

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**ALTERACIONES MACROSCÓPICAS E HISTOLÓGICAS EN *Rhipicephalus
microplus* INFECTADOS POR *Metarhizium anisopliae***

por

Santiago PAREJA ESCOBAR

Matías RODRIGUEZ SILVA

TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias
Veterinarias

ORIENTACIÓN: Producción animal

MODALIDAD: Situación problema

MONTEVIDEO

URUGUAY

2024

PÁGINA DE APROBACIÓN:

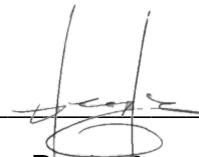
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dr. José M. Venzal

Segundo Miembro (tutor):



Dr. Pablo Parodi

Tercer Miembro:



Dra. Soledad Valledor

Cuarto Miembro (Co-tutor):



Dr. Rafel Carriquiry

Fecha:

16/12/2024

Autores:



Matias Rodriguez Silva



Santiago Pareja Escobar

AGRADECIMIENTOS:

Agradecemos a la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, por permitir nuestra formación tanto en lo académico, así como en lo personal. A todos aquellos docentes que fueron parte de todo el camino recorrido, cada uno aportando algo para nuestra formación.

Al tutor Dr. PhD Pablo Parodi y co-tutor Dr. Rafael Carriquiry por la dedicación de su tiempo, compromiso y trabajo para lograr que este ensayo salga de la mejor manera. También a INIA Tacuarembó, por brindarnos un lugar, equipamiento y materiales para poder realizar el trabajo. Al Dr. Mizael Machado y Alejandra Custodio por su aporte técnico y a todos aquellos funcionarios que de una forma u otra aportaron a nuestro ensayo.

A INIA Las Brujas, en especial al Dr. PhD Federico Rivas del laboratorio de bioensayos por brindar hongos para el ensayo.

Agradecemos a nuestras familias, amigos y pareja por el apoyo incondicional durante todos estos años, estando siempre presentes en los momentos buenos, así como en los más difíciles.

A nuestros compañeros que nos han acompañado a lo largo de toda la carrera y han hecho de ella más llevadera, sobre todo a aquellos que se transformaron en amigos.

Yo, Matias, quiero hacer una mención aparte para mi madre María Amelia y mi padre José Manuel por inculcarme los valores que hoy llevo, sus exigencias y por sus esfuerzos insuperables que me ayudaron a lo largo de mi vida. En especial a mi padre que hoy no me puede acompañar, quiero darte las gracias por tu esfuerzo constante a lo largo de toda tu vida, y por transmitirme el gusto por el campo, la veterinaria y sus actividades. Sé lo importante que es para vos que pueda cerrar esta etapa de mi vida.

Yo, Santiago. Quisiera dedicar este trabajo a mi querida abuela, quien jugó un papel crucial en mi vida y en mi formación académica. Gracias a ella tuve un techo bajo el cual vivir durante todos los años de mi carrera en Montevideo. Su generosidad y sacrificio me dieron la oportunidad de perseguir mis sueños y convertirlos en realidad. Aunque hoy no estás físicamente, estoy seguro de que estás compartiendo mi alegría y satisfacción por este logro.

ÍNDICE

Contenidos

Tabla de contenido

PÁGINA DE APROBACIÓN:.....	2
AGRADECIMIENTOS:	3
ÍNDICE	4
LISTA DE TABLA Y FIGURAS.....	6
RESUMEN	8
SUMMARY	9
INTRODUCCION	10
REVISION BIBLIOGRAFICA.....	13
1 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1888).....	13
1.1 Generalidades	13
1.2 Ciclo Biológico	13
1.3 Anatomía de la garrapata.....	16
2 Métodos de control de <i>R. microplus</i>	18
2.1 Control químico.....	19
2.2 Control no químico.....	20
3 <i>Metarhizium anisopliae</i>	22
3.1 Biología.....	22
3.2 Invasión y factores de virulencia	24
3.3 Patogenicidad y virulencia	27
3.4 Impacto en el medio ambiente	28
4 HIPOTESIS.....	28
5 OBJETIVOS.....	28
5.1 Objetivo general	28
5.2 Objetivos específicos	28
6 MATERIALES Y METODOS	28
6.1 Lugares de trabajo	28
6.2 Diseño experimental.....	29
7 RESULTADOS	32
7.1 Cambios macroscópicos	32

7.2	Alternaciones histológicas.....	36
7.2.1	Grupo control.....	36
7.2.2	Grupo tratamiento.....	39
8	DISCUSION.....	41
9	CONCLUSIONES.....	43
10	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE TABLA Y FIGURAS

Figura 1. Mapa de Uruguay que muestra distintas regiones según la prevalencia de garrapatas. (Región A) presencia de garrapatas del ganado ha sido continua durante los últimos 100 años. (Región B); la presencia de garrapatas del ganado ha sido variable a lo largo de los años; (Área libre) los brotes son esporádicos y las infestaciones de garrapatas deben ser eliminadas por ley. Miraballes et al. (2019).	11
Figura 2. Distribución mundial de <i>Rhipicephalus microplus</i> (Wharton, 1974).	13
Figura 3. Ciclo parasitario de <i>R. microplus</i> (Núñez et al., 1982).	15
Figura 4. Modelo epidemiológico conceptual de <i>B. microplus</i> (Cuore y Solari, 2022).	16
Figura 5. Diagrama de la cutícula de <i>R. microplus</i> (Hackman, 1982).	16
Figura 6. Visualización de <i>R. microplus</i> hembra: (A) vista dorsal, (B) vista ventral, (C) vista ventral del capítulo (Nava et al., 2017).	17
Figura 7. Vista dorsal de hembra de <i>R. microplus</i> sumergida en PBS. [A] Hembra con esqueleto removido (20x). [B] Hembra con el esqueleto levantado para visualizar la anatomía interna (40x). BC: base del capítulo; MT: túbulos de Malpighi; Tr: tráqueas; MS: intestino medio; MD: divertículo del intestino medio; RS: saco rectal; Go: órgano de Gené; H: corazón; Sg: glándulas salivales. Extraído de Tidwell et al., 2021.	18
Figura 8. Biodiversidad de las diferentes cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> . Imagen izquierda: morfología de la colonia. Imagen derecha: Microscopio electrónico de barrido de conidiósporas, utilizado a la misma escala (Scharank y Vainstein, 2010).	23
Figura 9. Etapas de la infección de <i>M. anisopliae</i> en garrapata (Schrack y Vainstein, 2010).	25
Figura 10. Esquematación del proceso realizado en el laboratorio de parasitología.	30
Figura 11. Esquematación de las distintas muestras, control y tratamiento, con el tiempo en que cada una estuvo en incubación.	30
Figura 12. Esquematación del proceso de manipulación de la muestra en el laboratorio de histopatología.	32
Tabla 1. Protocolo establecido del procesador de infiltración para garrapatas.	31
Tabla 2. Vista dorsal y ventral de cada garrapata, correspondiente al grupo que pertenecían y el periodo de incubación que llevaron.	33
Imagen 1. Sección histológica (H-E) del tegumento de la garrapata visualizada a través del microscopio óptico (40x), señalando sus diferentes capas: (EPI) Epicutícula; (PRO) Procutícula, compuesta por (EXO) exocutícula y (ENDO) endocutícula; y (CE) Células epiteliales.	36
Imagen 2. Sección histológica (H-E) del aparato bucal (AB) y glándulas salivales (GS) vistas al microscopio óptico (40x).	37
Imagen 3. Sección histológica (H-E) de glándula salival de <i>R. microplus</i> . (D) Ducto; (LD) Lumen del ducto; (FLECHAS) Núcleo de células acinares, visualizadas al microscopio óptico (40x).	
Imagen 4. Sección histológica (H-E) de teleógina vista al microscopio óptico (40x). Se visualizan diferentes estructuras anatómicas: (A) Glándulas salivales; (B) cutícula; (C) Células digestivas; (D) ovocitos.	38

Imagen 5. Diferentes tomas (H-E) de *R. microplus* al microscopio óptico (40x), tomado en distintas posiciones. (A) posición central; (B) posición latero-frontal; (C) posición frontal; (D) posición caudal. 39

Imagen 6. Sección histológica (H-E), visualizada al microscopio óptico (40x) de la cutícula *R. microplus*. (H) hifas. 40

Imagen 7. Visualización al microscopio óptico (40x) de sección central (H-E) de *R. microplus* retirada a las 96hs de incubación. 40

RESUMEN

La garrapata común del ganado bovino (*Rhipicephalus microplus*) es considerada uno de los problemas sanitarios con más impacto económico en la ganadería de Uruguay desde hace ya muchos años. Esto es debido a la disminución de la producción de carne y leche, transmisión de enfermedades con consecuente muerte de animales y altos costos de control. El uso indiscriminado de productos químicos para controlar dicho ectoparásito ha favorecido a la generación de resistencia. Alternativas emergentes que utilizan métodos de control biológicos de la garrapata favorecen a la preservación de la salud humana y del ecosistema. Este trabajo tuvo como objetivo investigar y describir las alteraciones macro e histopatológicas provocadas por el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en las garrapatas *R. microplus*. El ensayo se realizó sobre garrapatas colectadas de bovinos infectados naturalmente de un predio de Tacuarembó, Uruguay, llevando a cabo los trabajos de laboratorio en la Plataforma de Salud Animal (PSA), Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) Tacuarembó. Las garrapatas fueron divididas en grupo control y tratamiento, las tratadas se expusieron a una suspensión de conidios conocida de *M. anisopliae* y fueron incubadas en condiciones controladas durante distintos periodos de tiempo (24, 48, 72, 96 y 240 horas). Se realizaron observaciones macroscópicas y análisis histológicos. Tanto en el análisis macro como histológico sólo se encontraron alteraciones evidentes en la muestra que estuvo 96 horas en incubación. Se concluyó que en el ensayo realizado en este trabajo el hongo *M. anisopliae* demostró ser infectivo y mortal para *R. microplus* bajo condiciones controladas, con cambios significativos observados a las 96 horas de incubación. Estos resultados respaldan el potencial del control biológico de garrapatas mediante *M. anisopliae*, así como continuar con la búsqueda de métodos que favorezcan la acción del hongo en el hábitat natural de las garrapatas, mejorando así la eficacia del control biológico en condiciones de campo.

SUMMARY

The common cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) is considered one of the most economically impactful health issues in Uruguay's livestock industry for many years. This is due to decreased meat and milk production, the transmission of diseases resulting in animal deaths, and high control costs. The indiscriminate use of chemical products to control this ectoparasite has contributed to the development of resistance. Emerging alternatives using biological control methods for ticks help preserve human health and the ecosystem. This study aimed to investigate and describe the macro- and histopathological alterations caused by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus* ticks. The experiment was conducted on ticks collected from naturally infected cattle from a farm in Tacuarembó, Uruguay, with laboratory work carried out at PSA, INIA Tacuarembó. The ticks were divided into a control and a treatment group, with the treated ones exposed to a known suspension of *M. anisopliae* conidia and incubated under controlled conditions for various time periods (24, 48, 72, 96, and 240 hours). Macroscopic observations and histological analyses were conducted. Both macro- and histological analyses revealed significant alterations only in the sample incubated for 96 hours. It was concluded that, in the experiment conducted in this study, *M. anisopliae* proved to be infective and lethal to *R. microplus* under controlled conditions, with significant changes observed at 96 hours of incubation. These results support the potential of biological tick control through *M. anisopliae* and encourage the continued search for methods that enhance the fungus's effectiveness in the natural habitat of ticks, thereby improving biological control efficacy in field conditions.

INTRODUCCION

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos, conocidos por causar lesiones dérmicas (Melo et al., 2024) y por transmitir patógenos responsables de diferentes enfermedades en animales domésticos, silvestres y humanos (Camargo et al., 2016). Dichas enfermedades varían en cuanto a su agente etiológico, gravedad, ciclos biológicos y consecuencias, siendo algunas zoonosis, por ejemplo, la rickettsiosis transmitida por *Amblyomma triste*, con importancia en lo que respecta a la salud pública, y otras produciendo grandes pérdidas económicas en animales de producción, como lo son las enfermedades transmitidas por *Rhipicephalus microplus* en los países ganaderos (Camargo et al., 2016, Venzal y Nava, 2011).

Rhipicephalus microplus, conocida como la garrapata común del ganado bovino, es considerada la garrapata más importante del ganado vacuno a nivel mundial. Se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales, siendo originaria de la India y de carácter endémico en gran parte de Asia tropical y subtropical, el nordeste de Australia, Madagascar, el sudeste de África, América Central y del Sur, entre ellos Uruguay (Fraser, Bergeron, Mays y Aiello, 1993).

Dichos parásitos son hematófagos, causando daños a los bovinos de manera directa provocando lesiones a nivel cutáneo y disminuyendo la producción de carne y leche. Así como daños indirectos a través de la transmisión de protozoarios, los cuales provocan enfermedades como la babesiosis (*Babesia bovis* y *Babesia bigemina*) y la anaplasmosis (*Anaplasma marginale*), siendo este último aspecto de mayor relevancia (Solari, Dutra y Quintana, 2013).

En Uruguay, las condiciones climáticas son propicias para el desarrollo de este parásito durante ciertos momentos del año. Esto ha llevado a que la garrapata común del ganado vacuno sea uno de los principales problemas sanitarios en la ganadería uruguaya, causando pérdidas significativas. Estas pérdidas fueron estimadas (Ávila, 1998) en 32,8 millones de dólares anuales, dado por pérdidas productivas, campañas de control, costos de tratamientos, daño en cueros y por las consecuencias de las enfermedades transmitidas. A la fecha, se estiman que estas pérdidas podrían rondar los 45 millones de dólares (Miraballes, Riet, Fuellis y Araoz, 2018).

La lucha contra la garrapata en el Uruguay lleva una larga data, comenzando en el año 1910 donde se promulgó la Ley N° 3606. Posteriormente, en 1956, se promulgó la Ley N° 12293, declarando a la garrapata como una plaga nacional, obligando a los propietarios y tenedores de ganado a contribuir con su erradicación según lo dispuesto por dicha ley y entre otros puntos, prohibiendo el tránsito de animales con garrapata en todo el territorio nacional, independientemente del grado de evolución del parásito. En 2008, se publicó la Ley N° 18.268, que declaró de interés nacional la lucha contra la garrapata común del ganado bovino, incluyendo bajo el mismo marco normativo las enfermedades infecciosas de los animales transmitidas por ectoparásitos, como *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* (Uruguay, 2008). Esta ley también estableció la división del territorio nacional en zonas o áreas libres y de

control, teniendo en cuenta los factores epidemiológicos, productivos, ecológicos, socioeconómicos y geográficos (Figura 1).

