

**ANEXO 4. IDENTIFICACIÓN DE
ÓRGANOS BLANCO EN GARRAPATAS DE
LA ESPECIE *Boophilus microplus* PARA
ANTICUERPOS–ANTIGARRAPATA EN
BOVINOS INDUCIDOS POR EL
INMUNÓGENO TICK-VAC MK[®] DEL
LABORATORIO LIMOR DE COLOMBIA
S.A MEDIANTE MÉTODOS DE
INMUNOPEROXIDASA**

José David Gutiérrez Osorio

Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Microbiología Industrial

Bogotá, Colombia

30 de junio de 2006

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Identificar órganos blanco en garrapatas de la especie *Boophilus microplus* para anticuerpos–antigarrapata en bovinos inducidos por el inmunógeno Tick-Vac del laboratorio Limor de Colombia S.A mediante métodos de inmunoperoxidasa.

1.2. Objetivos específicos

- Estandarizar protocolo de fijación, deshidración, inclusión y corte de tejidos ricos en quitina.
- Estandarizar protocolo de inmunoperoxidasa en tejidos ricos en quitina.
- Identificar anticuerpos bovinos en órganos blancos de la garrapata por medio de la técnica de inmunoperoxidasa, utilizando un anti-anticuerpo conjugado con biotina como anticuerpo secundario.
- Justificar la eficacia de Tick-Vac MK[®] en la reducción de infestaciones por *Boophilus microplus*.

2. Materiales y Métodos

La metodología para este proyecto, implicó varios pasos y procedimientos; primero se realizó una recolección de las muestras a estudiar (garrapatas *Boophilus microplus*), preparación de la muestra y cortes, después de haber obtenido los cortes, se realizó coloración hematoxilina-eosina a varios cortes de garrapatas en diferentes estadios de su ciclo biológico con el fin de identificar órganos y estructuras. Después de la tinción de Hematoxilina-eosina, se llevó a cabo un procedimiento inmunohistoquímico de avidina-biotina, para identificar en qué órganos o estructuras actúan los anticuerpos inducidos por la vacunación del ganado con el inmunógeno TickVack MK®.

2.1. Fijación

Tiene por objeto fijar la estructura y ultra estructura de los tejidos en un momento determinado de su ciclo vital, interrumpiendo las funciones de la célula evitando su deformación y estabilizando la estructura morfológica y química de las células para poder realizar procedimientos de coloración e identificación (González 1969). Para realizar esta operación, se emplean sustancias químicas que reciben el nombre de fijadores, sustancias capaces de desnaturalizar e inactivar enzimas intracelulares y posteriormente evitar auto lisis (se da porque las células contienen enzimas proteolíticas que pueden autodigerir las células y destruirlas) (Martínez 1979).

Con el objetivo de realizar una buena preservación de los tejidos, en este trabajo se realizó una fijación con formaldehído al 4 % en un buffer fosfato de sodio con p.H de 7.4.

2.2. Remoción de quitina

Después de la fijación, los ectoparásitos fueron puestos en remojo en una solución al 4 % de fenol en 80 % de alcohol etílico (4 ml fenol en 96 ml de alcohol etílico al 80 %) por 24 horas con el objetivo de ablandar el exosqueleto duro quitinoso, característico de estos organismos artrópodos.

2.3. Deshidratación

La deshidratación consiste en extraer agua de los tejidos. Comúnmente se utilizan agentes deshidratantes como alcohol (etílico, metílico, amílico y butílico) y acetona; pero, el alcohol

es más usado que la acetona porque esta absorbe agua de la atmósfera y tiene un gran poder para extraer lípidos dentro de la célula (Bozzola 1992).

