



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE DISULFURO DE DIBENCIOLO, TRISULFURO DE DIBENCIOLO Y METIL ÉSTER DE ÁCIDO OCTADECENOICO SOBRE EL PROCESO DE OVOGÉNESIS EN *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* RESISTENTE A ACARICIDAS †

[EVALUATION OF THE EFFECT OF THE COMBINATION OF DIBENZYL DISULFIDE, DIBENZYL TRISULFIDE AND OCTADECENOIC ACID METHYL ESTER ON THE PROCESS OF OVOGENESIS IN ACARICIDE-RESISTANT *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*]

G.N. Arceo-Medina¹, J.A. Rosado-Aguilar^{1*}, R.I. Rodríguez-Vivas¹, R. Borges-Argaez² and F.A. Barredo-Pool²

¹*Departamento de Salud y Medicina Preventiva. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Km. 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil. CP. 97100. Mérida, Yucatán, México. E-mail: alberto.rosadoaguilar@gmail.com*

²*Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43 No 130 Colonia Chuburná de Hidalgo. CP 97200. Mérida, Yucatán, México.*

**Corresponding author*

SUMMARY

Background. The aromatic compounds of *P. alliaacea* are a good alternative for the control of *Rhipicephalus microplus* resistant to acaricides; however, there are not reports evaluating the effect of these compounds on the reproductive system of *R. microplus*. **Methodology.** In the present work, the effect of the combination of three compounds: dibenzyl disulfide (63.1%), dibenzyl trisulfide (32.5%) and octadecenoic acid methyl ester (0.7%), on mortality and the oogenesis process was evaluated on *Rhipicephalus microplus* ticks resistant to acaricides. To evaluate the effects of this combination of compounds, the adult immersion test (AIT) was used, where mortality values, inhibition of oviposition and inhibition of hatching were obtained. Histopathology (HP) was used to evaluate the effect on oogenesis of the reproductive system. **Results.** In the AIT, non-significant mortalities ($26.4 \pm 9.8\%$) were obtained, high efficiency in percentages of oviposition inhibition ($85.6 \pm 3.7\%$) and moderate efficacy in the inhibition of hatching ($57.0 \pm 4.0\%$). In HP, the uteri of ticks subjected to immersion in the mixture of benzylsulfur compounds (1%) for one minute showed changes in the normal structure of their oocytes: morphological alterations that appear as deformed and heterogeneous cell masses. **Implications.** These compounds do not affect adult mortality; however, they have a high impact on larval progeny, breaking the *R. microplus* cycle. **Conclusion.** The mixture of the studied compounds exerts an inhibiting effect on the process of oogenesis in *R. microplus*, which is promising for the control of this ectoparasite.

Keywords: Benzyl disulfide; benzyl trisulfide; octadecenoic acid methyl ester; ovaries; *Rhipicephalus microplus*.

RESUMEN

Antecedentes. Los compuestos aromáticos de *P. alliaacea* son una buena alternativa para el control de *Rhipicephalus microplus* resistentes a acaricidas; sin embargo, no existen reportes que evalúen el efecto de estos compuestos en el sistema reproductor de *R. microplus*. **Metodología.** El presente trabajo evaluó el efecto de la combinación de tres compuestos: Disulfuro de dibencilo (63.1%), trisulfuro de dibencilo (32.5%) y metil éster de ácido octadecenoico (0.7%), sobre la mortalidad y el proceso de ovogénesis de garrapatas *Rhipicephalus microplus* resistentes a acaricidas. Para evaluar los efectos de ésta combinación de compuestos, se empleó la prueba de inmersión de adultas (PIA) donde se obtuvieron los valores de mortalidad, inhibición

† Submitted January 10, 2020 – Accepted February 18, 2020. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License. ISSN: 1870-0462.

de la oviposición e inhibición de la eclosión. Para evaluar el efecto en la ovogénesis del sistema reproductor se utilizó histopatología (HP). **Resultados.** En la PIA se obtuvieron mortalidades no significativas ($26.4 \pm 9.8\%$), alta eficacia en porcentajes de inhibición de la oviposición ($85.6 \pm 3.7\%$) y moderada eficacia en la inhibición de la eclosión ($57.0 \pm 4.0\%$). En la HP, los úteros de las garrapatas sometidas a inmersión en la mezcla de compuestos bencilsulfurados (1%) durante un minuto presentaron cambios en la estructura normal de sus ovocitos: alteraciones morfológicas que aparecen como masas celulares deformes y heterogéneas. **Implicaciones.** Estos compuestos no afectan en la mortalidad de adultas; sin embargo, tienen un gran impacto en la progenie larval, rompiendo el ciclo de *R. microplus*. **Conclusión.** Se concluye que la mezcla de los compuestos estudiados ejerce un efecto inhibitorio sobre el proceso de ovogénesis en *R. microplus*, lo cual resulta prometedor para el control de este ectoparásito.

Palabras clave: Disulfuro de bencilo; trisulfuro de bencilo; metil éster de ácido octadecenoico; ovarios; *Rhipicephalus microplus*.

INTRODUCCIÓN

Rhipicephalus microplus es considerada como la garrapata de mayor importancia en la industria ganadera, debido a las pérdidas económicas que ocasiona además de ser un vector que contribuye a la diseminación de enfermedades infecciosas en países tropicales y subtropicales incluyendo a México (Ghosh y Nagar, 2014; Rodríguez-Vivas et al., 2017).

