

## DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LA EMBRIOGÉNESIS DE LA GARRAPATA DEL GANADO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE)

Irais Granda García<sup>1</sup>, Estefan Miranda-Miranda<sup>2</sup>, Reynaud Enrique<sup>3</sup>, Manuel Fernández Ruvalcaba<sup>2</sup>, Raquel Cossio-Bayugar<sup>2</sup>. <sup>2</sup>Centro nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria INIFAP Carr. Fed. Cuernavaca-Cuautla No. 8534, Jiutepec Morelos 62550. irais\_mvz@hotmail.com, miranda.estefhan@inifap.gob.mx, fernandez.manuel@inifap.gob.mx, cossio.raquel@inifap.gob.mx, <sup>3</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad, 2001, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca 62210, Mexico; enrique@ibt.unam.mx.

**RESUMEN:** El objetivo de este trabajo, fue estudiar y caracterizar la embriología de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* desde la oviposición hasta la eclosión. Se fijaron muestras de huevos embrionados cada 24 h, estas muestras se tiñeron con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) y se visualizaron al microscopio de epifluorescencia. Se identificaron 14 etapas que representan los eventos fisiológicos por los que pasa el desarrollo del embrión hasta su eclosión; primeras divisiones nucleares (día1-3; division nuclear sin division celular), blastodermo (día 4) blastoporo (día 5), engrosamiento primario (día5), campo dorsal (día9), formación de banda germinal (día 9), segmentacion de la banda germinal (día 9), brote de extremidades, (día 9-11) diferenciación de extremidades (día12), diferenciacion neural (día 13), inversión (día 14), cierre dorsal (día 15), cierre ventral (día16) post embrión (día 20). Este trabajo muestra un sistema para reconocer las distintas etapas del desarrollo embrionario con herramientas simples del laboratorio.

Palabras clave: embriogénesis, garrapata el ganado, desarrollo de garrapatas.

### Embryogenesis morphological description of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)

**ABSTRACT:** The objective of this work was to study and characterize the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryogenesis from freshly laid eggs to hatching larvae. Eggs were fixated every 24 hr. and treated eggs were placed on a microscope glass slide and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Specimens were imaged on an epifluorescence microscope. Fourteen stages were identified which represent the physiological events of embryonic development until larval hatching: Early nuclear divisions (1-3 days; nuclear mitosis without cytokinesis), blastoderm (4th day) blastopore (5th day), primary thickening (5th day), dorsal field (9th day), Germ band formation (9th day), germ band segmentation (9th day), limb differentiation (12th day), nervous system differentiation (13th day), inversión (14th day), dorsal closure (15th day), ventral (16th day) postembryonic (20th day). This work provides us with a system which allows easy recognition of the distinct tick embryo development stages using simple laboratory tools.

Key words: embryogenesis, cattle tick, tick development.

### Introducción

Uno de los principales problemas que amenazan la ganadería de bovinos en zonas tropicales y subtropicales es la presencia de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Nuñez *et al.*, 1985; de Castro 1997, Cossio-Bayugar *et al.*, 2012). Estos ectoparásitos han tenido gran impacto adverso en la salud del ganado debido a que actúan como vectores de importantes enfermedades infecciosas bovinas, pero también de manera indirecta en la salud humana debido a la capacidad de resistencia que han desarrollado a los pesticidas químicos usados masivamente en el infructuoso control de la garrapata,

contaminando el medio y afectando la carne de consumo humano; este conjunto de problemas así como daños directos e indirectos a la productividad del sector ganadero, han llevado a los científicos a buscar nuevos métodos de control para estos parásitos hematófagos por lo que es imprescindible conocer mejor los aspectos biológicos de la garrapata que aún no se han profundizado. Es el objetivo de este estudio conocer y caracterizar la embriogénesis de la garrapata *R. microplus* a partir de los huevos recién ovipositados hasta la eclosión de las larvas.

## Material y Método

Se utilizó una cepa de garrapata de *R. microplus* de referencia susceptible a acaricidas comerciales; las garrapatas fueron mantenidas y cultivadas sobre bovinos en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) en Jiutepec, Morelos, México. Se infestaron bovinos con 10,000 larvas de garrapatas de 15 días de edad y 21 días después de la infestación, se recolectaron las hembras ingurgitadas, se pusieron a ovipositar en cajas Petri y se incubaron a 28 °C y 80% de humedad relativa hasta la ovoposición (Cossio-Bayugar *et al.*, 2012). Una vez iniciada la postura se colectaron los huevos ovipositados a las 72 horas, ya que los huevos de las primeras 48 horas presentan bajo porcentaje de viabilidad, los huevos se mantuvieron en una incubadora a 28 °C con una humedad relativa del 80% acorde a metodología descrita previamente (Miranda–Miranda *et al.*, 2009). Los embriones se fijaron en una solución PBS conteniendo 4% de paraformaldehído. Después de la fijación se descorionaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) por 5 minutos, se lavaron varias veces con PBS para eliminar el NaClO se incubaron en la solución fijadora con hetpano y se guardaron en metanol a -20°C hasta su uso (Ashburner, 1989).

