana externa formación de conidióforo vista 100x b) Conidióforo de *M. anisopliae* formado en el huevo de *R. microplus*, se presentan el Co= conidio, fíalide. Tinción ácida periódico pash, magnificación 1000X.

En nuestra investigación encontramos huevos de garrapatas infectados de forma natural (sin inoculación artificial) por *M. anisopliae*, estos huevos provenían de garrapatas adultas inoculadas con *M. anisopliae*, los cuales podrían haberse infectado en el ovario de la garrapata, o bien de las hifas que se desarrollaron en la cutícula cuando son ovipositados, ya que están en pleno contacto con la garrapata. Los órganos infectados con *M. anisopliae* podrían servir de inóculo, al estar en íntimo contacto con los huevos que se desarrollan en el ovario de *R. microplus*, al respecto se ha reportado la infección del ovario de *R. microplus* por *M. anisopliae* (Fiorotti de Paulo et al., 2018).

Los ovocitos antes de ser fecundados pudieron infectarse por *M. anisopliae*, a través del micropilo. El micropilo es un poro del corion por donde penetra el esperma, el micropilo atraviesa todo el corion hasta llegar al ovocito, permitiendo la fecundación (Hilker y Meiners., 2002).

El huevo está formado por ovocito con nutrientes o yema, envuelto por la membrana vitelina que contiene más nutrientes. La yema es rica en vitelogenina, y glucógeno. Se llama vitelo a los nutrientes dentro del huevo que alimentan al embrión. La capa que recubre el huevo se llama corion, el corion tiene función protectora, de intercambio de gases y también minimiza la pérdida de agua. El corion se compone de dos capas: el endocorion y el exocorion (Hilker y Meiners., 2002).

Al respecto se ha reportado de hongos como *Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.) que forma parte de la microbiota interna, de la garrapata Americana del perro, *Dermacentor variabilis*. Este hongo aparentemente se adquiere mientras los huevos están en la cámara genital, en lugar de transováricamente, y luego se transmite a larvas, ninfas y adultos transestadialmente. Como hongo primario, *S. brevicaulis* puede conferir una ventaja protectora contra hongos secundarios evitando infecciones entomopatógenas, favoreciendo así la abundancia y distribución de *D. variabilis* (Benoit y Yoder, 2004).

La histología reveló el desarrollo de hifas que colonizaban el interior y exterior del huevo, figura 15 a y b, se evidenció la reproducción del hongo, este formó conidióforos y conidios en la capa externa del huevo figuras 15. a y b. el contenido interno del huevo de *R. microplus* se encontraba denso y ocupado por las hifas de *M. anisopliae*, color rojo figuras 15 a y b.

Resultados similares encontraron Ment et al. (2010) al inocular huevos de *R. annulatus*, el hongo emergió de los huevos y formó conidióforos y conidios externamente sobre los huevos muertos. En nuestro estudio observamos la ruptura del corión del huevo de *R. microplus* debido a la emergencia del hongo, en la proximidad al corión se observó una concentración de hifas, que formaban una masa empaquetada, como micelio compacto. En la histología no se observó células en desarrollo ni formación del embrión. El hongo coloniza totalmente el huevo, alimentándose de los nutrientes. Sin embargo, en los huevos de garrapatas no inoculadas con *M. anisopliae* no se encontró afectación por hongos.

El mecanismo de penetración de *M. anisopliae* en huevos de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* en condiciones ambientales óptimas, así como las lesiones provocadas en el interior de los huevos infectados, fueron descritos por Valerio-Garcia et al., (2005). La infección de los huevos de garrapata por *M. anisopliae* involucra eventos comunes, como adhesión, germinación de conidios, formación de apresorios, invasión y desarrollo dentro de los huevos (Ment et al., 2010). Sin embargo, la etapa final del desarrollo fúngico difiere según las condiciones ambientales.

Los huevos recién ovipositados de *R. microplus*, no infectados con hongos son ligeramente marrones, ovalados, y cubierto con una capa de cera protectora, en contraste con la deformación y achatamiento, opacidad cuando son colonizados internamente por hifas de *M. anisopliae*.

Gindin et al. (2009) evaluaron el efecto ovicida de *Metarhizium* sp en huevos de tres especies de garrapatas, (Acari: Ixodidae) *Hyalomma excavatum* (Koch), *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Say), y *Rhipicephalus sanguineus* (Latereille), redujeron los porcentajes de eclosión de los huevos de las tres especies de garrapatas al 0 - 32% en comparación con el 80 al 90% en los huevos de control.

Los huevos de garrapata más viejos son más susceptibles a la infección por hongos que las recién puestas y la susceptibilidad de los huevos a la infección fúngica depende de la especie fúngica y su aislado, así como de la especie de garrapata (Gindin et al., 2009).

Los hongos entomopatógenos pueden penetrar, actuando como hifas de "búsqueda". En otros ácaros como el *Tetranychus urticae*, aparte de la penetración normal, los tubos germinativos del

hongo *I. fumosorosea* se incrustaron en la cáscara del huevo, esto conllevó a la interrupción del desarrollo embrionario a las 48-96 horas después de la inoculación (Zhang et al., 2014).

En nuestro estudio los huevos no infectados presentaron un desarrollo embrionario normal y se completó la escisión del huevo, hasta la formación del embrión entre los 19 y 25 días después de la oviposición (Figs. 16 A y B). Sin embargo, los huevos ovipositados por *R. microplus* inoculadas con *M. anisopliae*, presentaron micelio en su superficie entre los seis y nueve días después de ovipositados.