El principal método de control para *R. microplus* es el uso de compuestos químicos (piretroides sintéticos, organofosforados, amidinas, fenilpirazolonas, inhibidores del desarrollo y lactonas macrocíclicas); sin embargo, debido a la intensa actividad agrícola y el uso indiscriminado en la ganadería bovina se ha propiciado la aparición de garrapatas resistentes a estos acaricidas (Massard et al., 2004; Rodríguez-Vivas et al., 2012). Hoy en día el uso exclusivo de acaricidas para el control de garrapatas se está volviendo poco viable en términos prácticos y económicos, y requiere la adopción de alternativas que tengan como objetivo una buena eficacia y mitigar los problemas ambientales por acumulación de desechos tóxicos en la naturaleza (Borges et al., 2011; Rosado-Aguilar et al., 2017).

El uso de hierbas medicinales en animales aumentó en los últimos años, directamente relacionado con el mercado emergente de mascotas. Entre las ventajas de los fitoteráuticos que actualmente justifican su uso están los efectos sinérgicos de sus componentes, la fácil degradación en el medio ambiente, la proporción de compuestos que actúan sobre diferentes objetivos moleculares, el menor riesgo de efectos secundarios y los costos relativamente más bajos en investigación (Bagavan et al., 2009; Arceo Medina et al., 2016). Asimismo, el uso de métodos alternativos ha demostrado ser un recurso eficaz para el control biológico de ácaros resistentes a químicos, al poseer ciertos

compuestos que inhiben o retrasan su crecimiento, desarrollo y reproducción (Barbosa et al., 2015; Rosado Aguilar et al., 2017).

Estudios previos han demostrado que *Petiveria alliacea* L. (familia Phytolaccaceae) es eficaz para el control de *R. microplus*. Rosado-Aguilar et al. (2010b) evaluaron el extracto metanólico del tallo de *P. alliacea* contra larvas y adultas de *R. microplus* resistentes a acaricidas y encontraron alta actividad acaricida (>85%). Asimismo, los mismos autores analizaron los metabolitos secundarios presentes en la fracción activa empleando CG/masas, logrando la identificación de dos tipos principales de compuestos: a) aromáticos, siendo éstos trisulfuro de dibencilo (63.1%), disulfuro de dibencilo (32.5%) y *cis*-estilbena (0.3%), y b) ácidos grasos, siendo éstos metil éster de ácido hexadecanoico (2.8%), metil éster de ácido octadecadienoico (0.4%) y metil éster de ácido octadecenoico (0.7%). Arceo-Medina et al. (2016) demostraron el sinergismo existente entre los compuestos sulfurados disulfuro de dibencilo y trisulfuro de dibencilo, los cuales son los responsables de la actividad acaricida de la especie *P. alliacea* para el control de *R. microplus* resistentes a acaricidas, provocando en las larvas una alta mortalidad y en las adultas una alta inhibición de la eclosión de huevos. De acuerdo a lo citado anteriormente los compuestos aromáticos de *P. alliacea* resultan ser una buena alternativa para el control de *R. microplus* resistentes a acaricidas; sin embargo, no existen reportes sobre histopatología que evalúen el efecto de estos compuestos en el sistema reproductor de *R. microplus*. Por lo anterior, el presente estudio evaluó el efecto en el proceso de ovogénesis de garrapatas tratadas previamente con la mezcla de compuestos bencilsulfurados y *Trans* 9- metil éster de ácido octadecenoico [MEAD]; para determinar el posible mecanismo de acción que ejercen dichos compuestos para el control de *R. microplus* resistentes a acaricidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El trabajo se realizó en el estado de Yucatán, México el cual presenta un clima de tipo Aw (cálido-subhúmedo), la temperatura media anual es de aproximadamente 26°C con variaciones de 16.2° a 35.6° C. La precipitación pluvial anual fluctúa entre 500 y 1,100 mm (INEGI, 2010).

Compuestos químicos empleados y mezclas realizadas

Se usaron dos grupos de compuestos químicos obtenidos comercialmente, a) aromáticos (Disulfuro de dibencilo [DDB] y trisulfuro de dibencilo [TDB]), y b) ácidos grasos (*Trans* 9-metil éster de ácido octadecenoico [MEAD]), todos de la marca Sigma-Aldrich, México. Un estudio previo (Arceo-Medina *et al.*, 2016), demostró que las mezclas TDB+DDB y TDB+DDB+MEAD fueron las que obtuvieron la más alta actividad en mortalidad (33% y 32%, respectivamente) e inhibición de la eclosión (97.7% y 92.2%, respectivamente) por lo cual fueron seleccionadas estas mezclas en el presente estudio para ser evaluadas al 1% de concentración.

Obtención y manejo de garrapatas

Se utilizaron garrapata *R. microplus* colectadas de un rancho bovino productor de leche del estado de Yucatán, México que fueron previamente identificadas como resistentes al amitraz, cipermetrina y a la ivermectina (Rodríguez-vivas *et al.*, 2006; Alegría-Lopez *et al.*, 2015). En el rancho se utilizaron 10 bovinos para hacer la colecta de al menos cuatro garrapatas adultas repletas de *R. microplus* de cada animal. Las garrapatas repletas fueron lavadas con agua y solución de hipoclorito de sodio al 0.05%, para ser colocadas en cajas de Petri para iniciar el proceso de la oviposición. Las cajas de Petri fueron depositadas en una cámara húmeda (80-90% de humedad a temperatura controlada de 27 ± 2°C). Dos semanas después los huevos fueron transferidos a viales de cristal y tapados con algodón, para ser sometidos a las mismas condiciones señaladas previamente. Quince días después se obtuvieron las larvas y se esperó hasta 14 días post eclosión. Las larvas fueron usadas para infestar artificialmente a un bovino (del mismo rancho) libre de garrapatas, siguiendo la técnica descrita por Fragoso *et al.* (1999). El bovino permaneció en una instalación

libre de garrapatas y se le aplicó 1 g de larvas. Al día 21 post-infestación se obtuvieron garrapatas adultas repletas que fueron utilizadas para la prueba de inmersión de adultas.