**Visualización de huevos en microscopio de epifluorescencia.** Se colocó una pequeña cantidad de muestra de embriones fijados en un tubo eppendorf de 2.5 ml, se le realizó un lavado con PBS/Tritón X100 al 0.1% por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante, se adicionó 1ml de PBS/Tritón X100 al 0.1% DAPI (2:5000) y se incubó por 20min, transcurrido el tiempo, se eliminó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con 1ml de PBS/Tritón X100 al 0.1% por 5 min cada lavado; la muestra se montó colocando 160µl de citifluor en el centro de un portaobjetos y posteriormente adicionó la muestra evitando dejar burbujas, se colocó el cubreobjetos y se revisó que no quedara aire, en su defecto se adicionó la cantidad necesaria de citifluor para eliminar el aire existente, se selló el portaobjetos con el cubreobjetos, barniz y se visualizó la muestra en el microscopio de epifluorescencia. (TechSmith Corporation).

## Resultados y Discusión

Se fijaron 26 muestras de huevos de garrapata *R. (Boophilus) microplus* correspondiente a los 26 días que duró la embriogénesis de la muestra colectada. Se obtuvieron 828 fotografías de embriones teñidos con DAPI y a partir de estas imágenes se identificaron 14 etapas distinguibles del desarrollo embrionario con diferentes tiempos de duración.

En la primera etapa con duración de 1 a 3 días se observan las primeras divisiones (Fig. 1A), como puntos brillantes distribuidos en todo el huevo, este resultado está relacionado a lo reportado por Seixas y colaboradores (2012) que describen que la embriogénesis de la garrapata *R. microplus* comienza con un cigoto no celular y divisiones repetidas del núcleo sin división celular, estas divisiones las describe del primero al cuarto día después de la oviposición.

En la segunda etapa, a los 4 días de desarrollo se forma el blastodermo, en la cual existe una migración de células a la periferia del huevo (Fig. 1 B). Al quinto día se da la tercera etapa donde se presenta la formación del blastoporo en uno de los polos del huevo (Fig. 1C).

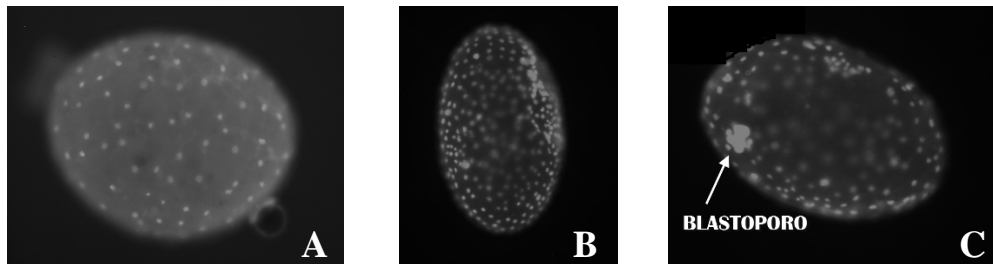


Figura 1. A) Etapa 1: Primeras divisiones. B) Etapa 2: Blastodermo. Se observa una mayor cantidad de núcleos en el huevo, los cuales comienzan a migrar a la superficie del huevo. C) Etapa 3: Blastoporo. Algunas células comienzan a concentrarse en uno de los polos la cual es denominada blastoporo. Imágenes obtenidas al microscopio de epifluorescencia (10X).

Posteriormente en la cuarta etapa, al sexto día de la embriogénesis, se observa el engrosamiento primario en el mismo sitio donde se formó el blastoporo (Fig. 2A). En el engrosamiento primario se observa una mayor densidad de tejido y núcleos en el área del blastoporo generando una apariencia de una pequeña protuberancia, la cual se considera que es resultado de la internalización de las células de la región del blastoporo debajo del blastodermo (Mittman y Wolff, 2012); En el inicio de esta etapa, las arañas comienza la gastrulación la cual es el proceso morfogénico que separa el blastodermo (una capa sencilla de células), en las tres capas germinales: ectodermo, endodermo y mesodermo, reorganizando el tejido en un mayor grado de complejidad donde el blastoporo desaparece marcando así el final de la gastrulación (Wolff y Hilbrant, 2011). La quinta etapa se presenta hasta los nueve días de desarrollo (Fig. 2B) distinguiéndose un campo dorsal, donde hay una migración celular dejando ver una división de la masa de tejido del embrión y la vitelina.

