

# ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DO TRATO DIGESTIVO DE *BOOPHILUS MICROPLUS* PELA AÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-RBM 86.

C. MORA HERNÁNDEZ<sup>1</sup>, C. L. MASSARD<sup>2</sup>, C. O. SOARES<sup>3</sup> & A. H. FONSECA<sup>4</sup>.

(1) Professor da Universidade Centroamericana, Manágua - Nicarágua; Doutorando em Medicina Veterinária-Parasitologia Veterinária, UFRRJ.  
(2) Professor Titular, Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ. Antiga Rodovia Rio-São Paulo, CEP: 23851-970, Seropédica, RJ; (3) Graduando em Medicina Veterinária, UFRRJ; (4) Professor Titular, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, UFRRJ.

**SUMÁRIO:** Amostras de carrapatos *Boophilus microplus*, provenientes de bovinos da raça holandesa e mestiços, imunizados com a vacina GAVAC<sup>TM</sup>, foram coletados para avaliação de alterações histológicas no trato digestivo. Selecionou-se fêmeas alimentadas sobre animais vacinados e controles, em diferentes níveis de ingurgitamento. Após serem inoculadas com formaldeído a 10% nas placas peritremáticas e abertura anal, foram fixadas com alfinete entomológico em parafina solidificada e banhadas com solução tampão fosfato, sendo posteriormente dissecadas. As alças intestinais foram removidas e separadas de outros órgãos internos. Os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina e, tricrômio de Masson. Na microscopia ótica, observou-se destruição de células digestivas, secretoras e, em casos mais severos, células basofílicas, permanecendo apenas a lâmina basal. Ocorreu ainda erosão e ruptura da parede intestinal e extravasamento do conteúdo digestivo para a cavidade celomática. Tais lesões incompatibilizam o processo de oogênese neste carrapato.

**PALAVRAS - CHAVE:** *Boophilus microplus*, vacina, histopatologia, intestino.

## INTRODUÇÃO

A produção de uma vacina eficiente contra o *Boophilus microplus* tem merecido maior atenção por parte dos pesquisadores nas últimas duas décadas. A primeira indicação de controle imunológico de carrapatos foi feita por TRAGER (1939), obtendo sucesso ao vacinar cobaios com extratos brutos de *Dermacentor variabilis*.

Estudos conduzidos por ALGER & CABRERA (1972); SCHILEIN & LEWIS (1976), demonstraram bom desempenho na reposta imune em coelhos, inoculados com extratos intestinais de *Anopheles stephensi*, e de diferentes órgãos de *Stomoxys calcitrans*, respectivamente. ALLEN & HUMPHREYS (1979) indicaram as possibilidades de produzir vacinas contra artrópodes empregando novos antígenos funcionais.

Os ixodídeos têm a habilidade de evadir a resposta imune do hospedeiro, devido a multiplicidade de efeitos provocados pela

atividade farmacológica dos componentes salivares (SAUER, 1977; BROWN & ASKENASE, 1984; INOKUMA *et alii*, 1993).

Devido a ineficiência dos antígenos salivares (ALLEN, 1979; WIKEL, 1988), pesquisas foram direcionadas a encontrar antígenos ocultos, naqueles órgãos que não estão normalmente expostos ao hospedeiro.

O isolamento da glicoproteína Bm 86, a partir da superfície de membrana de células digestivas do *B. microplus* por WILLADSEN *et alii.*, (1989) proporcionou o desenvolvimento de eficientes imunógenos. A recombinação desta glicoproteína em *Pichia pastoris* (RODRIGUEZ *et alii.*, 1994), induziu um aumento no potencial imunogênico, pois nesta expressão a secreção ocorre de forma glicosilada, originando minúsculas partículas denominadas de antígeno recombinante Bm 86 e, os carrapatos alimentados sobre os animais vacinados sofrem severos danos a nível intestinal.

O objetivo do presente trabalho, foi avaliar as alterações histológicas do trato digestivo do *B. microplus*, pela ação de anticorpos contra o antígeno recombinante Bm 86.