Debe hacerse progresivamente para evitar la salida brusca del agua, lo cual, podría producir rupturas en las estructuras celulares. Para realizar este paso se emplean alcoholes de graduación creciente comenzando por los de bajo título y terminando con los absolutos (González 1969)

El procedimiento que se llevó a cabo es el siguiente:

Se sumergieron las garrapatas en alcohol al 50 % durante 15 minutos, seguidamente se renovó el alcohol al 50 % una vez y se dejó actuar nuevamente por 15 minutos. Se decantó el alcohol al 50 % y se reemplazó por alcohol al 70 % por un tiempo de 15 minutos. Posteriormente, se decantó el alcohol al 70 % y se cambió por alcohol al 80 % durante 15 minutos. Se decantó el alcohol anterior y se cambió por alcohol al 96 % por 30 minutos.

El alcohol al 96 % fue sustituido por alcohol absoluto (100 %) dejando que actúe por media hora, este último paso se realizó una vez más con la misma concentración de alcohol y el mismo tiempo. Por último se decantó el alcohol al 100 %.

2.4. Imbibición

Antes de realizar el corte, es importante introducir los tejidos en un medio líquido que al solidificarse se obtenga una consistencia que permita ser cortado. El medio líquido realiza una imbibición, es decir, este rellena los espacios dejados en la deshidratación (González 1969).

Para este fin se utilizó Cryomatrix, el cual es una resina muy utilizada en cortes a bajas temperaturas (Figura 1). La resina es de consistencia viscosa a temperatura ambiente pero a -30 grados centígrados se endurece dando el soporte necesario a los tejidos para realizar los cortes en el criostato. Los compuestos activos de Cryomatrix son polivinil alcohol 10 % y polietilenglicol 4 %.



Figura 1: Cryomatrix (Thermo Shandon), resina utilizada como medio de imbibición para el procesamiento y seccionamiento de tejidos a bajas temperaturas.

Esta resina presenta varias ventajas frente a otros medios de imbibición; entre ellas esta en que se une fuertemente al criocartucho, evitando que la muestra se desprenda durante el seccionamiento, da fuerte soporte a los tejidos para realizar los cortes, se congela rápidamente (4 minutos aproximadamente), permite suave seccionamiento del tejido, es removida del tejido durante la tinción de hematoxilina-eosina cuando entra en contacto con la acetona o con el agua y es soluble en agua sin dejar residuos en el tejido.

2.5. Preparación de moldes e inclusión

Para este fin se realizo en papel aluminio un molde pequeño de unos 5 cm³ de capacidad.

1. Primero se agrega una capa de Cryomatrix en fondo del molde.
2. Después, se introduce la muestra; en este caso una garrapata y se deposita sobre la capa de Cryomatrix, evitando que la muestra toque el fondo del molde.
3. Luego, se termina de llenar el molde con Cryomatrix hasta que la garrapata quede completamente sumergida o suspendida en el plástico líquido.
4. se introduce el molde con todo su contenido en el criostato para el congelamiento a -30C⁰.
5. después de 5 minutos, tiempo en el cual el plástico esta completamente congelado, se procede a cortar.

2.6. Seccionamiento o corte

Los cortes se realizan con el mismo criostato, el cual nos permite obtener cortes de 3 a 4 μ de espesor (Figura 2).



Figura 2: Criostato utilizado para el seccionamiento de tejidos durante el procesamiento histológico de muestras de *Boophilus microplus*. Este equipo permite realizar cortes de tejido de aproximadamente 3 a 4 μ m de espesor a bajas temperaturas.

Para este proceso se retira el molde del criostato por un breve momento para retirar el papel aluminio del taco de Cryomatrix congelado.

Se ubica el taco en el criocartucho de corte, luego el criocartucho es ubicado en el soporte para criocartuchos del criostato, luego se procede a cortar.



Figura 3: Componentes del sistema de seccionamiento del criostato utilizados durante el procesamiento histológico de muestras de *Boophilus microplus*.

El corte es realizado por una cuchilla ultra fina la cual es accionada por una palanca mecánica en el exterior del criostoto.

