LEIDIANE LIMA DUARTE

Cultura de células embrionárias de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* para cultivo de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale*

São Paulo

2017

LEIDIANE LIMA DUARTE

Cultura de células embrionárias de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* para cultivo de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Darci Moraes Barros Battesti

De acordo:

Orientador

São Paulo

2017

VERSÃO CORRIGIDA

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3437
FMVZ

Duarte, Leidiane Lima
Cultura de células embrionárias de carrapatos do gênero Rhipicephalus para cultivo de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale*. / Leidiane Lima Duarte. -- 2017.
94 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Darci Moraes Barros Battesti.

1. *Rhipicephalus sanguineus s.l.* 2. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 3. Culturas de células embrionárias. 4. *Ehrlichia canis*. 5. *Anaplasma marginale*. I. Título.

São Paulo, 03 de julho de 2017
CEUAx N 1300090415

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Darci Moraes Barros Battesti
Área: Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal
Darci Moraes Barros Battesti (orientador)

Título do projeto: "Cultura de células embrionárias de Rhipicephalus sanguineus (Latreille) (Acari: Ixodidae), de origem temperada, para cultivo de Ehrlichia canis".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, **ANALISOU** e **APROVOU** a Notificação (versão de 26/maio/2017) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: ", anteriormente intitulado: "Cultura de células embrionárias de Rhipicephalus sanguineus (Latreille) (Acari: Ixodidae), de origem temperada, para cultivo de Ehrlichia canis " alterado para "Cultura de células embrionárias de carrapatos do gênero Rhipicephalus para cultivo de Ehrlichia canis e Anaplasma marginale". A mudança ocorrida foi necessária para agregar importantes resultados obtidos em estudos paralelos realizado com a espécie Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Dessa forma, pretendemos apresentar resultados mais completos. Além disso, a aluna Leidiane Lima Duarte necessita adiantar a data da defesa de sua dissertação do mestrado, pois foi aprovada em um processo seletivo no qual deverá ingressar no início do próximo semestre. ".

Comentários da CEUA: "Pesquisador responsável solicita alteração do título do projeto de pesquisa para se adaptar com novos resultados obtidos em pesquisas paralelas: "Cultura de células embrionárias de Rhipicephalus sanguineus (Latreille) (Acari: Ixodidae), de origem temperada, para cultivo de Ehrlichia canis " alterado para "Cultura de células embrionárias de carrapatos do gênero Rhipicephalus para cultivo de Ehrlichia canis e Anaplasma marginale".".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

São Paulo, 4th July 2017

CERTIFIED

We certify that the Research "Culture of embryonic cells of Rhipicephalus sanguineus (Latreille) (Acari: Ixodidae), temperate origin, for cultivation of Ehrlichia canis", protocol number CEUAx 1300090415, under the responsibility Darci Moraes Barros Battesti, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day August 19, 2015.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Cultura de células embrionárias de Rhipicephalus sanguineus (Latreille) (Acari: Ixodidae), de origem temperada, para cultivo de Ehrlichia canis", protocolado sob o CEUAx nº 1300090415, sob a responsabilidade de Darci Moraes Barros Battesti, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 19 de agosto de 2015.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Lima-Duarte, Leidiane

Título: Cultura de células embrionárias de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* para cultivo de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Dedico esta dissertação á minha família

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por sustentar-me diariamente.

A minha orientadora Darci Moraes Barros Battesti pela oportunidade em ter me aceito como aluna. Agradeço sua dedicação e apoio ao longo desses anos, sendo responsável pelo meu crescimento pessoal e profissional, demostrando sempre sua generosidade e companheirismo.

A minha mãe Antônia Azevedo Lima Duarte, que sempre foi um exemplo de força e coragem para mim. Serei eternamente grata por todo seu amor.

A minha doce irmã Sophia Natiele Lima de Jesus, que me incentiva a ser alguém melhor.

Ao meu companheiro e melhor amigo Marco Antonio Caires Santana, por estar sempre ao meu lado, por toda sua paciência, carinho e incentivo.

Aos pesquisadores Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna e Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó que me cederam os carrapatos.

A Prof. Dr. Rosângela Machado Zacarias por me ceder as cepas de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale*.

A Daniella Aparecida Franze, agradeço imensamente tudo que você me ensinou.

Ao Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça, pelo auxilio em alguns momentos dessa dissertação.

Ao Dr. Diego Garcia Ramirez e Jairo Alfonso Mendoza Roldan, pela ajuda na confirmação da identidade celular.

A Gabrielle Ribeiro de Andrade, por estar sempre disposta a me ouvir; pelos e-mails trocados, pela revisão deste trabalho, pela ajuda para preparar a curva de crescimento celular. Expresso aqui minha imensa admiração e meu respeito por você.

A todos que contribuíram de alguma forma nessa longa jornada, em especial: Dr. Felipe S. Krawczak, Juliana Cuoco Badari, Ricardo Bassini Silva e Camila Dias.

Aos meus colegas do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan: Felipe Gomez, Dr. Simone Michaela Simons, Mercedes Reyes e Leonor Rodrigues De Souza.

A minha segunda família: Midian, Izabela, Ana Maria, Ronaldo, Giovanna, Mirely Mesack, Mirian, Miqueias e Mizia, vocês possuem um lugar especial no meu coração.

Ao Danival Lopes Moreira, pelo auxilio nos momentos difíceis, e pela sua prontidão e bondade.

Aos funcionários da secretaria de Pós-graduação do VPS.

Aos órgãos de financiamento, FAPESP pelo auxílio financeiro que permitiu a realização desse trabalho, e CAPES pela bolsa de Mestrado.

“A persistência é o menor caminho do êxito” (Charles Chaplin)

RESUMO

LIMA-DUARTE, L. **Cultura de células embrionárias de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* para cultivo de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale***. [Embryonic cell culture of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae), of temperate origin, for *Ehrlichia canis* culture.].2017. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

No Brasil, carrapatos do gênero *Rhipicephalus* são representados pelas espécies *Rhipicephalus sanguineus s.l.* (Latreille) e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini), sendo que a primeira espécie possui especificidade com cães domésticos e a segunda com bovinos. Para o cão, *R. sanguineus* s.l. é o principal vetor de agentes causadores da babesiose canina e da erliquiose, enquanto que nos bovinos, *R. microplus* é responsável, principalmente, pela transmissão de agentes causadores da babesiose e anaplasmose. Alguns dos patógenos causadores dessas doenças são difíceis de serem cultivados *in vitro*, e não crescem em meios artificiais, especialmente *Anaplasma* spp. Assim, muitas linhagens celulares de carrapatos foram desenvolvidas nos últimos 40 anos e têm sido amplamente utilizadas para isolamento e propagação de microrganismos patogênicos. Cultivos celulares obtidos de células embrionárias de carrapatos oferecem um sistema de vetor *in vitro*, que é útil principalmente para estudos de agentes intracelulares. Dessa forma, a obtenção de culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* (origens tropical e temperada) e de *R.* (*B.*) *microplus*, bem como, sua infecção com *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale*, respectivamente, são objetivos do presente estudo. Os cultivos celulares dessas espécies de carrapatos foram preparados com massas de ovos de diferentes idades e mantidos à 30 °C em meio de cultura L15-B, suplementado com 10% de Triptose Fosfato e 20% de Soro Fetal Bovino. Subcultivos foram realizados após a formação da monocamada celular confluente. As identidades celulares foram confirmadas pela PCR e sequenciamento, utilizando um fragmento do gene mitocondrial 16S rDNA. As sequências das culturas de células de *R. sanguineus* (tropical e temperada) e de *R. microplus* foram depositadas no GenBank. Essas culturas de células foram infectadas com *E. canis* e *A. marginale* (cepas Jaboticabal), respectivamente, e mantidas em meio L-15B (Vitrocell) suplementado com Soro Fetal Bovino enriquecido com ferro (Hyclone) nas concentrações de 2% e 5%. As células infectadas foram mantidas em propagações sucessivas até a terceira passagem, para novas culturas de células não infectadas, sendo então criopreservadas. O DNA extraído das células infectadas e não infectadas de *R. sanguineus* (de ambas as origens) e de *R. microplus* , foi analisado pela PCR quantitativa em

tempo real (qPCR), utilizando os genes *E. canis-dsb* e *msp1β*, respectivamente. Propagações de células de carrapatos infectadas para as novas culturas de *R. sanguineus* (origem tropical) e *R. (B) microplus*, foram bem-sucedidas. Por outro lado, as células de *R. sanguineus* (origem temperada) não se tornaram infectadas no presente estudo.