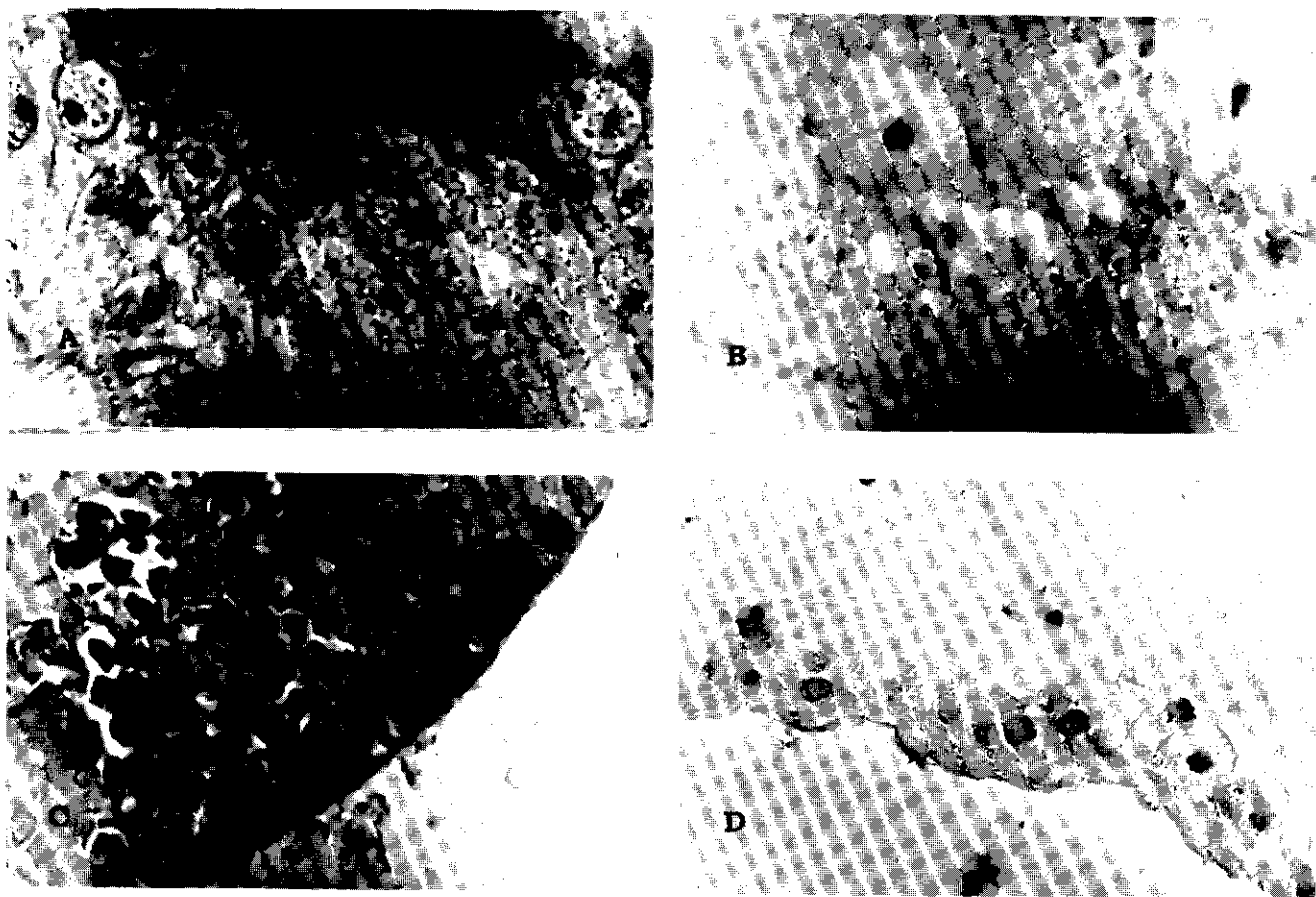


Fig. 1 - Lesões no trato digestivo de fêmeas de *Boophilus microplus* pela ação de anticorpos anti- rBm 86 "Gavac<sup>TM</sup>". A - Células digestivas apresentando alterações no citoplasma e no núcleo (400X); B - Células digestivas ausentes e células secretoras em número reduzido com citoplasma vacuolizado (400X); C - Destruição total das células secretoras e digestivas e alterações nas células basofílicas (400X); D - Ausência das células digestivas e secretoras.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas fêmeas de *B. microplus* com diferentes níveis de ingurgitamento, alimentadas sobre bovinos imunizados com a vacina "GAVAC<sup>TM</sup>"-rBm 86, e animais controles. Os carrapatos foram classificadas de acordo com aparência visual em afetadas e aparentemente normais, para aqueles provenientes de animais vacinados, a partir de 30, 40, 50, 60 e 70 dias após a vacinação. Para os provenientes de animais controles, somente se padronizou o tamanho em maior ou igual a 4 mm.