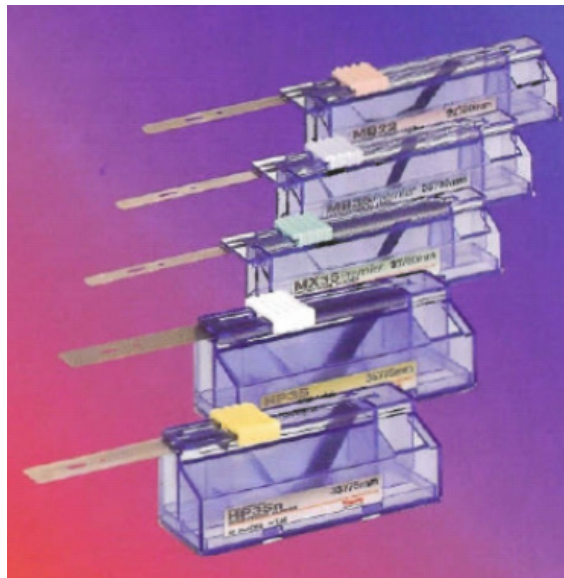


Figura 4: Cuchillas para criostato Thermo Shandon utilizadas para el seccionamiento de muestras durante el procesamiento histológico de *Boophilus microplus*. Estas cuchillas permiten obtener cortes de tejido de alta precisión para análisis histológicos e inmunohistoquímicos.

2.7. Método de la hematoxilina-eosina

Soluciones:

1. solución de hematoxilina de harris.

2. etanol acido al 1 %.
3. solución de azuleamiento. Solución acuosa de Amoniacó al 2 %.
4. solución acuosa o alcohólica de eosina.

Modo de operar:

1. remoción de resina con acetona.
2. lavar con agua corriente.
3. teñir con hematoxilina de Harris durante 2 minutos.
4. lavar en agua corriente.
5. diferenciar en alcohol acido al 1 % durante 5 a 30 segundos.
6. azular en solución acuosa de amoniaco al 2 % durante 5 minutos.
7. lavar con agua corriente.
8. colorear con eosina durante 2 minutos.
9. lavar en agua corriente
10. deshidratar, aclarar y montar.

2.8. Técnica de avidina biotina

1. Después de realizados los cortes se toman y se fijan a una lamina portaobjetos.
2. fijación y remoción de la resina en acetona a temperatura ambiente durante 1 minuto.
3. recuperación de antígeno en baño maria a 90 grados centígrados, con buffer citrato durante 45 minutos.
4. dejar enfriar a temperatura ambiente.
5. bloquear peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 10 %.
6. lavar con TBS tres veces durante 2 minutos cada vez.

7. aplicar suero primario, en este caso el de animales con 120 días de vacunación y como control negativo se aplico suero de animales sin vacunar a otra muestra
8. incubación durante 45 minutos.
9. lavar con TBS.
10. aplicar anticuerpo conjugado con biotina hasta que cubra la muestra (el corte de garrapata) en su totalidad durante 10 minutos,
11. lavar con TBS.
12. aplicar streptavidina hasta que cubra la totalidad del tejido.
13. lavar con TBS.
14. aplicar diaminobencilina para contrastar bajo el microscopio de fluorescencia.
15. lavar con agua corriente.
16. contrastar con hematoxilina 2 minutos.
17. lavar con agua corriente.
18. deshidratar en estufa a 60 grados centígrados durante 7 minutos.
19. aclarar tejido con xilól: se deben realizar tres aclaraciones con 3 minutos de duración cada una.
20. dejar secar a temperatura ambiente.
21. aplicar una gota de cytoresina y cubrir con lamina cubreobjetos.
22. observar bajo el microscopio.

2.9. Controles

En la anterior metodología se utilizaron como control positivo, suero de bovinos inoculados con tres dosis de la vacuna y un refuerzo (anticuerpo primario no marcado), para asegurar un elevado titulo de anticuerpos anti-garrapata en dicho suero.