Palavras-chave: *Rhipicephalus sanguineus* s.l., *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, culturas de células embrionárias, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma marginale*

ABSTRACT

DUARTE, L.L. **Embryonic cell culture of ticks of the genus *Rhipicephalus* for cultivation of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma marginale***. [Cultura de células embrionárias de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* para cultivo de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale*]. 2017. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

In Brazil, ticks of the genus *Rhipicephalus* are represented by the species *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Latreille) and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini), being that the first one has specificity with domestic dogs and the second with cattle. For dogs, *R. sanguineus* s.l. is the main vector of causative agents of canine babesiosis and ehrlichiosis, whereas in cattle, *R. microplus* is responsible, mainly, for the transmission of agents that cause babesiosis and anaplasmosis. Some of the pathogens that cause these diseases are difficult to grow *in vitro*, and do not grow on artificial media, especially *Anaplasma spp*. Therefore, many tick cell lines were developed in the last 40 years and have been used for the isolation and propagation of pathogenic microorganisms. Cell cultures obtained from embryonic tick cells offer an *in vitro* vector system, which is mainly useful for studies of intracellular agents. The aim of the present study was to obtain cultures of *R. sanguineus* (tropical and temperate lineages), *R. microplus* embryonic cells, and their infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma marginale*. Cell cultures from the tick species were prepared with egg masses of different ages and kept at 30 ° C in L15-B culture medium supplemented with 10% Tryptose Broth and 20% Fetal Bovine Serum. Subcultures were done after confluent cell monolayer formation. Cellular identities were confirmed by PCR and sequencing using a 16S rDNA mitochondrial gene fragment. Sequences of *R. sanguineus* (tropical and temperate) and *R. microplus* cell cultures were deposited on GenBank. These cell cultures were infected with *E. canis* and *A. marginale* (Jaboticabal strains), respectively, and maintained in L-15B medium and Fetal Bovine Serum with iron (Hyclone) supplemented at 2% and 5% concentrations. The infected cells were maintained in successive propagations until the third passage, to new cultures of uninfected cells, and then were cryopreserved. DNA extracted from infected and uninfected *R. sanguineus* (both origin) and *R. microplus* cells was analyzed by quantitative real-time PCR (qPCR) using the *E. canis*-dsb and msp1β genes,

respectively. Propagations of infected tick cells to the new cultures of *R. sanguineus* (tropical origin) and *R. microplus*, were successful. On the other hand, the *R. sanguineus* cells (temperate origin) did become infected in the present study.

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus* s.l., *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, embryonic cell culture, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma marginale*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1.1- Linhagens de células de carrapatos estabelecidas 28

Figura 2.1- Cultivos primários e 1º subcultivo de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus*(origem tropical) 39

Figura 2.2- Cultivos primários de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus*(origem temperada) 40

Figura 2.3-Cultivo primário e 1º subcultivo de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem temperada) 41

Figura 2.4- Massas de ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (linhagem temperada) com diferentes idades e culturas 42

Figura 2.5-: Ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (linhagem temperada) com 16 dias de idade e culturas 43

Figura 2.6- Microscopia eletrônica de transmissão e Microscopia óptica de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem tropical), infectadas com *E. canis*. 44

Figura 2.7 Microscopia eletrônica de transmissão de culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem tropical), infectadas com *E. canis*. 45

Figura 3.1- Cultivos de células embrionárias de *R.* (*B.*) *microplus* 67

Gráfico 3.2- Curva de crescimento de células embrionárias de *R. (B) microplus* no 8º subcultivo 68

Gráfico 3.3- Gráfico de tendência linear 69

Figura 3.4- Microscopia Eletrônica de Transmissão de culturas de Célula embrionárias de *R.(B.) microplus* infectadas com bactérias *A. marginale*. 70

Figura 3.5-: Fotomicrografias ópticas de culturas de células embrionárias de R. (B) microplus infectadas com *A. marginale*, coradas com Panótico rápido 71

LISTA DE ABREVIAÇÕES

R. sanguineus: *Rhipicephalus sanguineus*

R. (B.) microplus**:** *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

E. canis: *Ehrlichia canis*

A. marginale: *Anaplasma marginale*

L-15: Leibovitz

BOD: Biological oxygen demand

SFB: Soro Fetal Bovino

PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase

qPCR: PCR quantitativa em tempo real

DMSO: Dimetil Sulfóxido

EMC: Erliquiose Monocítica Canina

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

s.s: Senso stricto

s.l.: Sensu lato

TPB: Triptose fosfato

DH82: células histiocitárias de cães, linhagem originária de monócitos caninos,

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MIQE: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR

SPG: Sacarose-fosfato-glutamato

BOD: Inubadora Biological Oxygen Demand incubator

MIQE: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

USP: Universidade de São Paulo

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

P1: primeiro subcultivo

P2: segundo subcultivo

P3: terceiro subcultivo

LISTA DE SIMBOLOS

% Porcentageme

µm Micrometro

mm Milimetro

µl Microlitro

g Gramas

Mg Miligrama

Min Minuto

ml Mililitro

Pb Pares de bases

Rpm Rotação por minuto

x*g* Força G

nm Nanômetro

µg Micrograma

ºC Grau Celsius

µmax: Taxa máxima de crescimento específica

Td (h^{-1}) Tempo de duplicação

µ Taxa de crescimento específica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20

1.1 *Rhipicephalus sanguineus*s.l (Latreille, 1806), ... 20

1.2 Rhipicephalus (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1887) 22

1.3 Linhagens de células de carrapatos 24

1.4 Aplicabilidade 26

1.5 Justificativa 28

1.6 Objetivo 28

1.6.1 Geral 28

1.6.2 Específicos 28

1.7 Apresentação dos capítulos 29

2. CAPÍTULO I PADRONIZAÇÃO DE CULTIVO DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE *Rhipicephalus sanguineus*(ACARI: IXODIDAE) E SEU USO PARA CULTIVO DE *Ehrlichia canis*. 30

2.1 Introdução 31

2.2 Material e métodos 32

2.2.1 Origem dos carrapatos 32

2.2.2 Desinfecção das fêmeas 33

2.2.3 Cultivos primários 33

2.2.4 Subcultivos 34

2.2.5 Criopreservação e descongelamento 34

2.2.6 Confirmação da identidade celular 35

2.2.7 Infecção das culturas primárias de células embrionárias de *R. sanguineus* (linhagem tropical e temperada) 36

2.2.8 PCR em tempo real 36

2.2.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão 37

2.3 Resultados 38

2.4 Discussão 45

2.5 Conclusão 49

Referências 50

Anexo A- Protocolo do Meio L15B 55

Anexo B- Preparação do gel de agarose 1% 56

3. CAPÍTULO II PADRONIZAÇÃO DE CULTIVO DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* E SEU USO PARA CULTIVO DE *Anaplasma marginale* **57**

3.1 Introdução 58

3.2 Material e métodos 59

3.2.1 Origem dos carrapatos 59

3.2.2 Desinfecção das fêmeas de *R. (B) microplus* 59

3.2.3 Cultivos primários 60

3.2.4 Subcultivos 61

3.2.5 Criopreservação e recuperação das culturas 62

3.2.6 Confirmação da identidade celular 63

3.2.7 Infecção das culturas primárias de células embrionárias de *R. microplus* com *A. marginale* (cepa Jaboticabal) 64

3.2.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão 65

3.3 Resultados 65

3.4 Discussão 65

3.5 Conclusão 74

Referências 75

Anexo A- Protocolo do Meio L15B 79

Anexo B- Preparação do gel de agarose 1% 80

4. CONCLUSÃO GERAL 81

REFERÊNCIAS 82

1. INTRODUÇÃO

Atualmente são catalogadas mais de 900 espécies de carrapatos agrupadas na ordem Ixodida (Metastigmata), incluídas nas famílias Ixodidae, “carrapatos duros”, apresentando aproximadamente 722 espécies, Argasidae, “carrapatos moles”, com 208 espécies, e Nuttalliellidae, família representada por uma única espécie, *Nuttalliella namaqua* Bedford, 1931. Os gêneros compreendidos na família Ixodidae são: *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* e *Rhipicephalus*. Aqueles que pertencem à família Argasidae são: *Argas*, *Antricola*, *Nothoaspis*, *Ornithodoros* e *Otobius* (GUGLIELMONE et al., 2010; NAVA et al., 2017).

