

SECRECIÓN NATURAL DE SALIVA EN LA GARRAPATA *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann), ALIMENTADA ARTIFICIALMENTE EN TUBOS CAPILARES.*

Efraín Benavides Ortiz y

Alan Ronald Walker**

RESUMEN

Hembras de la garrapata *Rhipicephalus appendiculatus* fueron alimentadas artificialmente con medio de cultivo celular contenido en tubos capilares, con el objeto de inducir la secreción natural de saliva en el medio. Estas secreciones salivares son una fuente importante de material antigénico para estudios sobre la resistencia del huésped a la garrapata. Como medio se utilizó una solución balanceada de sales "Hank", y en él se evaluó el efecto de la adición de tres concentraciones diferentes de albumina sérica bovina sobre la aceptación de las garrapatas para alimentarse en el medio. También se evaluó el efecto producido por la adición del fagoestimulante "glutathion reducido" en cada concentración de proteína. En el primer grupo de experimentos, garrapatas previamente alimentadas sobre conejos durante cuatro días, demostraron mayores aumentos de peso ($P < 0,01$) cuando se les ofreció medio que contenía 5% de proteína, comparados con los obtenidos por garrapatas alimentadas en medio que contenía 0,5% o carente de proteína. La adición del glutathion reducido no demostró efectos significativos sobre los aumentos de peso de las garrapatas. En experimentos subsiguientes, las garrapatas se alimentaron mejor en medio que contenía 5% de proteína, pero aquellas prealimentadas sobre conejos inmunes a la garrapata demostraron un aumento menor de peso ($P < 0,01$) comparado con el obtenido cuando las garrapatas se prealimentaron en conejos que no habían tenido contacto previo con las garrapatas. Conejos inmunes a la garrapata desarrollaron reacciones inmediatas y retardadas de hipersensibilidad, cuando fueron inoculados intradérmicamente con saliva de garrapata obtenida artificialmente mediante inyección de dopamina. Reacciones similares se observaron al inyectar los medios recuperados

después de la alimentación de las garrapatas, demostrando así la presencia de componentes salivares alergénicos en ellos.

SUMMARY

NATURAL SECRETION OF SALIVA IN THE TICK *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann) FED ARTIFICIALLY OF CAPILLARY TUBES

Rhipicephalus appendiculatus female ticks were artificially fed on capillary tubes containing a cell culture medium, in an attempt to induce the natural secretion of saliva into the medium. These salivary secretions are an important source of antigenic material for studies on resistance of the host to the tick. Hank's Balanced Salt solution was used as medium and the effect of the addition of three different concentrations of bovine serum albumine on the acceptance of the ticks to fed on the medium were evaluated. The effect of the addition of the phagostimulant reduced glutathion on each concentration of protein, was also evaluated. On the first group of experiments, ticks prefed on rabbits for four days, showed higher increases in weight ($P < 0.01$) when the media offered contained 5% protein as compared with the increases observed on ticks fed on media containing 0.5% or no protein. The addition of glutathion showed no effect on the weight increase of the ticks. In subsequent experiments, ticks fed better on media containing 5% protein, but those prefed on rabbits immune to the tick showed a lower weight increase ($P < 0.01$) than that displayed by ticks prefed on naive rabbits. Rabbits sensitized to the tick by repeated infestations, developed immediate and delayed hypersensitivity reactions following the intradermal injection of tick saliva, obtained by the injection of dopamine to the tick. Similar type of reactions were observed on the rabbits, when the media on which the ticks have been fed, were injected. This fact demonstrated the presence of allergenic salivary components on them.

ta son importantes en la estimulación del sistema inmune del huésped (Wikel y Allen 1982). Por ésta razón, las glándulas salivares de la garrapata y sus secreciones son una fuente importante de material antigénico para los estudios modernos en este campo.

La mayoría de estudios sobre resistencia, realizados hasta ahora, han usado extractos de glándulas salivares o extractos de garrapatas completas (Wikel et al. 1978; Willadsen 1980), mientras que los estudios de intoxicación por garrapatas, transmisión de enfermedades y fisiología de artrópodos se han basado en saliva obtenida artificialmente mediante el uso de drogas parasimpaticomiméticas que estimulan la salivación (Purnell et al. 1969; Tatchell 1967; Gregson 1973). La saliva obtenida de esta manera es extremadamente diluida y no es necesariamente el equivalente a saliva producida naturalmente (Binnington y Kemp 1980).

La secreción natural de saliva puede lograrse mediante estimulación táctil del hipostoma, colocando un tubo capilar sobre él (Gregson 1973), pero a pesar de haber sido ampliamente usado en estudios de intoxicación por garrapatas, este método es muy laborioso y sólo es posible obtener pequeñas cantidades de saliva.

El propósito de este trabajo fue intentar inducir la secreción natural de saliva en hembras de la garrapata *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann) (Parasitiformes: Ixodidae), a las cuales se les ofreció como alimento un medio simple en tubos capilares.

REVISIÓN DE LITERATURA

Adherencia y Alimentación de la garrapata.

Las glándulas salivares de la garrapata

* Apartes del trabajo presentado como tesis de M.Sc. del primer autor.

** Respectivamente: Médico Veterinario, M.Sc. Ph.D. Sección Centro de Diagnóstico, ICA Apartado Aéreo 7984. Bogotá, D.E., Colombia y Entomólogo, Ph.D. Centre for Tropical Veterinary Medicine. University of Edimburg, Roslin, Scotland EH 25-9RG.