No laboratório os carrapatos foram lavados em água destilada e secos com papel filtro. Em seguida, procedeu-se à inoculação de formaldeído a 10% nas placas espiraculares e abertura anal na dose de 50-150 µl por artrópode. Para isto, utilizou-se seringas de 1 ml e agulhas n° 27.5 G. Uma vez injetadas, as fêmeas foram deixadas em repouso por 10 minutos, fixando-as a seguir com alfinetes entomológicos em placas de Petri contendo parafina solidificada e solução tampão fosfato pH 7,4.

Os cortes histológicos foram examinados em microscópio (LEITZ DIALUX 20 ES), e as fotomicrografias realizadas com câmara (WILD MPS 12) acoplada ao microscópio. O número de observações foi realizado de acordo a metodologia descrita por AGBEDE & KEMP (1985).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo dos cortes histológicos de intestino de carrapatos visivelmente afetados e aparentemente normais, encontrou-se alterações morfológicas das células intestinais em diferentes níveis de intensidade. A lesão frequentemente observadas foi a destruição de células digestivas e secretoras. Em casos mais severos, os danos atingiram as células basofílicas, permanecendo apenas a lâmina basal; ocorrendo ainda erosão e ruptura da parede intestinal e, o consequente extravasamento do conteúdo intestinal para a cavidade celomática. (Fig. 1).

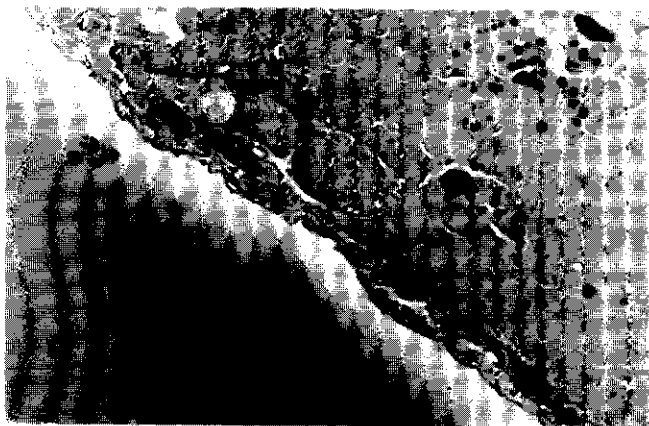
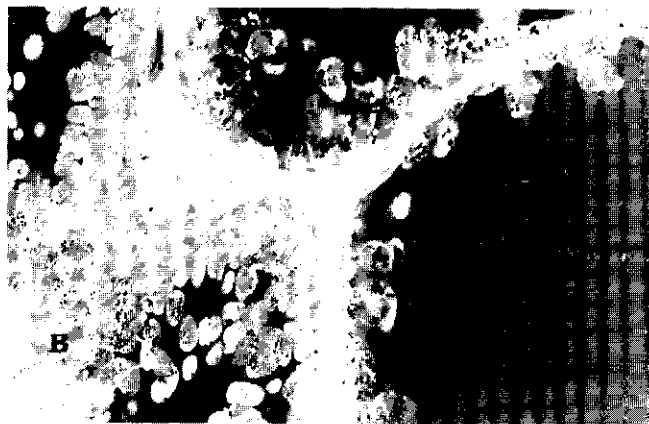
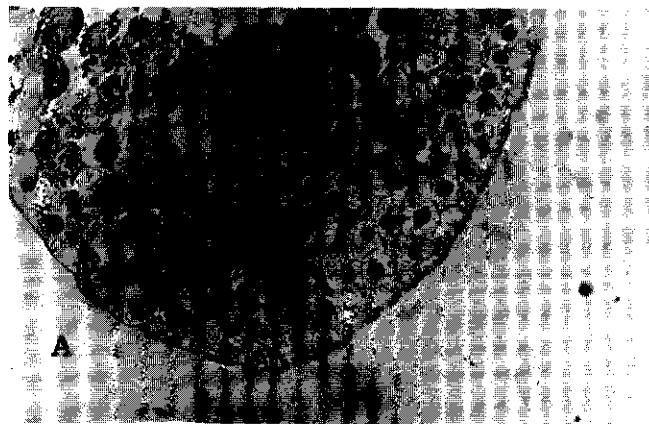