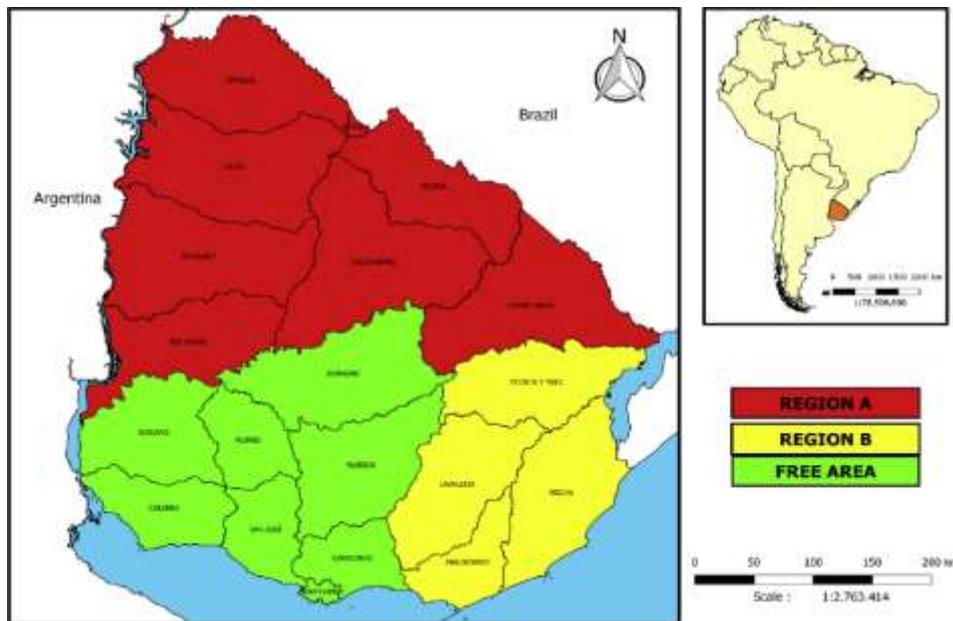


Figura 1. Mapa de Uruguay que muestra distintas regiones según la prevalencia de garrapatas. (Región A) presencia de garrapatas del ganado ha sido continua durante los últimos 100 años. (Región B); la presencia de garrapatas del ganado ha sido variable a lo largo de los años; (Área libre) los brotes son esporádicos y las infestaciones de garrapatas deben ser eliminadas por ley. Miraballes et al. (2019).

En las zonas libres no están presente la garrapata mientras que en las zonas control región A y B), la garrapata se encuentra presente y la autoridad sanitaria establece medidas para disminuir la prevalencia de esta, así como las enfermedades que transmite y zonas de erradicación donde la autoridad sanitaria establece medidas para lograr el estatus de área libre (Errico et al., 2009).

En nuestro país y el mundo existen distintas estrategias en lo que respecta al control y/o erradicación de la garrapata. Entre ellas las que han sido más utilizada son en base al uso de productos químicos (ixodicidas) (Redondo et al., 1999), asociado a la epidemiología de esta especie. Estudios realizados en nuestro país (Cardozo, Nari, Franchi, López y Donatti, 1984) han demostrado que existen en promedio 3 generaciones por año de garrapatas con una interrupción en invierno, pudiendo tener alguna variación dependiendo del clima (factor año).

El control químico se ha vuelto ineficaz en algunas regiones debido a la aparición de garrapatas resistentes a estos productos, siendo esto beneficiado por su uso indiscriminado, la subdosificación y otras malas prácticas (Fonseca y Alcides, 2015).

A raíz de esto se han buscado diferentes alternativas (tratamientos no químicos) para la reducción del uso de productos garrapaticidas. Entre ellas se encuentra el uso animales con características raciales más resistentes (*Bos indicus*), manejos

estratégicos de las pasturas, la inmunización a través de vacunas comerciales y el control biológico a través de hongos entomopatógenos, los cuales se hará más énfasis.

Estos organismos han ganado terreno no solo por ser una opción distinta a la utilización de productos químicos, sino también porque reducen el impacto ambiental y los riesgos para la salud asociados con su uso. Contribuyendo así a los objetivos de “Una Sola Salud”, al abordar de manera integral los problemas de salud animal, ambiental y humana. Sumado a esto, se presenta también como una alternativa más orgánica, en un mercado global que exige cada vez más la producción sustentable. Estos organismos son conocidos por su gran capacidad de regular las poblaciones de insectos, gracias a su gran habilidad de infectar artrópodos como *R. microplus*, *Ixodes scapularis*, *Rhipicephalus sanguineus* y *Amblyomma maculatum* (Walquiria, Lubeck, Schran y Henning Vainstein, 2005).

Dentro de los géneros de hongos entomopatógenos mayormente estudiados para el uso en el control de la garrapata común del ganado bovino se encuentran los géneros *Metarhizium* spp., *Lecanicillium* spp. y *Beauveria* spp. Estos organismos logran penetrar al hospedador de manera directa a través del integumento, lo que la diferencia de otros microorganismos como virus o bacterias los cuales deben ser ingeridos para provocar la infección (Hajek y St, Leger 1994). Durante el proceso infeccioso, las esporas/conidios del hongo se adhieren a la cutícula del insecto, luego germinan y liberan un tubo germinativo que penetra la cutícula. A partir de ahí, el hongo se desarrolla y crece dentro del cuerpo del insecto, causando daño mecánico o produciendo toxinas que contribuyen a la muerte del hospedero. Este hongo va a producir nuevas esporas que quedan en el entorno dispersadas, permitiendo la infección de nuevos hospederos y la continuación de su ciclo de vida (Hajek y St, Leger, 1994).

Diversos estudios in vitro y pruebas de campo han demostrado la eficacia de estos hongos, no solo siendo capaces de causar la muerte de varias especies de garrapatas, sino que también reduciendo las poblaciones a través de los efectos negativos que causan a nivel de la reproducción de estos insectos (Fernandes y Bittencourt, 2008). El objetivo de nuestro trabajo fue describir cómo se dan dichos cambios tanto macro como histológicos en garrapatas *R. microplus* al ser infectados por hongos de la especie *Metarhizium* spp.

REVISION BIBLIOGRAFICA

1 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888).

1.1 Generalidades

Las garrapatas son ectoparásitos obligatorios que pertenecen al phylum Artrópoda, clase Aracnida, subclase Acari, orden Ixodida. (Murell y Barker, 2003). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, conocida como garrapata común del ganado bovino, es un parásito hematófago perteneciente a la familia Ixodidae (garrapatas duras), una de las tres familias (Argasidae y Nuttalliellidae) que conforman a las cerca de 999 especies de garrapatas que han sido identificadas en el mundo (Lopez y Bentancourt, 2024). Está asociada principalmente a los bovinos, aunque también puede parasitar a otros mamíferos domésticos y silvestres (Campos Pereira y Labruna, 2008). La distribución mundial de esta garrapata abarca regiones tropicales y subtropicales. Es endémica en el subcontinente indio, gran parte de Asia tropical y subtropical, Madagascar, el sureste de África, el Caribe, México y varios países de América Central y del Sur (Wharton, 1974) (Figura 2). Si bien fue considerada como establecida en el noreste de Australia, actualmente la especie corresponde a *Rhipicephalus (Boophilus) australis* (Estada-Peña et al., 2012).

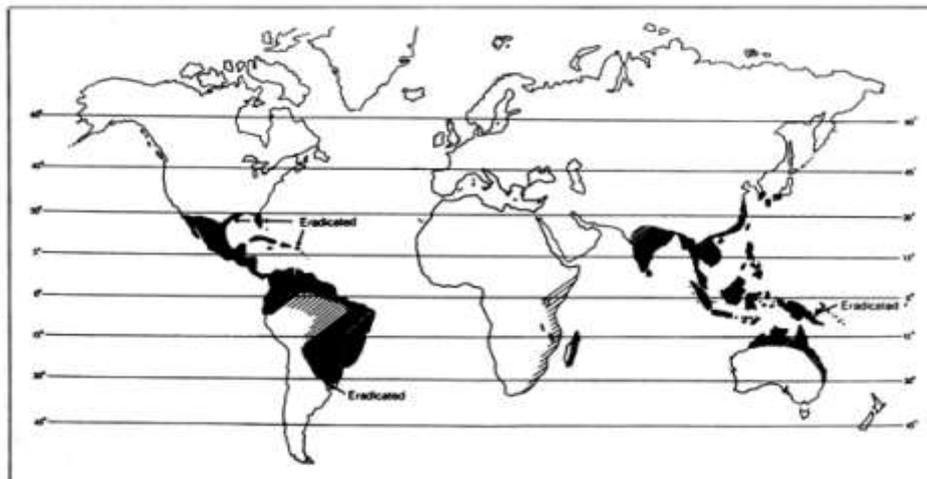


Figura 2. Distribución mundial de *Rhipicephalus microplus* (Wharton, 1974).

1.2 Ciclo Biológico

El ciclo biológico de *R. microplus* es monoxeno, ya que se desarrolla en un solo hospedero y parasita principalmente a bovinos. Este ciclo consta de dos etapas: una etapa de vida libre, que ocurre en el ambiente, y otra etapa de vida parasitaria sobre el huésped (Fiel y Nari, 2013) (Figura 3).

La etapa de vida libre, también llamada extra parasitaria, comienza cuando la Teleogina (hembra ingurgitada) cae del hospedero al suelo para comenzar con oviposición. El periodo entre el desprendimiento y el inicio de la oviposición se denomina protoquia, y su duración depende de las condiciones climáticas. En agosto, con temperaturas promedio de 16 a 19°C, este periodo puede durar de 25 a 51 días. Sin embargo, durante el verano, cuando las temperaturas aumentan, este periodo disminuye de 2 a 3 días, según registros realizados en Artigas, Cerro Largo y Tacuarembó (Cardozo et al., 1984). Durante el periodo de oviposición (ootoquia) el tiempo transcurrido es de 14 días en condiciones óptimas (Fiel y Nari, 2013). Sin embargo, este periodo puede extenderse más del triple cuando las condiciones son adversas. Incluso en invierno, con temperaturas muy bajas, el ciclo extra parasitario puede verse interrumpido (Núñez, Cobeñas y Moltedo, 1982).

En este tiempo, la garrapata puede llegar a poner de 1000 a 4500 huevos, los cuales van a eclosionar a larvas que luego contaminarán las pasturas, dando así inicio a la etapa parasitaria (Núñez et al., 1982). El ciclo parasitario se divide en tres etapas: larval, ninfa y adulta. Este ciclo comienza cuando las larvas detectan y suben al huésped, donde se alimentan pasando a metalarva a los 3 a 4 días desde el comienzo del ciclo. Luego mudan a ninfa a los 7 a 9 días, aproximadamente. Estas ninfas se caracterizan por medir 1mm, presentar cuatro pares de patas y tres hileras de dientes a cada lado del hipostoma. Siguiendo a esto muda a metaninfa, la cual mide de 2.5 a 4 mm y se caracteriza por presentar una doble envoltura de quitina (Núñez et al., 1982).

La etapa adulta comienza alrededor del día 13 o 14 del ciclo. Durante esta fase, la garrapata presenta cuatro pares de patas y a diferencia de las ninfas, cuatro pares de dientes a cada lado de la línea media del hipostoma. Es en esta etapa cuando comienza la diferenciación sexual (Fiel y Nari, 2013). Las hembras continúan su ciclo, pasando de Neogina a Partenogina, etapa en la que esperan a ser fecundadas por el macho. Luego, pasan a ser teleogina, en la cual succionan grandes cantidades de sangre en pocas horas antes de caer al suelo, generalmente alrededor del día 21 al 23 del ciclo. En contraste, los machos pueden vivir hasta 40 días, son altamente móviles y se desprenden varias veces para fecundar a varias hembras (Núñez et al., 1982). Una vez que la teleogina está en el suelo, vuelve a comenzar la etapa extra parasitaria- no parasítica.

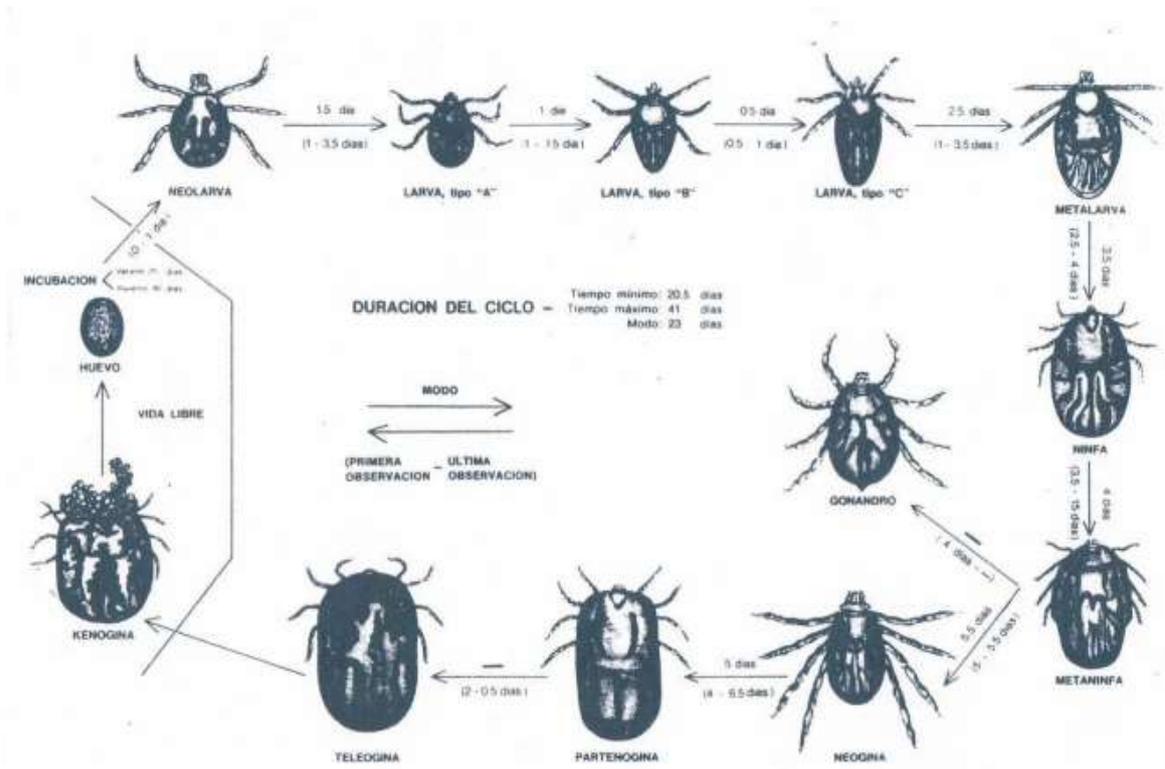


Figura 3. Ciclo parasitario de *R. microplus* (Núñez et al., 1982).