Los huevos infectados presentaron contracción, cambio de coloración y muerte embrionaria, una cavidad más ancha entre el corión del huevo y el embrión, además de la contracción del embrión; esto variaba a menudo avanzaba la colonización fúngica ver figura 16 c a f. Como resultado el embrión resultó gravemente dañado, en comparación con el embrión bien desarrollado en el control. La contracción de los huevos de ácaros infectados por hongos entomopatógenos fue observada por Zhang et al., (2014) en *T.urticae* y (Shi y Feng, 2004), en *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) indicando que el desarrollo embrionario fue interrumpido por la infección fúngica.

Las actividades ovicidas de *M. anisopliae* en los huevos de *R. microplus* se atribuyen a la interrupción de los embriones en desarrollo, debido a la penetración de *M. anisopliae* en el corión y posterior absorción de los nutrientes del huevo. Nuestros hallazgos agregan conocimiento sobre la infección y reproducción del hongo *M. anisopliae* en huevos de la garrapata *R. microplus*, este conocimiento podría mejorar el diseño de estrategias de aplicación de este hongo en campo, para el manejo de las garrapatas en potreros y el hospedero.

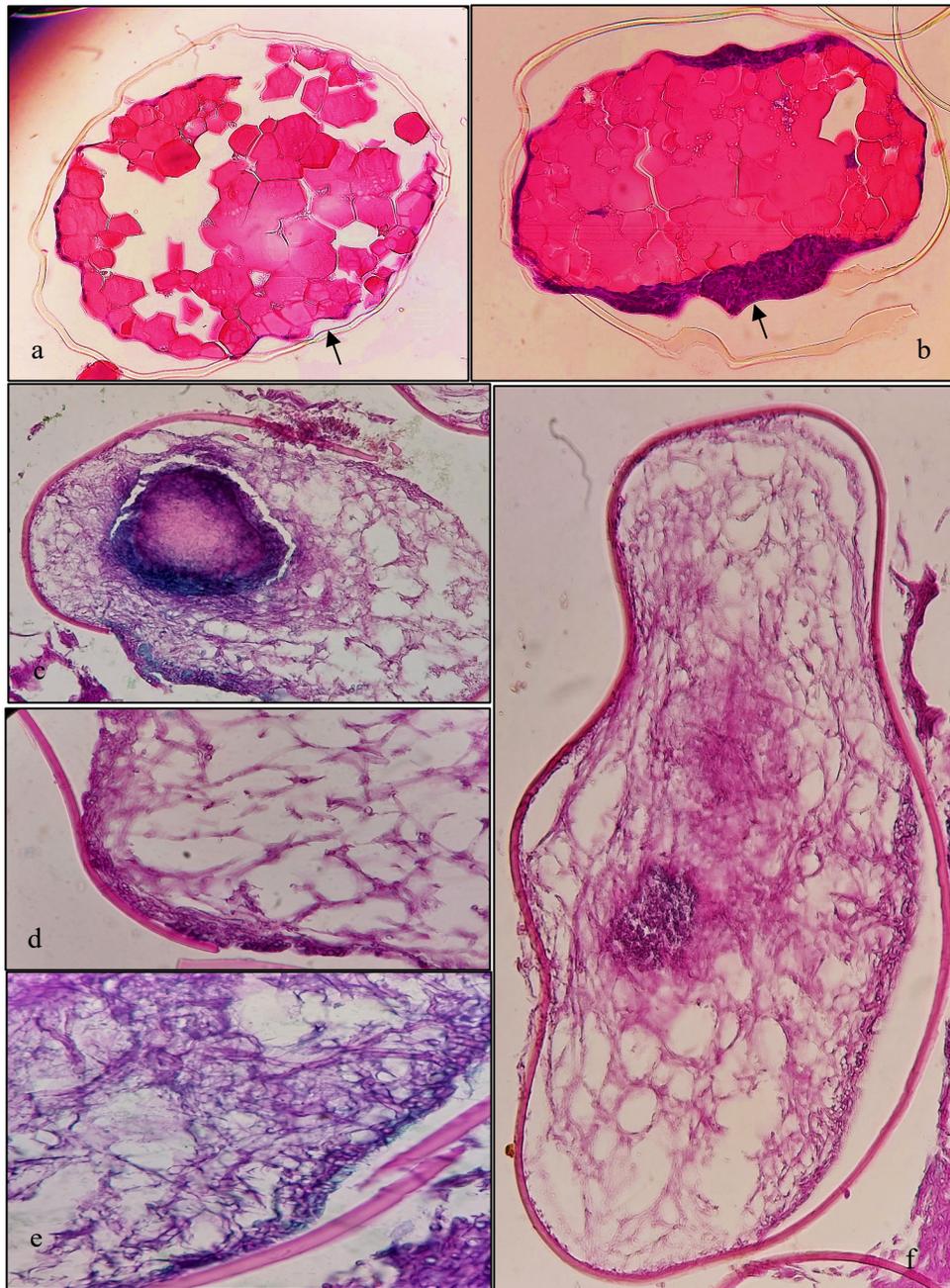


Figura 16. Sección transversal de un huevo de garrapata. a) Exocorion delineado por el tubérculo central, (la flecha señala el Exocorion). b) Extensión de la banda germinal (la flecha indica la banda germinal) horas después de iniciado el desarrollo embrionario. c) Micelio de *M. anisopliae* en el contenido interno del huevo. d) hifas emergiendo del huevo a través de la capa externa y abundantes conidios en la parte externa. e) Crecimiento y aglomeración de hifas en la parte interna del huevo. f) Hifas en desarrollo que colonizan las células del huevo ocasionando la interrupción de la formación del embrión.

