

DESENVOLVIMENTO DE *BABESIA CANIS* (PIANA & GALLI-VALERIO, 1895) NO INTESTINO E HEMOLINFA DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE).

L.H. O'DWYER¹; C.L. MASSARD¹ & E. DAEMON¹

(¹)Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), CEP 23851-970, Seropédica, RJ.

SUMÁRIO: Com o objetivo de verificar o desenvolvimento de *Babesia canis* no carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, foram colhidas amostras de hemolinfa e intestino de fêmeas ingurgitadas em cães positivos para *B. canis*, a partir do 1º até o 15º dia após o desprendimento. Foram observadas formas arredondadas do protozoário no intestino 24 horas após o desprendimento, bem como parasitos arredondados e em forma de clava, entre o 10º e 11º dia. Na hemolinfa, os esporocinetos foram encontrados somente a partir do 10º dia de incubação dos carrapatos.

PALAVRAS-CHAVE: *Babesia canis*, *Rhipicephalus sanguineus*, carrapato, cão.

INTRODUÇÃO

O ciclo biológico de parasitos do gênero *Babesia* Starcovici, 1893 vem sendo estudado desde o início do século quando KOCH (1906) foi o primeiro a demonstrar diversas formas de *B. bigemina* no carrapato *Boophilus annulatus*. Apesar de diferentes autores terem abordado o ciclo de *Babesia* sp. nos seus respectivos vetores (CHRISTOPHERS, 1907; DENNIS, 1932; ZAPF & SHEIN, 1994), no Brasil poucos estudos têm sido realizados sobre o assunto (BARREIRA, 1988; MAFRA *et alii*, 1992). Em relação à *B. canis* no carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, nenhuma informação foi até então relatada no nosso país. Por outro lado, cepas diferentes de uma mesma espécie de *Babesia* podem apresentar comportamento diferente em relação a determinada espécie de carrapato vetor (FRIEDHOFF, 1988), bem como ocorrem variações morfológicas entre diferentes populações de *R. sanguineus* no Brasil (RIBEIRO, 1995), o que justifica o estudo dessa espécie de protozoário nas condições brasileiras. Assim, o objetivo do presente estudo foi observar os estágios do ciclo biológico de *B. canis* no intestino e hemolinfa de fêmeas de *R. sanguineus* ingurgitadas em cães positivos para *B. canis*, em diferentes dias após o desprendimento do hospedeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos laboratórios da Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz (EPPWON), do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Foram utilizados cinco cães jovens, com idade variando de seis meses a dois anos, machos e fêmeas, positivos para *B. canis*. Cada cão foi infestado com carrapatos, segundo adaptação da técnica de NEITZ *et alii* (1971), recebendo 25 machos e 25 fêmeas de *R. sanguineus*. Todos os carrapatos estavam comprovadamente negativos para *B. canis*, tendo sido obtidos de uma colônia mantida por 10 gerações sucessivas em coelhos. Um dos cães que manteve parasitemia elevada para *B. canis*, foi reinfestado com *R. sanguineus*, recebendo desta vez, 35 machos e 35 fêmeas.

Os cães infestados foram examinados diariamente, com avaliação da temperatura retal e confecção de esfregaços sangüíneos para verificação da parasitemia. O desenvolvimento dos carrapatos também foi acompanhado diariamente, com exames individuais dos cães infestados e observação dos carrapatos fixados.

As fêmeas que se desprendiam foram acondicionadas individualmente em placas de Petri e mantidas em estufa

incubadora para B.O.D à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa superior a 80% e escotofase. A partir do 1º dia até o 15º dia após o desprendimento, amostras de hemolinfa e fragmentos de intestino foram examinados microscopicamente para verificação da infecção por *B. canis*.

Os esfregaços de hemolinfa foram preparados a partir da secção da parte distal de uma ou mais patas das fêmeas, com o auxílio de uma tesoura de ponta fina. Todas as amostras foram depositadas em lâmina de vidro para microscopia, secas ao ar, fixadas em metanol por três minutos e coradas com corante Giemsa a 10% por 40 minutos.