Prueba de inmersión en garrapatas adultas

Para determinar la actividad acaricida de los compuestos contra garrapatas adultas, se utilizó la metodología descrita por Arceo-Medina *et al.* (2016). Los compuestos comerciales TDB y DDB, se diluyeron al 3.3% en etanol absoluto para obtener una concentración final del 1%. En el caso del compuesto MEAD, comercialmente se encontraba diluido al 1% en heptano. Para los bioensayos se utilizaron como diluyentes adicionales etanol, agua y Triton X100, obteniendo una solución final del 1% en agua destilada (Et-TX1%) (Para obtener una concentración final al 1% se tomó 150µl de cada compuesto concentrado al 3.3% y se diluyó en 350 µl de Et-TX1%).

Para evaluar la actividad acaricida de las mezclas (TDB+DDB y TDB+DDB+MEAD) de los compuestos se utilizaron las mismas proporciones de los compuestos identificados en el tallo de *P. alliacea* por Rosado-Aguilar *et al.* (2010b): TDB (63.1%), DDB (32.5%) y MEAD (0.7%). En cada bioensayo se usó Et-TX1% como control.

Del bovino infestado artificialmente se colectaron garrapatas adultas repletas, seleccionando aquellas con peso de 220mg±40. Se escogieron 135 garrapatas que fueron asignadas a tres grupos de 15 garrapatas (repeticiones) para cada tratamiento (TDB+DDB y TDB+DDB+MEAD) y el control (Et-TX1%).

Los grupos tratados (mezclas al 1% de concentración) y controles fueron sumergidos por 1 minuto en viales de cristal de 3 ml, siendo colocadas de manera individual las garrapatas adultas en cámaras de cultivo de 24 pozos e incubadas por 15 días, manteniendo una temperatura a 28 ± 2°C, con una humedad relativa del 80%, para permitir la oviposición de las garrapatas (Cen-Aguilar *et al.*, 1998; Rosado-Aguilar *et al.*, 2010b; Arceo-Medina *et al.*, 2016). La tasa de mortalidad se registró diariamente contando las garrapatas muertas. Se consideró como garrapatas muertas aquellas que presentaron oscuridad cuticular, así como falta de movimiento en los tubos de malphigui y lesiones cutáneas hemorrágicas. Al día 15 post-tratamiento se procedió a recolectar y pesar el conjunto de huevos ovipositados por las hembras de cada grupo

tratado, seleccionando de manera aleatoria 100 huevos que fueron colocados en viales de vidrio de 25 mm x 95 mm, sometiéndolos a las mismas condiciones de temperatura y humedad señaladas previamente. Durante 21 días se observaron los viales y las tasas de eclosión de los diferentes tratamientos y controles. La inhibición de oviposición y eclosión fueron determinados para todos los grupos tratados en relación a los controles (Rodríguez-Vivas y Cob, 2005; Rosado-Aguilar *et al.*, 2010b). La eficacia acaricida fue clasificada de la siguiente manera: alta eficacia (86–100%); relativamente alta eficacia (71–85%); moderada eficacia (56–70%); baja eficacia (31–55%); y eficacia no significativa (0–30%) (Rosado-Aguilar *et al.*, 2010a; Arceo-Medina *et al.*, 2016).

Formula de inhibición de la oviposición (Rodríguez-Vivas y Cob, 2005):

$$\frac{\text{PHGT} - \text{PhGT}}{\text{PHGC} - \text{PhGC}} (100)$$

PHGT: Peso de hembras de grupo tratado. PHGC: Peso de hembras de grupo control

PhGT: Peso de huevos de grupo tratado. PhGC: Peso de huevos de grupo control

Formula de Inhibición de la eclosión (Rodríguez-Vivas y Cob, 2005):

$$100 - \left(\frac{\text{Número de larvas eclosionadas por grupo}}{\text{Numero de huevos totales por grupo}} (100) \right)$$

Análisis histopatológico

Antes de la extracción de los úteros, las hembras fueron congeladas a -5°C durante 5 min. Para observar y documentar los cambios en las estructuras internas durante el proceso de oviposición, se recolectaron muestras de los ovarios 72 h, 120 h y 180 h una vez iniciada la oviposición. La disección y extracción de los ovarios se realizó bajo un estereomicroscopio (Leica®), utilizando una solución PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7.4) (Souza *et al.*, 2013).

Cada muestra se fijó en solución de FAA durante 48 h y se mantuvo a 4°C , se enjuagó con agua destilada y se deshidrató con etanol (30, 50, 70, 85, 96 y 100%, v/v).

Antes de aumentar la concentración de etanol, cada tratamiento se repitió dos veces, con una nueva solución (Catzin *et al.*, 2014). Las muestras se embebieron en resina (hidroxietilmetacrilato) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Kit JB-A, Polyscience). Se cortaron secciones

longitudinales (5 μm de espesor) con un micrótomo y se tiñeron durante 20 minutos con el reactivo de azul de toluidina. Luego las muestras se enjuagaron con agua destilada dos veces (Catzin *et al.*, 2014). La observación y el análisis de las estructuras se llevaron a cabo con un microscopio Olympus (BX42) provisto de un sistema óptico UIS2, movimiento vertical del foco, una fuente de luz LED de alta reproducibilidad de color y un condensador Abbe (NA 1.1) para $4 \times 100 \times$ y se fotografió con una cámara digital. El estudio se realizó en cada una de las muestras recolectadas de los tres tratamientos. Los ovocitos I a V de cada campo seleccionado se clasificaron primero de acuerdo con las fases descritas por Saito *et al.* (2005). Las observaciones y los daños encontrados por las mezclas de compuestos sobre los ovocitos, se registraron con base en la caracterización de las etapas de la ovogénesis (Saito *et al.*, 2005).