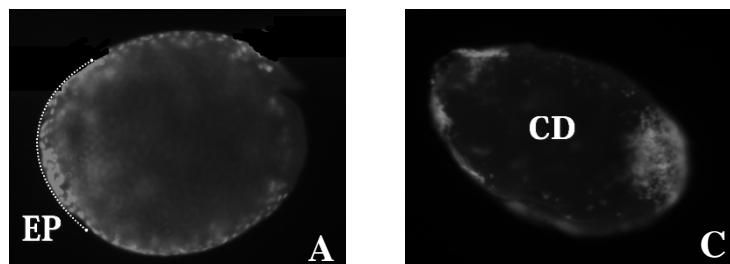
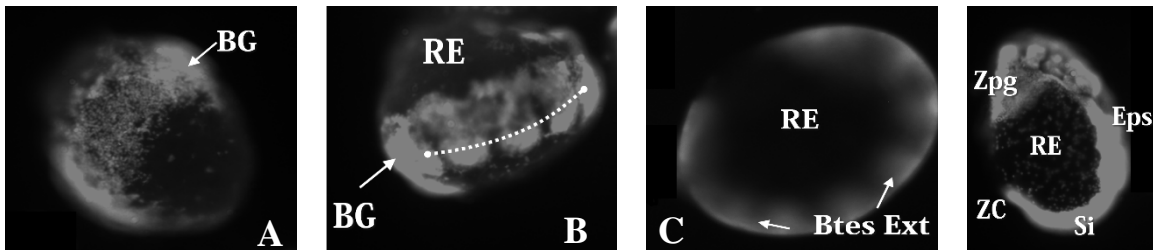


Figura 2. A) Etapa 4: Engrosamiento Primario (EP). Se observa una mayor densidad de tejido en el área del blastoporo. B) Etapa 5: Campo dorsal (CD). Hay una migración celular dejando dos áreas de diferente masa celular, la de menor densidad se denomina campo dorsal. Imágenes obtenidas al microscopio de fluorescencia (10X).

En el noveno día, en la sexta etapa, se observa un desarrollo rápido del embrión, donde después del campo dorsal, se forma la banda germinal donde la consecuente migración de las células forman una masa de tejido que se extiende a lo largo del huevo de forma ventral dejando la mayor parte de la vitelina en la parte dorsal (Fig. 3A). En este mismo día se presenta la séptima etapa, caracterizada por la segmentación de la banda germinal de forma transversal distinguiéndose los segmentos de lo que en un futuro serán las patas, pedipalpo y los extremos del embrión (Fig. 3B).

En la etapa 8 se observan los brotes de las extremidades los cuales comienzan a visualizarse a partir del noveno hasta el onceavo día (Fig. 3C), en esta imagen se visualizan los primeros esbozos de

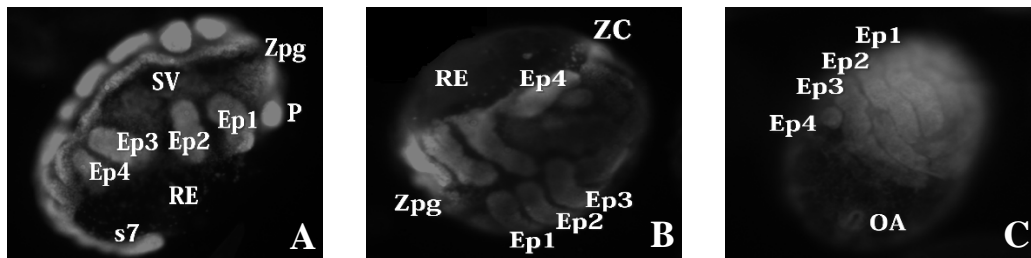
lo que en un futuro serán extremidades como la zona pre-gnatosomal, los pedipalpos, los tres pares de patas y algunos segmentos que van formándose conforme avanza el desarrollo y del otro extremo de la zona pre-gnatosomal, la zona de crecimiento, así como la aparición del surco ventral. La novena etapa se presenta a los doce días, la cual está determinada por la diferenciación de las extremidades, en esta etapa se aparecía mejor las diferentes extremidades que se han formado así como la aparición de nuevos segmentos ideosomales; dentro de las estructuras que se pueden visualizar están los lóbulo pre-quelicerales, los pedipalpos, cuatro pares de patas, que aunque la larva emerge con 3 pares de patas ya aparece el vestigio del cuarto par de patas la cual será notoria hasta la adultez, así como el surco ventral que se va extendiendo longitudinalmente conforme avanza el desarrollo (Fig. 3D).