VI. CONCLUSIONES

La infección por *M. anisopliae* en garrapatas, ocurre primeramente en el tegumento; con la adhesión y germinación del conidio. A medida que la infección por el hongo progresa, la cutícula de la garrapata pierde el brillo y se torna débil. un líquido emana de las lesiones ocasionadas por el hongo, principalmente en las áreas más degradadas de la cutícula.

La adhesión de conidios de *M. anisopliae* a la cutícula fue del 98%. Los huevos de garrapatas fueron parasitados por *M. anisopliae* y no eclosionaron. El achatamiento y la muerte embrionaria fue característico en los huevos infectados por *M. anisopliae*. El hongo *M. anisopliae* destruye la cutícula, afecta los oviductos y daña la estructura basal del intestino.

En los tubos de Malpighi, oviductos, glándulas salivales y cutícula, se observó desorganización celular debido a daños causados por hongo, *M. anisopliae* atravesó la cutícula y colonizó la totalidad del cuerpo interno de la garrapata, mediante crecimiento hifal. El daño ocasionado a dos estados del ciclo biológico de *R. microplus*, abre camino a la generación de nuevos garrapaticidas de origen microbianos, amigables con el medio ambiente e inocuos a la salud animal y humana.

VII. RECOMENDACIONES

Realizar estudios de eficacia biológica con *M. anisopliae* en condiciones de campo

Realizar transformados de *M. anisopliae* con la proteína verde fluorescente para el monitoreo en campo, después de aplicarse en la garrapata.

VIII. LITERATURA CITADA

- Acosta, D., Gómez, P., Hernández, V., y Aranda, E. (2007). Métodos de control biológico para *Boophilus microplus* (CAN.). Investigación Agropecuaria. 4,155-166.
- Almada, A. (2015). Parasitosis: pérdidas productivas e impacto económico. Sitio argentino de producción animal. 5 p. disponible en <http://www.produccion-animal.com.ar>.
- Alvarado-Artola, R.J y Dixon-Méndez, J.B. (2010). Identificación de las principales especies de garrapatas que afectan al ganado bovino en el municipio de Mulukuku, RAAN. [Tesis Lic.MV. Universidad Nacional Agraria. Managua, NI].
- Alewu, B y Nosiri, C. (2011). Pesticides and human health. In: Stoytcheva M, editor. *Pesticides in the Modern World – Effects of Pesticides Exposure*. InTech p. 231–50. Available from: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-effects-of-pesticides-exposure/pesticide-and-human-health>
- Angelo, I., Fernandes, E., Bahiense, T., Perinotto, W., Golo, P., Moraes, A., Bittencourt. V. (2012). Virulence of *Isaria* sp. and *Purpureocillium lilacinum* to *Rhipicephalus microplus* tick under laboratory conditions. *Parasitol Res* 111, 1473-1480.
- Anchordoquy, J. M., Anchordoquy, J.P., Nikoloff, N., Gambaro, R., Padula, G., Seoane, A., y Furnus, C. (2018). Doramectin induced cytotoxic and genotoxic effects on bovine peripheral lymphocytes and cumulus cells *in vitro*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1559569>
- Arruda, W., Lubeck, I., Schrank, A., Vainstein; M. (2005). Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 37, 231-244.
- Arthur, D.R. (1960). Ticks. A monograph of the Ixodoidea, part V. Cambridge Univ Press, Cambridge.
- Arthur, D. R. (1962). "Ticks and Disease," Pergamon Press, Oxford.
- Arthurs, S. y Dara, S. K. (2019). Global status of microbial control programs and practices. *J. Invert. Pathol*, 165, 3. DOI: [10.1016/j.jip.2019.04.007](https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.04.007)
- Badgular, P.C., Selkar, NA., Chandratre, G.A., Pawar, N.N., Dighe, V.D., Bhagat, ST., Telang, A.G y Vanag, G. R. (2016). Fipronil-induced genotoxicity and DNA damage in vivo: Protective effect of vitamin E. *Human and Experimental Toxicology*, 1-12
- Balashov, Y. (1972). Bloodsucking ticks (Ixodoidea)-Vectors of Disease of Man and Animals. *Misc Publ Entomol Soc Amer*, 8, 163-376.
- Barker, S., Murrel, A. (2008). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Ticks: Biology disease and control* Eds. A. Bowman y P. Nuttal. Cambridge University Press. 39 p.