Análisis de resultados

Se realizó ANOVA simple para comparar los porcentajes de mortalidad, inhibición oviposición e inhibición de eclosión de ambos tratamientos con el grupo control utilizando el programa STHATGRAPHICS PLUS.

RESULTADOS

Macroscópicos

En el cuadro 1 se presenta la mortalidad y los porcentajes de la inhibición de la oviposición y eclosión. Se observa que ninguna de las dos mezclas (TDB+DDB y TDB+DDB+MEAD) presentó mortalidades significativas (26 y 23% respectivamente) en garrapatas adultas. En inhibición de la oviposición las mezclas demostraron alta (86%) y relativamente alta eficacia (80%), respectivamente (15 días post-tratamiento). Sin embargo, presentaron eficacia no significativa (7%) y moderada (57.3%) en el porcentaje de inhibición de la eclosión (21 días post-oviposición), respectivamente.

Microscópicos

En la observación simple al estereoscopio de los huevos de *R. microplus* tratadas con los compuestos químicos estudiados, se verificó que los huevos tratados con ambas mezclas (DDB+TDB y DDB+TDB+MEAD) presentaron un aspecto oscuro, seco, opaco y eran menos adherentes en comparación con los grupos no tratados.

Cuadro 1. Mortalidad, porcentaje de inhibición de la oviposición y porcentaje de inhibición de la eclosión mezclas de compuestos aromáticos y ácidos grasos contra hembras repletas de *Rhipicephalus microplus*.

Mezcla de compuestos	% Mortalidad	% IOVP	% IE
CONTROL	0.0±0.0	5.6±4.8	7.38 ± 3
DDB+TDB	26.4±9.8*	85.6±3.7*	7.0±2.0
DDB+TDB+MEAD	23.2±7.6*	80.3±6.8*	57.0±4.0*

DDB: disulfuro de dibencilo, TDB: trisulfuro de dibencilo, MEAD: metil ester de ácido octadecenoico. IOVP= inhibición de oviposición, IE= Inhibición de eclosión *Existen diferencias significativas entre las mezclas de compuestos evaluados y grupo control ($p < 0.05$).

Los ovarios analizados por el grupo control estaban formados por una pared de células epiteliales que a su vez presentan un lumen, el cual atraviesa el ovario en dirección longitudinal. Las células de esta pared son pequeñas y tienen un núcleo con una forma redondeada (fig. 1a-c).

En los grupos control, las células del pedicelo no presentaron deformidades o alteraciones aparentes, también se observó la presencia de núcleos bien definidos en comparación con los grupos tratados, los cuales mostraron lisis celular y presencia de espacios vacíos (Figura 1 y 2).

Las garrapatas sometidas a inmersión en la mezcla de compuestos bencilsulfurados (1%) así como la combinación con MEAD mostraron cambios en la estructura normal de sus ovocitos: alteraciones morfológicas que aparecen como masas celulares deformes y heterogéneas.

Se observan varias etapas de desarrollo encontrando ovocitos en etapas (I-V) en la pared del ovario, sin embargo, solo los ovocitos en las primeras etapas (I – III) se unen a la pared mediante células que forman la estructura del pedicelo (Figura. 1, 2). Es posible observar que en ovocitos con desarrollo normal, (grupo de control), las células pedicelo están intactas (Fig. 1A).

En hembras expuestas a las mezclas de grupos tratados se observa que estas células del pedicelo pierden sus núcleos (Fig. 2G), también se observaron ovocitos en estadios I y II los cuales presentaban una vesícula germinal con dos nucléolos (Fig. 2G).

Se encontraron nucléolos teñidos con forma de anillo y otras alteraciones en los ovocitos expuestos a la mezcla de compuestos bencilsulfurados al 1% (Fig. 2H).

Con respecto a la mezcla de bencilsulfurados y MEAD no se encontraron diferencias significativas al compararse con la mezcla binaria de sulfurados (DDB+TDB), encontrando lesiones similares en

ambos grupos tratados. Sin embargo, sí se encontró mayor presencia de ovocitos en etapas IV y V, con respecto a la combinación binaria de bencilsulfurados.

Los ovocitos en los estadios IV y V de los grupos control mostraron gránulos de yema distribuidos uniformemente, haciéndolos más grandes en comparación con las etapas iniciales. Estos ovocitos maduros están rodeados por el corion, una membrana acelular gruesa; en grupos expuestos a la mezcla de bencilsulfurados, se observaron pliegues y deformaciones en toda su longitud (Fig. 2A y F); dichos ovocitos mostraron citoplasma vacuolado con una ocupación frecuente de los espacios en el citoplasma (vacuolas) localizados en o alrededor de la vesícula germinal (Fig. 2D); se observó la ruptura y formación incompleta de ovocitos IV y V (Figura. 2 B, C).

DISCUSIÓN

Petiveria alliacea es capaz de sintetizar diferentes derivados de azufre, entre ellos trisulfuro de dibencilo que podrían ser empleados como marcadores quimiotáxicos de esta planta. Este tipo de metabolitos se encuentran en la planta entera (hojas, tallos, raíces y flores) (Kubec, 2001). Este compuesto ha sido reportado únicamente en *P. alliacea* sin que exista otro reporte de su presencia en otras plantas, ni siquiera en aquellas de la familia Phytolaccaceae (Muñoz, 2011). Datos compilados por Williams *et al.* (2007) revelaron que el compuesto trisulfuro de dibencilo y sus derivados, podrían tener extraordinario interés farmacéutico. Si bien los compuestos bencilsulfurados empleados en el presente trabajo no presentan actividad sobresaliente en garrapatas adultas, éstos poseen un marcado efecto en la inhibición de la ovoposición, que resulta interesante para fines de uso comercial y control de *R. microplus* (Rosado-Aguilar *et al.*, 2010b; Arceo Medina *et al.*, 2016); sin embargo, presenta una actividad acaricida no significativa con respecto a la mortalidad de garrapatas adultas (Arceo-Medina *et al.*, 2016).