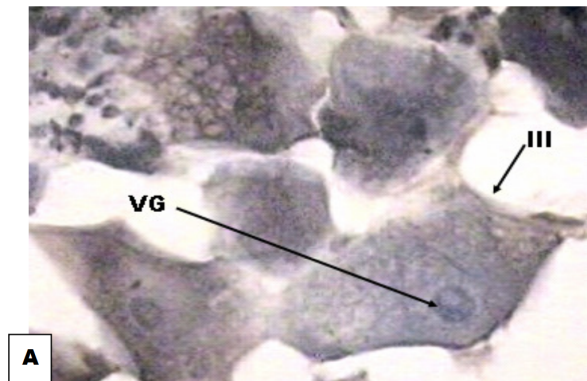
Como control negativo, se utilizo suero de bovinos que no fueron inmunizados (anticuerpo primario no marcado) y por lo tanto este suero no ha de tener anticuerpos anti-garrapata. Aunque se presume que probablemente contenga un titulo muy bajo de anticuerpos contra

garrapata debido a la exposición natural del ganado a estos parásitos en los potreros, y a la respuesta del sistema inmunológico del animal hacia estos ácaros.

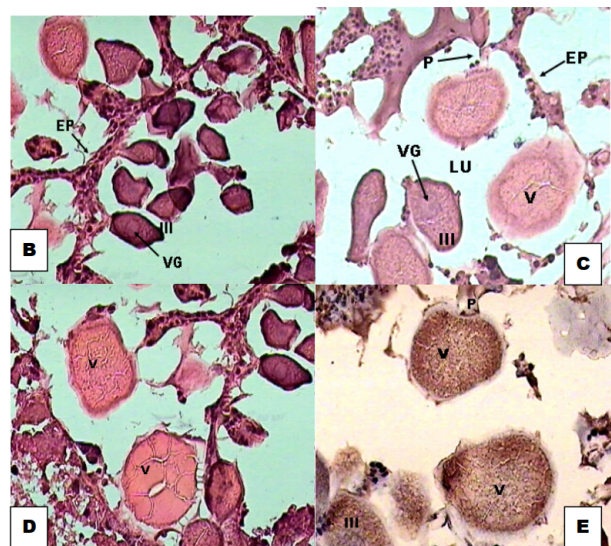
3. Resultados y discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio realizado, en el artículo; PRUEBA DE ESTABLO PARA EVALUAR LA EFECTIVIDAD DE LA VACUNA TICKVAC MK® CONTRA LA GARRAPATA *Boophilus microplus* (Betancourt Antonio, 2005), obtuvieron una inhibición de la oviposición de las garrapatas de 48,88 %, una reducción de la Eclosión de los huevos de 69,02 % y una inhibición de la reproducción de las garrapatas de 74,0 %.

Con nuestro estudio inmunohistoquímico, podemos sustentar los excelentes resultados obtenidos en la prueba de efectividad de la vacuna, ya que las estructuras blanco principales para los anticuerpos producidos por el ganado inmunizado con el cuadro de vacunación completo, fueron las glándulas salivales, el intestino y los oocitos de *B. microplus*, en los últimos estadios del proceso de maduración.



(a) Imagen de oocitos en etapa III, utilizando como control negativo suero de bovinos no inmunizados.
VG: vesícula germinal.



(b) Tinción con hematoxilina y eosina para identificación de estructuras y reacción positiva en oocitos. EP: epitelio del ovario; VG: vesícula germinal; P: pedicel; LU: lumen del ovario; III y V: oocitos en sus diferentes etapas.

Figura 5: Microfotografías de oocitos y estructuras ováricas de *Boophilus microplus*. (A) Imagen de oocitos en etapa III, utilizando como control negativo suero de bovinos no inmunizados. (B–E) Tinción con hematoxilina y eosina para identificación de estructuras y reacción positiva en oocitos tipo III y V. EP: epitelio del ovario; VG: vesícula germinal; P: pedicel; LU: lumen del ovario; III y V: oocitos en sus diferentes etapas.

En la figura A, podemos observar que la identificación de antígenos es casi nula en oocitos tipo III, debido a que esta imagen fue obtenida de cortes de garrapatas procesados utilizando suero de bovinos no inmunizados en nuestro protocolo como control negativo. Por lo tanto se demuestra el nulo o bajo título de anticuerpos en suero de animales no inmunizados con Tick-Vac MK®.