- Benoit, J. B. y Yoder, J. A. (2004). Maternal transmission of a fungus to eggs in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (SAY). *International Journal of Acarology*, 30(1), 77-80. doi: 10.1080/01647950408684372.
- Benavidez, E., y López, G. (2005). Clave pictórica para la identificación de garrapatas en Colombia y Norte de Sudamérica. Corpoica. 16 p. disponible en <http://www.corpoica.org.co/>
- Binneck, E., Lastra, C.C., Sosa-Gómez, D.R. (2019). Genome sequence of *Metarhizium rileyi*, a microbial control agent for Lepidoptera. *Microbiol. Res. Announcements* 8, e00897-19. doi:10.1128/MRA.00897-19.
- Burger, T., Shao, R., y Barker, S. (2014). Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 76, 241-253.
- Butt, T.M., Coates, C.J, Dubovskiy, I.M., y Ratcliffe, N. A. (2016). Entomopathogenic fungi: new insights into host-pathogen interactions. In *Advances in genetics*, 94, 307-364. New York, NY: Academic Press.
- Cordón, A. (2012). Sanidad e Inocuidad Pecuaria en Centroamérica y República Dominicana: Una agenda prioritaria de políticas e inversiones Nicaragua. OIRSA 113 p.
- Chitimia-Dobler, L. Pfeffer, T, y Dunlop J. (2016). *Haemaphysalis cretacea* a nymph of a new species of hard tick in Burmese amber. *Parasitology* 145, 1440-1451 doi: [10.1017/s0031182018000537](https://doi.org/10.1017/s0031182018000537)
- Dantas-Torres, F. (2018). Species Concepts: What about Ticks? *Trends in Parasitology*, 34(12), 1017-1026. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.09.009>
- Dantas-Torres, F., Fernandes-Martins, T., Munoz-Leal, S., Castilho-Onofrio, V., Barros-Battestie, D.M. (2019). Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 10,101252 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.012>
- Damgaard, I.N., Skakkebaek, N. E, Toppari, J., Virtanen, H.E, Shen, H, Schramm K.W., Petersen, J. H, Jensen, Tina.K, y Main, K. M. (2006). Persistent pesticides in human breast milk and cryptorchidism. *Environ Health Perspect*, 114(7)1133-8. doi:10.1289/ehp.87.
- de la Vega, R; Díaz, G; Galán, M., y Fernández, C. (2012). Anatomy and histology of the female reproductive system of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Rev. Salud Anim.*1:1-10.
- Díaz, E.R. (2012). Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos *Rhipicephalus microplus*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal.*5,72-81.

- Domínguez, D., Cruz, R., Almazán, C., Saltijeral, J., De la Fuente, J. (2010). *Boophilus microplus*: Aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12,181 – 192.
- Dominguez, D., y Cruz, R. (2014). Perspectivas de la investigación genómica en el control de la garrapata y las enfermedades que transmite. II Simposio internacional de resistencia a los pesticidas en artrópodos, 2009. Eds. D. Domínguez, R. Cruz, M. Ortiz. Mérida, Yucatán, MX. Universidad Autónoma de Guerrero. 108 p.
- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C, Hoffmann, J.A, y Imler, J.L. (2005). The JakSTAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nat Immunol*, 6,946-953. <https://doi.org/10.1038/ni1237>
- Dubovskiy, M., Whitten, M.M. A., Yaroslavtseva, O. N., Greig, C., Kryukov, V. Y. Grizanova, E. V., Mukherjee, K., Vilcinskis, A., Glupov, V. V., y Butt T. M. (2013). Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi?. *PLoS One*, 8 (4), e60248 <https://doi.org/10.1371/annotation/3c61c1d6-7981-4f3e-a690-1ce7a4d89285>
- Edwards, K. T., Goddard, J., y Varela-Stokes, A. S. (2009). Examination of the Internal Morphology of the Ixodid Tick, *Amblyomma maculatum* Koch, (Acari: Ixodidae); a “How-to” Pictorial Dissection Guide. *Midsouth entomologist*, 2: 28-39
- Estrada-Peña A. (2015). Orden Ixodida: Las Garrapatas. *Ibero Diversidad Entomológica @ccesible* no 13:1-15.
- Eskenazi, B., Marks, A.R., Bradman, A., Harley, K., Barr, B., Johnson, C., Morga, N., y Jewell, N.P. (2007). Organophosphate Pesticide Exposure and Neurodevelopment in Young Mexican-American Children. *Environmental Health Perspectives*, 115(5), 792-798.
- Estrada-Peña, A., y de la Fuente, J. (2018). The fossil record and the origin of ticks revisited. *Exp Appl Acarol* 75, 255-261 <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0261-z>
- FAO. (2003). Resistencia a los Antiparasitarios: Estado Actual con Énfasis en América Latina. FAO. Roma, IT. 40 p.
- FAO. (2009). El estado mundial de la agricultura y la alimentación, 2009.El ganado y la salud humana y animal.22 p disponible en <http://www.fao.org/publications/es/>.
- FAO. (2015). El cambio climático, las plagas y las enfermedades transfronterizas. 4p. Disponible en <http://www.fao.org/foodclimatep>.
- FAO. (2010). La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, eds. Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma (disponible en <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm>) (traducción de la versión original en inglés, 2007).
- Feldman-Muhsam, B; Borut, S. (1971). Copulation in ixodic ticks. *J Parasitol*, 57(3), 630-634.