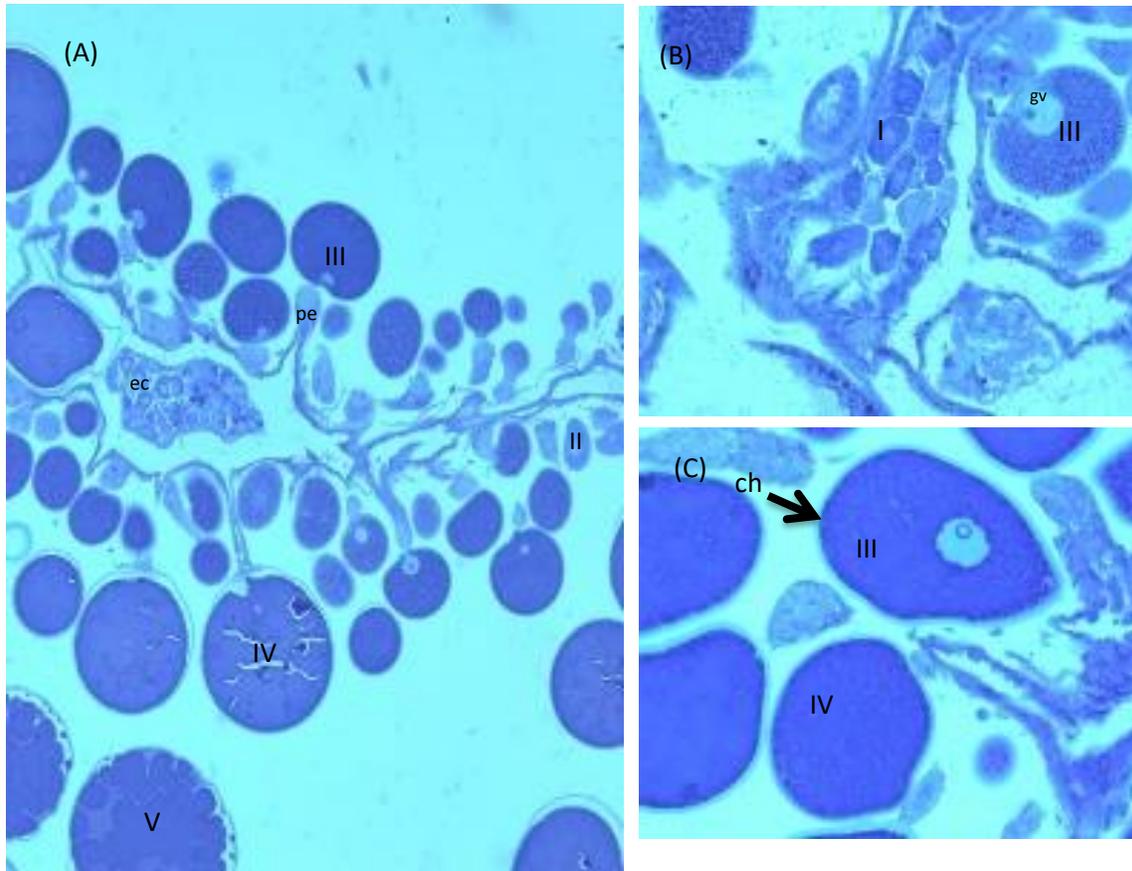


Figura 1. Cortes histológicas de ovarios de *Rhipicephalus microplus* no tratados (grupo control) teñidas con azul de toluidina grupo control 40x: (A) ovocitos en varias etapas de maduración; (B) ovocito I, III; (C) ovocito III, IV. ch = corión; gv = vesícula germinal, pe=pedicelo, ec=epitelio ovarico

Los principales cambios observados del efecto de la mezcla de compuestos bencilsulfurados y ácidos grasos en el presente estudio fueron las deformidades celulares presentes en los grupos tratados. Al analizar ambos grupos tratados, las lesiones en los grupos fueron similares, posiblemente al mayor predominio de los bencilsulfurados en ambas mezclas. Sin embargo, se observó una presencia mayor de ovocitos en etapas finales (IV y V) en la mezcla de DDT+TDB+MEAD, lo cual podría deberse a efectos antagonistas por parte del MEAD, al presentar menor porcentaje en inhibición de la eclosión con respecto al grupo DDB+TDB. Esto concuerda con resultados previos realizados por Arceo Medina *et al.* (2016), quienes observaron que la combinación de metil ester de ácido hexadecanoico (palmítico) y compuestos sulfurados ocasionaba reducción en la actividad larvicida en un 30%. Dicho efecto se le atribuye a la pérdida de unión de los compuestos debido a una

alteración entre los puentes de sulfuro (Rösner *et al.*,2001).

Al comparar los porcentajes de eclosión podemos observar que la mezcla DDB+TDB+MEAD, presenta mayores porcentajes en IE, por lo que el efecto del ácido graso pudiera ser en el órgano de GENE, más que en el ovario en sí. Una de las alteraciones observadas en todos los ovocitos fue la vacuolización; de acuerdo a lo reportado por Arnost *et al.* (2011) esta alteración es un intento por parte de la célula para aislar algún agente o sustancia tóxica o incluso el citoplasma que haya sido dañado por la acción del compuesto para poder continuar con su proceso metabólico.

El efecto tóxico observado en ovocitos y estructuras celulares cercanas también se ha observado en otros estudios con plantas; Souza *et al.* (2013) y Barbosa *et al.* (2016) utilizando técnicas similares a las empleadas en el presente

estudio, evaluaron los cambios producidos por extractos de *Guarea kunthiana* y *Melia azedarach* sobre el proceso en la ovogénesis de *R. microplus* y observaron efectos inhibitorios sobre los ovocitos, lo que les impedía continuar con su proceso de desarrollo, así como daños morfológicos en las células tales como la vacuolización, desorganización celular y deformación, hallazgos similares a los encontrados en el presente estudio.