No Brasil, até a presente data, a fauna ixodológica é de 70 espécies, composta por 46 Ixodídeos e 24 Argasídeos (KRAWCZAK et al., 2015; WOLF et al., 2016) distribuída em nove gêneros: *Antricola*, *Argas*, *Ornithodoros*, *Nothoaspis*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus* (MARTINS et al., 2013; NAVA et al., 2017).

O gênero *Rhipicephalus* KOCH, 1844 compreende 84 espécies no mundo, incluindo cinco espécies do subgênero *Boophilus* (GUGLIELMONE et al., 2010; HORAK et al., 2013). No Brasil, esse gênero está representado pelas espécies *Rhipicephalus sanguineus s.l.* (Latreille, 1806) e *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1887), a primeira é parasita de cães e responsável pela babesiose e ehrlichiose canina, enquanto que a segunda parasita os bovinos e transmite os agentes da babesiose e anaplasmose bovina.

1.1 *Rhipicephalus sanguineus*s.l (Latreille, 1806),

A espécie *R. sanguineus* s.l., inicialmente nomeada como *Ixodes sanguineus*, é conhecida popularmente como carrapato marrom do cão, possui alta capacidade adaptativa a diversas condições climáticas e conjuntos ecológicos que permitem sua ampla distribuição nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas (FLECHTMANN, 1973; DANTAS-TORRES, 2008).

O hospedeiro natural de *R. sanguineus* é o cão doméstico e as populações caninas são as principais fontes de manutenção destes parasitos no ambiente (DANTAS-TORRES, 2008; SERRA-FREIRE, 2009). Entretanto, estes carrapatos podem eventualmente parasitar outros hospedeiros, inclusive humanos (DANTAS-TORRES et al., 2006; LOULY et al., 2006).

Para completar seu ciclo de vida *R. sanguineus* s.l. necessita de três hospedeiros, podendo haver de 2 a 3 gerações por ano (GUGLIELMONE et al. 2006).

O carrapato *R. sanguineus* sensu stricto (s.s.), é a espécie mais controversa do complexo "*R. sanguineus*" que inclui 17 espécies (WAKLER et al., 2000; NAVA et al., 2014; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015).

A origem de *R. sanguineus* s.s. é duvidosa, uma vez que o espécime tipo foi perdido. Hoogstraal (1956) considerou que o *R. sanguineus* s.s. é uma espécie africana, enquanto Feldman-Muhsam (1967), Morel e Vassiliades (1963) e Pomerantsev et al. (1940) a consideraram uma espécie do Mediterrâneo.

Durante a última década, alguns estudos biológicos (SZABÓ et al., 2005), morfológicos (OLIVEIRA et al.,2005; SANCHES et al., 2016) e moleculares (SZABÓ et al., 2005; BURLINI et al., 2010; MORAES-FILHO et al., 2010; NAVA et al., 2012), indicaram que o táxon *R. sanguineus* é composto por mais de uma espécie.

Moraes-Filho et al. (2011) realizaram uma análise filogenética através do gene 16S, e os resultados demostraram a existência de no mínimo dois "grupos" de *R. sanguineus* na América Latina.

Nava et al. (2012) realizaram análise genética de sequências do gene rDNA mitocondrial 16S e 12S de *R. sanguineus*, e os resultados filogenéticos revelaram dois haplótipos, sendo denominados como "Linhagem sul ou temperada" (parte da Argentina, Uruguai, Chile, Itália, e sul do Brasil) e "Linhagem norte ou tropical", para as populações de *R. sanguineus* das regiões tropicais e subtropicais (Brasil com exceção do sul do Rio Grande do Sul, Paraguai, Colômbia, África do Sul, Moçambique e Norte da Argentina).

A espécie *R. sanguineus* s.l. está envolvida no ciclo epidemiológico de agentes que provocam diferentes doenças em cães e em seres humanos, atuando como vetores biológicos e mecânicos, transmitindo vírus, bactérias e protozoários (PAROLA et al., 2005; OTRANTO et al., 2009; BOWMAN et al., 2011).

As principais doenças transmitidas por *R. sanguineus* s.l. aos cães são a Babesiose, causada por *Babesia vogeli* e a Ehrliquiose Monocítica Canina (EMC) causada por *Ehrlichia canis* (DANTAS-TORRES, 2008; CHAO et al., 2015). A EMC constitui-se em uma das doenças infecciosas de cães mais importantes no Brasil (VIEIRA et al., 2011).

As espécies de Ehrlichia estão compreendidas na ordem Rickettsiales e pertencem à família Anaplasmataceae (Dumler et al., 2001; Paddock e Childs, 2003).

A doença é caracterizada por manifestações clínicas multissistêmicas, que variam na intensidade de acordo com as fases da doença: aguda, assintomática (subclínica) e crônica. Os sintomas da doença EMC incluem trombocitopenia, leucopenia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (Banaeth et al., 2009), febre, depressão e epistaxe (Harrus et al., 1999).

Após um período de incubação de 8 a 20 dias, o agente se multiplica nos órgãos do sistema mononuclear fagocítico (fígado, baço e linfonodos). Logo, na fase aguda, a infecção acarreta uma hiperplasia linforeticular com posterior inflamação (COSTA et al., 2015).

Até recentemente, pensava-se que *E. canis* infectasse apenas caninos. Porém, em 1994, a bactéria foi isolada e molecularmente caracterizada a partir de amostras de sangue de humanos assintomáticos na Venezuela (PEREZ et al., 1996). Em 2006, *E. canis* foi detectada em pacientes humanos com sinais clínicos compatíveis com erliquiose (PÉREZ et al., 2006). Mais recentemente, Bouza-Moura et al. (2017) detectaram DNA de *E. canis* em amostras obtidas do banco de sangue da Costa Rica, país onde a EMC é endêmica.

No Brasil, embora ainda não tenha sido detectado DNA de *E. canis* em humanos, anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. foram obtidos em pacientes com sintomatologia clínica compatível com erliquiose humana (CALIC et al., 2004; COSTA et al., 2006). Desde então, *E. canis* é considerada por alguns autores como um agente potencial de doenças humanas em áreas endêmicas para EMC, causada por essa bactéria (NICHOLSON et al., 2010).

Na América Latina, ficou demonstrado que a EMC ocorre nas áreas tropicais, enquanto que nas áreas temperadas, os carrapatos não são suscetíveis à bactéria. Então, essas diferenças taxômicas das populações de *R. sanguineus* também refletem a situação da EMC na América do Sul (CICUTTIN et al., 2015; MORAES-FILHO et al., 2015).

A bactéria *E. canis*, tem sido cultivada em células de carrapatos, predominantemente na linhagem celular de *Ixodes scapularis* Say, 1821 (ISE6) (BELL-SAKYI et al., 2007). Porém, outras linhagens celulares, como as de *Dermacentor variabilis* (SAY, 1821), *Hyalomma anatolicum* (KOCH, 1844), *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), *R. appendiculatus*, *Rhipicephalus evertsi* (NEUMANN, 1897) e *R. microplus* também suportam o crescimento de *E. canis* (FERROLHO et al., 2016).

1.2 Rhipicephalus (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1887)

A espécie *R. microplus*, conhecida popularmente como “carrapato do boi”, tem ampla distribuição geográfica, tendo se adaptado a diferentes regiões do mundo, juntamente com seu hospedeiro (principalmente bovinos), devido às importações.

Inicialmente esta espécie era citada como *Boophilus microplus*, porém, estudos moleculares e morfológicos, comprovaram sua relação filogenética com o gênero *Rhipicephalus*, ficando *Boophilus* na posição subgenérica (MURRELL; BARKER, 2003).

Apesar da disseminação de *R. microplus* não ser bem documentada, a espécie é possivelmente originária da India (HOOGSTRAL, 1986). A introdução de *R. microplus* no Brasil, ocorreu entre os séculos XVI e XVII (BARRÉ; UILENBERG, 2010).