INTRODUCCIÓN

La resistencia animal a la infestación por garrapatas tiene bases inmunes y genéticas. Hoy se indica con evidencia que los componentes salivares de la garrapata

son un par de estructuras con apariencia de racimo de uvas, localizadas lateralmente en el hemocelo, que se extienden hasta la altura de los espiráculos (Till 1961). En las hembras se presentan tres tipos de acinos glandulares: Acino tipo I ó piramidal y acinos granulares tipo II y III (Batungbacal 1974; Binnington 1978). En los machos existe un acino adicional tipo IV.

Se ha demostrado que existen siete tipos de células granulares en el macho de *Dermacentor variabilis* (Say), nueve tipos en la hembra de *Boophilus microplus* (Canestrini) y *R. appen-diculatus* y diez tipos en los machos de *B. microplus* (Kemp et al. 1982). Tres de estas células probablemente secretan cemento para adherencia y las otras cuatro secretan glicoproteínas y enzimas que pueden jugar un papel importante en la alimentación, mientras que las células epiteliales no granulares y aquellas que forman los acinos tipo I parecen estar implicadas en la osmorregulación (Binnington 1978).

Una vez que la garrapata encuentra un sitio apropiado para su adherencia, penetra la piel del huésped mediante movimientos de los queléceros (Gregson 1973), esto es seguido por la secreción de cemento en los siguientes diez minutos (Kemp et al. 1982). Entonces, rápidamente se inicia un proceso de ingestión de fluidos y salivación. Este patrón es más complejo que las simples alteraciones entre ingestión de sangre y salivación. Los procesos son discretos inicialmente, para luego incrementarse en frecuencia con períodos largos de secreción de saliva (Gregson 1969; Arthur 1970). La salivación más copiosa ocurre hacia el final del proceso de alimentación y regresa al huésped excesos de agua, concentrando la sangre ingerida (Kemp et al. 1982).

Se ha demostrado que las diferencias en los patrones de ingestión y salivación están relacionadas con la composición química del medio ofrecido bajo membranas artificiales. Esta respuesta parece ser debida a la presencia de quimiorreceptores en las piezas bucales de la garrapata (Waladde y Rice 1982). Así mismo, Waladde et al. (1979) demostraron que los fagoestimulantes trifosfato de adenosina (ATP) y glutatión reducido (GSH) incrementaron la frecuencia del

patrón simple de alimentación en *B. microplus* adherido en membranas artificiales. La composición del medio también afecta la deposición de cemento adherente (Kemp et al. 1982).

Estudios histoquímicos de las glándulas salivares de la garrapata y de la saliva han demostrado que estas secreciones contienen enzimas hidolíticas débiles, como esterases y aminopeptidasas y agentes farmacológicos, como prostaglandinas y antagonistas de la histamina. Sin embargo, su papel en el proceso de alimentación de la garrapata no ha sido completamente estudiado (Schleger y Lincoln 1976; Binnington y Kemp 1980). Las glándulas salivares intervienen además en la regulación de iones y en la eliminación de excesos de agua (Tatchell 1969; Kaufman y Sauer 1982).

Métodos artificiales de alimentación de garrapatas y técnicas para obtener su saliva.

Los métodos artificiales para la alimentación de garrapatas han sido ampliamente usados. Para argásidos, Edelsten (1974) describió métodos que utilizan la membrana corioalantoidea de huevos embrionados. Para ixódidos, Gregson (1973) logró inducir la adherencia de hembras de *Dermocentor andersoni* (Stiles), parcialmente alimentadas, a membranas. El concluyó que el material preferido era la piel perfundida con la sangre del huésped vivo. Por su parte, Kemp et al. (1975) alimentaron larvas de *B. microplus* en un medio parcialmente definido a través de cortes delgados de piel bovina.

El método de tubos capilares ha sido principalmente usado en estudios de transmisión de enfermedades. Se ha indicado que las garrapatas sólo ingieren la sangre ofrecida en los capilares por un tiempo limitado (Gregson 1973). La garrapata *R. appendiculatus* ha sido alimentada hasta por siete días, cuando los tubos capilares, con suero y sangre desfibrinada o heparinizada, fueron colocados y renovados frecuentemente (Purnell y Joyner 1967). Burgdorfer (1956) demostró que el proceso de alimentación se restringe a un período de 4-6 horas, a menos que sean ofrecidas suspensiones frescas. Esto sugiere que el medio tiende a contaminarse con saliva.

Se ha concluido que la salivación ocurre en los tubos capilares de manera suficiente, como para recolectar partículas infectivas de *Theileria parva* en el medio remanente en los tubos capilares en un período tan corto como dos horas. Este método ha sido ampliamente usado en estudios de transmisión de este protozoario (Purnell et al. 1969; Walker et al. 1979).

En cuanto a la obtención de saliva, Gregson (1957) encontró que las garrapatas podrían ser inducidas a salivar, si un tubo capilar se colocaba cuidadosamente sobre el hipostoma. De acuerdo con Tatchell (1967), para esta técnica es crítico que el diámetro interno del tubo comprima los queléceros.

El uso de drogas parasimpaticomiméticas para obtener secreciones salivares ha sido ampliamente descrito. Se ha reportado que inyecciones de 5-10 microlitros de pilocarpina al 10% en salina, causan un incremento en seis veces la secreción de saliva en *B. microplus* sobre aquel obtenido con sólo el estímulo táctil (Tatchell 1967).