En otro estudio realizado por Denardi *et al.*, (2011) se evaluaron los extractos acuosos provenientes de la planta del neem (*Azadirachta indica*) a concentraciones del 10 y el 20%, presentando actividad acaricida no significativa sobre garrapatas adultas de *R. sanguineus*, coincidiendo con los resultados encontrados en este estudio con *R. microplus*; sin embargo, estos autores reportaron que la concentración del 10% provoca alteraciones morfológicas en las células germinales tales como la aparición de zonas de vacuolización citoplásmica con consiguiente fragmentación de las vesículas germinales, incluso en aquellos ovocitos en etapas iniciales de desarrollo (I- III). En los ovocitos en etapas finales de desarrollo (IV-V) la azadiractina afectó la producción y la deposición de elementos proteicos y polisacáridos que son parte de la yema de los ovocitos, esto podría explicar el aspecto oscuro, seco y opaco de los huevos observados en nuestro estudio.

Otro de los cambios observados en la histopatología del presente estudio fue el engrosamiento y la desorganización presentada por el corion de los ovocitos en los grupos tratados con compuestos bencilsulfurados y MEAD, de acuerdo con Saito *et al.*, (2005) este material sirve como una barrera protectora contra situaciones adversas, como desecación, choques mecánicos, depredación y cambios en la humedad y la temperatura. König *et al.*, 2019 mencionan la presencia de microporos en el corion, lo que permite la oxigenación del embrión. De acuerdo a diversos autores la presencia de un corion más grueso en comparación con el grupo control, puede estar relacionado como

un medio de respuesta protectora contra sustancias extrañas por parte de los ovocitos tratados lo que perjudicaría la supervivencia del embrión al interferir en el intercambio de gases (Arnosti *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2016; König *et al.*, 2019).

Barbosa *et al.*, (2016), observaron que el 3- β -O-tigloilmeliano presente en *Guarea kunthiana* posee efectos sobre la oviposición; sin embargo, presenta poca efectividad sobre mortalidad larval, lo cual puede ser asociado a que el principal mecanismo de acción involucra al sistema endocrino de garrapatas. Los limonoides y protolimonoides presentes en esta planta, actúan sobre el sistema endocrino de los insectos al interferir con la vitelogénesis y al alterar el crecimiento y el proceso de ecdisis, además de otros efectos perjudiciales (Migueta *et al.*, 2015). Barbosa *et al.*, (2016) menciona que la regulación de la muda larval y el inicio de la metamorfosis implica un equilibrio entre los ecdisteroides y las hormonas juveniles (HJ). Sin embargo, en las garrapatas no hay evidencia de hormonas juveniles en general, por lo que se desconoce el posible papel de las hormonas en la regulación del desarrollo larvario/ninfal y la metamorfosis. En la mayoría de los insectos que se han estudiado, las HJ también parecen ser la hormona gonadotrófica femenina (Barbosa *et al.*, 2016); sin embargo, en las garrapatas, la reproducción y la embriogénesis están reguladas por las hormonas ecdisteroides (Roe *et al.*, 2014).

CONCLUSIÓN

Se concluye que los compuestos sulfurados (Disulfuro de dibencilo [DDB] y trisulfuro de dibencilo [TDB]), así como el *Trans* 9- metil éster de ácido octadecenoico [MEAD] ejercen efecto sobre el proceso de ovogénesis en el ciclo biológico de *R. microplus*, lo cual resulta prometedor para el control de este ectoparásito. Este es el primer estudio en evaluar las alteraciones morfológicas e histológicas sobre ovarios de garrapatas *R. microplus* al emplear compuestos bencilsulfurados presentes en *P. alliacea*.