Estudios acerca de la epidemiología de esta especie en el Uruguay (Nari et al, 1979) han demostrado un marcado comportamiento de la garrapata en tres generaciones por año, con una interrupción en el invierno. De esta manera, estos investigadores (Fiel y Nari, 2013) desarrollaron un modelo epidemiológico que permite resumir conceptualmente el número de generaciones que se presentan por año y cómo se desarrolla la dinámica poblacional (Figura 4). Este modelo ha sido útil para proporcionar un marco técnico sobre el tema y a partir de él han surgido diferentes estrategias de control desarrolladas actualmente.

La primera generación comienza a fines del invierno (agosto) donde las temperaturas comienzan a ser más propicias para el desarrollo del ciclo hasta el mes de noviembre, y se origina a partir de aquellas larvas que se encontraban inactivas y sobrevivieron el invierno. Durante este tiempo la población de garrapatas es baja, siendo de 3 a 4 garrapatas por animal, con la excepción de algún predio con problema de resistencia donde puede alcanzar hasta 100 por animal (Fiel y Nari, 2013). La segunda generación va desde noviembre a febrero, donde la población de garrapatas es mayor al de la primera. Durante el otoño se da la tercera generación donde la cantidad de garrapatas es crítica, pudiendo encontrarse hasta 400 ejemplares por animal. Esta última generación no solo tiene implicancia por los daños que puede causar durante ese momento, sino que van a ser las responsables de formar la primera generación de la temporada siguiente.

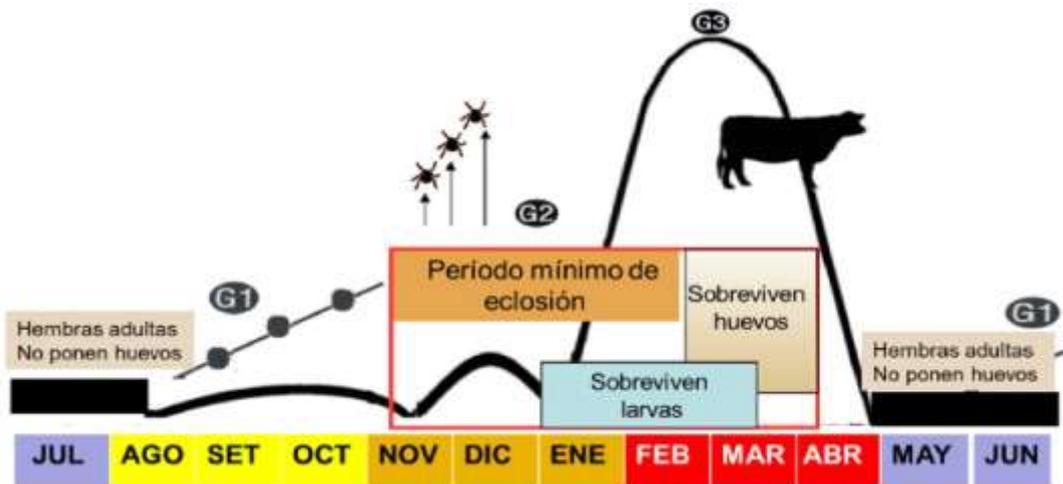


Figura 4. Modelo epidemiológico conceptual de *B. microplus* (Cuore y Solari, 2022).

1.3 Anatomía de la garrapata

Lo que respecta al tamaño de *Rhipicephalus microplus*, en el caso de los machos pueden alcanzar entre 2.5 y 3.5 mm de largo, mientras que las hembras pueden llegar a medir entre 3.5 y 5 mm (Núñez y col., 1982).

Poseen un engrosamiento en la cutícula llamado escudo dorsal, este está compuesto por lípidos, proteínas y quitina lo que le da dureza y resistencia al mismo, actuando como barrera primaria de protección (Olhagaray, 2018). La cutícula está compuesta por tres capas evidentes: epicutícula, exocutícula y endocutícula (Figura 5). El escudo dorsal presenta patrones característicos que pueden ayudar en la identificación de la especie y varían dependiendo del sexo y del estado de alimentación de la garrapata.

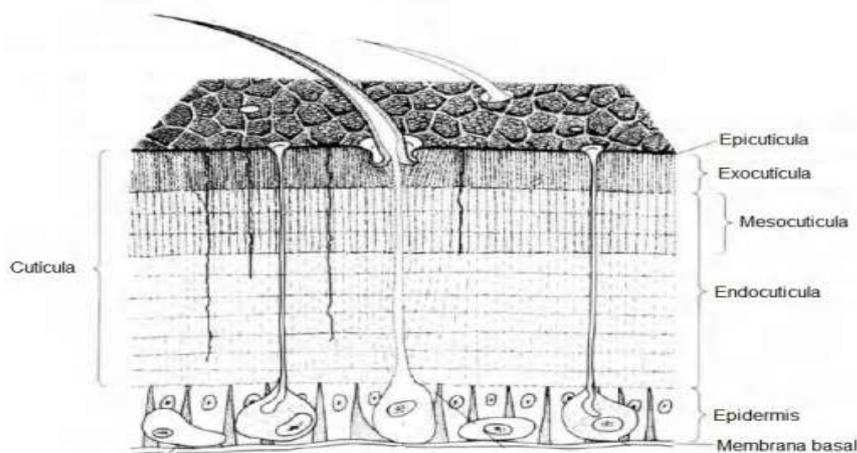


Figura 5. Diagrama de la cutícula de *R. microplus* (Hackman, 1982).

Su cuerpo está acompañado de 8 patas (6 en larva) (Figura 6), especializadas con garras para afirmarse al huésped. Presenta un aparato bucal adaptado para perforar la piel de su huésped y alimentarse de su sangre. Este está conformado por quelíceros, hipostoma y palpos. Los quelíceros son estructuras en forma de pinzas encargadas de perforar la piel del huésped y mantenerse sujeto durante la alimentación. El hipostoma presenta forma de aguja y es encargada de insertarse en la piel para extraer sangre. Por otro lado, los palpos son órganos sensoriales ubicados próximos a la boca, capaces de detectar la temperatura y sustancias químicas emitidas por el huésped. Además de los palpos, *R. microplus* tiene un órgano sensorial llamado Haller, que se encuentran en la parte anterior del cuerpo y son sensibles a los cambios en la luz y la humedad del ambiente.

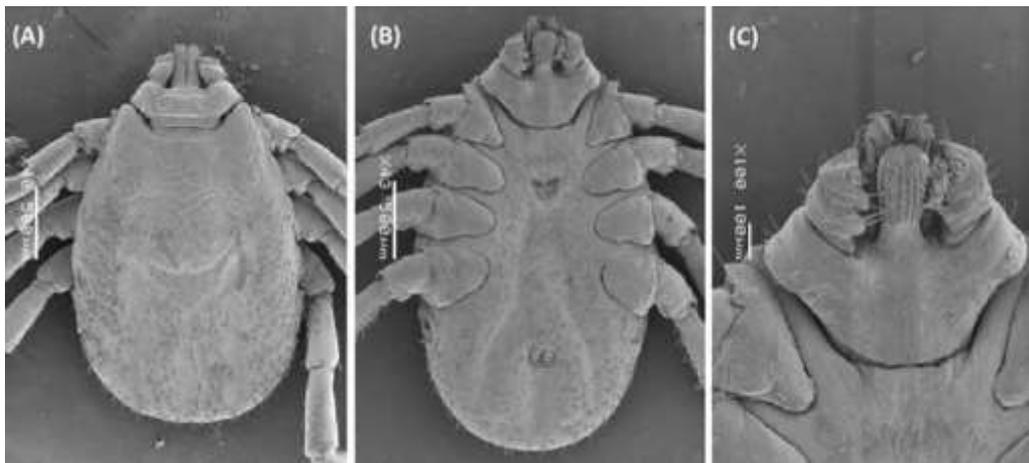


Figura 6. Visualización de *R. microplus* hembra: (A) vista dorsal, (B) vista ventral, (C) vista ventral del capítulo (Nava et al., 2017).

Por otra parte, esta garrapata presenta glándulas salivales las cuales son importantes ya que secretan sustancias que ayudan a disolver la sangre y suprimir la respuesta inmune del huésped, facilitando la alimentación continua. A través de la saliva son transmitidos patógenos como los causantes de babesiosis y anaplasmosis (Parodi et al., 2022; Tidwell et al., 2021). El sistema respiratorio está compuesto por la tráquea la cual no solo se encarga del transporte de oxígeno a los órganos, sino también de la eliminación de CO₂.

Al sistema digestivo lo compone el intestino medio, órgano más largo del cuerpo de la garrapata, y su función es almacenar la sangre digerida. También presenta un preestomago encargado de secretar enzimas digestivas para la correcta digestión de la sangre ingerida. Los túbulos de Malpighi son componentes adicionales del sistema digestivo y sirven para consolidar los desechos nitrogenados y facilitar su transporte hacia el saco rectal en forma de cristales de guanina (Tidwell et al., 2021). El saco rectal se encuentra ubicado en la parte posterior del cuerpo de la garrapata, cerca del ano y cumple un papel crucial en la excreción de desechos y en

el mantenimiento del equilibrio osmótico dentro del cuerpo del ectoparásito (Figura 7).

En las hembras, el sistema reproductivo femenino consiste en la abertura genital, una vagina dividida en dos partes (vestibular y cervical), receptáculo seminal, oviductos y ovarios. Además, existen dos glándulas accesorias: la glándula lobular y la glándula tubular las cuales se desarrollan después de la inseminación (Tidwell et al., 2021).

Los machos también presentan una apertura genital, por donde va a liberar el espermátforo y transferirlo manualmente a través de sus partes bucales hacia la apertura genital de la hembra (Tidwell et al, 2021). Lo que conecta la apertura genital al resto del sistema reproductivo (testículos, glándula accesoria y conducto deferente) es el conducto eyaculador.

El sistema nervioso de la garrapata incluye un cerebro situado en la parte anterior del cuerpo, así como una serie de ganglios a lo largo del cuerpo que controlan las funciones corporales (Tidwell et al, 2021).

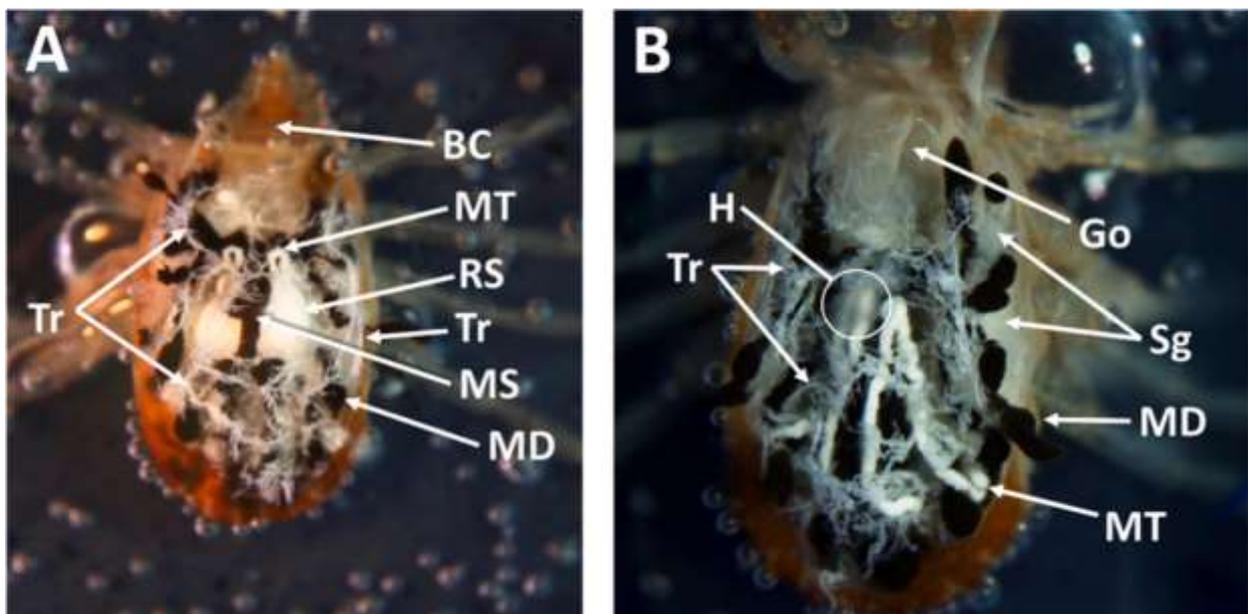


Figura 7. Vista dorsal de hembra de *R. microplus* sumergida en PBS. [A] Hembra con esqueleto removido (20x). [B] Hembra con el esqueleto levantado para visualizar la anatomía interna (40x). BC: base del capítulo; MT: túbulos de Malpighi; Tr: tráqueas; MS: intestino medio; MD: divertículo del intestino medio; RS: saco rectal; Go: órgano de Gené; H: corazón; Sg: glándulas salivales. Extraído de Tidwell et al., 2021.

2 Métodos de control de *R. microplus*

Existen distintas estrategias en lo que respecta al control y/o erradicación de la garrapata en nuestro país. Entre ellas la más utilizada son las que tienen como base

el uso de productos químicos (acaricidas), teniendo en cuenta las distintas generaciones del parásito.

2.1 Control químico

El control químico consiste en la utilización de acaricidas en momentos estratégicos, considerando la dinámica poblacional que existe en Uruguay y el ciclo biológico del parásito. Los principales grupos químicos utilizados son las lactonas macrocíclicas, organofosforados, piretroides sintéticos, amidinas, fenilpirazoles, fluazuron y recientemente las isoxazolininas (fluralaner).