- Fiorotti de Paulo, J., Guedes-Camargo, M., Coutinho-Rodrigues, C. J.B., Marciano, A. F., Clemente de Freitas, M., Mesquita da Silva, E., Silva-Gôlo, P., Spadacci -Morena D.D., da Costa-Angelo, I., y Pinheiro-Bittencourt, V.R.E. (2018). Rhipicephalus microplus infected by Metarhizium: unveiling hemocyte quantification, GFP-fungi virulence, and ovary infection. *Parasitology Research* (117), 1847-1856
<https://doi.org/10.1007/s00436-018-5874-y>
- Gao, Q., Jin, Kai., Sheng-Hua, Y., Z, Yongjun., Xiao, G., Shang, Y., Zhibing, D., Hu, X., Xie, X.Q., Zhou, G., Peng, G., Luo, Z., Huang, W., Wang, B., Fang, W., Wang, S., Zhong, Yi., Ma, L-J., St-Leger, R.J., Zhao, G.P., Pei, Y., Feng, M.G., Xia, Y., y Wang, Ch. (2011). Genome Sequencing and Comparative Transcriptomics of the Model Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet* 7(1): e1001264. doi:10.1371/journal.pgen.1001264
- Gindin, G., Ment, D., Rot, A., Glazer, I., y Samish, M. (2009). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) to Tick Eggs and the Effect of Egg Cuticular Lipids on Conidia Development. *J. Med. Entomol*, 46(3), 531-538
<http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0318>
- Gindin, G.; Samish, M., Alekseev, E., Glazer, I. (2001). The Susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) Ticks to Entomopathogenic Fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 11: 111-118.
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R., Barros, A.T., Andreotti, R., Cancado, P.H., Leon, A.A., Pereira, J.B., y Villela, H.S. (2014). Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet*, 23, 150-156.
- Gottar, M., Gobert, V., Matskevich, A.A., Reichhart, J.M, Wang, C., Butt, T.M., Belvin, M, Hoffmann, J.A., y Ferrandon, D. (2006). Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell*, 127, 1425-1437. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.046.
- Gunnell, D., Eddleston, M., Phillips, M.R., y Konradsen, F. (2007). The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC Public Health*, 7:357. doi:10.1186/1471-2458-7-357
- Hilker, M y Meiners, T. (2002). *Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition*. 1a edición en inglés. Blackwell Publishing. Berlín, Viena.
- Humber, RA. (2008). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98:262-266
- Hung, D.Z., Yang, H.J., Li, Y.F., Lin, C.L., Chang, S.Y., Sung, F.V., y Tai, S.CW. (2015). The long-term effects of organophosphates poisoning as a risk factor of CVDs: a nationwide population-based cohort study. *PLoS One* 10:e0137632. doi:10.1371/journal.pone.0137632

- Hu, G., y Leger, R. J. St. (2002). Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl. Environ. Microbiol*, 68, 6383-6387 DOI: [10.1128/AEM.68.12.6383-6387.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6383-6387.2002)
- 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. *Veterinary Parasitology*, 137, 1-10
- Karami-Mohajeri, S., y Abdollahi M. (2011). Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Hum Exp Toxicol* 30(9):1119-40. doi:10.1177/09603271110388959
- Kaufman, W.R. (2004). Assuring paternity in a promiscuous world: are there lessons for ticks among the insects? *Parasitology*, 129:145-160.
- Keirans, J.E., (2009). Order ixodida. In: Krantz, G.W., Walter, D.E. (Eds.), *A Manual of Acarology*, third ed. Texas Tech University Press, Lubbock, Texas, pp. 111-123.
- Kemp, D.H., Stone, B.F., Binnington, K.C., (1982). Tick attachment and feeding: role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions and the host response. In: Obenchan, F.D., Galun, R. (Eds.), *Physiology of Ticks*. Pergamon Press, pp.119-168
- Krantz, G.W. (1978). *A manual of acarology*. Second edition. Oregon State Univ Book Stores, Corvallis, Oregon.
- Lecuona, R. (1996). Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Técnicas empleadas con hongos entomopatógenos. Ed. Lecuona, R. *Pra edición*. Buenos aires. AR. 338 p
- Leahy, J., Mendelsohn, M., Kough, J., Jones, R. y Berckes, N. (2014). Biopesticide oversight and registration at the US Environmental Protection Agency. In *Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities* (eds Gross, A. D. et al.) American Chemical Society Symposium Series, 1172, 3-18. DOI: [10.1021/bk-2014-1172.ch001](https://doi.org/10.1021/bk-2014-1172.ch001)
- Leemon, D.M. y Jonsson, N.N. (2012). Comparative studies on the invasion of cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) and sheep blowflies (*Lucilia cuprina*) by *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Journal of Invertebrate Pathology* 109, 248-259. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.12.001>
- Leger R. J.St. y Wang, J.B. (2020). *Metarhizium*: Jack of all trades, master of many. *Open Biol*, 10: 200307. <https://doi.org/10.1098/rsob.200307>
- Leo, P., Geest, V., y Bruin, J. (2008). Diseases of mites and ticks: from basic pathology to microbial control-an introduction. *Exp Appl Acarol*. 46, 3-6 DOI: [10.1007/s10493-008-9222-2](https://doi.org/10.1007/s10493-008-9222-2)