Estudios fisiológicos de las glándulas salivares de la garrapata han demostrado que existe un control neural de la salivación (Kaufman y Phillips 1973), pero ésta puede ser también estimulada por la inyección de líquidos isotónicos en la hemolinfa, tales como cloruro de sodio, sucrosa, urea o agua destilada (Kaufman y Sauer 1982).

MATERIALES Y METODOS

Alimentación artificial

Las hembras de *R. appendiculatus* utilizadas en este estudio, se obtuvieron de la colonia establecida en el Centre for Tropical Veterinary Medicine (Universidad de Edinburgo, Escocia). Estas garrapatas se sometieron a una prealimentación en las orejas de conejos Nueva Zelanda, por 4-5 días. Con el fin de extraer saliva, a algunas se les permitió alimentarse por 6-7 días, hasta la plena ingurgitación. Las garrapatas fueron removidas, lavadas y secadas y luego se procedió a pesarlas.

Tubos capilares de vidrio de 75 mm de

largo y 0,8-0,9 mm de diámetro interno fueron moldeados al calor para reducir el diámetro de los extremos a 0,2-0,5 mm, con el fin de adaptarlos a las piezas bucales de la garrapata (Burgdorfer 1956; Tatchell 1967; Gregson 1973).

Para los medios artificiales se utilizó la solución balanceada de sales de Hank (Gibco, Europa), a la que se le adicionaron tres concentraciones diferentes de Albúmina Plasmática Bovina (BPA). De acuerdo con la concentración de proteína utilizada, los medios se denominaron de la siguiente manera: HBSS (Sin proteína), HO,5PA (0,5% de proteína) y H5% BPA (5% de proteína). El pH de los medios se ajustó a 7,2, mediante la adición de bicarbonato de sodio.

Los medios se esterilizaron mediante la filtración a través de un filtro Swinnex con una membrana de acetato de celulosa de un tamaño de poro de 0,22 μm y se repartieron en alícuotas de 5 ml, las cuales se conservaron congeladas a -20°C . Previamente a su uso, los medios fueron descongelados y usados a temperatura ambiente en los experimentos. Como fagoestimulantes en los medios se utilizó el Glutatión reducido (GSH) (Sigma Labs.) a la concentración de 10^{-2} M.

Para la alimentación artificial, las garrapatas fueron adheridas ventralmente a un soporte Perpex especialmente diseñado, en donde los tubos capilares que contenían el medio respectivo se colocaron cuidadosamente sobre las piezas bucales de la garrapata (Fig. 1). En cada experimento se trabajó con grupos de 10 garrapatas.

El peso individual de cada garrapata se registró utilizando una balanza Oerteling (R.20, $d=0,1$ mg). Así mismo, se anotó el nivel de la columna de fluido en los tubos capilares, antes y después del proceso de alimentación. Este período fue generalmente de 4-5 horas, durante las cuales las garrapatas se colocaron en el interior de una cámara con una humedad relativa del 100% dentro de un incubador a 37°C . Además, se realizaron algunas pocas observaciones con períodos de 14 horas de alimentación.

Luego del período de alimentación artifi-



Figura 1. Alimentación artificial de garrapatas con un medio contenido en tubos capilares. Observe como el extremo del tubo encaja con el hipostoma que penetra en él.

cial, el medio remanente en los tubos capilares se recolectó en recipientes plásticos de acuerdo con el grupo experimental y se conservó congelado a -20°C .

Se realizaron dos grupos de experimentos utilizando garrapatas prealimentadas en conejos sin previa exposición a garrapatas. El primer grupo incluyó la comparación de tres diferentes niveles de albúmina en el medio (0, 0,5% y 5%) con la inclusión o no de GSH como fagoestimulante.

El segundo grupo consistió en comparar garrapatas alimentadas en el medio sin proteína y con 5% de ella, pero sin utilizar fagoestimulantes. Además, en algunas repeticiones se utilizaron garrapatas prealimentadas en conejos que habían sido previamente expuestos a la garrapata *R. appendiculatus*.

Como estimulante de la secreción salivar se utilizó dopamina. En dos ocasiones las garrapatas se inyectaron con una solución de dopamina 10^{-2} M en PBS. La inyección se efectuó en el centro del dorso de las garrapatas, aplicando 2-10 μl de solución por espécimen, a intervalos de 15-20 minutos (Kaufman y Sauer 1982; Walker et al. 1979). La saliva producida se colectó mediante la colocación de tubos capilares sobre las piezas bucales de

la garrapata, 15-20 minutos después de la segunda inyección. La saliva se recolectó en tubos Eppendorf y se conservó congelada a -20°C .

Detección de componentes salivares en el medio después de la alimentación artificial

Con el fin de detectar material antigénico que pueda permanecer en el medio después de la alimentación de garrapatas, se utilizó una prueba de hipersensibilidad en la piel de conejos sensibilizados a la garrapata. En ellos se comparó la reactividad dérmica producida por los diferentes medios luego de la alimentación de garrapatas en ellos, contra la reactividad producida por la inyección de saliva obtenida por la estimulación con dopamina.

A cuatro conejos Nueva Zelanda se les permitió desarrollar inmunidad a la garrapata por medio de tres infestaciones con adultos machos y hembras, utilizando un esquema similar al descrito por Wikel et al. (1978), con períodos de reposo de 7 días entre una y otra infestación. La prueba dérmica se realizó a los 12 y 13 días de finalizada la tercera infestación.