Brevemente, repasando los diferentes mecanismos de acción de cada molécula, las lactonas macrocíclicas actúan sobre los receptores GABA 18, aumentando la permeabilidad de la membrana celular al cloro causando hiperpolarización y parálisis de ectoparásito. En el caso de los organofosforados inhiben la enzima acetilcolinesterasa. Los piretroides alteran los canales de sodio, estimulando las células nerviosas produciendo repetidas descargas y eventuales casos de parálisis (Ponce et al., 2016). Las amidinas, como por ejemplo el Amitraz, actúan como agonistas de la octopamina produciendo una sobreestimulación de la sinapsis octopaminérgica. Los fenilpirazoles como lo es el fipronil, inhiben los receptores GABA produciendo una hiperexcitabilidad. El fluazurón, perteneciente al grupo de las benzoilureas, las cuales interfieren en la formación de quitina, impidiendo de esta manera maduración de huevos, larvas y ninfas, interrumpiendo la reproducción y se cortando el ciclo biológico del parásito (Rodríguez Vivas et al., 2010). Por último, el mecanismo de acción de las isoxazolininas consiste en bloquear los canales de cloro regulados por GABA y ácido glutámico en el sistema nervioso de los parásitos provocando una despolarización continua de las células nerviosas, lo que causa hiperexcitación, parálisis y, finalmente, la muerte del parásito (Rodríguez Vivas et al., 2020).

Con el correr de los años, el uso indiscriminado de una misma molécula, así como la mala aplicación de estas, han permitido a *R. microplus* desarrollar resistencia a la mayoría de los acaricidas (Cuore y Solari, 2022). Es por esto que se han comenzado a buscar diferentes estrategias para el combate a esta garrapata, como lo son productos biológicos, vacunas, estrategias de manejo y utilización de otras razas. Sumado a esto surgió el Control Integrado de Parásitos (CIP), lo cual busca combinar las distintas herramientas previamente mencionadas, de manera planificada y considerando la epidemiología del parásito (Cuore y Solari, 2022).

2.2 Control no químico

2.2.1 Control genético

Este control se basa en la incorporación de razas bovinas con mayor resistencia al parásito como son los animales *Bos indicus*, en comparación con *Bos taurus* (Fonseca y Alcides, 2015).

2.2.2 Manejo de pasturas

Consiste en la rotación de pasturas con el fin de darle un descanso obligado a cada potrero o parcela, reduciendo el encuentro entre huésped/hospedador y de esta manera las larvas activas de los ectoparásitos quedan expuestas a condiciones desfavorables, como la falta de alimento y la deshidratación, lo que disminuye su supervivencia y su capacidad de infectar al ganado en futuros ciclos (Wilkinson, 1953).

2.2.3 Vacuna contra la garrapata

Esta ha sido una alternativa que ha demostrado eficacia en otras partes del mundo. Dos vacunas comerciales que utilizan el antígeno recombinante oculto Bm86 (glicoproteína de membrana del intestino de la garrapata), han logrado buenos resultados en planes de control integrado tanto en Cuba (Fonseca y Alcides, 2015) como en Australia. Sin embargo, distintos ensayos realizados en nuestro país con dichas vacunas no demostraron niveles aceptables de protección (Cuore y Solari, 2019), por lo cual su desarrollo sigue siendo un desafío para el futuro.

2.2.4 Control biológico – Hongos entomopatógenos

La estrategia implica el empleo de organismos vivos que actúan como depredadores del parásito. Dentro de estos organismos se encuentran los hongos entomopatógenos. Estos hongos son conocidos por su gran capacidad de regular las poblaciones de insectos, gracias a su gran habilidad de infectar artrópodos como *R. microplus*, *Ixodes scapularis*, *Rhipicephalus sanguineus* y *Amblyomma maculatum* (Walkiria A., et al 2004). Dentro de los géneros de hongos entomopatógenos mayormente estudiados para el uso en el control de la garrapata común del ganado bovino se encuentran los géneros *Metarhizium* spp., *Lecanicillium* spp. y *Beauveria* spp. (Rivas-Franco y Parodi, 2022).

El ciclo de vida de estos hongos consta de dos fases principales: una fase parasítica y una fase saprofítica. En la fase parasítica, el hongo infecta al insecto y se desarrolla dentro de su cuerpo, lo que eventualmente lleva a la muerte del hospedero. Después de que el insecto muere, comienza la fase saprofítica, en la cual el hongo se alimenta de la materia orgánica del insecto muerto y completa su ciclo de vida. Esta capacidad de los hongos entomopatógenos para sobrevivir y alimentarse de materia orgánica

del suelo o de otros sustratos después de la muerte del insecto les permite actuar como patógenos facultativos. Es decir que pueden persistir y mantenerse en el medio ambiente en ausencia de insectos para infectar (Hajek y St, Leger, 1994).

El logro de un programa exitoso de control biológico de plagas mediante hongos entomopatógenos se fundamenta en varios aspectos clave. Estos incluyen la producción adecuada del inóculo para su aplicación en el campo, la selección meticulosa de cepas o aislados con una alta virulencia, un óptimo crecimiento y capacidad de esporulación, así como una notable resistencia a las condiciones ambientales adversas (García et al., 2015).

Algunas experiencias en nuestro país (Rodríguez et al., 2022) llevadas a cabo entre 2003 y 2020 en diferentes ensayos, han demostrado que estos hongos son una alternativa viable. Dichos ensayos se realizaron sobre diferentes plagas, entre ellas las garrapatas de ganado (*R. microplus*), plagas hortícolas como *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabacci*, hormigas cortadoras y, hongos y bacterias que causan enfermedades en los cultivos tales como *Botrytis*, *Phitium*, *Peronospora* y *Sclerotinia*, entre otros. A partir de estos trabajos se lograron obtener más de 20 aislamientos autóctonos de hongos patógenos, los cuales fueron empleados en más de 100 sistemas de producción en diversas áreas y ecosistemas del país. Esto demostró ser una alternativa viable desde perspectivas ecológicas, económicas y sociales, al tiempo que suplanta el uso de insumos químicos sintéticos.

Por otro lado, Fernandes y Bittencourt (2008) publican una revisión acerca de distintos ensayos *in vitro* de distintos investigadores, mostrando resultados del uso de hongos entomopatógeno en distintas garrapatas de Sudamérica, en distintos estados evolutivos del parásito. Muestran que en un ensayo (Bittencourt et al., 1999), el periodo de incubación de los huevos aumentaba (23,5 - 23,8 a 29,4 - 39,5 días), así como el tiempo de eclosión de estos (6 - 8 a 10,3 - 15 días) respecto al grupo control cuando se enfrentaban conidios de *M. anisopliae* con *R. microplus*. También señalan según otros ensayos (Souza et al., 1999) que disminuye el % de eclosión de los huevos de *Amblyomma cajennense* respecto al control (de 100% a 0,33 % de eclosión) en concentración altas de conidios ($\times 10^8$) de *Beauveria bassiana*.

En la misma revisión (Fernandes y Bittencourt, 2008) evidencian algunos resultados de ensayos en larvas. En uno de ellos (Melo et al., 2006), sobre larvas de *R. microplus* expuestas en una suspensión de conidios (10^8) de *M. anisopliae*, logrando porcentajes de mortalidad entre un 97% a 99%, en comparación al 1 a 2 % del grupo control. Fernandes et al., 2006 enfrentó conidios ($10^4 - 10^8$) de *B. bassiana* a larvas *R. microplus* y como resultado obtuvo un aumento en la mortalidad (16 - 100% respectivamente) comparado con el control (10%), al día 10 de tratamiento.

Otros trabajos que se describen en ninfas demuestran el aumento en la mortalidad al ser tratada con dichos hongos, como es el estudio realizado por Reis et al. (2001), donde concluyen que hay un aumento de 29 - 75% de mortalidad en garrapatas *A. cajennense* tratados con una concentración de conidios ($10^5 - 10^8$ respectivamente)

de *B. bassiana*. En el caso de ensayos en garrapatas adultas, Posadas y Lecuona (2007) evidenciaron la reducción de un 45 a 60 % en la producción de huevos y una disminución de 46 a 69 % en la eclosión de estos, de garrapatas *R. microplus* en suspensión (10^8) de *B. bassiana*.

3 *Metarhizium anisopliae*

Esta especie es un hongo entomopatígeno verdadero anamorfo y facultativo, aislado por primera vez en 1879 del escarabajo *Anisoplia austriaca* Herbst por Metchnikoff, quien sugiere su uso por primera vez como agente microbiano para el control de insectos (Ojeda-Chi et al., 2011). Al principio fue descrito como *Entomophthora anisopliae*, y posteriormente como *Metarhizium anisopliae* por Soronki (1883) (Olhagaray, 2018).

3.1 Biología

Metarhizium spp. está ampliamente propagado en la naturaleza, siendo encontrado en el suelo, en la rizosfera de las plantas o como parasito saprofito en cadáveres de artrópodos, así como son parásitos de muchos insectos y garrapatas (Scharank y Vainstein, 2010). Este hongo presenta muchas cepas las cuales varían en tamaño de sus conidios y la especificidad de sus hospederos, provocando de esta manera que sea muy diverso genéticamente (Figura 8). *M. anisopliae* var. *anisopliae* es la variedad que presenta mayor espectro de hospederos (Olhagaray, 2018).

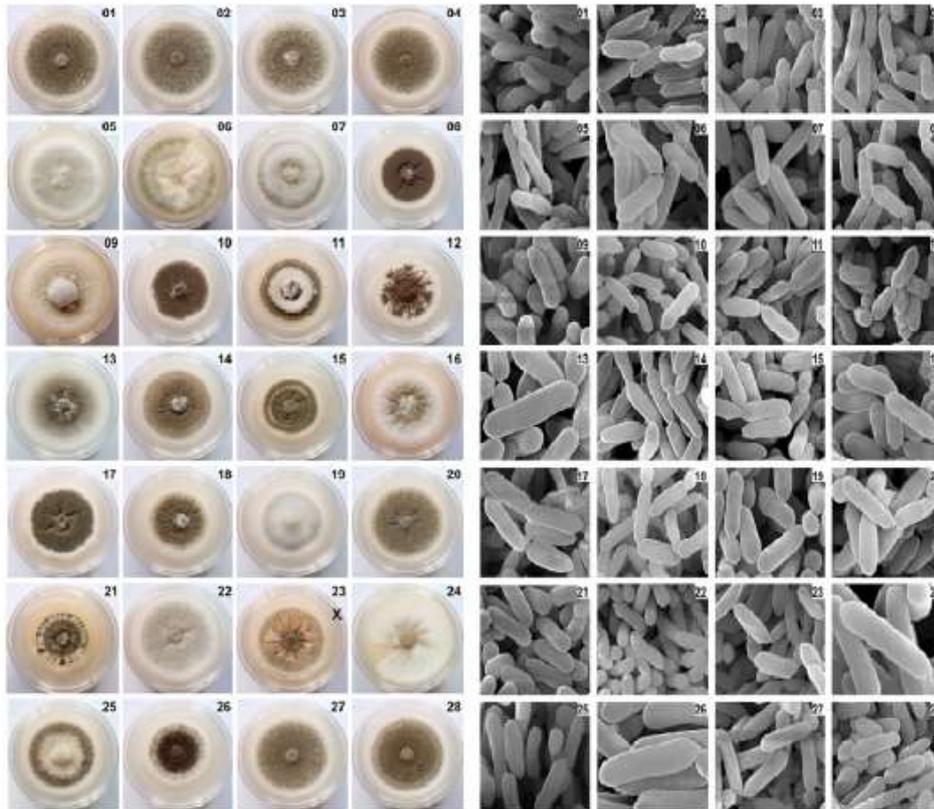


Figura 8. Biodiversidad de las diferentes cepas de *Metarhizium anisopliae*. Imagen izquierda: morfología de la colonia. Imagen derecha: Microscopio electrónico de barrido de conidiósporas, utilizado a la misma escala (Scharank y Vainstein, 2010).

Metarhizium se desarrolla vegetativamente a través de hifas que generan micelios y conidios, los cuales son los propagadores infecciosos en los hospedadores de artrópodos y en el medio de cultivo. Aunque *M. anisopliae* tiene un rango de hospedadores amplio en general, cada cepa puede dirigirse solo a hospedadores específicos (Scharank y Vainstein, 2010)

Respecto a las condiciones climáticas apropiadas para el hongo, las temperaturas más altas para el crecimiento de micelio son 37 – 40 °C (Rangel et al., 2005). Esto coincide con la mayoría de los hongos entomopatógenos, los cuales son considerados mesofílicos, con crecimiento entre 10 y 40 °C. Por otro lado, la temperatura máxima de germinación para *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* es alrededor de 37 °C. Las mayores dificultades que encuentra el hongo son a temperaturas muy elevadas en rangos de 49 a 60°C, aunque el daño provocado por las altas temperaturas depende de la humedad. Mientras altas temperaturas con alta humedad causan desnaturalización de las proteínas y desorganización de las membranas, altas temperaturas secas pueden producir daño en el ADN llevando a la despurinización (Rangel et al., 2005),

Si bien estas temperaturas extremas son difíciles de encontrar en nuestra región, se ha descubierto que el hongo se enfrenta a un estrés calórico importante cuando se

asocia con insectos. Por ejemplo, cuando es usado para el control de la garrapata en bovinos, los conidios pueden ser expuestos a temperaturas dérmicas de hasta 45° C (Rangel et al., 2005).

3.2 Invasión y factores de virulencia

La infección comienza con la deposición de conidios en la cutícula del hospedador, seguida por adherencia y, bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura, la germinación de las esporas. La invasión del cuerpo del insecto y del sistema circulatorio (hemolinfa) ocurre una vez que el hongo ha atravesado la cutícula (Shah y Pell, 2003). La adherencia es crucial para el inicio de la infección y está dada por interacciones hidrofóbicas entre las proteínas de la superficie de la spora como lo son las hidrofobinas (Fang, Pei y Bidochka, 2007), y la capa lipídica que cubre la cutícula de la garrapata. La degradación de lípidos también ha sido relacionada recientemente con el crecimiento de *M. anisopliae* previo a la penetración en la cutícula del hospedador. Estas moléculas están presentes en la epicutícula, la primera barrera de defensa contra microorganismos patógenos del artrópodo, lo que resalta la importancia de las enzimas lipolíticas en las etapas iniciales de la infección. Se sugiere que las lipasas producidas por *M. anisopliae* son las que participan en este proceso (Schrank y Vainstein, 2010).

Durante el proceso de penetración de la cutícula, el hongo secreta proteasas, quitinasas y lipasas que degradan sus principales componentes (lípidos, proteínas y quitina) permitiendo así la penetración de las hifas (Schrank y Vainstein M, 2010).