- Lord, J. (2005). From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology*. 89:19-29.
- Lonc, E., Guz-Regner, K., Kiewra, D., Szczepańska, A. (2014). Insight into tick biocontrol with special regard to fungi. *Annals of Parasitology*, 60, (3)169-177p.
- López-Llorca, LV., Macia-Vicente, JG., Jansson, H-B. (2008). Mode of action and interactions of nematophagous fungi. In: Ciancio A, Mukerji KG (eds) *Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes*. Springer, Dordrecht.
- Lu, D., Wang, D., Ni, R., Lin, Y., Feng, C., Xu, Q., Wang-Guoquan, X., y Zhou, Z. (2015). Organochlorine pesticides and their metabolites in human breast milk from Shanghai, China. *Environ Sci Pollut Res Int* ,22(12):9293-306. doi:10.1007/s11356-015-4072-z
- Lu, H. L y Leger. R.J. St. (2016). *Insect Immunity to Entomopathogenic Fungi. Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi*. Academic Press is an imprint of Elsevier. DOI: [10.1016/bs.adgen.2015.11.002](https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.002)
- Mans, B.J., de Klerk, D.R., de Castro, M.D., y Latif, A. (2012). The mitochondrial genomes of *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae) and *Argas africanus* (Ixodoidea: Argasidae): estimation of divergence dates for the major tick lineages and reconstruction of ancestral blood-feeding characters. *PLoS One* 7, e49461 DOI:[10.1371/journal.pone.0049461](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049461)
- Mans, B.J. de Klerk, D.R, Pienaar, R., y Latif, A.A. (2011) *Nuttalliella namaqua*: a living fossil and closest relative to the ancestral tick lineage: implications for the evolution of blood-feeding in ticks. *PLoS One* ,6 (8), e23675 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023675>.
- Manzano, R., Díaz, V., y Pérez, R. (2012). *Garrapatas: Características Anatómicas, Epidemiológicas y Ciclo Vital. Detalles de la Influencia de las Garrapatas Sobre la producción y Sanidad Animal*. Sitio argentino de producción animal.
- Marmaras, VJ., y Lampropoulou, M. (2009). Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell Sign*, 21:186-195. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.08.014>
- McLoughlin, N. (2017). Fungal origins?. *Nature Ecology and Evolution* 1: 1-2
- Merillon, J., y Ramawat, K. (2012). *Plant defence: Biological control*. Springer Science + Business Media B.V. New york. 412 p.
- Ment, D., Gindin, G., Glazer, I., Perl, S., Elad, D., Samish, M. (2010). The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. *Fungal biology*, 114, 49 -56.
- Miranda-Contreras., Gómez-Pérez, R., Rojas, G., Cruz, I., Berrueta, L., Salmen, S., Colmenares, M., Barreto, S., Balza, A., Zavala, L., Morales, Y, Molina, Y., Valeri, L., Contreras, C.A., y Osuna, J.A. (2013). Occupational Exposure to Organophosphate and Carbamate Pesticides Affects Sperm Chromatin Integrity and Reproductive Hormone

Levels among Venezuelan Farm Workers. *Journal of Occupational Health*, 55, 195-203.
<https://doi.org/10.1539/joh.12-0144-FS>

- Monzón, A. (2001). Producción, Uso y Control de Calidad de Hongos Entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*. 63: 95-103.
- Mora-Hernández, C. (1998). Revisión sobre la problemática y los últimos avances en el control de la garrapata *Boophilus microplus*. *Encuentro Año XXX*. 46: 40-45.
- Mora-Hernández, C. A.; Oliveira-Soares, Cleber; Massard, C.L.; da Fonseca, A. H. (1998). Histología do intestino de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *R. bras. Ci. Vet.*, 5, (2)79-81.
- Murrel, A.; Barker, S. (2003). Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56, 169-172.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. (2015). NCBI Taxonomy browser <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=ixodidae>. Consultada en Enero de 2020.
- Nari, A. (1995). Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Veterinary Parasitology*, 57, 153-165.
- Nari, A. (2011). Towards sustainable parasite control practices in livestock production with emphasis in Latin America. *Vet Parasitol*, 180, 2 -11.
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., y Hens, L. (2016). Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Front. Public Health*, 4:148. doi: 10.3389/fpubh.2016.00148
- Nikoloff, N., Carranza-Martin, A.C., Fabra, M. C., y Furnus, C. C. (2021). Amitraz induced cytotoxic effect on bovine cumulus cells and impaired oocyte maturation. *Environmental Science and Pollution Research* <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12670-x>
- Núñez, J., Muñoz, M., y Moltedo, H. (1982). *Boophilus microplus*. La garrapata común del ganado vacuno. Pra ed. Buenos aires, AR, Editorial Hemisferio Sur S.A. 184 p.
- Oliver, Jr, JH. (1974). Symposium on reproduction of arthropods of medical and Veterinary importance. IV. Reproduction in ticks. (Ixodoidea). *J Med Entomol*, 11, (1) 26-34.
- Oporta, J.J. (2017). Control microbiano de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) del ganado bovino, con hongos entomopatógenos en condiciones de laboratorio. [Tesis Ing. Agrónomo. Universidad Nacional Agraria-sede Juigalpa, Chontales].
- Ojeda, M., Rodríguez, R., Galindo, E., Lezama, R., y Cruz, C. (2011). Control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) using the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Review. *Rev Mex Cienc Pecu*, 2, 177-192.