**Figura 3.** A) Etapa 6. Banda germinal (BG). En esta región se aprecia una densidad celular más alta en comparación con el tejido embrionario restante. B) Etapa 7: Segmentación de la Banda Germinal (día 9). Se observa con un tejido más denso el desarrollo de los segmentos primordiales del cuerpo del embrión. C) Figura 4. Etapa 8. Brotes de las extremidades (día 9). Vista lateral. Se observan segmentos de lo que en el futuro serán las extremidades gnatosomales e ideosomales. D) Etapa 9 Diferenciación de las extremidades. Vista lateral (día 10). RE. Región extraembrionaria. Zpg Zona pregnatosomal. Btes Ext. Brotes extremidades. Eps. Extremidades podales. ZC. Zona de crecimiento. Si. Segmentos ideosomales. Imágenes obtenidas al microscopio de fluorescencia (10X).

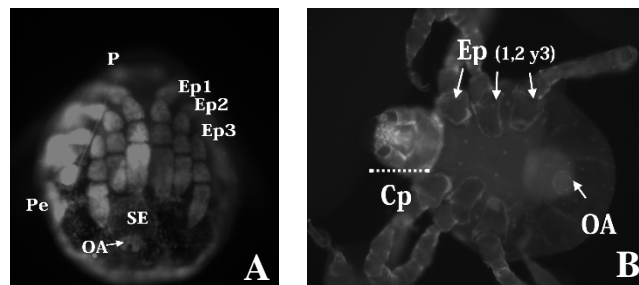
La diferenciación neural se observa a los trece días de desarrollo en la etapa 10, aquí el surco ventral sigue extendiéndose y las extremidades anteriores crecen más a diferencia de las posteriores, se observa mayor densidad en la zona pre-gnatosomal, sin embargo no es posible visualizar esta región con más detalle; en la parte posterior tiene una mejor visibilidad los segmentos ideosomales que se han formado hasta este punto (Fig. 4A). La etapa once denominada inversión, se da a los catorce días de desarrollo, es cuando las extremidades tanto gnatosomales como ideosomales se alargan y toman más volumen, se logran ver cuatro pares de patas sin embargo la última se encuentra en dirección diferente a los otros tres pares de patas, los segmentos ideosomales se observan más definidos y, en general el embrión comienza a internalizarse abarcando así un segmento de la parte dorsal del huevo (Fig. 4B). Mittman y Wolff (2012) informan que esta etapa es el proceso por el cual la yema se internaliza y la banda germinal se ha dividido ventralmente dejando una hendidura que es al menos dos veces tan ancho como el surco ventral, y al final de esta etapa, los terguitos prosomales comienzan a extenderse dorsalmente para abarcar más de la circunferencia del huevo. El ensanchamiento gradual del surco ventral es un proceso relativamente lento y que se acelera significativamente durante la etapa, marcando el inicio de la inversión dando como resultado que la distancia entre la región pre-gnatosomal y los posteriores segmentos ideosomales aumenten.

El cierre dorsal, la etapa doce se presenta a los quince días, en esta etapa el embrión ya tomó forma y la parte anterior se ha desarrollado, se logra ver el orificio anal; debido a la movilización de la vitelina y a la forma que va tomando el embrión, las extremidades podales van cubriendo la parte ventral (Fig. 4C).



**Figura 4.** Etapa 10: Diferenciación neural. (Día 10), en una vista ventro-lateral se observa una zona pre-gnatosomal, los pedipalpos y cuatro pares de patas para caminar siendo más visibles las patas izquierdas; El surco ventral se extiende posteriormente hasta el séptimo segmento ideosomal. En la parte anterior donde se encuentra la región pre-gnatosomal se aprecian dos campos con mayor densidad celular que son los posibles lóbulos pre-quelicerales. B) Etapa 11: Inversión. Vista ventro-lateral, se hacen evidentes cuatro pares de patas, sin embargo el cuarto par de patas tiene una posición horizontal dirigida hacia la zona de crecimiento. La distancia entre la zona de crecimiento y la zona pre-gnatosomal aumenta C) Etapa 12: Cierre dorsal. Vista ventral (día15); se observan los cuatro pares de patas y el orificio anal (OA). RE. Región extraembrionaria. Zpg Zona pregnatosomal. Ep(1-4)s. Extremidades podale(1-4). ZC. Zona de crecimiento. P. palpos Si. SV. Surco Ventral. S. 7. Segmento (ideosomal) 7. Las imágenes obtenidas al microscopio de fluorescencia (10X).