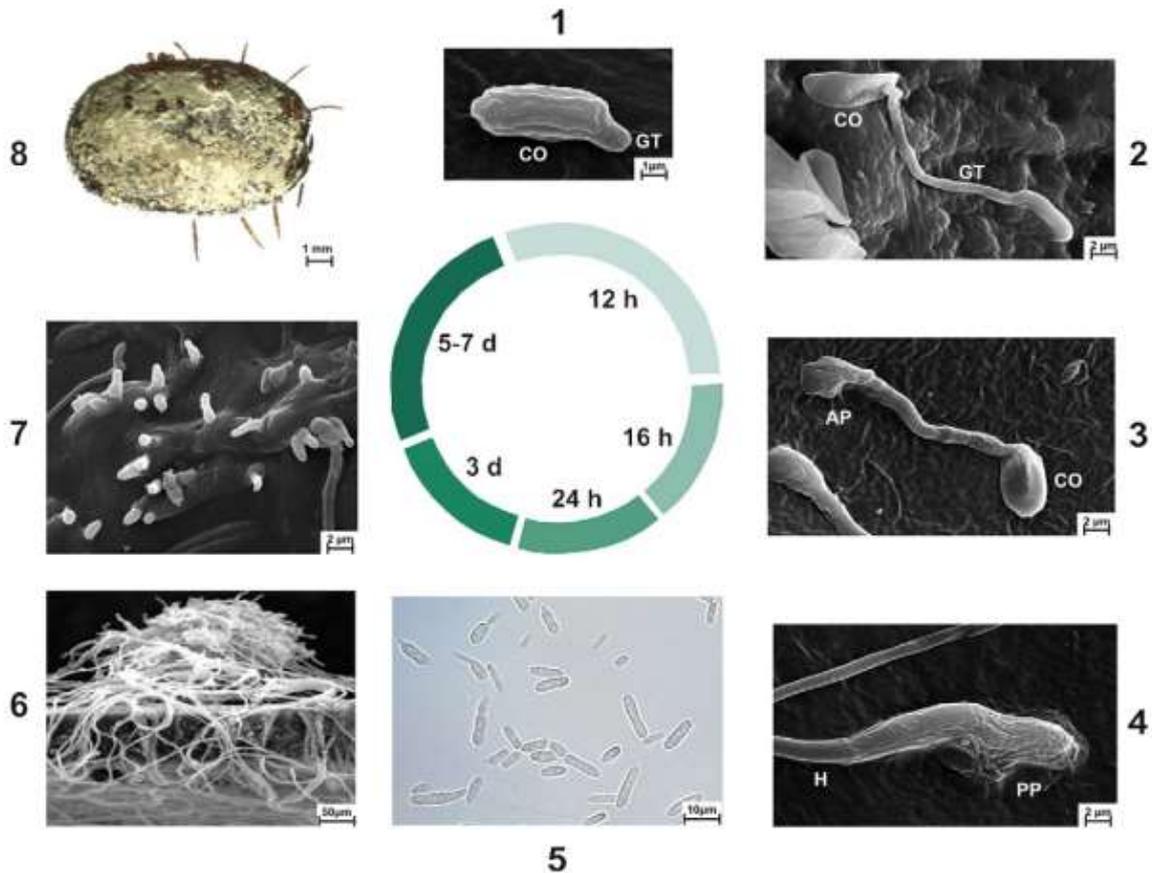


Figura 9. Etapas de la infección de *M. anisopliae* en garrapata (Schrank y Vainstein, 2010).

En la Figura 9 se muestran las distintas etapas de infección en una garrapata. (1) Adherencia de los conidios a la cutícula del hospedador vista mediante microscopio electrónico de barrido (MEB) (2) Germinación de los conidios, visto a través de MEB; (3) Diferenciación de túbulo germinal en apresorio mediante MEB; (4) Penetración de la cutícula, mediante MEB; (5) Diferenciación de hifas en blastoporos, mediante microscopio óptico; (6) colonización del hospedero, mediante MEB; (7) extrusión hacia la superficie del cadáver del hospedador, mediante MEB y (8) imagen de las conidiósporas y la producción de conidios en un cadáver de garrapata (Schrank y Vainstein, 2010).

Al atravesar la cutícula (primera línea de defensa) el hongo debe superar la respuesta inmune innata del artrópodo. La mayoría de estos responden tanto de manera celular como humoral ante una infección fúngica, activándose esta cuando comienza la degradación de la cutícula. Los hongos cuentan con dos estrategias de defensa ante las respuestas del hospedador; el desarrollo de formas de crecimiento cripticas que permanecen ocultas a la respuesta inmune de artrópodo, y la producción de sustancias inmunomoduladores que suprimen el sistema de defensa del hospedador (Schrank y Vainstein, 2010). Wang y St Leger (2006) sugieren que la producción de

una proteína similar al colágeno (MCL1) por parte del hongo es la encargada de evadir la respuesta inmune.

Una vez que penetra en el organismo, las estructuras hifales van a colonizar la hemolinfa, donde empiezan a consumir los nutrientes disponibles. Durante este proceso, se generan toxinas conocidas como destruxinas, las cuales desempeñan un papel crucial en los efectos patógenos, interfiriendo con los procesos de excreción, dificultando la movilización y reduciendo la capacidad de alimentación del hospedador (Schrank y Vainstein, 2010).

La colonización del hongo en los órganos del artrópodo se produce en la siguiente secuencia: cuerpos grasos, sistema digestivo, tubos de Malpighi, hipodermis, sistema nervioso, músculos y tráquea (Ojeda-Chiet et al., 2011). El proceso continúa con la colonización de la cutícula y la emergencia del hongo en la superficie cuticular dentro de las 72-96 horas posteriores a la infección (Walkiria et al., 2005).

La muerte de la garrapata es a consecuencia de las micotoxinas, cambios patológicos en el hemocele, acción histolítica y bloqueo mecánico del aparato digestivo, secundario al crecimiento de las hifas (Ojeda-Chi et al., 2011) como fue mencionado previamente. Luego de la muerte del artrópodo y cuando las condiciones de humedad relativa son adecuadas se produce la emergencia. Esta se realiza a través del tegumento, donde crece en la superficie y esporula después de 48 a 60 h de la muerte del hospedero (Ojeda-Chi et al., 2011).

Por otro lado, las garrapatas han desarrollado diversas estrategias para sobrevivir en su entorno, incluida la capacidad de secretar una variedad de compuestos bioquímicos para defenderse de patógenos potenciales. En cuanto a la secreción de compuestos defensivos contra patógenos potenciales, esto puede ocurrir en varias etapas del ciclo de vida de la garrapata, pero es especialmente crítico durante las etapas en las que están expuestas a un mayor riesgo de infección, como cuando están buscando un huésped o alimentándose de sangre (de la Fuente, 2018). Dentro de estos se encuentran los compuestos antifúngicos como péptidos antimicrobianos, lípidos, enzimas y otros metabolitos secundarios. Estas sustancias tienen la capacidad de inhibir el crecimiento y la viabilidad de hongos y otros microorganismos, lo que les proporciona a las garrapatas una ventaja competitiva en su hábitat natural. Cuando las garrapatas entran en contacto con *M. anisopliae*, las sustancias antifúngicas que secretan pueden desencadenar una serie de respuestas en el hongo. Por un lado, inhibir directamente el crecimiento y la capacidad infectiva del hongo, así como inducir respuestas de defensa en el hongo, activando mecanismos de resistencia que disminuyan su susceptibilidad a los compuestos antimicrobianos. (Šimo, Kazimirova, Richardson y Bonnet, 2017).

Por otro lado, si el parásito está mudando, la germinación se perderá con la muda lo cual no favorece la infección (Vega et al., 2012).

El estadio larvario de la garrapata surge como un punto crítico en la interacción entre la garrapata y los hongos entomopatógenos, investigaciones han revelado que este estadio de desarrollo, debido a sus características biológicas tiene una mayor susceptibilidad a la colonización por hongos como el *M. anisopliae* (Samish, Ginsberg y Glazer, 2004). La reducida dimensión del cuerpo de las larvas de garrapata, en comparación con los estadios posteriores, conlleva una menor barrera física para la penetración y colonización por hongos entomopatógenos. Esta circunstancia se ve acentuada por la falta de un sistema inmunológico completamente desarrollado en las larvas, lo que las hace menos capaces de defenderse eficazmente contra las infecciones fúngicas (Samish et al., 2004).

Además, la limitada movilidad y la reducida capacidad de desprendimiento de las larvas prolongan su exposición a las esporas fúngicas, favoreciendo así la colonización y establecimiento del hongo en el hospedador. En consecuencia, la identificación de la susceptibilidad del estadio larvario de la garrapata a la colonización por hongos entomopatógenos como el *M. anisopliae* ofrece una perspectiva prometedora para el desarrollo de estrategias efectivas de control biológico de las poblaciones de garrapatas en entornos agrícolas y ganaderos (Samish, Ginsberg y Glazer, 2004).

3.3 Patogenicidad y virulencia

La patogenicidad se define como la capacidad de provocar una enfermedad y esta influenciada por diversos factores, incluyendo la virulencia, la concentración y la capacidad de resistir distintas condiciones ambientales. Aunque la virulencia juega un papel crucial, no es el único factor determinante del éxito en el control, ya que intervienen otros aspectos que determinarán si la micosis podrá o no desarrollarse en la garrapata (Olhagaray, 2018).

A la virulencia la determinan factores genéticos intrínsecos que controlan la codificación de diversas enzimas clave, como adhesinas, proteasas, quitinasas, lipasas, entre otras, encargadas de descomponer componentes importantes de la garrapata durante la infección. También se caracteriza por la producción de toxinas, como las destruxinas, que disminuyen las defensas del hospedero, causan daños al sistema muscular y afectan la función excretora (Olhagaray, 2018).

Se ha observado que la virulencia aumenta después de que las cepas han sido sometidas a pasajes a través de la plaga hospedera (Olhagaray, 2018). Esta mejora se evidenció en un ensayo (Frazzon et al., 2000), donde reaislaron la cepa M5 después de uno y dos pasajes en teleóginas. Al segundo día de tratamiento, la cepa re aislada después de un solo pasaje, mostró una mortalidad del 1,8%, mientras que la misma cepa re aislada luego de dos pasajes, generó una mortalidad del 84%. En contraste, múltiples pasajes en medios artificiales o en condiciones inadecuadas pueden disminuir la virulencia (Olhagaray, 2018).

3.4 Impacto en el medio ambiente

Se ha demostrado que *M. anisopliae* no causa efectos colaterales en los animales de sangre caliente ni al medio ambiente (Kaaya, Mwaigi, E y Ouna, 1996). Estudios han demostrado que sólo exhibe toxicidad en células de insectos, y no en humanas, bacterias o protozoarios (Ojeda-Chi et al., 2011). Se debe destacar que en condiciones de campo *M. anisopliae* afecta específicamente a sus huéspedes blanco, bajando así la posibilidad de afectar a otros organismos presentes en el campo (Goettel y Johnson, 1992).

4 HIPOTESIS

La exposición (inmersión) de *Rhipicephalus microplus* con conidios de *Metarhizium anisopliae* genera cambios macroscópicos y alteraciones histológicas que pueden observarse entre las 24 y 96 horas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de infección causada por *Metarhizium anisopliae* y su repercusión a nivel macroscópico e histológico en la garrapata del bovino.

5.2 Objetivos específicos

- 1- Identificar el tiempo post infección de *Metarhizium anisopliae* para observar el desarrollo macroscópico del hongo y alteraciones histológicas en la garrapata.
- 2- Poner a punto la técnica de procesamiento histológico de garrapatas.
- 3- Caracterizar las alteraciones macroscópicas a nivel de cutícula externa.
- 4- Caracterizar las alteraciones histológicas y co-localización del hongo.

6 MATERIALES Y METODOS

6.1 Lugares de trabajo

El presente trabajo se realizó durante octubre 2023 a julio 2024 en las instalaciones de la Plataforma de Salud Animal de INIA Tacuarembó, en los laboratorios de Ectoparásitos y Patología.

6.2 Diseño experimental

Etapa de campo

Fueron colectadas 50 garrapatas *Rhipicephalus microplus* partenoginas de un bovino de la raza cruce británica (Hereford) (N° CEUA= EXP_INIA.2023.22) y sin tratamiento con acaricidas.

Etapa de laboratorio

Preparación de la muestra

Se realizó un triple lavado de la muestra de garrapatas con agua destilada, utilizando un colador y luego secadas en papel absorbente. Posteriormente se seleccionaron 10 partenoginas (conforme a tamaño y aspecto morfológico: color, forma) y fueron separadas en dos grupos de cinco (5) garrapatas (control y tratamiento).

Suspensión de hongos

La suspensión de *M. anisopliae* con una concentración de 1×10^7 conidios por mililitro, fue proporcionada por el laboratorio de Bioinsumos de INIA Las Brujas (Dr. PhD Federico Rivas). Este hongo fue aislado del campo Canelones-Uruguay, mantenido en condiciones de laboratorio, con repiques en Tenebrios (*Tenebrio molitor*) y utilizado para el control de placas hortofrutícolas. Dicha suspensión fue preparada en tubos falcon de 50ml, en base acuosa (agua destilada estéril) con Tritón X-100 al 0.001%.

Inmersión de garrapatas

Previo a la inmersión de garrapatas del grupo tratamiento (n=5), la suspensión fue homogenizada por 2 minutos en vortex. Una vez sumergidas las garrapatas, permanecieron en la suspensión durante 5 minutos siguiendo el protocolo indicado por Barbieri et al., (2023). Durante este proceso y cada 2 minutos se homogeneizó nuevamente en el vortex. El grupo control (n=5) se lo sumergió en una solución acuosa (agua destilada estéril) con Tritón X-100 al 0.001% por 5 minutos.

Pasado el tiempo de inmersión, se retiró el sobrenadante, dejando las garrapatas en el fondo de cada tubo, éstas se extrajeron y fueron colocándolas en papel absorbente durante 5 minutos para su secado. Paso siguiente, cada garrapata fue colocada individualmente en placas de Petri (60 mm de diámetro). De esta manera se contaba con 5 placas de Petri del grupo control y 5 del grupo tratamiento (Figura 11). Fueron colocados en cada placa un trozo de algodón húmedo e incubadas (incubadora Binder® modelo KBWF 240, Alemania) en condiciones de 27° C y humedad relativa > 80 %. La duración de incubación de las muestras fue de: 24, 48, 72, 96 y 240 horas, por cada hora de incubado se fueron retirando una placa tratamiento y un control (Figura 9 y 10).