En las fotografías se observa que la reacción inmunohistoquímica positiva más fácilmente identificable por la intensidad del color café, es en las imágenes obtenidas de los oocitos de *Boophilus microplus*. Lo anterior nos indica que los anticuerpos producidos por bovinos vacunados con el inmunógeno Tick-Vac MK®, tienen como blanco principal los ovocitos maduros de *Boophilus microplus*, lo que justifica un 69,02 % en la reducción de la eclosión de los huevos de *B. microplus*.

Se observa en las imágenes que los ovocitos inmaduros son afectados con menor intensidad que los maduros y según el artículo, obtuvieron una inhibición de la oviposición de las garrapatas de 48,88 %. Estos dos resultados, obtenidos de estudios independientes, se deben a que el antígeno poliproteico de la vacuna es obtenido de larvas recién nacidas de *B. microplus*. Por esta razón, la reacción positiva es más intensa en los ovocitos maduros que en los inmaduros, ya que a medida que maduran los ovocitos, se van sintetizando más o nuevas proteínas, lípidos y carbohidratos (antígenos) que formarán parte de las futuras larvas de las cuales es producida la vacuna.

Si observamos detalladamente en la figura G, podemos darnos cuenta que en el epitelio del ovario no hay reacción o identificación de antígenos. Esto nos indica que los anticuerpos producidos por el ganado inmunizado, no están dirigidos a atacar el ovario pero sí a los oocitos en sus diferentes estadios de desarrollo. Este resultado se debe nuevamente, a que la vacuna Tick-Vac MK® está elaborada a partir de larvas de *B. microplus* y la larva en su corta vida hasta el momento de ser procesadas para la elaboración del producto, no han desarrollado ningún tipo de estructura similar al ovario.

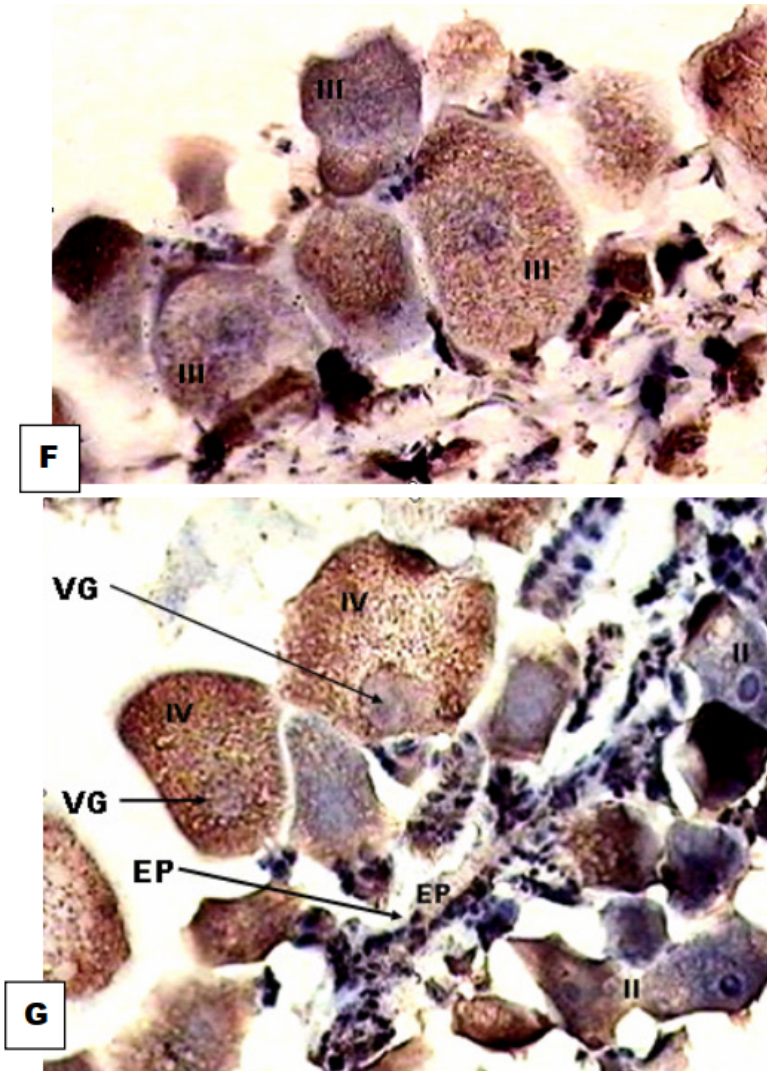


Figura 6: Imágenes de secciones del ovario y oocitos de *Boophilus microplus*. EP: epitelio del ovario; II: oocitos en etapa II; III: oocitos en etapa III; IV: oocitos en etapa IV; VG: vesícula germinal.