É um carrapato monoxeno que tem bovinos como principais hospedeiros, podendo ser eventualmente encontrado em outros animais domésticos e em alguns ungulados silvestres (FURLONG, 2005). O ciclo de vida de *R. microplus* ocorre praticamente sobre o hospedeiro; e a fase de vida livre restringe-se às fêmeas alimentadas e as larvas em jejum. As condições climáticas (temperatura do ar e pluviosidade), e o grau de resistência do hospedeiro são fatores que influenciam a duração do ciclo de vida do carrapato e, também, no peso das teleóginas (OLIVEIRA et al. 1974; ROCHA, 1984; LEMOS, et al., 1985).

Durante o ano podem ocorrer de 3 a 4 gerações de carrapatos, porém, somente 1 a 2% dessa população alcança a fase adulta, isto por causa de predadores como insetos, fungos, aves e bactérias (GONZÁLES, 1993).

A espécie *R. microplus* é considerada um dos ectoparasitos que mais acarretam impacto econômico em áreas tropicais (JONSSON, 2006). Altas infestações propiciam grandes perdas para bovinocultura, resultando em prejuízos anuais de bilhões de dólares na pecuária nacional (MARTINEZ et al., 2006; RODRIGUES et al., 2014; MILKPOINT, 2017). Tais prejuízos estão associados, principalmente, à ingestão de sangue que afeta a produção de carne e leite, à transmissão de agentes infecciosos, à inoculação de toxinas nos hospedeiros, gerando diversas alterações e consequências como a inapetência alimentar. Grandes infestações também reduzem a qualidade do couro do animal, devido às cicatrizes geradas durante a alimentação (HORN, 1983; FURLONG, 1993; KLAFKE et al., 2006). Este carrapato é responsável por transmitir os patógenos das enfermidades que integram o complexo “Tristeza Parasitária Bovina” (TPB), que incluem os protozoários do gênero *Babesia* e bactérias do gênero *Anaplasma* (DE LEÓN et al., 2010).

A espécie *R. microplus* é endêmica, e as evidências epidemiológicas indicam que ela é a principal vetora de *Anaplasma marginale* (GUGLIELMONE, 1995, KESSLER, 2001; DE CAMPOS-PEREIRA et al., 2008).

Anaplasma marginale é o agente etiológico da anaplasmose bovina. Sua transmissão pode ser realizada tanto pelo carrapato *R. microplus*, como também por vetores mecânicos, tais como os insetos hematófagos *Stomoxys calcitrans*, tabanídeos e culicídeos (ARTECHE et.al., 1992; OLIVEIRA et al., 2003; CARELLI et al., 2007 AUBRY; GEALE, 2011). No entanto, estudos demonstraram que a transmissão biológica feita por carrapatos é pelo menos duas vezes mais eficiente que a transmissão mecânica feita pela mosca de estábulo (SCOLES et al., 2005).

A anaplasmose bovina é responsável por causar grandes perdas econômicas, principalmente, em países de clima tropical e subtropical, com alta morbidade e mortalidade em bovinos (BARROS et al., 2005; JÚNIOR et al., 2008; KOCAN et al., 2010).

A bactéria *A. marginale,* tem sido cultivada em linhagens de células de carrapatos, como *I. scapulares* (ISE6-IDE8), *Ixodes ricinus* (IRE/CTVM18) e em células do vetor *R. microplus* (BME26) (MUDERLOH et al.,1996; BLOUIN et al., 2003; MUDERLOH et al.,2004; ZWEYGARTH et al.,2006; BASTOS et al., 2009; ESTEVES et al., 2009; VILLAR et al., 2010; AYLLON et al., 2013).

1.3 Linhagens de células de carrapatos

O cultivo de células consiste em processos de isolamento e manutenção da viabilidade e da proliferação das células de um determinado tecido (animal ou vegetal) em um sistema *in vitro* constituído de nutrientes e fatores essenciais à sobrevivência, sob condições de temperatura, pH e osmolaridade controladas (DO AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011). A cultura celular é basicamente dividida em dois grandes grupos: culturas primárias, as quais são obtidas diretamente de tecidos, são heterogêneas, mantém-se pouco tempo em cultura e são mais propícias ao desenvolvimento de contaminações; e linhagens celulares, que são obtidas a partir de culturas primárias, podem ser células imortalizadas (devido a alterações genéticas), apresentam crescimento rápido e contínuo e proliferação ilimitada ou limitada a um número elevado de divisões celulares (COIMBRA, 2008).

Alguns dos agentes patogênicos transmitidos por picadas de carrapatos são muito difíceis de serem cultivados em meios de cultura artificiais. Dessa forma, linhagens contínuas

de células a partir de várias espécies de carrapatos ixodídeos e argasídeos já foram estabelecidas e representam uma ferramenta muito útil para o isolamento e propagação de patógenos. Apesar de existir aproximadamente 900 espécies de carrapatos mundialmente conhecidas, há relativamente poucas linhagens celulares de carrapatos estabelecidas até o momento (BELL-SAKYI et al., 2007).

As tentativas de cultivar células de carrapatos datam de mais de 50 anos. A primeira tentativa foi realizada por Weyer (1952), que obteve células a partir de tecidos de *Rhipicephalus bursa* Canestrini & Fanzago, 1878; no entanto, o cultivo durou apenas oito dias. Embora alguns avanços tenham ocorrido desde a primeira tentativa, o sucesso do cultivo de células de carrapato *in vitro* se limitava às culturas primárias. Contudo melhorias na metodologia possibilitaram o estabelecimento da primeira linhagem celular de tecido de carrapato (ninfa) da espécie *Rhipicephalus Appendiculatus* Neumann, 1901 (VARMA et al., 1975).

Linhagens de células foram estabelecidas a partir de carrapatos dos gêneros *Rhipicephalus* (VARMA et al., 1975, KURTTI et al., 1982, PUDNEY et al., 1979, HOLMAN; RONALD, 1980), *Dermacentor* (BHAT e YUNKER, 1977; YUNKER et al., 1981; KURTTI et al., 1983), *Hyalomma* (BELL-SAKYI et al., 2007), *Ixodes* (MUNDERLOH et al.,1994; KURTTI et al.,1996; SIMSER et al., 2002; LAWRIE et al., 2004; BELL-SAKYI, 2004), *Ornithodoros* (KURTTI et al., 2005; BELL-SAKYI et al., 2009) e *Amblyomma* (BELL-SAKYI et al., 2000; BELL-SAKYI, 2004; KURTTI et al., 2005; SINGU et al., 2006; CIRELLI-MORAES, 2015).

As linhagens de células de *R. microplus* e *R. sanguineus* já foram estabelecidas há mais de 20 anos (HOLMAN; RONALD, 1980; KURTTI et al.,1988; MUNDERLOH; KURTTI, 1989; COSSIO-BAYUGAR et al., 2002; BELL-SAKYI,2004).

No Brasil, a primeira linhagem celular estabelecida com sucesso foi da espécie *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (IBU/ASE-16) (CIRELLI-MORAES, 2015), cujo método resultou em patente internacional (PCT/BR2016/0501901).

Atualmente existem mais de 40 linhagens de células de carrapatos de diferentes espécies, 14 Ixodidae e uma de Argasidae (Quadro 1.1). A maioria está depositada no Instituto Pirbright, Surrey (Reino Unido), no banco denominado Biobank (https://www.pirbright.ac.uk/search?keywords=biotick;type=All).

1.4 Aplicabilidade

As culturas de células de carrapatos oferecem um simplificado sistema de vetor *in vitro*, agregando maior conhecimento sobre a biologia e a interação hospedeiro-vetor-patógeno. São também utilizadas para análises genéticas e proteômicas (BELL-SAKYI et al. 2007).