Luego de cada extracción, se realizó observación macroscópica utilizando Estereoscopio (Zeiss®, modelo Stemi 508, Alemania), donde se tomaron fotos contemplando posición dorsal como ventral, registrando cambios macroscópicos

Paso siguiente cada garrapata se las colocó en formol al 10% en tubo eppendorf para su proceso histopatológico.

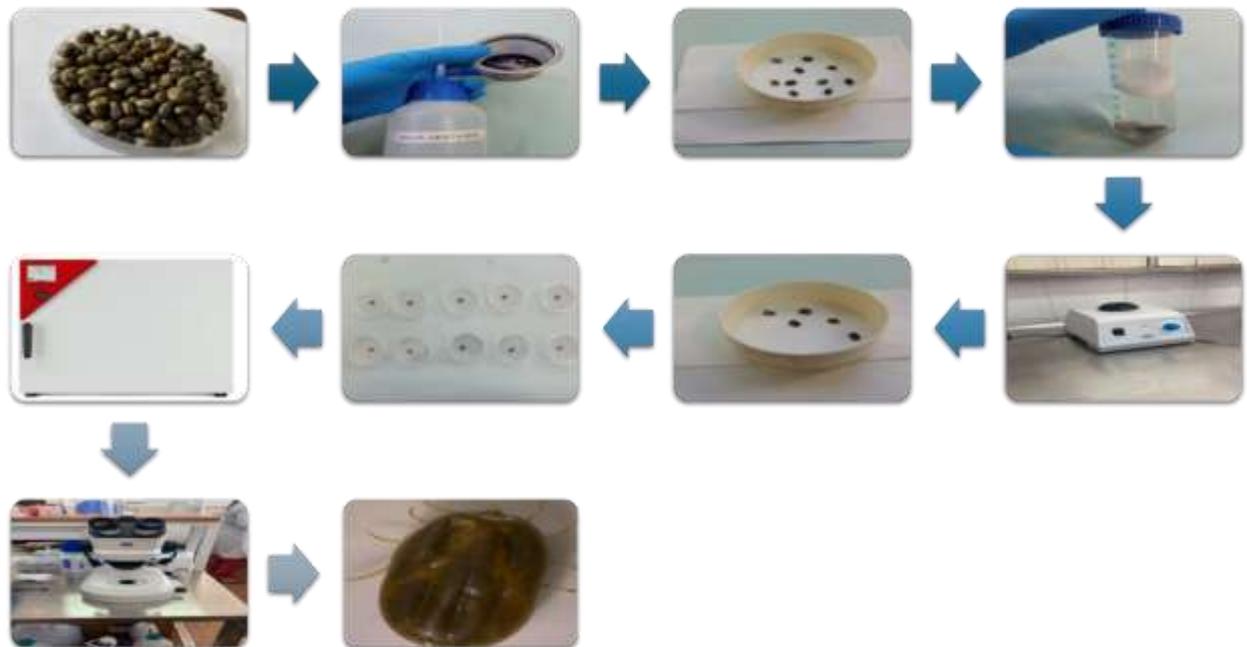


Figura 10. Esquematación del proceso realizado en el laboratorio de parasitología.

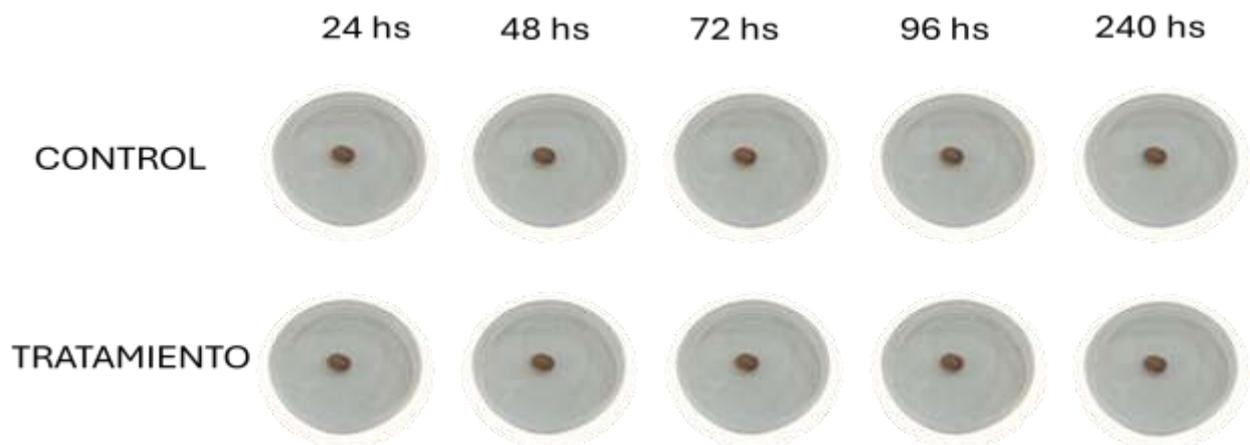


Figura 11. Esquematación de las distintas muestras, control y tratamiento, con el tiempo en que cada una estuvo en incubación.

Procesamiento histológico

Para el procesamiento histológico fueron utilizadas 5 garrapatas de los distintos tratamientos mencionados anteriormente. Inicialmente las garrapatas fueron fijadas en formol al 10% (6 horas) y transferidas a líquido de Bouin. Luego se procedió a secar en papel toalla y se colocaron en el procesador automático de fijación (Histo-Tek®, modelo VP1, Holanda). Para este proceso fue utilizado el programa de procesamiento automático descrito en la Tabla 1. Una vez logrado este proceso se pasó al inclusor de parafina (Tissue-Tek®, modelo TEC 5, Holanda) y las garrapatas fueron orientadas en posición dorsal sobre los moldes de acero inoxidable. Los bloques de parafina obtenidos fueron cortados a 4 micras (Accu-Cut® modelo SRM™ 200, USA) y posteriormente se realizó la coloración de hematoxilina y eosina (Tissue-Tek Prisma®, modelo Plus, USA). Finalmente se obtuvieron preparados histológicos que fueron examinados utilizándose microscopio óptico (Zeiss®, modelo Primostar 3, Alemania) para la descripción de alteraciones histológicas (Figura 12).

Etapa	Solución	Tiempo	Temp. (°C)
1	Formalina	3:00	40
2	Alcohol 95	0:20	40
3	Alcohol 95	0:20	40
4	Alcohol 95	0:20	40
5	Alcohol 95	0:20	40
6	Alcohol 95	0:20	40
7	Alcohol 100	0:30	40
8	Xileno	0:10	40
9	Xileno	0:20	40
10	Xileno	0:20	40
11	Parafina	0:10	60
12	Parafina	0:20	60
13	Parafina	0:20	60
14	Parafina	0:20	60

Tabla 1. Protocolo establecido del procesador de infiltración para garrapatas.

TIEMPO DE INCUBACION	GRUPO	VISTA DORSAL	VISTA VENTRAL
24 HORAS	CONTROL		
	TRATAMIENTO		
48 HORAS	CONTROL		

	TRATAMIENTO		
	CONTROL		
72 HORAS	TRATAMIENTO		

96 HORAS	CONTROL		
	TRATAMIENTO		
240 HORAS	CONTROL		

Tabla 2. Vista dorsal y ventral de cada garrapata, correspondiente al grupo que pertenecían y el periodo de incubación que llevaron.

7.2 Alternaciones histológicas

7.2.1 Grupo control

No se evidenció ningún cambio histológico en aquellas muestras que formaban parte del grupo control. A través de éstas se pudo identificar diferentes estructuras anatómicas.

En la imagen 1 se observan las diferentes capas del tegumento de la garrapata: la cutícula con sus diferentes capas (epicutícula, exocutícula y endocutícula); las células epidermales y la membrana basal.

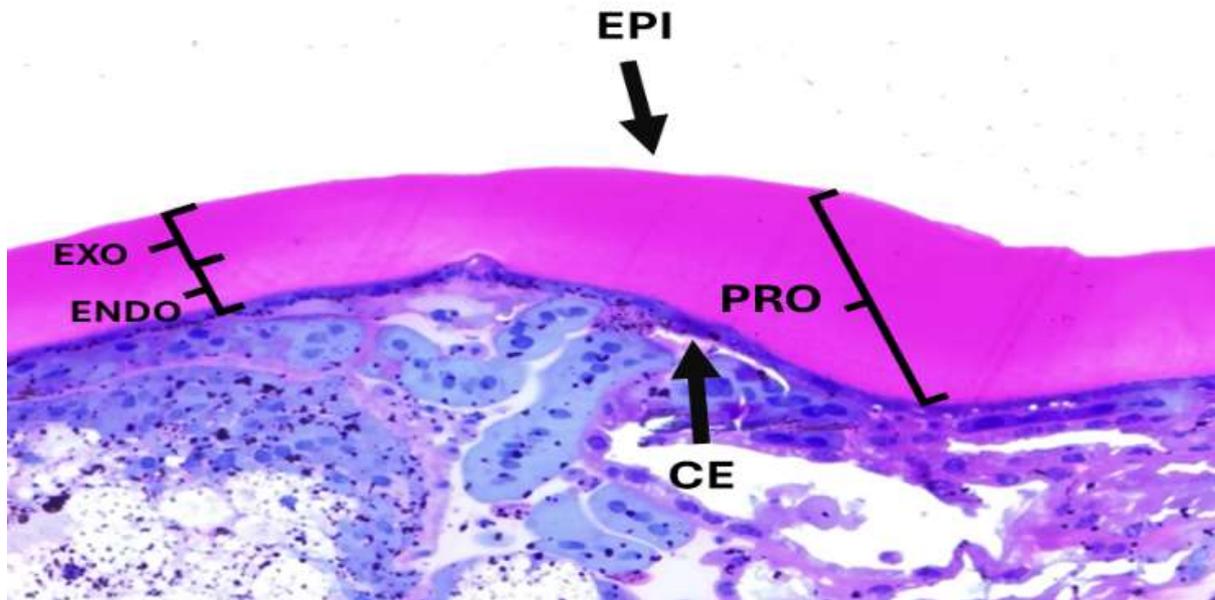


Imagen 1. Sección histológica (H-E) del tegumento de la garrapata visualizada a través del microscopio óptico (40x), señalando sus diferentes capas: (EPI) Epicutícula; (PRO) Procutícula, compuesta por (EXO) exocutícula y (ENDO) endocutícula; y (CE) Células epiteliales.

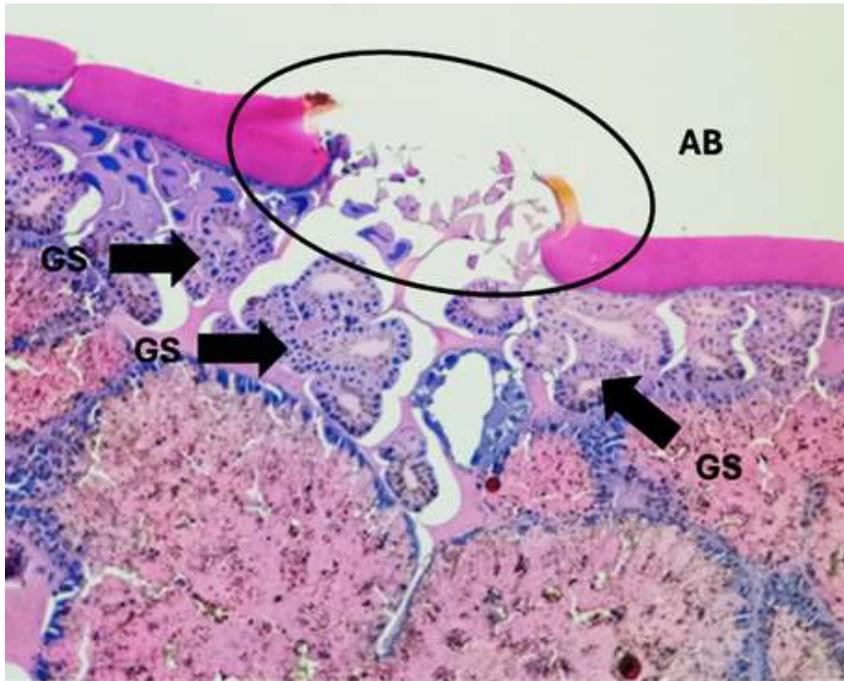


Imagen 2. Sección histológica (H-E) del aparato bucal (AB) y glándulas salivales (GS) vistas al microscopio óptico (40x).

En la imagen 2, se visualiza donde se encuentra el capítulo de la garrapata (aparato bucal), con ausencia de alguna de sus estructuras, debido al proceso de corte, y las glándulas salivales próximas a este.

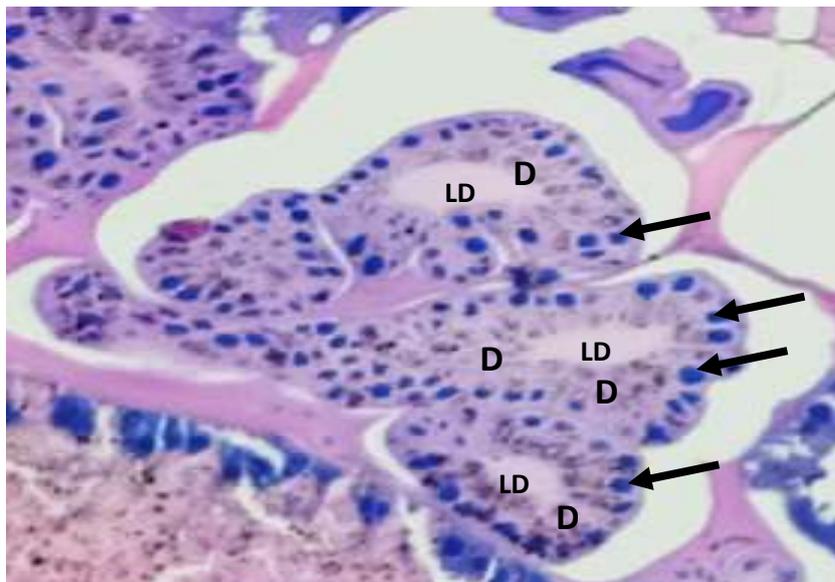


Imagen 3. Sección histológica (H-E) de glándula salival de R. microplus. (D) Ducto; (LD) Lumen del ducto; (FLECHAS) Núcleo de células acinares, visualizadas al microscopio óptico (40x).