Aparte del efectivo efecto de la vacuna demostrado en la reducción de la eclosión y en la inhibición de la oviposición, podemos observar en las imágenes obtenidas, que los anticuerpos producidos por bovinos vacunados también están dirigidos a otras estructuras de las garrapatas como las glándulas salivales.

En los acinos salivales, la reacción no es tan intensa como en los ovocitos, pero se puede observar que si hay una reacción positiva evidenciada por la coloración café del citoplasma de las células acinales.

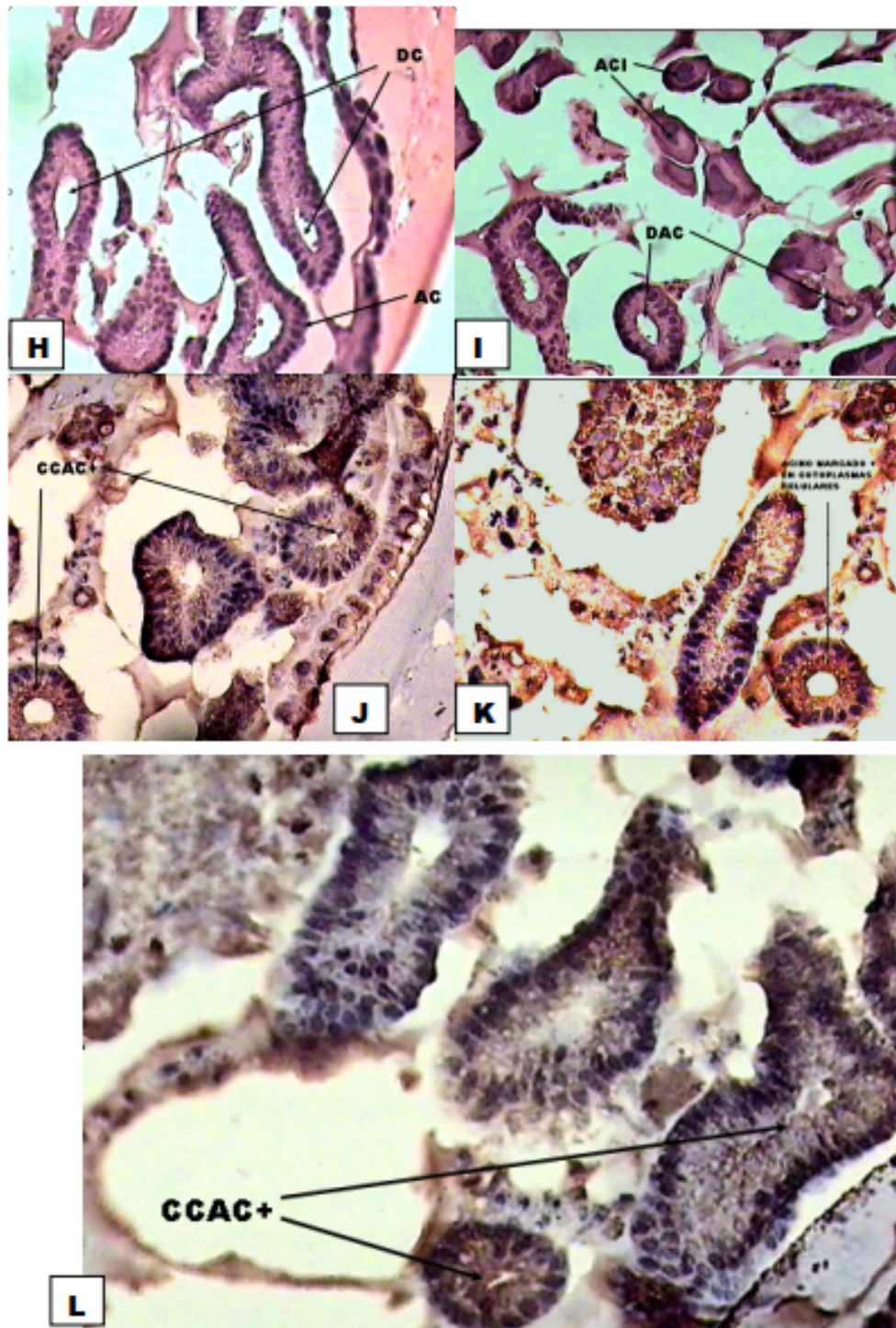


Figura 7: Microfotografías de glándulas salivales de *Boophilus microplus*. H e I: secciones histológicas de acinos salivales. J, K y L: reacción inmunohistoquímica positiva en glándulas salivales. DC: ducto colector; AC: acino; ACI: acino; DAC: ducto acinar; CCAC+: citoplasma de células acinares positivo.

Mientras que el tejido intestinal si demuestra una intensa reacción positiva, podemos ver que el citoplasma se encuentran de color café, y los núcleos celulares están tenuemente azules, resultado que nos evidencia la acción de los anticuerpos producidos por el ganado vacunado dirigido principalmente a estructuras citoplasmáticas de las células intestinales o acinales.