Los cuatro conejos inmunizados y uno sin exposición previa a las garrapatas fueron rasurados en el dorso y el área de piel dividida en cuadros de aproximadamente 4 cm X 4 cm con la ayuda de un marcador indeleble. En cada conejo se inyectó intradérmicamente 0,1 ml de las diluciones del material a probar. Las reacciones de hipersensibilidad inmediata producidas por estos materiales se valoraron por el tamaño de los diámetros de la reacción de edema producida dos horas después de la inyección. El producto de dos mediciones en ángulo recto se tomó como representativo del área de reacción (Willadsen et al. 1978).

Con el fin de detectar reacciones de hipersensibilidad retardada, se realizaron lecturas adicionales a las 24 y 48 horas post-inoculación, registrando en este caso el diámetro del área de eritema e induración (Roitt 1980). Los medios, así como la saliva obtenida mediante estimulación por dopamina, fueron ensayados si diluir y en diluciones de 1/10 y 1/100 en PBS.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cambios de peso en garrapatas alimentadas artificialmente en diferentes medios

La habilidad de las garrapatas para ingerir el medio ofrecido en los tubos capilares, se midió por el aumento de peso registrado durante el período de alimentación. Sin embargo, no todas las garrapatas se alimentaron exitosamente y los valores obtenidos mostraron gran dispersión y ausencia de normalidad en los datos crudos. Así, los valores negativos fueron eliminados y los datos sometidos a transformación logarítmica ($\log_{10}[x+1]$), previo al análisis de varianza (Sard 1978). El efecto de cada tratamiento en el éxito para incrementar el peso se evaluó mediante una prueba de chi-cuadrado (Bailey 1981).

La Figura 2 ilustra los resultados obtenidos en el primer experimento, al comparar tres niveles de proteína en el medio y la adición de GSH como fagoestimulante. El incremento de peso de las garrapatas alimentadas en medio que contenía 5% de proteína fue diferente ($P < 0,01$) del incremento logrado en las garrapatas alimentadas en medios que contenían 0,5%

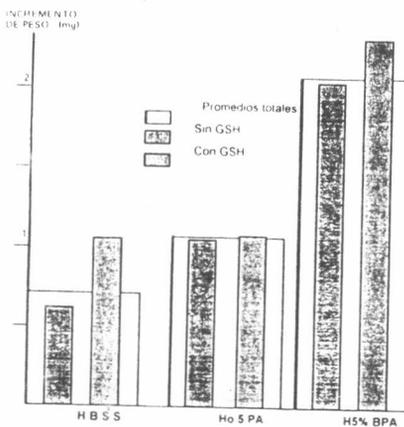


Figura 2. Efecto de tres concentraciones de proteína en el medio y la adición de GSH, sobre el incremento de peso de garrapatas alimentadas artificialmente en tubos capilares. La diferencia en H5% BPA es altamente significativa, ($P < 0,01$). La adición de GSH no demostró efectos significativos.

ó sin proteína. La adición de GSH no demostró efecto significativo sobre estos incrementos de peso.

La calibración volumétrica de los tubos capilares demostró que 1 mm de reducción en la columna de fluido, representaba un volumen de 0,726 μ l. El análisis de la relación entre el aumento de peso y la reducción de la columna de fluido (Fig.3) mostró una correlación altamente significativa en todos los tratamientos. Esto indica que la pérdida de líquido en los tubos fue causada por la ingestión por parte de las garrapatas y que la evaporación o escape no fueron factores importantes en la variación.

Durante el segundo grupo de experimentos, al analizar las diferencias entre garrapatas alimentadas en dos medios (proteína al 5% de concentración o no proteína), y utilizando garrapatas prealimentadas en conejos con y sin exposición previa a las garrapatas, se encontró que los mayores valores de aumento de peso se dieron en las garrapatas alimentadas en medio que contenía 5% de proteína y a su vez prealimentadas en conejos susceptibles (1,93 \pm 0,86 mg) y los menores valores se observaron en garrapatas alimentadas en medio sin proteína y prealimentadas

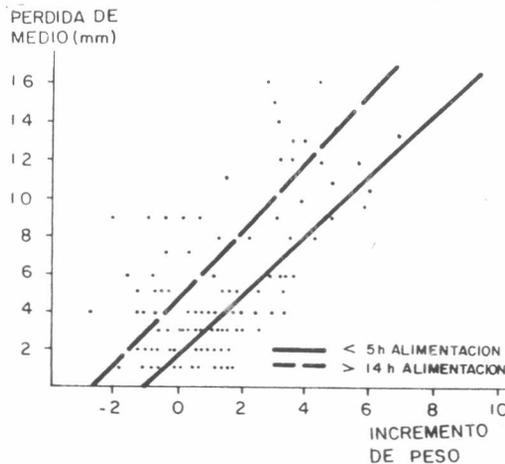


Figura 3. Correlación entre el incremento de pesos y la pérdida de medio en los tubos capilares en garrapatas alimentadas artificialmente por períodos de menos de 5 horas ($r=0,877$) o más de 14 horas ($r=0,863$). Las pendientes son similares pero difieren ($P < 0,01$) en nivel.