Há mais de 30 anos, as linhagens celulares de *R. appendiculatus* são utilizadas para propagação de arbovírus (VARMA et al., 1975; VARMA, 1989; PUDNEY, 1987). E linhagens celulares de outras espécies de carrapatos também foram aplicadas com sucesso para propagar outros patógenos (LAWRIE et al.,2004; GARCIA et al.,2005; BELL-SAKYI et al. 2016).
Propagação de agentes patogênicos como *Ehrlichia*, *Rickettsia* e *Anaplasma* já foram realizadas em linhagens de células de carrapatos, entre os quais, a bactéria *A. marginale* tem sido mais estudada (MUNDERLOH et al.,1996; BLOUIN et al., 2002). A linhagem celular de *R. appendiculatus* (RAE25) também foi utilizada para propagação de *Rickettsia sp*. (MUNDERLOH et al., 1998). Além desses agentes, muitos outros microrganismos foram isolados em culturas de células de carrapatos, tais como clamídias (SHATKIN et al., 1977); micoplasmas (TULLY et l., 1981) e borrélias (KURTTI et al., 1993; OBONYO et al., 1992).
Valera et al. (2007) reportaram o primeiro isolamento de *Borrelia lonestari* (cepa LS-1) na linhagem celular de *Ixodes scapularis* (ISE6), sendo que essa borrélia, não sobrevivia em outros substratos. Deste modo, a aplicação de linhagens celulares de carrapatos representa uma ferramenta muito útil para fornecimento de material antigênico sem a utilização de animais experimentais (PASSOS, 2012).

Quadro 1.1 –Linhagens de células de carrapatos estabelecidas

Espécies de Carrapato	Instar	Nome da linhagem	Referências
Amblyomma americanum	Ovos	AAE2,12	(Kurtti et al., 2005) (Singu et al., 2006)
Amblyomma sculptum	Ovos	IBU/ASE-16	(Cirelli-Moraes, 2015)
Amblyomma variegatum	Larva	AVL/CTVM13,17	(Bell-Sakyi,2004) (Bell-Sakyi et al.,2000)
Carios capensis	Ovos	CCE,1,2,3,5	(Kurtti et al., 2005)
Dermacentor albipictus	Ovos	DALBE3 DAE3, 15, 100	(Kurtti et al., 2005) (Munderloh et al., 1996) (Policastro et al., 1997)
Dermacentor (Anocentor) nitens	Ovos	ANE58	(Simser et al., 2001) (Kurtti et al., 2005)
Dermacentor variabilis	Ovos	DVE1	(Kurtti et al., 2005)
Hyalomma anatolicum anatolicum	Ovos	HAE/CTVM7, 8, 9, 10, 11	(Bell-Sakyi,1991)
Ixodes scapularis	Ovos	IDE2, 8, 12 ISE5, 6, 18, 25	(Munderloh et al.,1994) (Kurtti et al.,1996)
Ixodes ricinus	Ovos	IRE11 IRE/CTVM18, 19, 20	(Lawrie et al., 2004) (Bell-Sakyi, 2004) (Simser et al., 2002)
Ornithodoros moubata	Ovos/Larvas	OME/CTVM21 22,24,27	(Bell-Sakyi et al., 2009)
Rhipicephalus appendiculatus	Ovos	RAE25 RAE/CTVM1	(Kurtti, et al.,1988) (Bell-Sakyi, 2004)
	Ninfa	RA243, 257 RAN/CTVM3	(Varma et al.,1975) (Bekker et al., 2002)
Rhipicephalus evertsi	Ovos	REE/CTVM31	(Alberdi et al., 2012)
	Ninfa	REN/CTVM32	(Bell-Sakyi et al., 2015)
Rhipicephalus (Boophilus) microplus	Ovos	B. MICROPULUS IX,VII-SCC BMM 26 BME/CTVM2,4,6,6	(Kurtti, et al.,1988) (Cossio-Bayugar et al., 2002) (Bell-Sakyi,2004) (Holman ; Ronald, 1980)
Rhipicephalus (Boophilus) decolaratus	Ovos	BDE/CTVM12,14 e 16	(Bell-Sakyi,2004)
Rhipicephalus sanguineus	Ovos	RSE8 RML-RSE	(Kurtti, et al.,1988) (Yunker et al.,1984; 1987)

Fonte: Modificada de Bell-Sakyi et al. 2007

1.5 Justificativa

Muitos bioagentes transmitidos por carrapatos são autóctones e não crescem em meios sintéticos ou não se adaptam a outros substratos. Assim sendo, a obtenção de culturas a partir de células embrionárias de carrapatos para testar a viabilidade e o crescimento de patógenos ou a sua propagação, poderá representar um avanço significativo na compreensão das relações patógeno/vetor/hospedeiro. Além disso, uma linhagem celular estabelecida poderá significar baixo custo, rapidez de resultados e diminuição no uso de animais de laboratório, propostas estas, que vem a favor das normas estabelecidas pelo Conselho de Ética em Experimentação Animal.

1.6 Objetivo

1.6.1 Geral

Obter Culturas de células embrionárias de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* para cultivo de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale*.

1.6.2 Específicos

- Obter culturas primárias de ovos embrionados de *R. sanguineus* (origens tropical e temperada e de *R. microplus)*;
- Confirmar a identificação célular por meio de sequenciamento gênico utilizando um fragmento do gene mitocondrial 16S rDNA;
- Infectar células de *R. sanguineus* (origens tropical e temperada) e de *R. microplus* com *E. canis* e *A. marginale*, respectivamente, e verificar a eficiência dessas células como substratos para o crescimento desses patógenos.

1.7 Apresentação dos capítulos

O presente estudo foi dividido em dois capítulos, o primeiro capítulo contém a padronização de cultivo de células embrionárias de *R. sanguineus* (linhagens tropical e temperada) e seu uso para cultivo de *E. canis*. O segundo capítulo abrange a padronização de cultivo de células embrionárias de *R. microplus* e seu uso para cultivo de *A. marginale*.

2. CAPÍTULO I PADRONIZAÇÃO DE CULTIVO DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) E SEU USO PARA CULTIVO DE *Ehrlichia canis*.

Resumo

Rhipicephalus sanguineus s.l. (Latreille, 1906) é um carrapato com grande importância médica e veterinária, tendo uma ampla distribuição geográfica, sendo considerado um complexo de espécies com características distintas, dependendo das regiões temperadas ou tropicais. Em cães, este carrapato é o principal vetor da bactéria *Ehrlichia canis.* As culturas de células de carrapato têm sido amplamente utilizadas para a propagação de patógenos, oferecendo um sistema de vetor *in vitro*, que são úteis para estudos de patógenos intracelulares. No presente estudo, culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem tropical e temperada) foram obtidas, com a finalidade de verificar se podem servir como substrato para a bactéria *E. canis* (cepa Jaboticabal). As culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* s.l (Latreille) origem temperada e tropical, foram preparados a partir de massas de ovos de diferentes idades e mantidos à 30 C° em meio de cultura L-15B, suplementado com 10% de Triptose Fosfato e 20% de SFB. Subcultivos foram realizados após a formação da monocamada celular confluente. As identidades celulares foram confirmadas pela PCR e sequenciamento, utilizando um fragmento do gene mitocondrial 16S rDNA e as sequências depositadas no GenBank. Essas culturas de células foram infectadas com *E. canis* (cepa Jaboticabal), e mantidas em meio L-15B (Vitrocell) suplementado com SFB enriquecido com ferro, nas concentrações de 2% e 5%. O DNA extraído das células infectadas e não infectadas de *R. sanguineus* (de ambas as origens) foi analisado pela PCR quantitativa em tempo real (qPCR), utilizando os genes *E. canis-dsb* e *msp1β*. As culturas de células de *R. sanguineus* (origem tropical) suportaram o crescimento de *E. canis* durante pelo menos 40 dias. As subculturas de células de *R. sanguineus* (origem tropical) infectadas em novas culturas de células foram bem-sucedidas. Porém, as culturas de células de *R. sanguineus* (origem temperada) não mantiveram *E. canis*.

Palavras-chave: *Rhipicephalus sanguineus*, culturas de células, cultivos primários, *Ehrlichia canis*.

2.1 Introdução

Inicialmente nomeada como *Ixodes sanguineus*, a espécie *Rhipicephalus sanguineus s.l.* (Latreille, 1806) possui uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (FLECHTMANN, 1973; DANTAS-TORRES, 2008).

Durante a última década, estudos morfológicos, moleculares e biológicos indicaram que o taxon *R. sanguineus* é composto por pelo menos duas espécies (SZABÓ et al., 2005; DE OLIVEIRA et al.,2005; SZABÓ et al., 2005; BURLINI et al., 2010; MORAES-FILHO et al.,2011; NAVA et al.,2012; SANCHES et al., 2016).