Para extração dos fragmentos intestinais, as fêmeas foram depositadas em decúbito ventral em placa de Petri contendo no seu interior uma camada de 1,5 cm de parafina sólida. A imobilização dos carrapatos foi feita com alfinete entomológico transfixando a região entre o escudo e a base do gnatosoma. Com a tesoura de ponta fina fez-se uma incisão ao nível do sulco marginal, contornando o idiosoma. O tegumento dorsal foi rebatido, expondo a cavidade geral, que foi banhada com solução salina fria com o intuito de aumentar a consistência dos órgãos. Os fragmentos intestinais foram retirados, lavados em solução salina para remoção de parte do conteúdo intestinal, e em seguida, depositados em lâminas de vidro onde confeccionou-se os esfregaços. Estes foram secos ao ar, fixados em metanol e corados pelo Giemsa. Todas as lâminas assim obtidas foram examinadas em microscópio óptico, utilizando objetiva de 100x e ocular de 10x, com óleo de imersão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 160 fêmeas de *R. sanguineus*, foram recuperadas somente 46 fêmeas ingurgitadas vivas. Várias fêmeas foram encontradas desprendidas, completamente ingurgitadas, porém, mortas. Alguns dos carrapatos mortos apresentavam coloração avermelhada, sugerindo extravasamento do conteúdo intestinal. Outros não demonstravam nenhuma alteração aparente. A primeira hipótese para a morte dessas fêmeas é a reação do hospedeiro vertebrado ao carrapato. A segunda e mais provável, é a ação patogênica de *B. canis* ao carrapato, fato este que já foi relatado para algumas espécies de *Babesia* (RIEK, 1964; BARREIRA, 1988), necessitando, porém, de maiores estudos em relação à *B. canis* e *R. sanguineus*. Um fato que reforça esta hipótese, foi a presença de estágios iniciais de *B. canis*, no intestino de algumas das fêmeas mortas.

Nas primeiras 24 horas após o desprendimento das fêmeas ingurgitadas, foram observadas, no intestino do carrapato, formas intraeritrocíticas de *B. canis*, tanto piriformes quanto arredondadas, semelhantes às encontradas no sangue

periférico dos cães. Segundo MELHORN *et alii* (1980), os estágios piriformes são lisados e somente os estágios ovais do parasito continuarão o seu desenvolvimento no vetor. Pequenas formas em anel com citoplasma avermelhado e núcleo marginal foram observadas no conteúdo intestinal (Fig. 1A). Essas formas são semelhantes às formas encontradas no interior dos eritrócitos dos cães e de acordo com MELHORN *et alii* (1980), representam gametócitos de *B. canis*. Foram encontrados também parasitos maiores, cujo tamanho atingiu entre 5,6-6,2 até 7,6 micrômetros (Fig. 1B), que iniciaram divisão nuclear e parasitos com dois, quatro (Fig. 1C) ou mais núcleos (Fig. 1D). ZAPF & SHEIN (1994) consideraram, em relação à *B. equi*, que todos estes estágios multinucleados são microgamontes anteriores à formação dos microgametas. Ainda neste período de 24 horas após o ingurgitamento, foram observadas formas piriformes contendo dois núcleos e medindo $6,3 \times 8,7$ micrômetros, possivelmente um zigoto em formação.

Entre o 10º e o 11º dia após o desprendimento das fêmeas ingurgitadas, ainda foram observados eritrócitos não parasitados intactos, dentro do conteúdo intestinal. Foram observados parasitos arredondados com o citoplasma azulado, contendo o núcleo na maioria das vezes em posição central podendo, porém, estar deslocado para a margem do parasito (Fig. 1E). Esses estágios encontravam-se freqüentemente em grupos e são semelhantes aos que MELHORN *et alii* (1980) e ZAPF & SHEIN (1994) descreveram como macrogametas. Os estágios raíados - considerados como microgamontes, descritos pela primeira vez por KOCH (1906) para *B. bigemina* e posteriormente observados por outros autores para diferentes espécies, incluindo *B. canis* (SHORTT, 1973; MELHORN *et alii*, 1980) - não foram observados no presente estudo. Entretanto, foram encontrados estágios semelhantes aos considerados por ZAPF & SHEIN (1994) como grupos de macrogametas fertilizados. Fusão de gametas não foi identificada; contudo, a partir do 10º dia de incubação, zigotos (oocinetos) móveis foram observados no conteúdo intestinal, sendo os estágios imaturos menores com o núcleo arredondado localizado centralmente e o citoplasma azulado e uniforme (Fig. 1F). Cínetos idênticos aos encontrados na hemolinfa dos carrapatos também foram observados no conteúdo intestinal. Provavelmente estes atravessaram a parede intestinal e atingiram a hemolinfa (SHORTT, 1973; MELHORN *et alii*, 1980). Alguns oocinetos maiores e com o citoplasma bastante vacuolizado foram encontrados, talvez representando um estágio final do parasito, iniciando um processo de degeneração.