Fig. 2 - Lesões no trato digestivo de fêmeas de *Boophilus microplus*, pela ação de anticorpos anti - rBm 86 - "Gavac<sup>TM</sup>": Lesões observadas ao 50º, 60º e 70º dias, respectivamente. A - Degeneração inicial das células digestivas (160X); B - Acentuada degeneração das células digestivas, secretoras e basofílicas (250X); C - Destruição das células digestivas, secretoras, basofílicas e da lâmina basal (400X).

Em carrapatos aparentemente normais, coletados aos 30 dias de iniciada a vacinação, não foi possível detectar alterações morfológicas nas células digestivas, o que não significou que estivessem livres da ação dos anticorpos

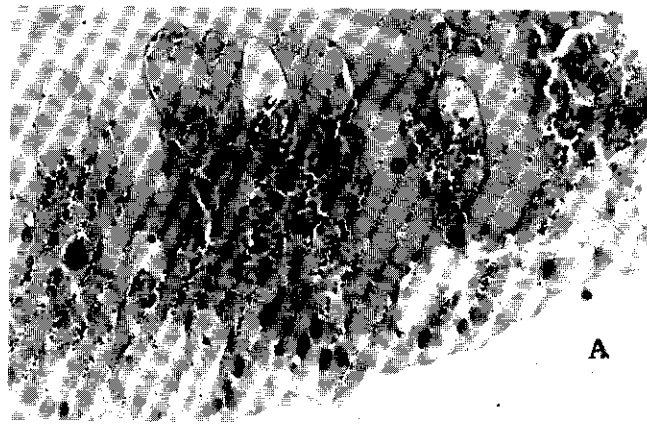


Fig. 3 - Lesões no trato digestivo de fêmeas de *Boophilus microplus*, naturalmente despreendidas, pela ação de anticorpos anti - rBm 86 - "Gavac<sup>TM</sup>". A - Vacuolização das células digestivas, secretoras e basofílicas (400X); B - Vacuolização acentuada das células digestivas, secretoras e basofílicas e degeneração das células basofílicas (400X).

específicos. Foi possível detectar alterações estruturais a partir dos 40 dias de iniciada a vacinação, observando-se lesões, principalmente, nas células digestivas. Entre o 50º e o 70º dia após a vacinação, encontrou-se severos danos nas células do trato digestivo do *B. microplus*, evidenciando-se a destruição de células digestivas, secretoras, basofílicas, bem como a ruptura da lâmina basal (Fig. 2). Em fêmeas despreendidas naturalmente, em avançado estágio de ingurgitamento, as lesões encontradas foram mais características pela vacuolização do citoplasma das células digestivas, secretoras e basofílicas (Fig. 3).

A estrutura histológica do intestino destes artrópodes, é composta por uma membrana basal coberta de fibras musculares longitudinais e circulares, formando várias camadas (BALASHIOV, 1972). Este mesmo autor descreveu três tipos celulares para o epitélio intestinal de *Hyalomma asiaticum*, os quais denominou de células de reserva, digestivas e secretoras, sugerindo que estas originam-se de uma única célula fonte. Enquanto TILL (1961); TATCHELL (1964) e CHINERY (1964), afirmaram que a parede do intestino é

constituída unicamente por células epiteliais, e que a sua estrutura e função é variável de acordo com o nível de ingurgitamento e da fase do ciclo biológico. Entretanto, AGBEDE & KEMP (1985), concordaram com o critério de BALASHOV (1972) quanto a origem dos tipos celulares, acrescentando porém que as células basais encontram-se em todos os instares. Estes autores classificaram as células intestinais do *B. microplus* em cinco tipos celulares: célula basal, digestiva, secretora (S1), secretora (S2) e célula basofílica, esta última persiste até a morte das fêmeas. Assim, no presente estudo adotou-se a classificação de AGBEDE & KEMP (1985) para a análise citológica.