Nava et al. (2012) realizaram análise genética de sequências do gene rDNA mitocondrial 16S e 12S de *R. sanguineus*, e os resultados filogenéticos revelaram dois haplótipos, sendo denominados como "Linhagem sul ou temperada" (parte da Argentina, Uruguai, Chile, Itália, e sul do Brasil) e "Linhagem norte ou tropical", para as populações de *R. sanguineus* das regiões tropicais e subtropicais (Brasil com exceção do sul do Rio Grande do Sul, Paraguai, Colômbia, África do Sul, Moçambique e Norte da Argentina).

A espécie *R. sanguineus* s.l. está envolvida no ciclo epidemiológico de agentes que provocam diferentes doenças, como *Ehrlichia canis, Coxiella burnetii, Rickettsia conorii Rickettsia rickettsii* e *Babesia canis* (PAROLA et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2008; OTRANTO et al., 2009; BOWMAN et al., 2011; MANTOVANI; BENAZZI, 1953).

A bactéria *E. canis* é o agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina (EMC) que é transmitida principalmente por adultos e ninfas do carrapato *R. sanguineus* s.l (STICH et al., 2008). Moraes Filho et al. (2015) demonstraram diferenças na competência vetorial de transmissão de *E. canis*, sendo que os carrapatos de regiões tropicais (São Paulo, Brasil) mostraram-se vetores altamente competentes, enquanto que aqueles das regiões temperadas da América do Sul (Argentina, Uruguai e sul do Brasil) não demonstraram competência.

Culturas de células de carrapatos oferecem um sistema de vetor *in vitro*, que são úteis para estudos de patógenos intracelulares, agregando um maior conhecimento sobre a biologia e interação hospedeiro-vetor-patógeno (VARMA. et al., 1975; BELL-SAKYI et al., 2007; BELL-SAKYI et al., 2016).

A primeira linhagem de células de carrapato estabelecida foi desenvolvida a partir de adultos do carrapato da espécie *Rhipicephalus Appendiculatus* Neumann (VARMA et al., 1975). Desde então, após modificações de protocolos, muitas outras linhagens surgiram.

Atualmente existem mais de 40 linhagens de células de carrapatos de diferentes espécies, sendo 14 espécies dentro da família Ixodidae e uma de Argasidae.

Propagação de agentes patogênicos dos gêneros *Ehrlichia, Anaplasma, Borrelia e Rickettsia* já foram realizadas em linhagens de células de carrapatos (MUNDERLOH et al., 1994; MUNDERLOH et al.,1996; BLOUIN et al., 2002; BELL-SAKYI et al. 2007; MONIUSZKO et al., 2014; BAÊTA et al. 2015; FERROLHO et al., 2016).

A bactéria *E. canis*, tem sido cultivada em células de carrapatos, predominantemente na linhagem celular de *Ixodes scapularis* Say, 1821 (ISE6) (BELL-SAKYI et al., 2007). Outras linhagens celulares, como as de *Dermacentor variabilis* (SAY, 1821), *Hyalomma anatolicum* (KOCH, 1844), *Ixodes ricinus* (LINNAEUS, 1758), *R. appendiculatus*, *Rhipicephalus evertsi* (NEUMANN, 1897), *R. microplus* e *R. sanguineus* também suportam o crescimento de *E. canis* (FERROLHO et al., 2016). No presente estudo, culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem tropical e temperada) foram testadas como substrato para o crescimento e manutenção da bactéria *E. canis* (cepa Jaboticabal).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Origem dos carrapatos

Fêmeas de *R. sanguineus* (origem tropical) foram doadas ingurgitadas, pelo laboratório de Ixodologia da Universidade Federal de Uberlândia (Registro CEUA/UFA 009/13).

Fêmeas de *R. sanguineus* (origem temperada) foram doadas pelo Prof. Dr. Marcelo B. Labruna (FMVZ-USP), sendo alimentadas assim que chegaram ao Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan (Registro CEUA Nº 9722270317). Essas fêmeas foram coletadas na Barra do Quarai, RS, localizado no extremo oeste do estado, entre as coordenadas 30º12'26" S e 57º33'17".

2.2.2 Desinfecção das fêmeas

Em uma capela de fluxo laminar horizontal, as fêmeas ingurgitadas foram lavadas em álcool 70% e mergulhadas em solução de cloreto de benzalcônio 2% por 15 minutos. A seguir, os espécimes foram lavados em água destilada esterilizada contendo antibióticos por 5 minutos, adaptando-se a técnica utilizada por Kessler et al. (1999). Depois de secas em gazes esterilizadas, as fêmeas foram colocadas individualmente em placas de Petri estéreis, e mantidas em uma estufa biológica com demanda de oxigênio (BOD), à 25 ^{o}C ± 1 e umidade de 90% ± 5, para realização das posturas.

2.2.3 Cultivos primários

Os ovos foram pesados e depositados em um tubo cônico tipo Falcon de 50 ml, as lavagens foram realizadas em uma capela de segurança biológica conforme protocolo proposto por Munderloh et. al. (1994) e Bell-Sakyi (1991).

O processo de lavagem iniciou-se com a imersão dos ovos em Cloreto de Benzalcônio 2% (TPP) e centrifugados a 400 x g, por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado (esse processo de centrifugação e descarte de sobrenadante, foi realizada ao final de cada etapa, antes da adição das diferentes soluções). Os ovos foram lavados durante 10 minutos em álcool 70% e em água destilada autoclavada por 5 minutos. Em seguida, os ovos foram lavados em solução de agua destilada autoclavada com 50 µl de anfotericina B e 100 µl de antibióticos (Penicilina e Streptomicina) por 25 minutos. Após, os ovos foram imersos em hipoclorito de sódio 2% durante 5 minutos, e então foi realizada a última etapa de lavagem com água destilada autoclavada.

Os ovos foram quebrados em meio L-15B completo (Vitrocell) (Anexo B) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino – (SFB) (Vitrocell) e a Triptose fosfato (TTB).
A suspenção celular foi centrifugada a 100 x g por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 2,5 ml de meio L-15B (Vitrocell) completo com 20% de SFB com antibióticos (com 2,5 µl de penicilina/estreptomicina e 2,5 µl de anfotericina B) e colocado em garrafas de 25 cm2, incubadas à 30°C. As culturas foram vistoriadas diariamente em Microscópio de Luz Invertida da marca Nikon, modelo Elipse. O meio foi trocado

semanalmente. No entanto, na primeira semana do cultivo, as trocas foram mais frequentes para evitar perda de células viáveis durante a remoção do meio. Todas as vezes em que houve necessidade de remover o meio para substituição por um novo.

2.2.4 Subcultivos

Os subcultivos foram realizados de acordo com o crescimento celular, e a partir da segunda passagem, os antibióticos foram suprimidos. Quando a confluência alcançou 90%-100%, as células foram retiradas da garrafa através de raspagem (*cell scraper*). Após centrifugação em tubo cônico tipo Falcon com 6 ml de meio L15-B (por 8 minutos a 100 x *g*) o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspendido em 8 ml de meio e dividido em 2 garrafas. A partir da primeira passagem, as culturas com cerca de $8x10^5$ células/ml (contadas em câmara de Neubauer), foram criopreservadas conforme descrito mais abaixo.

2.2.5 Criopreservação e descongelamento

O processo de criopreservação foi realizado segundo protocolo adaptado de Lallinger et al. (2010).

Uma alíquota da suspensão celular (corada com Azul de Tripan (Gibco) foi utilizada para a contagem celular em câmara de Neubauer para o cálculo da concentração de células/ml a ser utilizada no processo de criopreservação.

Após a contagem celular, a suspensão (oriunda da raspagem contendo células) com 8 ml de meio L-15B (Vitrocell) foi centrifugada a 100 x *g* por 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 1 ml de meio L15B contendo 10% de SFB (Vitrocell) e 500 µl de meio L15B contendo 25% de Dimetil Sulfóxido (DMSO) (HYBRI-MAX™). O conteúdo foi pipetado em um criotubo de 1,8 ml e transferido para um contender de congelamento NALGENE® Frosty™, e mantido no freezer -80 ^{o}C por 24 horas. Em seguida foi armazenado em nitrogênio líquido.