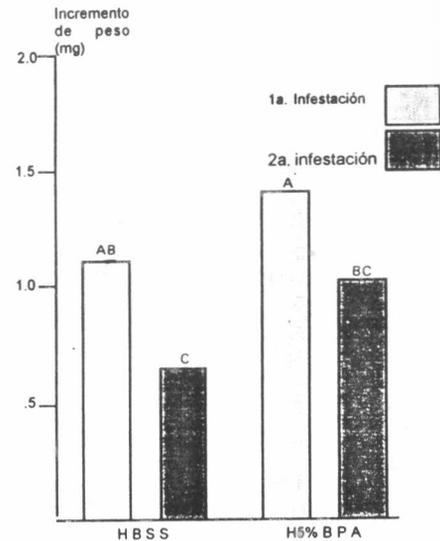


Figura 4. Efecto del nivel de resistencia a garrapatas de los conejos en que se prealimentaron las garrapatas, sobre el incremento de peso en hembras de *R. appendiculatus* alimentadas artificialmente en dos medios diferentes. Las columnas (promedios conjuntos, aproximadamente 60 garrapatas cada una) que portan diferente letra difieren con alta significancia ($P < 0,01$).

en conejos inmunes a las garrapatas (0,39 \pm 0,18 mg).

El análisis del efecto combinado de la fuente de prealimentación de las garrapatas y el tipo de medio usado para la alimentación, se ilustra en la Figura 4. El aumento de peso en garrapatas prealimentadas en conejos susceptibles a la garrapata (1,11 \pm 0,36 mg para HBSS y 1,41 \pm 0,68 mg para H5%BPA) fue mayor ($P < 0,01$) que el de garrapatas prealimentadas en conejos inmunes (0,64 \pm 0,37 mg para HBSS y 0,81 \pm 0,5 mg para H5%BPA).

En resumen, el medio que contiene 5% de proteína demostró ser el más efectivo para una alimentación artificial exitosa de la garrapata, aunque el medio sin proteína también permite cierto grado de alimentación. Estos resultados coinciden con los reportados por Kemp et al. (1975), quienes demostraron que para alimentar larvas de *B. microplus* sobre membranas era necesario suplementar el medio de cultivo con proteínas a una concentración del 7%. Reportes previos de alimentación artificial de garrapatas en tubos capilares sólo han incluido sangre entera o glóbulos rojos como medio (Burgdorfer 1956; Purnell y Joycer 1967; Walker et al. 1979).

La falla del GSG para crear un incremento en el patrón de alimentación, puede ser explicada por los hallazgos de Waladde et al. (1979), quienes demostraron que la adición de GSH o ATP a sangre entera, incrementó la frecuencia de las fases de ingestión, pero este efecto sólo fue notorio durante los primeros 7 minutos de alimentación. Período insignificante, si se tiene en cuenta que en estos experimentos el período de alimentación fue de cuatro horas.

El menor aumento de peso observado en las garrapatas prealimentadas en conejos con exposición previa al parásito, podría explicarse por una inhibición en la ingestión de líquidos, causada por agentes farmacológicos liberados por el huésped en el sitio de adherencia (Willadsen 1980). Se ha demostrado que ocurren alteraciones en la composición de la ingesta en garrapatas que se alimentan en conejos inmunes (Wikel y Allen 1982), creando un aumento en la ingestión de leucocitos, principalmente basófilos. Su ingestión y la posterior liberación de compuestos farmacológicamente activos, explicaría la interferencia con la alimentación de la garrapata.

Detección de componentes salivares en el medio después de la alimentación artificial.

Las reacciones de hipersensibilidad inmediata se caracterizaron por el desarrollo de una reacción edematosa prominente, la cual fue notoria al momento de la lectura, dos horas luego de la inoculación (Fig. 5). Con la medición de estas reac-

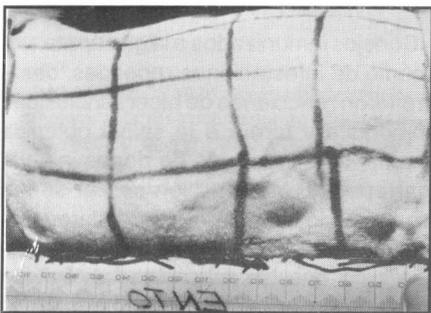


Figura 5. Reacción de hipersensibilidad inmediata a antígenos salivares de garrapata, en la piel de conejos inmunes. De izquierda a derecha se observan las reacciones producidas por saliva sin diluir, y diluciones 1/10, 1/100 y por PBS.

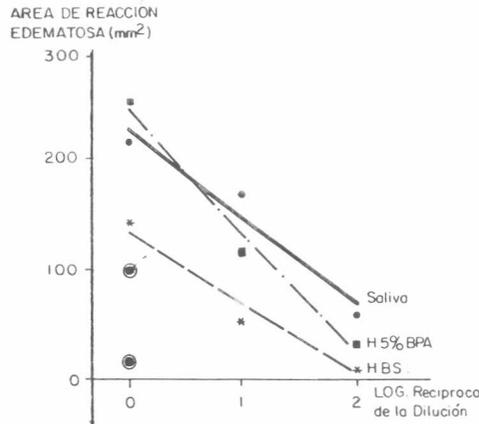


Figura 6. Relación entre la respuesta de hipersensibilidad inmediata y diluciones de los medios del experimento 2, o saliva. Las pendientes son similares, pero el nivel de la constante es diferente ($P < 0,01$). Los puntos representan el promedio para cada alérgeno en cada dilución (●) saliva, (★) HBSS, (■) H5% BPA. Los puntos dentro de un círculo representan las reacciones desarrolladas en el conejo control para saliva (◊) y H5% BPA (◄).

ciones se obtuvo, para cada inóculo, el promedio de los registros en los cuatro conejos inmunizados.