El cierre dorsal muestra un embrión en donde ya es posible identificar con mejor claridad la parte ventral y dorsal, así como un reacomodo de las extremidades podales de manera que las patas cubren la zona ventral de la futura larva. El cierre dorsal, es el proceso que completa la inversión donde los terguitos de ambas mitades del cuerpo se encuentran a lo largo de la línea media dorsal, cubriendo la totalidad de la yema dorsal con tejido embrionario; (Wolff y Hilbrant, 2011; Mittman y Wolff, 2012).



**Figura 6.** A) Etapa 13: Cierre Ventral. Vista ventral (día 16). Las extremidades podales cubren la region ventral. Se observa el orificio anal (OA) y saco excretor (SE). B) Etapa 14: Post-embrión. Vista ventral (día 26) en la cual es apreciable el hipostoma y los pedipalpos del capítulo (Cp), las tres pares de patas. Zpg Zona pregnatosomal. Ep(1-3)s. Extremidades podale(1-3). ZC. Zona de crecimiento. P. palpos PE. Peritrema. Si. SV. Surco Ventral. S. 7. Segmento (ideosomal) 7Las imágenes obtenidas al microscopio de fluorescencia (10X).

El cierre ventral es la etapa trece la cual se presenta a los dieciséis días de desarrollo caracterizada por el continuo movimiento del tejido embrionario y movilización de la yema, en esta etapa las extremidades podales siguen alargándose cubriendo hasta la parte superior del saco excretor o del orificio anal, estructuras que se hacen totalmente presentes, así como del peritrema; en esta etapa se logra observar las delimitaciones de los artejos en las extremidades podales (Fig. 6A).

Por último se observa la etapa catorce, la cual está denominada post-embrión, en este momento, el embrión deja de tomar la posición que tenía al eclosionar, extendiendo sus tres pares de patas y



dejando ver las coxas, estructuras que no se habían podido observar por la posición de las patas. El gnatosoma se deja apreciar en donde se observan todas las estructuras que forman el capítulo, las hileras de dientes que forman el hipostoma, y los pedipalpos; los quelíceros son apenas perceptibles (Fig. 6B).

En conclusión se puede decir que la embriogénesis de la garrapata *R. microplus* es muy parecida a otros artrópodos quelicerados como las arañas, y aunque el tiempo de desarrollo es muy diferente, en general se presentan los mismos eventos o etapas a diferente tiempo y duración; en la garrapata, las características más evidentes se logran apreciar a inicios de los nueve días de desarrollo con los brotes de las extremidades. El inicio de la organogénesis no se logró identificar debido a que ocurre en el interior del embrión.

### Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por SEP-CONACT (proyecto No. 103026).

### Literatura Citada

- Cossio-Bayugar, R., Miranda-Miranda, E., Narváez-Padilla, V., Olvera-Valencia, F. y E. Reynaud. 2012. Perturbation of tyraminerpic/octopaminergic function inhibits oviposition in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Journal of Insect Physiology*. 58: 628–633.
- Ashburner M. 1989. *Drosophila A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, Estados Unidos. 165.166.
- de Castro, J.J. 1997. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Veterinary Parasitology*. 71: 77-97.
- Nuñez, J. L., Muñoz Cobeñas, M. E. y H. L. Moltedo, 1995. *Boophilus microplus*. la garrapata común del ganado vacuno. Editorial Hemisferio Sur. Pp. 1-14.
- Miranda-Miranda E, Cossío-Bayúgar R, Quezada-Delgado MDR, Olvera-Valencia F. y S Neri-Orantes. 2009. Age-induced carboxylesterase expression in acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus*. *Research Journal of Parasitology* 4(3): 70-78.
- Mittmann, B y C. Wolff. 2012. Embryonic development and staging of the cobweb spider *Parasteadoda tepidariorum* C.L. Koch, 1841 (syn.: *Achaearanea tepidariorum*; Araneomorphae; Theridiidae). "Springer-Verlang" 222:189-216.
- Seixas, A., Oliveira, P., Termignonu, C., Logullo, C., Masuda, A., y I. da Silva Vaz Jr. 2012. "*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine". *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 148 (2012) 149-156.
- Wolff, C. y M. Hilbrant. 2011. The embryonic development of the Central American wandering spider *Cupiennius salei*. *Frontiers in Zoology* 2011, 8:15.