Para recuperação das células criopreservadas, cada criotubo foi rapidamente descongelado em banho-maria a 37 ºC. O conteúdo foi transferido para tubo cônico tipo Falcon contendo 5 ml meio de cultivo (L-15B) com de soro fetal a 20%. Após a centrifugação (100 x *g*

por 8 minutos em temperatura ambiente), os sobrenadantes foram descartados e o *pellet* ressuspendido em 4 ml de meio, sendo a seguir incubado em garrafa de 25 cm^2 e mantidas

2.2.6 Confirmação da identidade celular

A identidade celular foi confirmada utilizando um ensaio de PCR convencional com base em 16S rRNA mitocondrial (BLACK; PIESMAN, 1994). As amostras de células (4 ml) de *R. sanguineus (linhagens tropicais e temperadas)* foram raspadas dos frascos (25 cm^2) e processadas para extração de DNA usando o kit de extração de tecido DNeasy (Qiagen, Chatsworth, CA), seguindo as instruções do fabricante.

A mistura tinha tampão de PCR 10X (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), MgCl2 1,0 mM (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), desoxinucleótido trifosfato 0,2 mM (dNTPs) (Life Technologies®, Carlsbad, CA , EUA), 1.5U Taq DNA Polymerase (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA) e 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador 16S + 1 (5'-CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC TGT GG-3 ') e 16S - 1 (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T- 3 ') (Integrated DNA Technologies®, Coralville, IA, EUA). As amplificações foram realizadas com 10 ciclos iniciais de 92 ° C por 1 min, 48 ° C por 1min e 72 ° C por 1min, seguido de 32 ciclos de 92°C por 1 min, 54 ° C por 35 seg e 72 °C por 1,35 min, e extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose (Anexo C) a 1% corado com brometo de etídio (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA). Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta usando o Image Lab Software versão 4.1 (Bio-Rad®). Os produtos da reação de PCR foram purificados usando o kit comercial DNA Silica Bead (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EUA). O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado por meio de sistema automatizado baseado no método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo Sanger utilizando o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EUA) e ABI PRISM 310DNA Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA). A identidade foi confirmada utilizando o programa BLAST.

2.2.7 Infecção das culturas primárias de células embrionárias de *R. sanguineus* (linhagem tropical e temperada)

A infecção das células embrionárias foi realizada com a amostra Jaboticabal de *E. canis*, isolada por MACHADO (1993)[1] a partir de um cão, em fase aguda da doença (Aguiar et al., 2007).

Primeiramente, a amostra Jaboticabal de *E. canis* foi cultivada em células DH82, conforme descrito por Aguiar et al. (2007). A partir de uma taxa de infecção de 50 a 100%, a suspensão de células foi recolhida e transferida para um tubo cônico tipo Falcon com meio L-15B (Vitrocell) sem adição de antibióticos e SFB. O tubo cônico tipo Falcon foi invertido algumas vezes para homogeneização e centrifugado à temperatura ambiente por 15 minutos a 400 x *g*. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 2 ml de meio L-15B (Vitrocell). A suspensão foi novamente homogeneizada e centrifugada por 15 minutos a 400 x g. Este procedimento foi repetido três vezes.

Essa amostra foi inoculada em duas garrafas de 25 cm^2 com células de *R. sanguineus* (linhagem tropical e temperada). O meio L-15B (Vitrocell) suplementado com SFB (Hyclone™®-Chicago, Illinois, EUA) sob duas concentrações diferentes (2% e 5%) e substituídas parcialmente semanalmente. Após quatro semanas, as culturas positivas foram propagadas em novas culturas de células ou foram ultra centrifugadas a 9000 x*g* para extrair os agentes patogênicos semi-purificados antes da criopreservação.

Lâminas contendo amostras das culturas células de *R. sanguineus* (linhagem tropical e temperada), foram fixadas com metanol (100%) por 5 minutos. Para a preparação das lâminas e coloração com Panótico Rapído, utilizou-se o aparelho Cytospin (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

2.2.8 PCR em tempo real

---

[1]MACHADO, R.Z. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Campus de Jaboticabal. Comunicação pessoal, 1993.

As amostras das células de *R. sanguineus* de ambas as origens, não infectadas (controles) e infectadas com *E. canis*, foram retiradas dos frascos (25 cm^2) e processadas individualmente para extração de DNA utilizando o kit DNeasy Tissue (Qiagen, Chatsworth, CA), seguindo as instruções do fabricante. Os produtos obtidos a partir da extração foram testados quanto à presença de DNA específico de *E. canis*, com um protocolo qPCR utilizando os seguintes iniciadores: *Dsb*-321 (5'TTGCAAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA e *Dsb*-671 (5'GCTGCTCCACCAATAAATGTATCYCCTA-3). O TaqMan Sonda (5'AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA-3 ') e 5'-FAM / BHQ-1,3', que são específicas para *E. canis*.

A sonda TaqMan (5' AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA-3'), (5' FAM/BHQ-1,3'), especifica para a espécie *E. canis*, foi usada como marcador, conforme previamente padronizado por Doyle et al. (2005). A amplificação, aquisição e análise de dados foram realizadas em um sistema de detecção multicolor para Real-Time PCR (7500 Real-Time PCR Systems-AppliedBioSystems,Foster City, CA,EUA).

2.2.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras das células de *R. sanguineus* de ambas as origens, não infectadas (controle) e infectadas com *E. canis*, respectivamente, foram fixadas em solução de Karnovsky (mistura de glutaraldeído e paraformaldeído) (Karnovsky, 1965) em 0,1 M de tampão de cacodilato de pH 7,2 durante 2 horas. Em seguida foram pós-fixadas numa solução de Tetróxido de Ósmio a 1% no mesmo tampão durante 1 hora. Após a lavagem, imersas em solução de Acetato de Uranila a 0,5% com 13,3% de sacarose e mantidas a 4 °C durante 24 horas. A desidratação foi realizada em série etanólica. Após a passagem em óxido de propileno, as amostras foram infiltradas com 1:1 mistura de óxido de Propileno com resina Epon durante 2-3 horas. As suspensões celulares foram transferidas para BEEM cápsula com resina pura e centrifugadas a 900 *g* durante 5 minutos. Após a substituição da resina e nova centrifugação, para sedimentar as células, as cápsulas foram secas a 60 °C para a polimerização durante 2 a 3 dias. Secções ultrafinas (60-70 nm) foram colocadas em grelhas de cobre, em contraste com uma solução aquosa de acetato de uranila a 2% durante 10 minutos, citrato de chumbo, durante 3 a 5 minutos (Reynolds, 1963), e, em seguida, examinadas sob um microscópio TEM LEO 906E (Zeiss, Alemanha). As imagens foram capturadas pela câmera CCD MegaView III através do

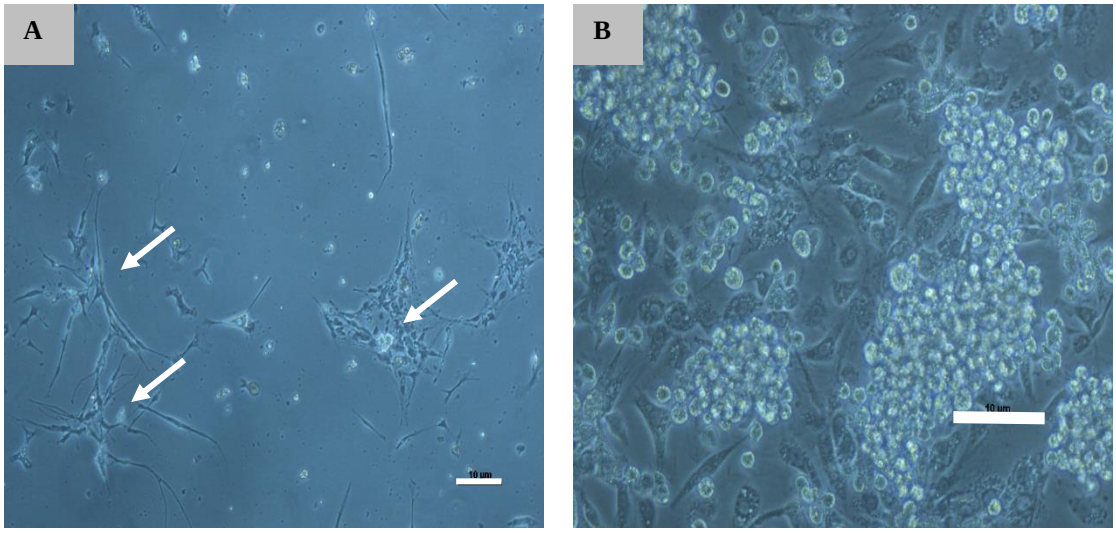
item de programa - Universal TEM imagem Platform (Olympus macio Imaging Solutions GmbH, Alemanha).