Las glándulas salivales están compuestas por acinos multicelulares que son responsables de la producción de saliva, los cuales se evidencian claramente en la imagen 3, junto a el sistema de conductos, encargados de transportar y liberar dicha secreción a la cavidad bucal de la garrapata.

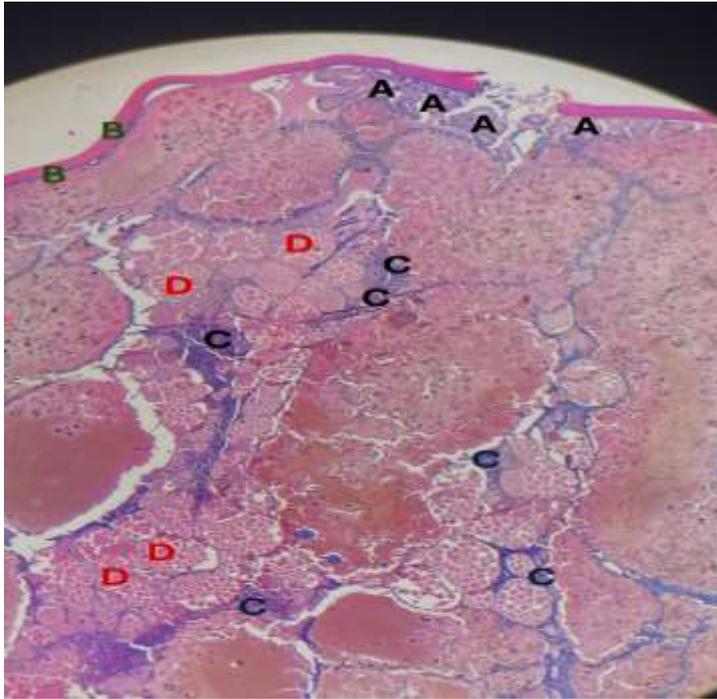


Imagen 4. Sección histológica (H-E) de teleógina vista al microscopio óptico (40x). Se visualizan diferentes estructuras anatómicas: (A) Glándulas salivales; (B) cutícula; (C) Células digestivas; (D) ovocitos.

En la imagen 4, podemos visualizar estructuras antes mencionadas como la cutícula y glándulas salivales, así como células digestivas correspondientes al intestino medio (C), órgano más largo del cuerpo de la garrapata y responsable de todo el proceso digestivo y la absorción de nutrientes, siendo así el principal órgano del sistema digestivo. Lo cubre internamente por un epitelio simple o pseudoestratificado sostenido por una membrana basal, que está subyacente a una capa externa de fibras musculares.

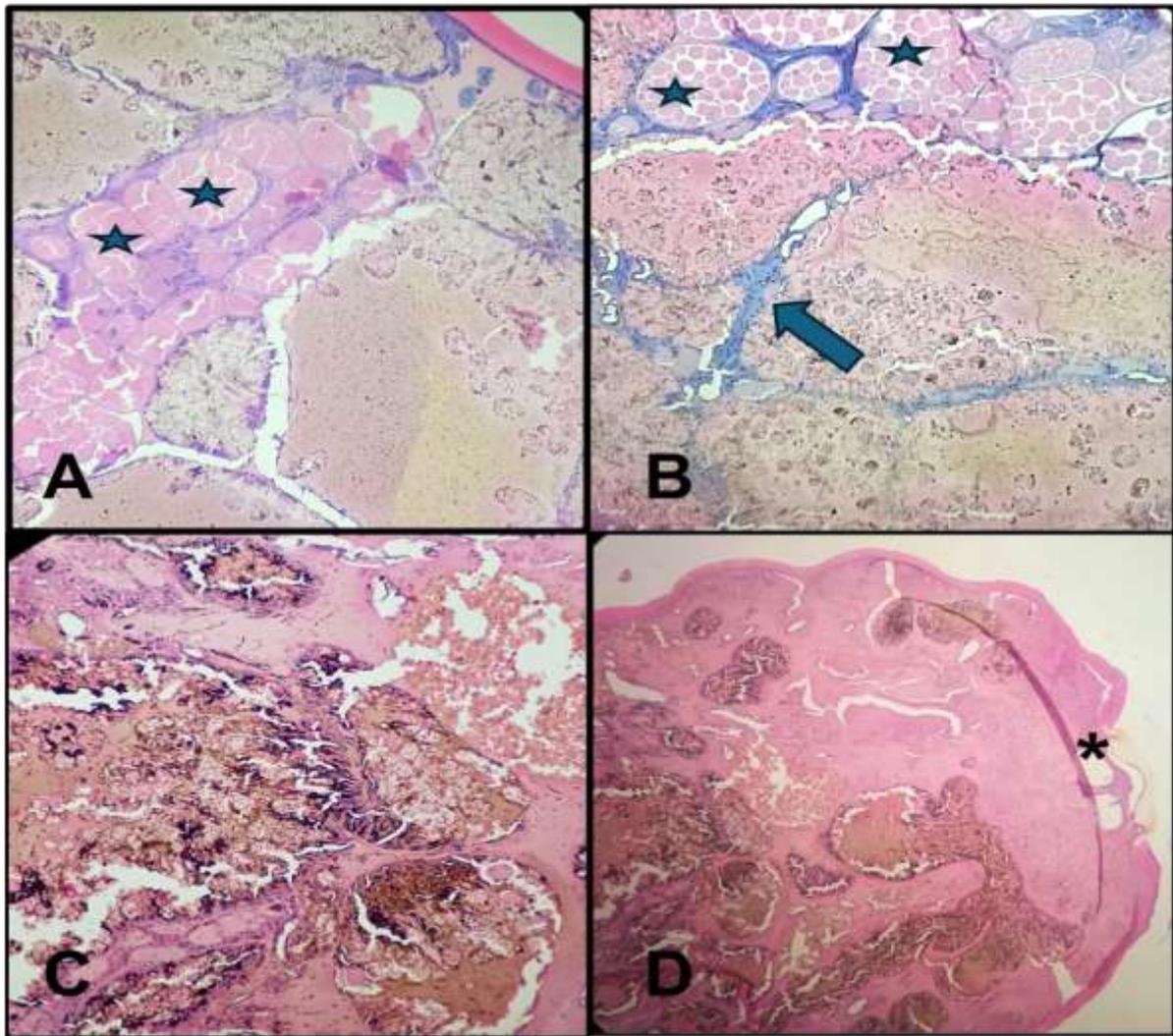


Imagen 5. Diferentes tomas (H-E) de R. microplus al microscopio óptico (40x), tomado en distintas posiciones. (A) posición central; (B) posición latero-frontal; (C) posición frontal; (D) posición caudal.

En la imagen 5, podemos reconocer los ovocitos (estrellas), células digestivas (flecha) y la base del capítulo (*) de la garrapata.

7.2.2 Grupo tratamiento

Como se lo menciono anteriormente, en nuestro ensayo solo se observaron cambios microscópicos en la muestra tratamiento retirada luego de 96 horas en incubación. Visualizándose en esta una lesión difusa, alcanzando incluso la cutícula de la garrapata (imagen 6).

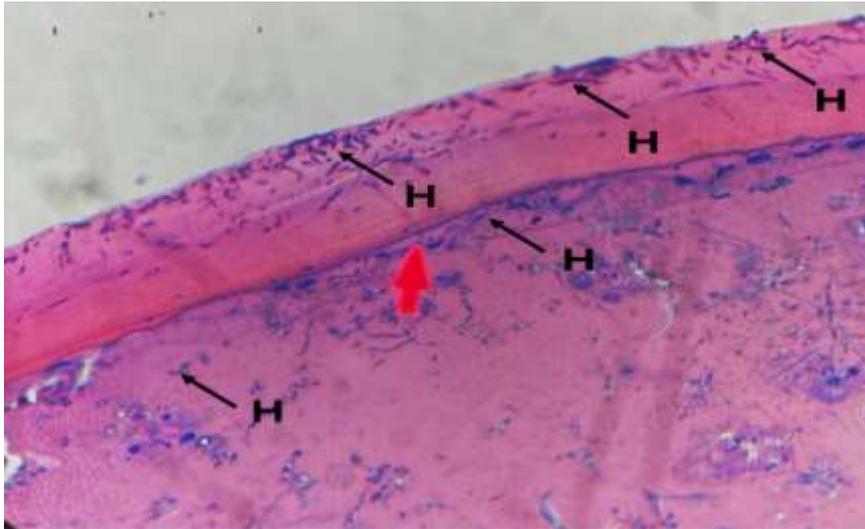


Imagen 6. Sección histológica (H-E), visualizada al microscopio óptico (40x) de la cutícula R. microplus. (H) hifas.

Se puede ver notoriamente la colonización de las hifas (H), las cuales colonizan las diferentes capas de la cutícula de la garrapata.

En la siguiente imagen (7), obtenida de la misma muestra, pero de una zona central de la garrapata podemos notar un grado de degeneración y necrosis difusa severa, lo cual imposibilita la identificación de estructuras anatómicas. Esto marca el daño que los hongos causan a nivel de los tejidos del parásito tanto en la colonización como en la posterior emergencia de las hifas.

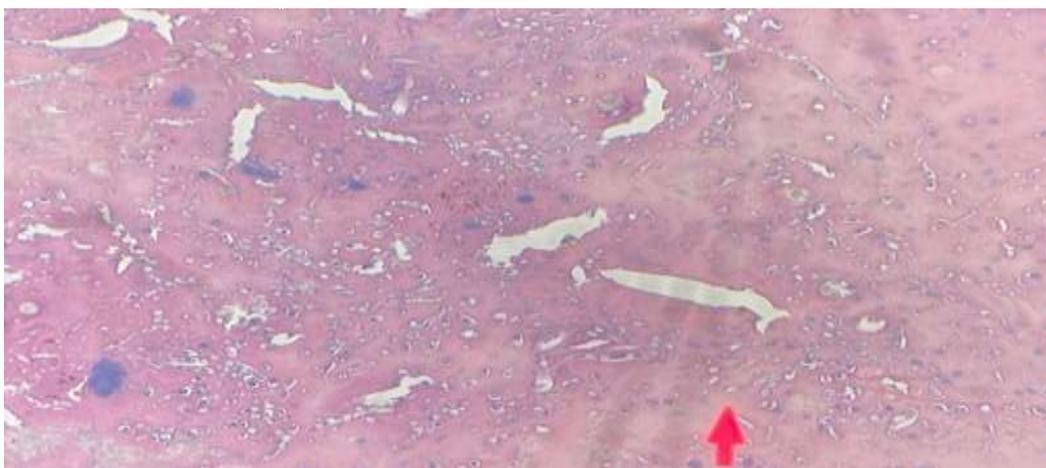


Imagen 7. Visualización al microscopio óptico (40x) de sección central (H-E) de R. microplus retirada a las 96hs de incubación.

8 DISCUSION

El control biológico utilizando *Metarhizium anisopliae* se muestra como una estrategia prometedora para enfrentar la infestación por garrapatas, especialmente la especie *Rhipicephalus microplus*, que constituye una preocupación significativa en la industria ganadera de Uruguay. Esta infestación no solo conlleva la transmisión de enfermedades y la reducción de la productividad, sino también pérdidas económicas considerables para los productores. Los resultados de este estudio respaldan esta promesa, demostrando el daño ocasionado en garrapatas tratadas con *M. anisopliae*.

Los cambios macroscópicos fueron sutiles en las muestras analizadas. No se observó una proliferación macroscópica del hongo hasta transcurridas 96 horas, momento en el cual se pudo visualizar la presencia de pequeñas colonias verdes azuladas, junto con alteraciones en la coloración de la cutícula del parásito. Esta presencia de colonias a las 96 horas puede estar dada por la liberación de micelio, la cual se da en la fase final de la infección, donde comienza la liberación del hongo. Coincidiendo en el tiempo con el trabajo de Schrank y Vainstein (2010), donde afirman que dicho proceso se da entre los 4 y 7 días post invasión y con Walkiria et al., (2005), donde describe que el proceso de colonización y emergencia se da entre 72 y 96 horas posteriores a la infección.

Es importante destacar que estas lesiones no fueron observadas en la muestra retirada a las 240 horas del inicio del experimento. Esto puede estar asociado a que las garrapatas hayan desarrollado mecanismos de defensa o adaptación que limitaron la proliferación del hongo o mitigaron sus efectos visibles (Wikel et al., 2013). También es importante considerar el ciclo vital del hongo *M. anisopliae*, el cual podría haber alcanzado una etapa en la que su capacidad para colonizar o causar daño macroscópico disminuyó después de las 96 horas (Broglia-Michelletti et al., 2012). Estos aspectos sugieren la necesidad de un seguimiento más detallado y la consideración de múltiples variables para comprender completamente los resultados observados en cuanto a la dinámica temporal de la invasión fúngica y sus efectos en las garrapatas.

A nivel microscópico, es importante destacar que ninguna garrapata del grupo control presentó cambios histológicos, lo que respalda la asociación entre la exposición a *M. anisopliae* y los cambios observados en las garrapatas tratadas. En cuanto al momento en que se observaron estos cambios en nuestro estudio, solo se detectaron cambios microscópicos a las 96 horas de exposición al hongo, lo que nos sugiere un proceso gradual en la invasión fúngica y el desarrollo de lesiones en las garrapatas.

Las alteraciones histológicas identificados a las 96 horas revelaron una serie de lesiones y procesos patológicos en las capas del tegumento de las garrapatas tratadas con *M. anisopliae*. Entre estas alteraciones se observaron signos de necrosis y degeneración, indicativos de un daño interno provocado por la invasión y la actividad del hongo. Es importante destacar que esta destrucción tisular se manifestó de manera generalizada y difusa en las estructuras internas de las garrapatas, tal como

lo describía (Kamp y Bittencourt, 2008), donde explica que esto es a consecuencia de las micotoxinas producidas por el hongo.

Dentro de las enzimas involucradas en estos procesos están las lipasas, las cuales tienen un rol fundamental en etapas tempranas de la infección al degradar la capa lipídica (primera barrera de defensa) que cubre a la cutícula. Las adhesinas por otro lado cumplen un papel fundamental en la adhesión al huésped. Sumado a esto, las proteasas y quitinasas degradan los componentes proteicos y de quitina, permitiendo así la penetración de las hifas (Schrank y Vainstein, 2010) y provocando la lesión difusa mencionada previamente. Estos procesos los pudimos visualizar en las láminas histológicas de nuestro trabajo.