- Ortiz-Urquiza, A, y Keyhani, N.O. (2013). Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, 4, 357-374.
- Pathak, X.C, y Kulshrestha, V. (1998). Experimental aspergillosis in the German cockroach *Blattella germanica*: a histopathological study. *Mycopathologia*, 143, 13-16. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006993430806>
- Peñalver, E., Arillo, A., Delclòs, X., Peris, D., Grimaldi, D. A., Anderson, S.R., Nascimbene, P.C., y Pérez-de la Fuente, R. (2017). Ticks parasitised feathered dinosaurs as revealed by Cretaceous amber assemblages. *Nat. Commun.* 9, 472, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01550-z>
- Pirsaheb, M., Limoe, M., Namdari, F., Khamutian, R. (2015). Organochlorine pesticides residue in breast milk: a systematic review. *Med J Islam Repub Iran* 29:228.
- Quiroz, H. (1990). Parasitología. Primera edición, D F, MX, Editorial Limusa, S.A de C.V. 786 p.
- Quinelato, S., Golo, P., Perinotto, W., Sá, F., Camargo, M., Angelo, I., Moraes, A., Bittencourt, V. (2012). Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. *Veterinary Parasitology* 190, 556-565.
- Rangel, D.E, Alston, D.G., y Roberts, D.W. (2008). Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycol. Res*, 112, 1355-1361. doi:10.1016/j.mycres.2008.04.011
- Remedio, R.N., Nunes, P.H. y Camargo-Mathias, M.I. (2014). The extensible integument of *Rhipicephalus sanguineus* female ticks in different feeding stages: A morphological approach. *Acta Zoologica (Stockholm)* 0: 1-9 doi: 10.1111/azo.12079
- Ren, Q., Liu, Z., Guan, G., Sun, M., Ma, M., Niu, Q., Li, Y., Liu, A., Liu, J., Yang, J., Yin, H., y Luo, J. (2012). Laboratory evaluation of virulence of Chinese *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. *Biological Control*, 63,98-101.
- Reza-Moosavi, M y Zare, R. (2012). Fungi as Biological Control Agents of Plant-Parasitic Nematodes. In *Plant Defence: Biological Control*. Edit. J.M. Mérillon y K.G. Ramawat. Springer Science+Business Media B.V.
- Rodríguez, R., Rosado, J., Ojeda, M., Pérez, L., Martínez, I., Bolio, M. (2014). Control Integrado de Garrapatas en la Ganadería Bovina. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*.3: 295-308.
- Rodrigues, D.S., y Leite, R.C. (2013). Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 65(5) 1570-1572.

- Roberts, D.W, y St. Leger, R.J. (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect–pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv. Appl. Microbiol.* 54, 1-70. doi:10.1016/S0065-2164(04)54001-7
- Rosario-Cruz, R., Almazan, C., Miller, R., Domínguez- García, D., Hernández-Ortiz, R., y de la Fuente, J., (2009). Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Front Biosci*, 14, 2657- 2665.
- Ruvalcaba, M. (2009). Perspectivas de control biológico parasitario y nuevas alternativas en el sector pecuario. Manejo integrado de *Boophilus microplus*. INIFAP. MX. 41p
- Saito, K., Bechara, G., Takagi, E., de Oliveira, P., Denardi, S., Camargo, M. (2005). Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 129, 299-311.
- Semchuk, KM., Love, E.J., y Lee, R.G. (1992). Parkinson’s disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology*, 42:1328-35. doi:10.1212/WNL.42.7.1328
- Schneider, L., Silva, C., Pamphile, J., Conte, H. (2013). Infection, colonization and extrusion of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in pupae of *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Entomology and Nematology*. 5:1-9
- Shi, W.B y Feng, M.G. (2004). Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. *Biological Control*, (30) 165-173. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.01.017>
- Samish, M., y Rehacek, J. (1999). Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annu. Rev. Entomol.* 44:159-182.
- Sant, N., Iwanicki, A., Pereira, A.A., Botelho, A.B., Rezende, J.M., de Andrade-Moral, R., Zucchi, M.I., y Júnior, I.D., (2019). Monitoring of the field application of *Metarhizium anisopliae* in Brazil revealed high molecular diversity of *Metarhizium* spp in insects, soil and sugarcane roots. *Sci. Rep*, 9, 1-2.
- San-Aw, K. M. y Mun-Hue, S. (2017). Mode of Infection of *Metarhizium* spp. Fungus and Their Potential as Biological Control Agents. *J Fungi (Basel)*, (7), 3-30. doi: 10.3390/jof3020030.
- Sanborn, M., Kerr, K.J., Sanin, L.H., Cole, D.C., Bassil, K.L., y Vakil, C. (2007). Non-cancer health effects of pesticides. Systematic review and implications for family doctors. *Can Fam Physician*, 53, 1712-20.
- Saravia-Bonilla, A S y Vindell-Amador, B G. (2013). Cambios histológicos en órganos internos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, causados por Lactonas macrocíclicas:

Ivermectina 1 %, Doramectina 1% y Abamectina 1%. [Tesis Lic. Med vet. Universidad Nacional Agraria. Managua, NI].

Schrank, A., y Vainstein, M.H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56:1267-1274.

Sônia M., Micheletti F., de Souza, L., Valente, E., de Araújo, M., da Silva, N., Gómez, M. (2012). Evaluation of entomopathogenic fungi as biological control agents *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *IDESIA* (Chile), 30: (1). 93-99

Sonenshine, DE. (1991). *Biology of Ticks*. Oxford University Press.

Sonenshine, D.E. y Roe, R.M. (2013). *Biology of Ticks*. Oxford University Press.