La Figura 6 presenta los resultados obtenidos al analizar los medios obtenidos durante la segunda fase de experimentos de alimentación artificial. Estos se presentan como regresión lineal entre el área de reacción edematosa desarrollada en los conejos y el logaritmo del recíproco de la dilución del medio utilizada (Willadsen et al. 1978).

Cada regresión por sí misma fue altamente significativa. El análisis de varianza entre las diferentes regresiones demostró que la pendiente era similar, pero mostró diferencias ($P < 0,01$) en el tamaño de la reacción producida por el antígeno sin diluir, de la siguiente manera: Saliva=226 mm², H5%BPA=242 mm² y HBSS=124 mm². Estos resultados sugieren la presencia de componentes salivares

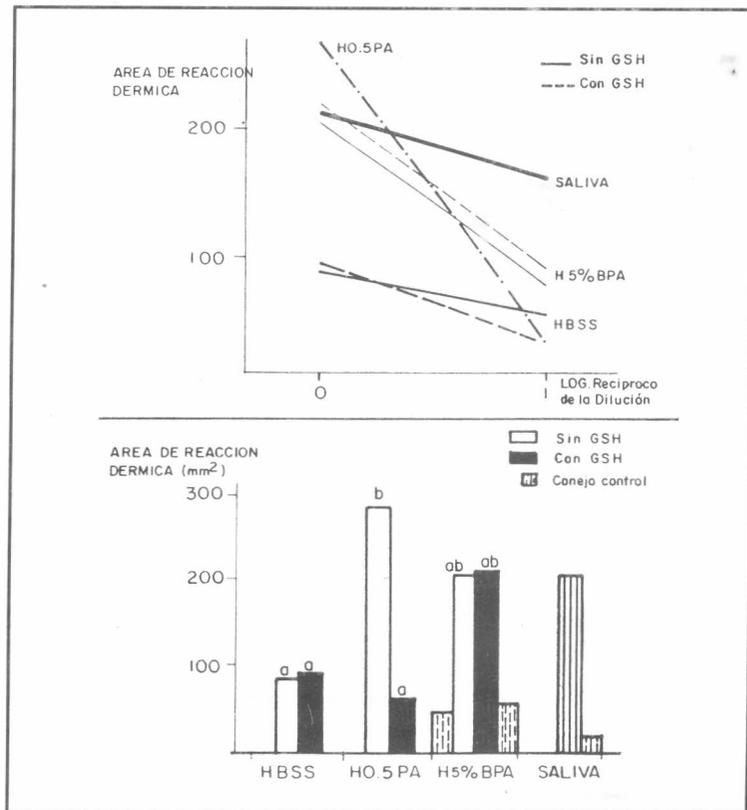


Figura 7. Reacciones de hipersensibilidad inmediata producidas en conejos inmunes por los medios usados para alimentar artificialmente garrapatas en el experimento 1. A. Relaciones entre dosis y área de reacción edematosa comparadas a la reacción producida por saliva obtenida por inyección de Dopamina. B. Promedio de las reacciones producidas saliva y medios, sin diluir, comparados con la reacción producida en el conejo control, hay diferencias altamente significativas entre columnas con letras diferentes.

en los medios, con una concentración mayor en H5%BPA, similar a la observada en la saliva obtenida mediante inyección de dopamina.

El conejo control (no inmune) desarrolló una ligera reacción a la saliva y a H5%BPA, sugiriendo la presencia de un factor no inmune en la reacción total, como es la presencia de compuestos vasoactivos (Wikel et al. 1978).

Las reacciones producidas por los medios obtenidos del experimento 1, se ilustran en la Figura 7. Estas reacciones presentaron mayor dificultad para su interpretación, ya que sólo dos diluciones fueron evaluadas. En este caso, no todas las regresiones fueron significativas, entonces, las reacciones fueron comparadas mediante un análisis de varianza, el cual demostró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los promedios para los diferentes medios. H0,5PA produjo las más fuertes reacciones (284 mm^2), nivel que no difiere del producido por saliva o H5%BPA.

Las reacciones de eritema e induración producidas por los inóculos, en general fueron más marcadas a las 24 horas post-inoculación. Con los datos obtenidos a las 24 horas se realizaron pruebas de

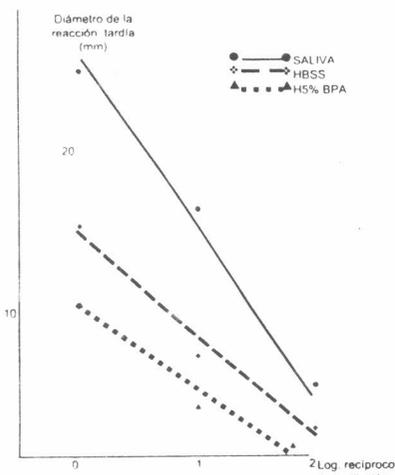


Figura 8. Relación entre la respuesta en la reacción de hipersensibilidad tardía, y la dilución de saliva o medios del experimento 2. La diferencia entre pendientes es significativa ($p < 0,05$) y la diferencia entre constantes es altamente significativa ($p < 0,01$). Los puntos representan los promedios para alérgeno en cada dilución. El conejo control no desarrolló ninguna reacción.