Es importante destacar también que la invasión fúngica no fue inmediata; la proliferación macroscópica del hongo se detectó después de 96 horas de exposición. Esta dinámica temporal señala la necesidad de ajustar el intervalo entre tratamientos a nivel de campo con relación a los convencionales (cada 21 días), acorde al tiempo de proliferación del hongo y al ciclo biológico de la garrapata para garantizar una eficacia óptima del control biológico. Tomando como referencia un proceso infeccioso de 96 horas, sería prudente pensar que, para las evaluaciones de eficacia de este hongo a campo, las aplicaciones del tratamiento a campo se podrían pensar estrategias de tratamientos cada 15 días con el fin de cortar el ciclo del parásito (Rodríguez et al, 2022). Debido a que los hongos necesitan un tiempo para invadir y provocar la muerte de este ectoparásito.

Por otro lado, durante el procesamiento de las muestras en el laboratorio de histopatología, nos enfrentamos a desafíos relacionados con la manipulación de las garrapatas debido a su reducido tamaño. Esta dificultad resultó en una mala adhesión a la parafina y, en algunos casos, en el desprendimiento del molde durante el proceso de inclusión. Para abordar este problema, se propone seguir protocolos establecidos como los publicados por Yang et al. (2023), donde sugieren sumergir las muestras en histogel antes de la inclusión en parafina. Esta técnica puede mejorar la adhesión de las garrapatas a la parafina, facilitando su manipulación y garantizando una buena calidad de las muestras finales para el análisis histopatológico.

Además, la limitación de contar con una sola muestra por período de incubación afectó nuestra capacidad para observar lesiones progresivas a lo largo del tiempo. Para superar esta limitación y mejorar la validez de nuestros resultados, sería recomendable aumentar el tamaño de la muestra (N) en futuros ensayos. Por ejemplo, disponer de cinco muestras para cada período de incubación permitiría una evaluación más completa de la respuesta de las garrapatas al tratamiento con *M. anisopliae*.

En resumen, nuestros resultados respaldan el potencial del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* como un agente efectivo de control biológico de garrapatas, coincidiendo así con ensayos realizados en Uruguay (Rodríguez et al., 2022), y en otras partes de Sudamérica como los que describen Fernandes y Bittencourt (2008).

Sin embargo, se identificaron áreas de mejora en cuanto al procesamiento de muestras y el diseño experimental, lo que sugiere la necesidad de futuras investigaciones para optimizar los protocolos de laboratorio y aumentar la validez de los resultados.

Estos hallazgos contribuyen al avance en la manipulación y análisis de garrapatas tanto a nivel macroscópico como microscópico para futuros ensayos. Además, aporta al conocimiento en el campo del control biológico de garrapatas, en la búsqueda de tratamientos alternativos que sean sustentables y favorezcan tanto la salud animal como humana, alineándose con la protección del medio ambiente.

9 CONCLUSIONES

En base al trabajo realizado podemos considerar que a concentraciones de 1×10^7 conidios por mililitro de *M. anisopliae* durante un tiempo determinado y en condiciones óptimas para el desarrollo del hongo se evidenció una proliferación macroscópica a las 96 horas.

Con respecto a las alteraciones histológicas, se evidenció un daño significativo en la misma muestra a las 96hs de incubado. El daño que se observó es de tipo difuso, no localizado, con una necrosis evidente, comprometiendo diferentes estructuras anatómicas, las cuales no se pudieron identificar en análisis de muestras tratadas.

Este trabajo aporta a un mayor conocimiento en el área de la parasitología, en búsqueda de aquellas alternativas más eficientes y amigables con el medio ambiente, salud animal y humana. A su vez aporta más experiencias en ensayos con garrapatas tanto a nivel macro, así como en histopatología, facilitando la manipulación de muestras en futuros ensayos.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ávila D. (1998). *Análisis Cuantitativo de los Costos a Nivel del País y del Productor por la Presencia de la Garrapata en el Uruguay*. Montevideo: IAEA-DILAVE-MGAP.
- Bates P. (2012). *External parasites of small ruminants. A practical guide to their prevention and control*. Londres: CABI.
- Bittencourt, V., Mascarenhas, A., y Horacio, J. (1999). Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Ciência Rural*, 29, 351-354. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3>
- Broglio-Micheletti S., de Souza L. A., Valante E., de Araujo M., da Silva N., y Gomez-Torres M. L. (2012). Evaluation of entomopathogenic fungi as biological control agents *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *IDESIA*, 30(1). 93-99.
- Camargo, M. G., Nogueira, M. R., Marciano, A. F., Perinotto, W. M., Coutinho Rodrigues, C. J., Scott, F. B., y Bittencourt, V. R. (2016). *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 223, 38-42. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.04.014>
- Campos Pereira, M., y Labruna, M. (2008). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus biología, controle e resistência*. Medvet.
- Cardozo, H., Nari, A., Franchi, M., López, A., & Donatti, N. (1984). Estudio sobre la ecología del *Boophilus microplus* en tres áreas enzoóticas del Uruguay. *Veterinaria*, 20(86-87), 4–10.
- Cuore, U., y Solari, M. A. (2019). *Control sustentable de parásitos en condiciones de silvo pastoreo con énfasis en garrapata Rhipicephalus (Boophilus) microplus y hemoparásitos*. Serie FPTA-INIA 80.
- Cuore U., y Solari, M. A. (2022). *Manual práctico para el control de la garrapata común del ganado y enfermedades asociadas*. CEV.
- de la Fuente, J. (2018). Controlling ticks and tick-borne diseases...looking forward. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(5), 1354-1357. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.04.001>

- Errico, F., Nari, A., Cuore, U., Mendoza, R., Suarez, H., Mesa, P., Saporiti, D. (2009). Una nueva ley de lucha contra la garrapata *Boophilus microplus* en el Uruguay. *Revista Plan Agropecuario*, 131, 42-47.
- Estrada-Peña, A.; Venzal, J.M.; Nava, S.; Mangold, A.; Guglielmone, A.A.; Labruna, M.B.; de la Fuente, J. 2012. Reinstatement of *Rhipicephalus (Boophilus) australis* With Redescription of the Adult and Larval Stages. *Journal Medical Entomology*, 49(4): 794-802. <http://dx.doi.org/10.1603/ME11223>
- Fang, W., Pei, Y., y Bidochka, M. J. (2007). A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology*, 153, 1017-1025. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/002105-0>
- Fernandes, É. K. K., y Bittencourt, V. R. E. P. (2008). Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental & Applied Acarology*, 46(1-4), 71-93. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9161-y>
- Fiel, C., y Nari, A. (2013). *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes.: fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control*. Hemisferio Sur.
- Fonseca, L., y Alcides, M., (2015). *Expresión de la proteína recombinante Bm86uy-r y evaluación de su respuesta inmune humoral en bovinos inmunizados*. (Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, UDELAR. Colibri. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10276/1/FV-31592.pdf>
- Fraser, C. M., Bergeron, J. A., Mays A., y Aiello, S. E. (1993). Infestación por garrapatas. *Manual Merck de Veterinaria* (pp. 958-976). Edra.
- Frazzon, A. P. G., Junior, I. D. S. V., Masuda, A., Schrank, A., y Vainstein, M. H. (2000). In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 94(1-2), 117-125. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00368-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00368-x)
- García, N., Tlecuítl, S., Favela, E., y Loera, O. (2015). Production and quality of conidia by *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*: critical oxygen level and period of mycelium competence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 2783-2791. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6225-2>
- Goettel, M. S., y Johnson, D. L. (1992). Environmental impact and safety of fungal biocontrol agents. Biological control of Locusts and Grasshoppers. *International Biological control of locusts and grasshoppers: proceedings of a workshop held*

- at the International Institute of Tropical Agriculture, (pp. 356-361).
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.667>
- Hajek, A. E., y St, Leger, R. J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, 39(1), 293-322.
<https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.001453>
- Kaaya, G. P., Mwaigi, E., y Ouna, E. (1996). Prospect for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculitatus* and *Amblyomma variagatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67, 15-20.
<https://doi.org/10.1006/jipa.1996.0003>
- López Valencia, G. y Betancourt Echeverri, J. A. (2024). *Garrapatas de los animales domésticos en América: Su importancia médica y veterinaria*. Universidad Industrial de Santander.
- Melo, S. M. P., Santos, I. R., Almeida, B. A., Sonne, L., Panziera, W., Driemeier, D., y Pavarini, S. P. (2024). Characterization of cutaneous lesions caused by natural tick infestation in cattle. *Veterinary Pathology*, 61(4), 582-589.
<https://doi.org/10.1177/03009858231217207>
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (s.f.). *Garrapata*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/legislacion-sanitaria-animal/22-enfermedades-parasitarias/224-garrapata>
- Miraballes, C., Riet Correa, F., Fuellis, C., Araoz, V (2018). Control de la Garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y la tristeza parasitaria. *Revista INIA*, 52, 13-17.
- Miraballes, C., Riet-Correa, F., Saporitia, T., Lara, S., Parodi, P., y Sanchez, J. (2019). Probability of *Rhipicephalus microplus* introduction into farms by cattle movement using a Bayesian Belief Network. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(4), 883-893
- Murell, A., y Barker, S. C. (2003). Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56(3) 169-172. <https://doi.org/10.1023/B:SYPA.0000003802.36517.a0>
- Nava, S., Venzal, J. M., Acuna, D. G. L., Martins, T. F., y Guglielmone, A. A. (2017). *Ticks of the southern cone of America: Diagnosis, distribution, and hosts with taxonomy, ecology and sanitary importance*. Elsevier.

- Núñez, J. L., Cobeñas, M. E. M., y Moltedo, H. L. (1982). *Boophilus microplus: la garrapata común del ganado vacuno*. Hemisferio Sur.
- Ojeda Chia, M. M., Rodríguez Vivas, R. I., Galindo Velasco, E., Lezama Gutierrez, R., y Cruz Vázquez, C. (2011). Control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) using the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*. *Revista Mexicana Ciencias Pecuarias*, 2(2) 177-192.
- Olhagaray Torres, M. (2018). *Actualización en el uso del hongo entomopatógeno Metarhizium anisopliae para el control de Rhipicephalus microplus* (Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, UDELAR). Montevideo. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/25164/1/FV-33604.pdf>
- Parodi, P., Armúa-Fernández, M.T., Corbellini, L.G., Rivero, R., Miraballes, C., Riet-Correa, F., y Venzal, J.M. (2022). Description of bovine babesiosis and anaplasmosis outbreaks in northern Uruguay between 2016 and 2018. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports*, 29, 100700. <https://10.1016/j.vprsr.2022.100700>
- Ponce, G., Cantú, P. C., Flores, A., Badii, M., Zapata, R., López, B., & Fernández, I. (2006). MODO DE ACCIÓN DE LOS INSECTICIDAS. *RESPYN Revista Salud Pública Y Nutrición*, 7(4).
- Samish, M., Ginsberg, H., & Glazer, I. (2004). Biological control of ticks. *Parasitology*, 129, S389–S403. <https://doi.org/10.1017/s0031182004005219>
- Schrank, A., y Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7), 1267-1274. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>
- Shah, P. A., y Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5), 413-423. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1240-8>
- Šimo, L., Kazimirova, M., Richardson, J., & Bonnet, S. I. (2017). The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 281. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00281>
- Rangel, D. E., Braga, G. U., Anderson, A. J., y Roberts, D. W. (2005). Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different

geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88(2), 116-125.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.11.007>

Redondo M, Fragoso H, Ortíz M, Montero C, Lona J, Medellín JA, Fría R, Hernández V, Franco R, Machado H, Rodríguez M, de la Fuente J (1999). Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac™ and amidine treatments. *Experimental & Applied Acarology*, 23, 841-849. doi: 10.1023/a:1015925616490

Rodríguez, A., Chia, E., y Rossi (2022). Control biológico. Aprendizajes para la transición agroecológica en Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 26(NE3), Article 967. <https://doi.org/10.31285/AGRO.26.967>

Rodríguez Vivas, R.I., Arieta Román, R.J., Pérez Cogollo, L.C., Rosado Aguilar, J.A., Ramírez Cruz, G.T., y Basto Estrella, G. (2010). Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(3), 115-123.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2010000300002>

Rodríguez Vivas, R.I., Bolio González, M., Rosado Aguilar, J., Guitérrez Ruíz, E., Torres Acosta, F., Ortega, A., Gutierrez Blanco, E., y Aguilar Caballero, A., (2020). Uso de isoxazolinas: alternativa para control de pulgas, ácaros y garrapatas en perros y gatos. *Bioagrocencias*, 12(2).
<http://dx.doi.org/10.56369/BAC.3086>

Solari, M. A., Dutra, F., y Quintana, S. (2013). Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (*Babesia* sp y *Anaplasma* sp) en el Uruguay. En C. Field y A. Nari (Coord.), *Enfermedades Parasitarias de Importancia Clínica y Productiva en Rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control* (pp. 657-688): Editorial Hemisferio Sur.

Uruguay. (2008, abril 25). Ley n° 18268: Declaración de interés nacional la lucha contra la garrapata común de bovino.
<https://www.impo.com.uy/bases/leyes/18268-2008>

Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa Ard, J. J., y Blackwell, M. (2012). Fungal entomopathogens. *Insect Pathology*, 2, 171-220. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3>

Venzal, José M, & Nava, Santiago. (2011). El género *Rickettsia* como agente de zoonosis en el Cono Sur de Sudamérica. *Revista Médica del Uruguay*, 27(2), 98-106.

- Walquiria, A., Lubeck, I., Schran, A., y Henning Vainstein, M. (2005). Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental & Applied Acarology*, 37, 231-244. <https://doi.org/10.1007/s10493-005-3818-6>
- Wang, S., Leger, C., y Wang, R. J. (2006). A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6647-6652. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601951103>
- Wharton, R.H. (1974). Ticks with Special Emphasis on *Boophilus microplus*. En Pal, R., Wharton, R.H. (ed.), *Control of Arthropods of Medical and Veterinary Importance*. Springer.
- Wilkinson, P. R. (1953). Observations on the sensory physiology and behaviour of larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Can) (Ixodidae). *Australian Journal of Zoology*, 1(3), 345-356. <https://doi.org/10.1071/ZO9530345>
- Wikel, S. (2013). Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Frontiers in Microbiology*, 4, 337. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00337>
- Yang, T. S., LaDouceur, E. E., Baumgartner, W. A., Marr, H. S., Karounos, M., Robertson, J., ... Birkenheuer, A. J. (2023). A practical protocol to prepare paraffin-embedded whole tick histology sections. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 14(4), 102162. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102162>