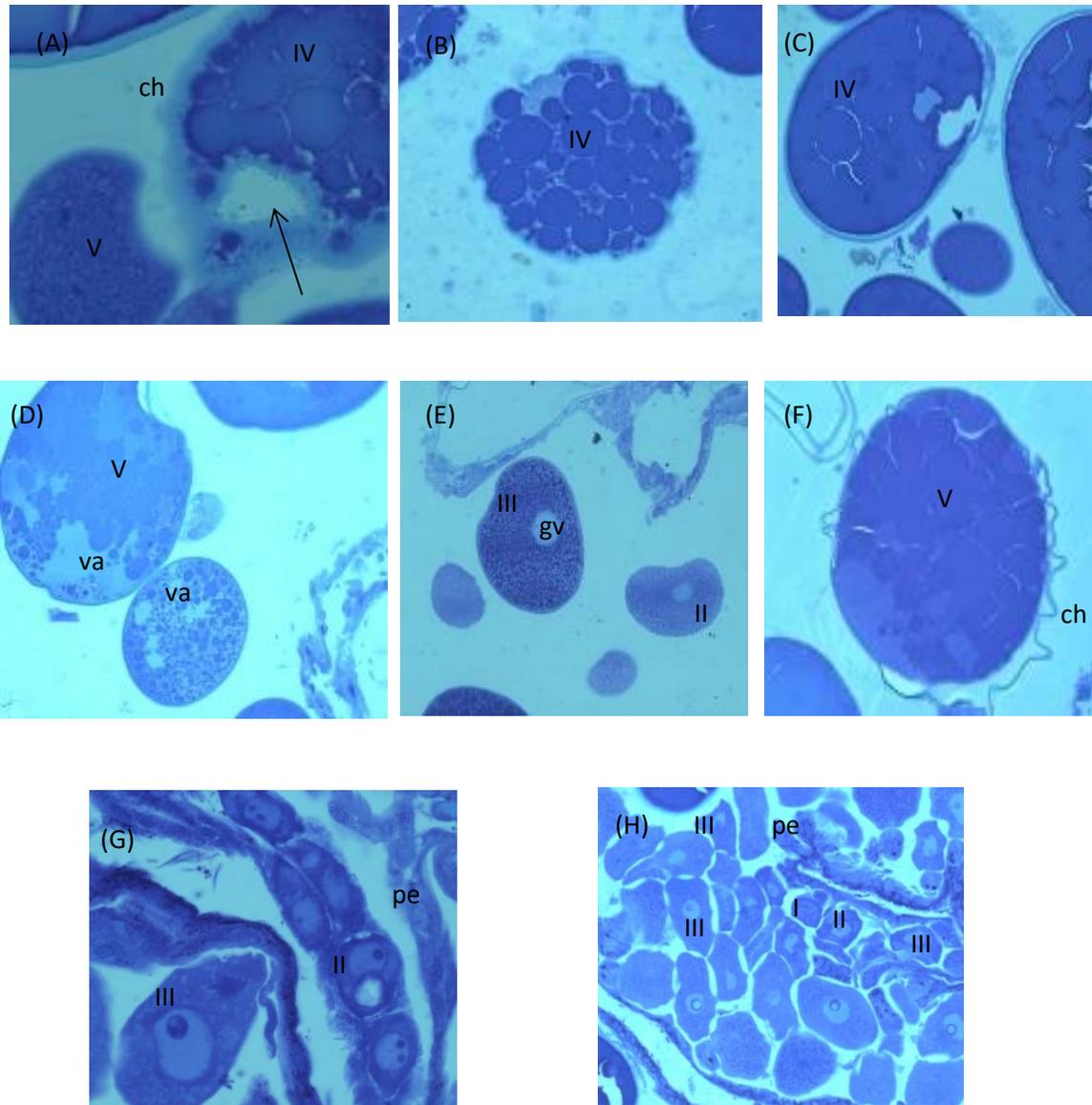


Figura 2. Cortes histológicas de ovarios de *Rhipicephalus microplus* tratados con disulfuro de dibencilo y trisulfuro de dibencilo 40x A) Ovocitos IV y V., presencia de corión irregular y forma irregular (flecha); B) forma irregular de ovocito IV; C) y D) Presencia de zonas de vacuolización, E,G H) ovocitos en diferentes etapas etapas I,II y III F) Ovocito V con presencia de corion irregular va= vacuolización. ch = corión; gv = vesícula germinal, pe=pedicelo, ec=epitelio ovárico

Agradecimientos

A la QBB Mirbella Cáceres-Farfán por su asistencia técnica en los laboratorios de Química de Productos Naturales del CICY.

Financiamiento. Los autores agradecen al CONACYT por el financiamiento del presente trabajo (clave CB-2012-01-178216) y por el apoyo a Giselly Arceo-Medina por la beca otorgada en los estudios de doctorado en el CCBA-UADY.

Conflicto de interés. Los autores declaran que no existe conflicto de intereses relacionados con esta publicación.

Cumplimientos de normas éticas. Los autores afirman que todos los procedimientos que contribuyen a este trabajo cumplen con los estándares éticos de las instituciones nacionales relevantes. Todos los procedimientos de colecta de garrapatas de animales donantes cumplen con los

estándares éticos del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria, UADY, México.

Disponibilidad de datos. Los datos están disponibles con el autor por correspondencia (alberto.rosadoaguilar@gmail.com), con previa solicitud.

REFERENCIAS

- Alegría-Lopez M.A, Rodriguez- Vivas R.I, Torres-Acosta.J.F.J, Ojeda-Chí. M.M., Rosado-Aguilar J.A. 2015. Use of ivermectin as endoparasiticide in tropical cattle herds generates resistance in gastrointestinal nematodes and the tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 1-8. <https://doi.org/10.1093/jme/tju025>
- Arceo-Medina, G.N., Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Borges-Argaez, R., 2016. Synergistic and antagonistic action of fatty acids: sulphides and stilbene against acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* ticks. *Veterinary Parasitology* 228, 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.023>
- Arnosti, A., Brienza, P.D., Furquim, K.C.S., Chierice, G.O., Bechara, G.H., Calligaris, I.B., Camargo-Mathias, M.I., 2011. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. *Experimental Parasitology* 127, 575-580. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.10.006>
- Bagavan, A., Kamaraj, C., Elango, G., Abduz-Zahir, A., Abdul-Rahuman, A. 2009. Adulticidal and larvicidal efficacy of some medicinal plant extracts against tick, fluke and mosquitoes. *Veterinary Parasitology* 166, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.007>
- Barbosa, C.D.A.S., Borges, L.M., Braz L.C.C., Lopes R.T. Migueta, C.H., De Sabóia-Morais T., Garcez, W.S., Garcez, F.R., 2016. In vitro activity of 3β-O-tigloylmelianol from *Guarea kunthiana* A. Juss.(Meliaceae) on oogenesis and ecdysis of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology* 164 5-11. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.01.015>
- Borges, L.M.F.; Sousa, L.A.D.; Barbosa, C.S. 2011. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 20(2), 89-96 <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000200001>
- Catzín-Yupit C.N., Ramírez-Morillo I.M. Barredo-Pool F.A, Loyola-Vargas V.M. 2014. Ontogenic development and structure of the embryo, seed, and fruit of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *South African Journal of Botany* 93: 1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2014.03.005>
- Cen A.J.F., Rodríguez-Vivas R.I., Domínguez, J.L., Wagner, G.G., 1998. Studies on the effect on infection by *Babesia* spp. on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology* 78, 253–257.
- Denardi, S.E., Bechara, G.H., Oliveira, P.R., Camargo-Mathias I. 2011. Inhibitory action of neem aqueous extract (*Azadirachta indica* A. Juss) on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. *Microscopy Research and Technique* 74(10): 889-899. <https://doi.org/10.1002/jemt.20973>
- Fragoso, H., Ortiz M., Santamaría, M., Ortiz, A., Rodríguez, M., Redondo, M., De la Fuente J., Hernández, V., 1999. Evaluación de la vacuna contra la garrapata BM86 Gavac para el control de *Boophilus annulatus*. IV seminario internacional de Parasitología animal “Control de la resistencia de la garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que transmiten”. Jalisco, México. 141-148
- Ghosh, S., Nagar, G., 2014. Problem of ticks and tick-borne diseases in India with special emphasis on progress in tick control