O sangue dos animais vacinados ingerido pelos carrapatos, contém altos níveis de anticorpos e outros elementos como o complemento que mediam a resposta imune. Segundo AGBEDE & KEMP, (1986); KEMP *et alii*, (1986), os anticorpos específicos se fixam na membrana das células digestivas, justificando assim os danos morfológicos.

Os anticorpos junto ao complemento, provocam severos danos na ausência de leucócitos (AGBEDE & KEMP, 1986; WILLADSEN *et alii*, 1989). Entretanto, WILLADSEN & KEMP (1988), sugeriram que o complemento pode ou não ser essencial, uma vez que demonstraram que o soro de bovinos imunizados reage com a superfície das células intestinais e, que a intervenção de anticorpos com as células digestivas resulta em uma marcante inibição de suas atividades endocíticas, que precede lesões celulares detectáveis.

A aparente ausência de alterações celulares nos carrapatos coletados aos 30 dias após a vacinação, pode dever-se ao fato dos baixos níveis de anticorpos neste período. Entretanto AGBEDE & KEMP (1987), demonstraram que há um bloqueio das atividades endocíticas nas células digestivas de carrapatos coletados 12 horas após iniciada a alimentação.

AGBEDE & KEMP (1986) registraram severas alterações histológicas no intestino de carrapatos alimentados, *in vitro* e *in vivo*, três semanas após a terceira dose da vacina; quando os níveis de anticorpos circulantes encontra-se no pico máximo. Fato semelhante foi observado durante a presente pesquisa em fêmeas oriundas de bovinos naturalmente infestados, entre o 50º e 70º dia após o início da vacinação.

As alterações provocadas no trato digestivo do *B. microplus* pela ação dos anticorpos anti-rBm 86, justificam as observações macroscópicas encontradas em fêmeas mortas, ou em fêmeas parcialmente ingurgitadas aderidas na pele do hospedeiro. Estas fêmeas apresentavam aspecto “seco” e, aquelas em adiantado estágio de ingurgitamento apresentavam coloração alterada, variando entre o róseo e o azul escuro. Fenômeno também observado em estábulo e a campo por outros autores (FRAGOSO *et alii*, 1995; MASSARD *et alii*, 1995; RODRIGUEZ *et alii*, 1995). Assim tais lesões incompatibilizam o processo de oogenese neste carrapato e interrompe seu ciclo vital.

## SUMMARY

Samples of the tick *Boophilus microplus*, from Holstein and crossbred immunized cattle with the “Gavac<sup>TM</sup>” vaccine, were collected to evaluate the histological changes on their digestive tract. Engorged females, under different levels, collected from vaccinated and control animals, were chosen and inoculated with 10% formaldehyde through the spiracular plates and anus. These females were then fixed, by entomological pins, on solid paraffin and rinsed in phosphate buffered solution (PBS), for further dissection. Gut caecae were removed and separated from other internal organs. Sections were stained by hematoxylin-eosin and Masson's triple. By light microscopy, it was observed destruction of digestive and secretory cells and, in extreme cases, of the basophilic cells, remaining only the basal lamina. There was also rupture of the gut caecae with contents leakage to the haemocoel cavity. These lesions damage the oogenesis process in this tick.

KEY WORD: *Boophilus microplus*, Vaccine, Histopathology, Midgut.

## AGRADECIMENTOS

Aos técnicos José N. Bahia Filho e Wilson Cabral da Fonseca, do Laboratório de Anatomia Patológica do Projeto Sanidade Animal, Convênio EMBRAPA/UFRRJ; pelo apoio no processamento dos cortes histológicos.

## REFERÊNCIAS

- AGBEDE, R. I. S. & KEMP, D. H. (1985). Digestion in the cattle-tick *Boophilus microplus*: light microscope study of the gut cells in nymphs and females. *International Journal of Parasitology* 15 (2): 147-157.
- AGBEDE, R. I. S. & KEMP, D. H. (1986). Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: histopathology of ticks feeding on vaccinated cattle. *International Journal of Parasitology* 16(1): 35-41.
- AGBEDE, R. I. S. & KEMP, D. H. (1987). Ultrastructure of secretory cells in the gut of the cattle-Tick *Boophilus microplus*. *International Journal of Parasitology* 17(6): 1089-1098.
- ALGER, N. E. & CABRERA, E. J. (1972). An increase in death rate of *Anopheles stephensi* fed on rabbits immunized with mosquito antigen. *Journal of Economic Entomology* 65(1) 165-168.