Na hemolinfa, os primeiros esporocinetos foram observados somente a partir do 10º dia de incubação das fêmeas ingurgitadas (Fig. 1G). Este período foi bastante superior ao descrito por BARREIRA (1988) para *B. bigemina* e *B. bovis*, cujo tempo de aparecimento dos esporocinetos na hemolinfa foi de

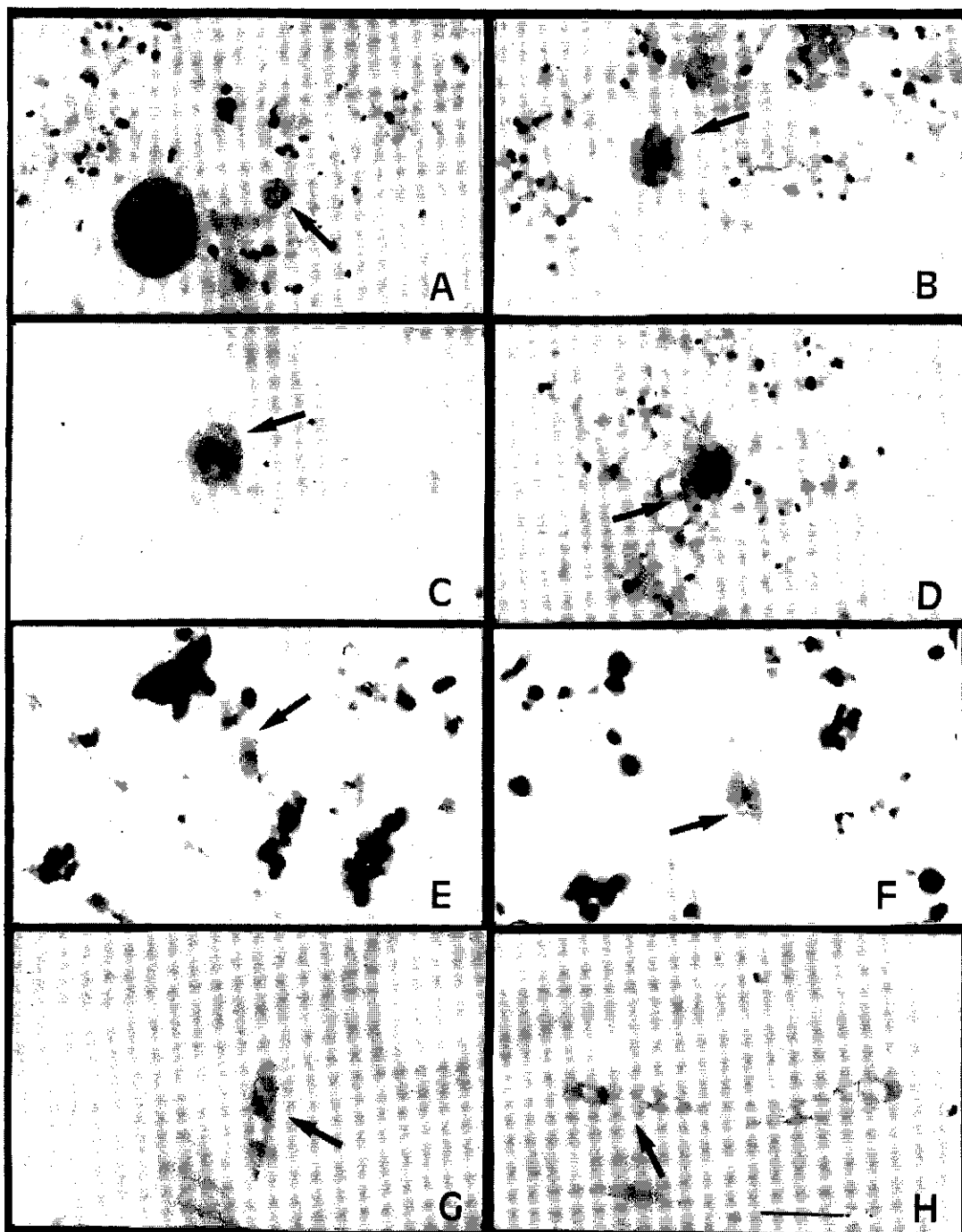


Fig. 1 - Aspectos morfológicos de *Babesia canis* no carrapato *Rhipicephalus sanguineus*: A, B, C e D. formas arredondadas no intestino, 24 hs após o desprendimento; E. formas arredondadas no intestino, entre o 10º e 11º dia após o desprendimento; F. oocineto no conteúdo intestinal a partir do 11º dia de desprendimento; G. esporocinetos imaturos na hemolinfa; H. esporocinetos maduros na hemolinfa. Giemsa (— = 10 µm).

três dias, SHORTT (1973) encontrou o tempo de incubação de seis dias para a primeira detecção de cinetos de *B. canis* na hemolinfa de *R. sanguineus*, enquanto HIGUCHI *et alii* (1991) observaram um período de dez dias para *B. gibsoni* no carrapato *Haemaphysalis leachi*. As variações de tempo observadas em relação ao aparecimento dos esporocinetos na hemolinfa, estão provavelmente relacionadas com as diferenças entre as

amostras de *B. canis* e de *R. sanguineus* utilizadas. Esta hipótese é corroborada por FRIEDHOFF (1988), que afirma haver diferenças biológicas entre cepas de *Babesia* e de seus vetores.