Estos resultados nos indican que el efecto de la vacuna sobre *Boophilus microplus* es bastante amplio y que es de mayor espectro que los productos elaborados en Cuba (Gavac™, Herber Bistec S.A.) y en Australia en 1994 (TickGARD™, Hoeschst Animal Health), ya que estos productos son producidos a partir del antígeno intestinal recombinante Bm86.

Por lo tanto los anticuerpos producidos por el ganado vacunado con los anteriores productos, están dirigidos principalmente contra el intestino de *B. microplus*.

Se han reportado casos de cepas de *B. microplus* como es el caso de la cepa Argentina A, la cual tiene baja susceptibilidad a la inmunización con la vacuna Gavac™, que contiene el antígeno recombinante Bm86, por lo tanto han tenido que investigar en el aislamiento de nuevos antígenos recombinantes como el Bm95, para poder atacar efectivamente cepas de garrapatas con baja susceptibilidad a la inmunización con Bm86 (García J, 2000).

En el caso de Tick-Vac®, es muy difícil que alguna cepa de *B. microplus* pueda crear algún tipo de resistencia, o manifieste baja susceptibilidad al producto debido a la misma naturaleza poliproteica del antígeno, ya que si la cepa Argentina A es poco susceptible a la inmunización con Bm86, muy probablemente no lo sea contra la totalidad de anticuerpos producidos contra la gran variedad de antígenos obtenidos de un pool de larvas de *B. microplus*. Este hecho posibilita el uso del producto, para el control de otras especies de *Boophilus* sp.