Sterba, J., Dupejova, J., Fiser, M., Vancova, M., y Grubhoffer, L. (2011) Fibrinogen-related proteins in ixodid ticks. *Parasit Vectors*, 4:127. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-127>

Steinhaus, E. (1956). *Microbial Control-The Emergence of an Idea. A Brief History of Insect Pathology through the Nineteenth Century*. University of California. Berkeley California. *Hilgardia*.26, (2), 107-157.

Steinhaus, A. E. (1957) a. Concerning the Harmlessness of Insect Pathogens and the Standardization of Microbial Control Products. *Journal of economic entomology*. 50:715-720.

Steinhaus, A. E. (1957) b. Microbial diseases of insects *Annu. Rev. Microbiol.* 11:165-182

Suárez, M., Méndez, L., Valdez, M., De Moura, R., Dos Reis, A., Vargas, N., Ascanio, E. (2007). Control de las infestaciones de la garrapata *Boophilus microplus* en la ganadería Cubana y en regiones de Latinoamérica con la aplicación del inmunógeno Gavac® dentro de un programa de lucha integral. *Redectopar. Red Electrónica de Garrapatas y Enfermedades Transmitidas por Garrapatas para América Latina y el Caribe*. Red Ectopar. Disponible en: <http://www.corpoica.org.co/redectopar/redectopar.asp>.

Suh, SO, Noda H, Blackwell M. (2001). Insect symbiosis: derivation of yeast-like endosymbionts within an entomopathogenic filamentous lineage. *Mol. Biol. Evol.* 18, 995-1000. (doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003901)

Tanada, Y. (1959). Microbial control of insect pests. *Annu. Rev. Entomol.* 4, 277-302.

Tartar, A., Shapiro, A.M., Scharf, D.W. y Boucias, D.G. (2005). Differential expression of chitin synthase (*CHS*) and glucan synthase (*FKS*) genes correlates with the formation of a modified, thinner cell wall in *in vivo*-produced *Beauveria bassiana* cells. *Mycopathologia*, (160), 303-314.

- Till, M.V. (1961). Memoirs of the entomological society of the Southern Africa: A contribution of anatomy and histology of the Brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus*. South African Institute for medical Research. Pretoria, Unión of South Africa.
- Valerio-Garcia, M., Monteiro, A., y Szabó, M. (2004). Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. *Ciência Rural*, Santa Maria, 34:1513-1518.
- Valerio-Garcia, M., Monteiro, C., Szabo, M., Prette, N., y Bechara, G. (2005). Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *metarhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36:368-372.
- Vega, F., y Kaya, H. (2012). *Insect Pathology* Second Edition. Elsevier Academic Press 32 Jamestown Road, London NW1 7BY, UK.
- Vega, F. E., Goettel, M.S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M.A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N.K., Monzon, A., Ownley, B.H., PELL, J. K., Rangel, D. E.N., y Roy, H.E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their Ecology. *Fungal Ecology*, 149-159. <https://doi:10.1016/j.funeco.2009.05.001>.
- Vertyporokh, L., Hulás-Stasiak, M., y Wojda, I. (2020). Host-pathogen interaction after infection of *Galleria mellonella* with the filamentous fungus *Beauveria bassiana*. *Insect Science* (27), 1079-1089. <https://doi:10.1111/1744-7917.12706>
- Villar, C. (2012). El parasitismo en bovinos y el cambio climático en países tropicales con énfasis en investigaciones de Colombia. Sitio argentino de producción animal. 7 p. Disponible en <http://www.produccion-animal.com.ar>.
- Wang, Bo., Tsakiridis, E. E., Zhang, Sh., Llanos, A., Desjardins, E. M., Yabut, M.J., G. E, Alexander., Day, E. A., Smith, B. K., Lally, J. S. V., han -Wu, J., Raphenya, A. R., Srinivasan, K.A., McArthur, A. G., Kajimura Sh., Jagdish -Suresh P., Wade, M-G, Morrison, M. K., Holloway, A. C., y Steinberg G. R. (2021). The pesticide chlorpyrifos promotes obesity by inhibiting diet-induced thermogenesis in Brown adipose tissue. *Nature Communications*, 12:5163
- Wang, Ch., Duan, Z y Leger, R. J. St. (2008). MOS1 Osmosensor of *Metarhizium anisopliae* Is Required for Adaptation to Insect Host Hemolymph. *EUKARYOTIC CELL*, 7(2) 302-309. <https://doi:10.1128/EC.00310-07>
- Wang, Ch y Leger, R. J. St. (2006). A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *PNAS*, 103(17) 6647 -6652. <https://doi.org/10.1073/pnas.060195110>
- Wang, Ch, y Leger, R.J. St. (2007). The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryot. Cell*, 6, 808-816. doi:10.1128/EC.00409-06

World Health Organization. (1990). Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture. England: World Health Organization.

Zhang, L., Shi, W.B., y Feng, M. G. (2014). Histopathological and molecular insights into the ovicidal activities of two entomopathogenic fungi against two-spotted spider mite. *Journal of Invertebrate Pathology*, (117), 73-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.02.005>

Zheng, P., Xia, Y., Xiao, G., Xiong, Ch., Hu, X., Zhang, S., Zheng, H., Yinhuang, Zhou, Yan., Wang, Shengyue., Ping- Zhao, G., Liu, X., Leger. J.St. R. y Wang, Ch. (2012). Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Genome Biol.* 12, R116. (doi:10.1186/gb-2011-12-11-r116)