- research: a review. *Journal of Vector Borne Diseases* 51(4), 259-70.
- INEGI 2010
<http://www.inegi.org.mx/sistemas/bise/mexicocifras/MexicoCifras.aspx?e=31&m=0&sec=M&ind=1001000001&ent=31&enn=Yucat%E1n&ani=2005&mun=50>
- Konig I.F.M., Gonçalves R.R.P., Oliveira M.V.S., Silva C.M., Thomasi S.S., Peconick A.P., Remedio R.N. 2019. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases* 10 766–774. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.010>
- Kubec, R., Musah, R.A. 2001. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry*. 58, 981-985. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00304-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00304-1)
- Massard, C.L. & Fonseca, A.H. (2004). Carrapatos e doenças transmitidas, comuns ao homem e aos animais. *A Hora Veterinária*. 135. 15-23.
- Méndez, G.M., Durán G.R., Borges, A.R., Peraza, S.S.A., Dorantes, E., Tapia, M.J.L., Torres, A.W., Ferrer, C.M., 2012. Flora Medicinal de los Mayas Peninsulares. CICY, FORDECY, FOMIX, PRONATURA. 262.
- Miguita, C.H., Barbosa, C.S., Hamerski, L., Sarmiento, U.C., Nascimento, J.N., Garcez, W.S., Garcez, F.R. 2015. 3b-O-tigloylmelianol from *Guarea kunthiana*: a new potential agent to control *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, a cattle tick of veterinary significance. *Molecules* 20, 111-126. <https://doi.org/10.3390/molecules20010111>
- Muñoz, C.I. 2011. Tesis de maestría evaluación de los contenidos metabólicos en cultivos de células de *Petiveria alliacea* L. (ANAMÚ). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Medellín Colombia.
- Perez- Cogollo, L.C., Rodriguez,-Vivas, R.I., Ramirez,-Cruz, G.T., Miller, R.J. 2010. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Veterinary Parasitology* 168, 165-169. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.021>
- Rodríguez-Vivas, R.I., Cob, G.L., 2005. Técnicas Diagnósticas en Parasitología Veterinaria. Segunda edición. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Alonso, D.M.A., Rodríguez, A.F., Frago, S.H., Santamaria, V.M., Rosario, C.R. 2006. Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the State of Yucatan, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine* 17, 280–286. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.04.001>
- Rodríguez-Vivas, R.I., Grisi L., Pérez de León, A.A., Silva Villela, H., Torres-Acosta, J.F.J., Frago Sánchez, H., Romero Salas, D., Rosario Cruz, R., Saldierna, F., García-Carrasco, D. 2017. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 8(1):61-74 <http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4304>
- Rodriguez-Vivas, R.I., Perez-Cogollo, L.C., Rosado-Aguilar, J.A., Ojeda-Chi, M.M., Trinidad-Martinez, I., Miller, R.J., 2014. *Rhipicephalus microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 23(2):113-122 <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014044>
- Roe, M.R., Donohue, K.V., Khalil, S.M.S., Bissinger, B.W., Zhu, J., Sonenshine, D.E., 2014. Hormonal regulation of metamorphosis and reproduction in ticks. *Biology of Ticks*. Oxford University Press, Oxford, 59-73 .
- Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar, C.A.J., Rodríguez, V.R.I., Borges, A.R., García, V.Z., Méndez G.M., 2010a. Screening of the acaricidal efficacy of phytochemical extracts on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae) by larval immersion test. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12, 417-422.

- <http://www.revista.ccba.uady.mx/urn:ISSN:1870-0462-tsaes.v12i2.358>
- Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar, C.A.J., Rodríguez, V.R.I., Borges, A.R., García, V.Z., Méndez G.M. 2010b. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Veterinary Parasitology* 168, 299-303. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.022>
- Rösner H, Williams LAD, Jung A, Kraus W., 2001. Disassembly of microtubules and inhibition of neurite outgrowth, neuroblastoma cell proliferation, and MAP kinase tyrosine dephosphorylation by dibenzyl trisulphide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1540(2): 166-177. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(01\)00129-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(01)00129-X)
- Saito, K.C., Bechara, G.H., Nunes E.T., Oliveira, P.R., Denardi, S.E., Camargo, M., I., 2005. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 129, 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.020>
- Sepúlveda, J.G., Porta, D.H., Rocha, S.M., 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 1(3), 322-363. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221317>
- Sousa, Lorena Alessandra Dias de, Rocha, Thiago Lopes, Sabóia-Morais, Simone Maria Teixeira, y Borges, Lígia Miranda Ferreira 2013. Ovary histology and quantification of hemolymph proteins of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* treated with *Melia azedarach*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22 (3), 339-345. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000300004>
- Williams, L.A., Rosner, H., Levy, H.G., Barton, E.N., 2007. A critical review of the therapeutic potential of dibenzyl trisulphide isolated from *Petiveria alliacea* L (guinea hen weed, anamu). *West Indian Medical Journal*. 56(1), 17-21 <https://doi.org/10.1590/s0043-31442007000100004>