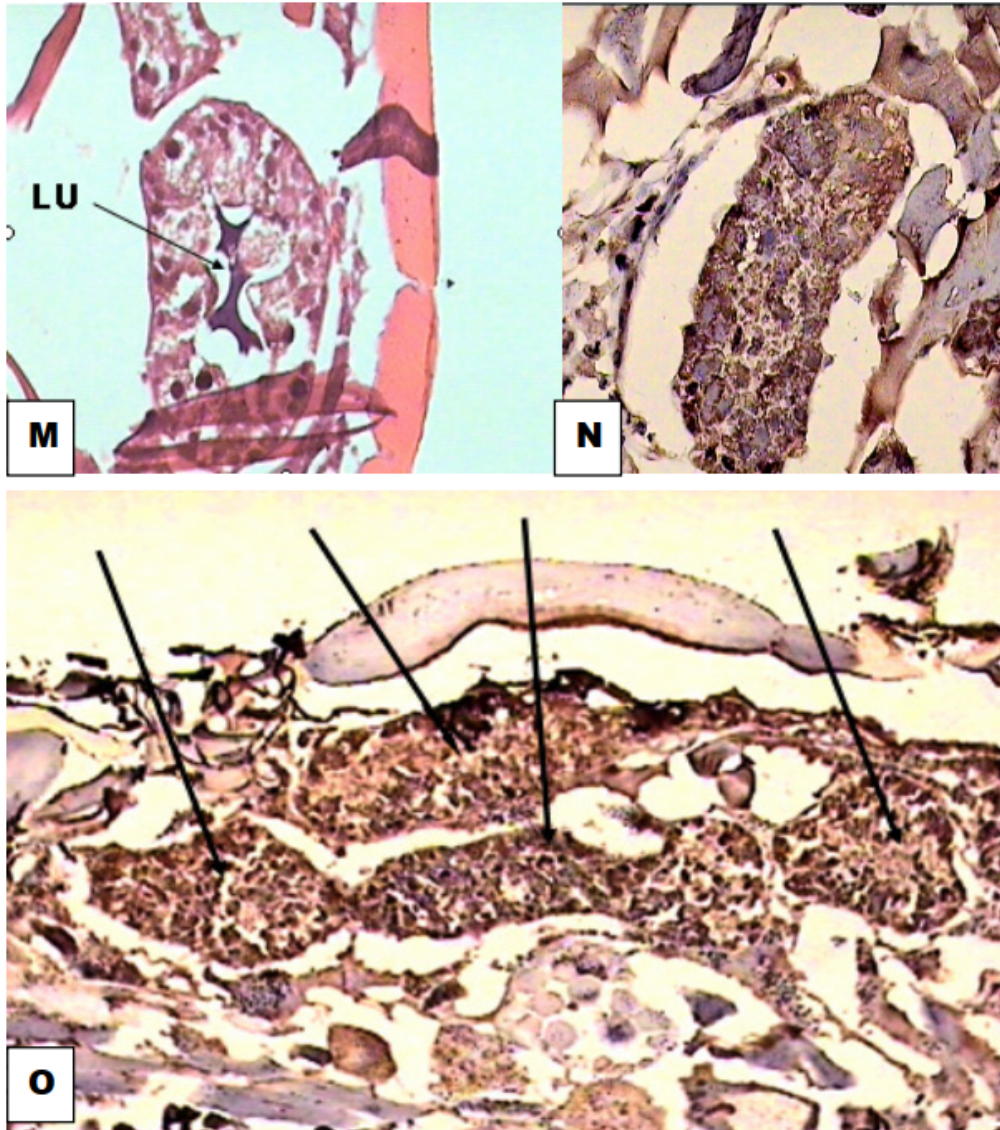


Figura 8: Microfotografías de intestino de *Boophilus microplus*. M: tinción de hematoxilina y eosina en corte transversal del intestino; LU: lumen intestinal. N: inmunoperoxidasa en corte transversal del intestino. O: inmunoperoxidasa en corte longitudinal de *Boophilus microplus*; las flechas señalan el intestino.

4. Conclusiones

- Se identificaron órganos como glándulas salivales, intestino y los oocitos en los últimos estadios de desarrollo, como las principales estructuras blanco para los anticuerpos antigarrapata en bovinos inducidos por el inmunógeno Tick-Vac MK[®] mediante la técnica de inmunoperoxidasa.
- Se estandarizó un protocolo de fijación, deshidratación, inclusión y corte de tejidos ricos en quitina.
- Se logró estandarizar técnica inmunohistoquímica como la inmunoperoxidasa, utilizando un anticuerpo biotinilado anti-inmunoglobulina G bovina, para la localización de antígenos en cortes de garrapata.
- Se justificó la eficacia de Tick-Vac MK[®], en la reducción de infestaciones por *Boophilus microplus*.
- Se demostró el mecanismo de acción de la vacuna para causar una inhibición de la oviposición de las garrapatas de 48,88 %, reducción de la eclosión de los huevos de 69,02 % y una inhibición de la reproducción de las garrapatas de 74,0 %.