- ALLEN, J. R. (1979). The immune response as a factor in management of acari of veterinary importance. In: *Recent Advances in Acarology*. Vol.II, RODRIGUEZ, J.G. (Ed.), Academic Press, New York, 569p.
- ALLEN, J. R. & HUMPHREYS, S. J. (1979). Immunization of guinea pigs and cattle against ticks. *Nature*, 280: 491-493.
- BAIASHOV, Y. S. (1972). Bloodsucking ticks (Ixodoidea) vector of diseases of man and animals. *Miscellaneous Publications Entomological Society America*. 8(5): 276-296.
- BROWN, S. J. & ASKENASE, P. W. (1984). Analysis of host components mediating immune resistance to ticks. In: *Acarology VI*, GRIFFITHS, D. A. & BOWMAN, C. E. (Ed.) 2: 1040-1050.
- CHINERY, W. A. (1964). The midgut epithelium of the tick *Haemaphysalis spinigera* Neumann, 1897. *Medical Entomology* 1: 206-212.
- FRAGOSO, H., ORTÍZ, M., RODRÍGUEZ, M. & DE LA FUENTE, J. (1995). Evaluation of the efficacy of the recombinant vaccine (GAVAC™) cattle artificially infested with *Boophilus microplus* (Can.). In *Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick*, DE LA FUENTE, J. (Ed.), Elfos Science, Havana, 241p.
- INOKUMA, H., KERLIN, R. L., KEMP, D. H. & WILLADSEN, P. (1993). Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. *Veterinary Parasitology* 47: 107-118.
- KEMP, D. H., AGBEDE, R. I. S., JHONSTON, L. A. Y. & COUGHLIN, J. M. (1986). Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. *International Journal of Parasitology* 16: 115-120.
- MASSARD, C. L., FONSECA, A. H., BITTENCOURT, V. R., OLIVEIRA, J. B. & SILVA, K. M. (1995). Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBm 86- "GAVAC" contra o carrapato *Boophilus microplus* no Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 17 (4) 167-173.
- RODRÍGUEZ, M., RUBIERA, R., PENICHER, M., MONTESINOS, R., CREMATA, J., FALCÓN, V. I., SÁNCHEZ, G., BRINGAS, R., CORDOVÉS, C., VALDÉS, M., LLEONART, R., HERRERA, L. & DE LA FUENTE, J. (1994). High level expression of the *B. microplus* Bm 86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *Journal of Biotechnology*, 33, 135-146.
- RODRÍGUEZ, M., MASSARD, C. L., FONSECA, A. H., RAMOS, N. F., MACHADO, H., LABARTA, V. & DE LA FUENTE, J. (1995). Effect of vaccination with a recombinant Bm 86 antigen preparation on natural infestation of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross breed cattle in Brazil. *Vaccine*, 13 (18): 1804-1808.
- SAUER, J. R. (1977). Acarine salivary glands physiological relationships. *Journal of Medical Entomology* 14(1) 1-9.
- SCHLEIN, Y. & LEWIS, C. T. (1976). Lesion in haematophagous flies after feeding on rabbits immunized with fly tissues. *Physiol. Ent.* 1:55.
- TATCHELL, R. J. (1964). Digestion in the tick *Argas persicus*. *Parasitology* 54: 423-440.
- TILL, W. M. (1961). A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann. *Memories of Entomological Society of Southern Africa*. 6: 123p.
- TRAGER, W. (1939). Further observations on acquired immunity to the tick *Dermacentor variabilis* Say. *Journal of Parasitology* 25: 137-139.
- WIKEL, S. K. (1988). Immunological control of hematophagous arthropod vectors: utilization of novel antigen. *Veterinary Parasitology*, 29: 235-264.
- WILLADSEN, P. & KEMP, D. H. (1988). Vaccination with "Concealed" antigens for tick control. *Parasitology Today*, 4(7) 196-198.
- WILLADSEN, P., RIDING, G. A., MCKENNA, R. V., KEMP, D. H., TELLAM, R. L., NIELSEN, J. N., LAHNSTEIN, J., COBON, G. S. & GOUGH, J. M. (1989). Immunologic control of a parasitic arthropod, identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *Immunology*, 143(4): 1346-1351.

(Received 1 November 1996, Accepted 12 March 1997)