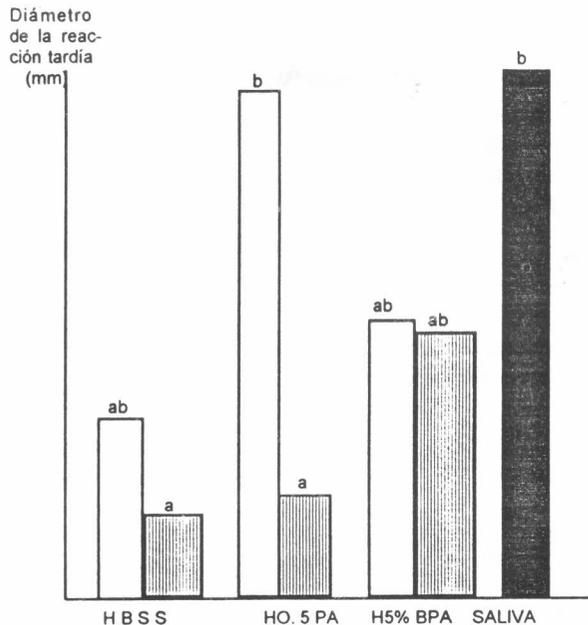


Figura 9. Efecto del tipo de medio durante la alimentación artificial, sobre el nivel de reacción de hipersensibilidad retardada desarrollada en conejos sensibilizados por los alérgenos sin diluir. Columnas con diferente letra son diferentes. ($p < 0,01$). El conejo control no desarrolló ningún tipo de reacción.

regresión, de manera similar a como se analizaron las reacciones inmediatas. El análisis de la información procedente del experimento 1 presentó los mismos problemas que los descritos para las reacciones inmediatas.

Las reacciones de hipersensibilidad retardada presentaron un patrón similar al de las reacciones inmediatas (Fig. 8 para el experimento 2 y Fig. 9 para el experimento 1), pero la saliva, obtenida mediante la inyección de dopamina en las garrapatas, produjo reacciones marcadamente diferentes de las producidas por los medios. H0,5%PA produjo niveles mayores de reactividad. El conejo control no desarrolló ningún tipo de reacciones.

Conjugando los resultados de las evaluaciones de las respuestas inmediatas y retardadas se puede afirmar que existen componentes antigénicos tanto en la saliva obtenida mediante inyección de dopamina, como en los diferentes medios en los que las garrapatas fueron alimentadas artificialmente. Estos antígenos desencadenan reacciones de hipersensibilidad inmediata y retardada en conejos inmunes. Ambos tipos de reacciones han sido descritas en animales resistentes a la garrapata (Willadsen et al 1978; Wikel et al. 1978).

Además, se demostró la presencia de factores no inmunes que forman parte de la reacción inmediata, tanto en la saliva como en algunos de los medios utilizados. Se cree que estos son compuestos vasoactivos secretados por la garrapata

para facilitar su alimentación en el huésped (Wikel et al. 1978).

CONCLUSIONES

Durante estos experimentos se demostró que:

- Garrapatas hembras de *R. appendiculatus*, prealimentadas en conejos, ingieren medios simples ofrecidos en tubos capilares, liberando componentes de la saliva al medio mientras se alimentan.

- Las garrapatas tuvieron un mayor incremento de peso cuando la solución balanceada de sales usada como medio fue adicionada de albumina bovina a una concentración de 5% (peso/volumen). La adición de proteína a la concentración de 0,5% ó del fagoestimulante GSH no produjo cambios en los aumentos de peso.

- Conejos inmunizados a la garrapata, por medio de infestaciones repetidas, desarrollaron reacciones de hipersensibilidad inmediata y tardía a la saliva obtenida mediante la inyección de dopamina a la garrapata. Una reacción similar se encontró en los conejos cuando fueron inoculados con los diferentes medios, después de que las garrapatas se habían alimentado en ellos. El tamaño de la reacción desarrollada demostró un patrón común de reducción a medida que aumenta la dilución del medio, haciendo posible de esta manera estimar la cantidad de alérgenos contenidos en cada medio.

-De esta manera se demostró, que luego de la alimentación artificial de garrapatas en diferentes medios, el medio que contenía albumina bovina a una concentración de 0,5% contenía alérgenos en una cantidad similar a la hallada en la saliva de la garrapata y en mayor cantidad a los alérgenos detectados en el medio adicionado de 5% de proteína o en el medio sin aditivos. A pesar de esto, aún fue posible demostrar componentes salivares en el medio simple sin proteína. La importancia de este hallazgo radica en el hecho de que la purificación de estos componentes de la saliva puede ser menos laboriosa en este medio, así estos se encuentren en menor cantidad.

-Como la alimentación artificial de garrapatas con tubos capilares es un procedimiento muy laborioso, cualquier intento posterior para alimentar artificialmente gran número de garrapatas tratando de obtener secreciones salivares, podría incluir la inducción de la alimentación artificial en membranas colocadas sobre un medio simple, de manera similar a la reportada por Kemp et al. (1975).