Os esporocinetos imaturos apresentavam-se com forma vermicular, possuindo núcleo arredondado, corado fortemente de vermelho e localizado principalmente na região mediana do parasito, podendo, entretanto, ser encontrado nas regiões

anterior e posterior. O citoplasma nestes estágios imaturos mostrou-se denso e uniforme, corando-se de azul em toda sua extensão. Alguns parasitos apresentavam uma massa de cromatina corada de vermelho na extremidade anterior do parasito ("cape"); esse, entretanto, não foi um achado constante. Com o amadurecimento dos cinetos, o citoplasma começou a apresentar vacúolos que foram aumentando em número e tamanho, assim como uma redução da massa de cromatina até o seu completo desaparecimento (Fig. 1H). Essa evolução se assemelha ao que foi descrito por RIEK (1964, 1966) e BARREIRA (1988) para *B. bigemina* e *B. bovis*.

Os cinetos na hemolinfa variaram de 1,8-3,7 micrômetros no seu diâmetro menor e 9,0-16,4 micrômetros no seu diâmetro maior, com uma média de $2,9 \pm 0,39 \times 13,6 \pm 1,87$ micrômetros. Estas mensurações são semelhantes às encontradas por SHORTT (1973) para *B. canis* e por HIGUCHI et alii (1991) para *B. gibsoni*.

Assim, ficou evidenciado que a cepa de *B. canis* estudada no presente trabalho, provavelmente foi responsável pela alta mortalidade do vetor, bem como mostrou comportamento diferente daquele citado na literatura no que tange ao tempo de migração dos cinetos para a hemolinfa de *R. sanguineus*.

SUMMARY

Haemolymph and gut of engorged female ticks *Rhipicephalus sanguineus* were collected from days 1 to 15 after the detachment to verify the development of *Babesia canis*. Round forms of the parasite were noticed 24 hours after detachment and both round forms and kinetes of the parasites were seen on the 10th and 11th days. Kinetes were observed in the hemolymph after 10 days of engorgement.

KEY WORDS: *Babesia canis*, *Rhipicephalus sanguineus*, tick, dog.

REFERÊNCIAS

- BARREIRA, J. (1988). Caracterização morfológica, aspectos biológicos e patogenia das formas evolutivas de *Babesia bovis* (Babés, 1888) e *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) (Protozoa: Babesiidae) em *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Tese Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, p. 103.
- CHRISTOPHERS, S.R. (1907). *Piroplasma canis* and its life cycle in the tick. *Scientific Memoirs of Officers of the Medical and Sanitary Departments of the Government of India*, 29:1-83.
- DENNIS, E.W. (1932). The life cycle of *Babesia bigemina* of Texas cattle fever in the tick *Margaropus annulatus*. *University of California Publications in Zoology*, 36:263-298.
- FRIEDHOFF, K.T. (1988). Transmission of *Babesia*. In: *Babesiosis of domestic animals and man*, RISTIC, M. (Ed.). Boca Raton, Florida, p. 23-52.
- HIGUCHI, S.; SIMOMURA, S.; YOSHIDA, H.; HOSHI, E.; KAWAMURA, S. & YASUDA, Y. (1991). Development of *Babesia gibsoni* in the haemolymph of the vector tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 53:491-493.
- KOCH, R. (1906). Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Piroplasmen. *Zeitschrift für Hygiene Infektionskrankheiten*, 54:1-9.
- MAIRA, C.L.; PATARROYO, J.H. & SILVA, S.S. (1994). *Babesia bovis* infectivity of an attenuated strain of Brazilian origin for the tick vector, *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 52:139-143.
- MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. & VOIGT, W.P. (1980). Light and electron microscopic study on developmental stages of *Babesia canis* within the gut of the tick *Dermacentor reticulatus*. *Journal of Parasitology*, 66:220-228.
- NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F. & WALTERS, H.S. (1971). Laboratory investigations on the life cycle on the Karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Newmann, 1904). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 38:215-224.
- RIEK, R.F. (1964). The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus*. *Australian Journal of Agriculture Research*, 15:802-821.
- RIEK, R.F. (1966). The life of *Babesia argentina* (Lignières, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Australian Journal of Agriculture Research*, 17:247-254.
- SHORTT, H.F. (1973). *Babesia canis*: The life cycle and laboratory maintenance in its arthropod and mammalian hosts. *International Journal for Parasitology*, 3:119-148.
- ZAPF, F. & SCHEIN, E. (1994). The development of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in the gut and the haemolymph of the vector ticks, *Hyalomma species*. *Parasitology Research*, 80:297-302.

(Received 1 November 1996, Accepted 30 April 1997)