BIBLIOGRAFIA

- ARTHUR, D.R. 1970. Tick feeding and its implications. *Advances in Parasitology* (Estados Unidos) v. 8, p.275-292.
- BAILEY, N.T.J. 1981. *Statistical methods in biology*. 2nd. Ed. London, Hodder & Stoughton. 215p
- BATUNGBACAL, N.R. 1974. The histology of the salivary glands in unfed and feeding *Rhipicephalus appendiculatus*. Roslin, Scotland, Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh. (Thesis M.Sc.).
- BINNINGTON, K.C. 1978. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. *International Journal for Parasitology* (Estados Unidos) v.8, p. 97-115.
- ; KEMP, D.H. 1980. Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission. *Advances in Parasitology*. (Estados Unidos) v. 18, p. 315-339.
- BURGDORFER, R. 1956. Artificial feeding on ixodid ticks for studies on the transmission of disease agents. *Journal of Infectious Diseases* (Estados Unidos) v. 100, p.212-214.
- EDELSTEN, R.M. 1974. The use of tick colonies in epidemiological studies on the transmission of pathogens. Roslin, Scotland, Centre for Tropical Veterinary Medicine. University of Edinburgh. p.(Thesis M.Sc.).
- GREGSON, J.D. 1957. Experiments on the oral secretion of the Rocky mountain wood tick *Dermacentor andersoni* (Stiles). *The Canadian Entomologist* v.89 no. 1, p. 1-5.
- 1969. Electrical observations of tick feeding in relation to disease transmission. *Second International Congress of Acarology 1967. Proceedings.* p. 329-339.
- 1973. Tick paralysis: An appraisal of natural and experimental data. Canada Department of Agriculture. Monograph No.9.
- KAUFMAN, W.R.; PHILLIPS, J.E. 1973. Ion and water balance in the ixodid tick *Dermacentor andersoni*. I. Routes of ion and water excretion. II. Mechanisms and control of salivary secretion. *Journal of Experimental Biology* (Inglaterra) v.58, p. 523-547.
- ; SAUER, J.R. 1982. Ion and water balance in the feeding tick: mechanisms of tick excretion. En: OBENCHAIN, F.D.; GALUN, R. (Eds.). *Current Themes in Tropical Science. Vol.1. Physiology of ticks.* Oxford, Pergamon Press. p. 213-244.
- KEMP, D.H.; KOUDESTAAL, D.L.; ROBERTS, J.A.; KERR, J.D. 1975. Feeding of *Boophilus microplus* larvae on a partially defined medium through thin slices of cattle skin. *Parasitology* (Inglaterra) v. 70, p. 243-254.
- ; STONE, F.F.; BINNINGTON, K.C. 1982. Tick attachment and feeding: Role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretion and the host response. En: OBENCHAIN, F.D.; GALUN, R. (Eds.) *Current Themes in Tropical Science. Vol.1. Physiology of ticks.* Oxford, Pergamon Press. p. 119-169.
- PURNELL, R.E.; JOYNER, L.P. 1967. An artificial feeding technique for *Rhipicephalus appendiculatus* and the transmission of *Theileria parva* from the salivary secretion. *Nature* (Inglaterra) v. 216, p. 484-485.
- ; BRANAGAN, D.; RAADLEY, D.E. 1969. The use of parasymphomimetic drugs to stimulate salivation on the tick *Rhipicephalus appendiculatus* and the transmission of *Theileria parva* using saliva obtained by this method from infected ticks. *Parasitology* (Inglaterra) v.59, p. 709-718.
- ROITT, I. 1980. *Essential Immunology*. 4 th. Ed. Edinburgh, Blackwell Scientific Publications. 358 p.
- SARD, D.M. 1978. Dealing with data: The practical use of numerical information. (4) displaying data. *Veterinary Record* (Inglaterra) v. 103, p. 26-28.
- SCHLEGER, A.V.; LINCOLN, D.T. 1976. *Boophilus microplus*: Characterization of enzymes introduced into the host. *Australian Journal of Biological Sciences* v.29, p. 482-497.
- TATCHELL, R.J. 1967. A modified method for obtaining tick oral secretions. *Journal of Parasitology* (Estados Unidos) v.53, p. 1105-1107.
- 1969. The ionic regulatory role of the salivary secretion of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Journal of Insect Physiology* (Estados Unidos) v. 15, p.1421-1430.
- TILL, W.M. 1961. A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann). *Memoirs of the Entomological Society of Southern Africa* v.6, p.12-27
- WALADDE, S.M.; RICE, M.J. 1982. The sensory basis of tick feeding behaviour. En: OBENCHAIN, F.D.; GALUN, R. (Eds.). *Current Themes in Tropical Science. Vol.1. Physiology of ticks.* Oxford, Pergamon Press. p.71-118.
- ; KEMP, D.H.; RICE, M.J. 1979. Feeding electrograms and fluid uptake measurements of the cattle tick *Boophilus microplus* attached to artificial membranes. *International Journal for Parasitology* (Estados Unidos) v. 9; p.89-96.
- WALKER, A.R.; BROWN, C.G.D.; BELL, L.J.; Mc KELLAR, S.B. 1979. Artificial infection of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with *Theileria parva*. *Research in Veterinary Science* (Inglaterra) v.26, p. 264-285.
- WIKEL, S.K.; ALLEN, J.R. 1992. Immunological basis of host resistance to ticks. En: OBENCHAIN, F.D.; GALUN, R. (Eds.). *Current themes in tropical science. Physiology of ticks* Oxford, Pergamon Press. p. 169-195.
- ; GRAHAM, J.E.; ALLEN, J.R. 1978. Acquired resistance to ticks: IV. Skin reactivity and in vitro lymphocyte responsiveness to a salivary gland antigen. *Immunology* (Inglaterra) v. 34, p. 257-263.
- WILLADSEN, P. 1980. Immunity to ticks. *Advances in Parasitology* (Estados Unidos) v. 18, p. 293-313
- ; WILLIAMS, P.G.; ROBERTS, J.A.; KERR, J.D. 1978. Responses of cattle to allergens from *Boophilus microplus*. *International Journal for Parasitology* (Estados Unidos) v.8, p.89-95.