2.3 Resultados

O total de posturas utilizadas no presente estudo para realizar as culturas primárias, foi proveniente de 230 fêmeas, sendo 100 de *R. sanguineus* (origem tropical) e 130 fêmeas de *R. sanguineus* (origem temperada).

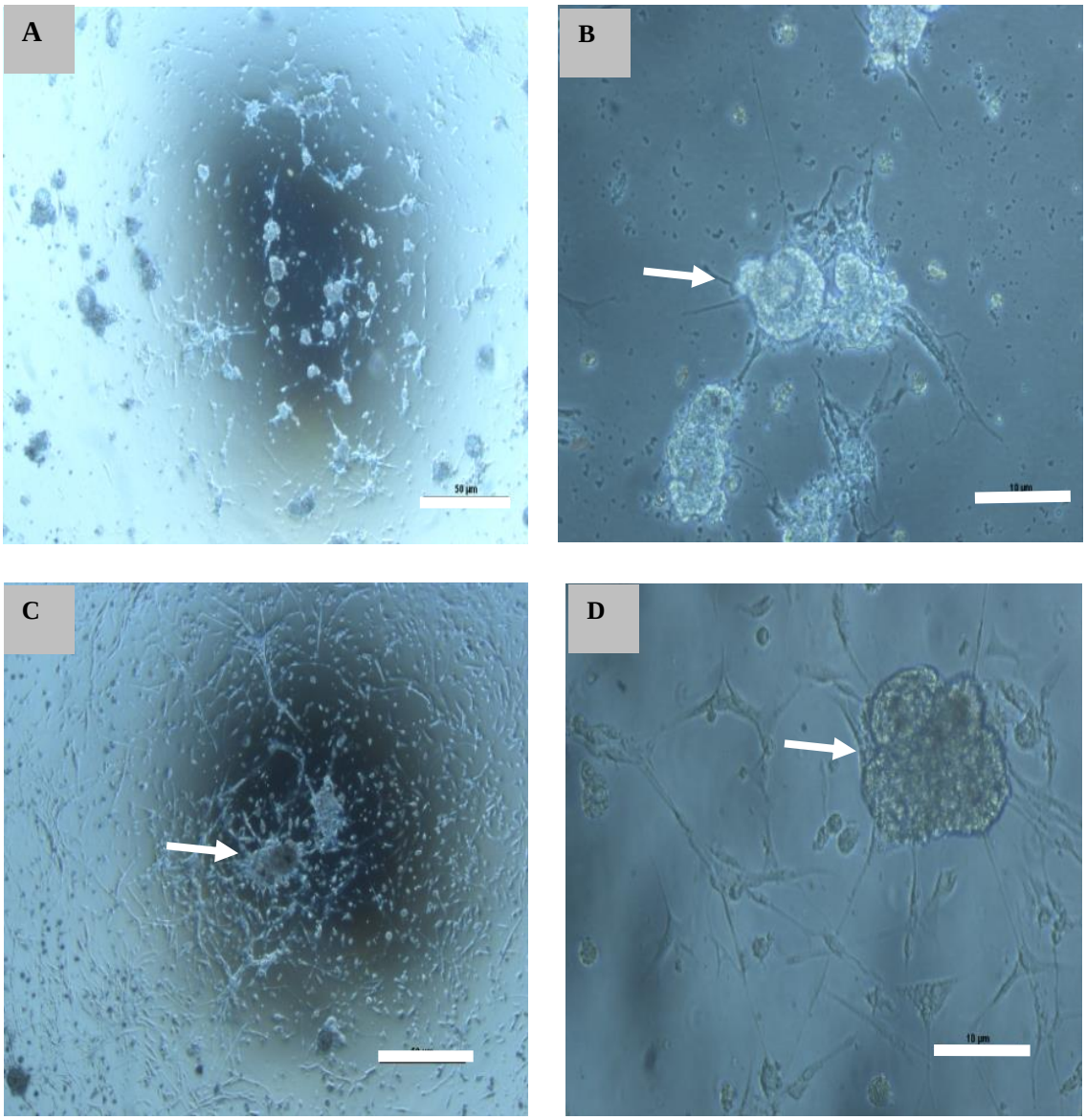
Inicialmente o crescimento celular das culturas primárias de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem tropical e temperada) foi lento, no entanto as células apresentaram viabilidade celular (Figura 2.1 e 2.2, respectivamente). Morfologicamente as células apresentaram-se finas, alongadas e espessas. Após 60 dias de cultivo em meio L-15B suplementado com 20% de SFB, ocorreu formação da monocamada celular confluente, dando origem ao primeiro subcultivo (Figura 2.2 e 2.3). No entanto, as culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem temperada) após o primeiro subcultivo (P1), apresentaram um crescimento celular lento em comparação as células embrionárias de *R. sanguineus* (origem tropical). A monocamada celular das culturas de *R. sanguineus* (origem tropical) se formou após aproximadamente 30 dias, sendo necessário realizar o subcultivo, já as culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem temperada) só atingiram a monocamada celular após 60 dias.

Figura 2.1: Cultivos primários e 1º subcultivo de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus* (origem tropical)



A: Células de *R. sanguineus* (origem tropical) após 10 dias do cultivo, barra 10µm. **B:** Células de *R. sanguineus* (origem tropical) após 15 dias do primeiro subcultivo, barra 10 µm. Setas indicam os conjuntos de células aderidas a garrafa.

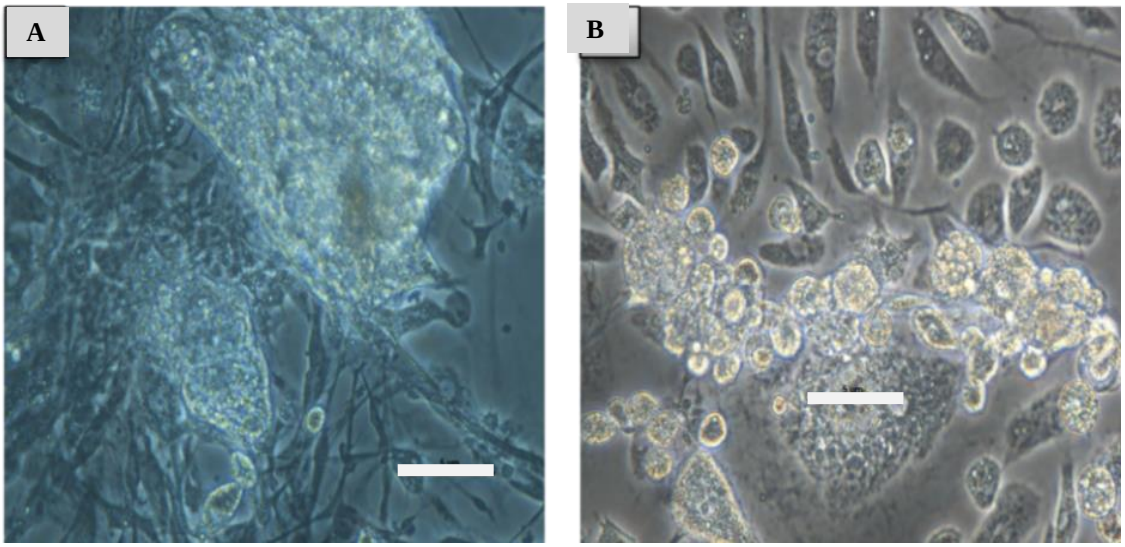
Figura 2.2: Cultivos primários de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus* (origem temperada)



A-B: Células de *R. sanguineus* (linhagem temperada) após 9 dias do cultivo, respectivamente, barras 50µm e 10µm. **C-D:** Células após 30 dias do cultivo, respectivamente, barras 50µm e 10µm. As setas indicam os conjuntos de células aderidas.

Fonte: LIMA-DUARTE (2017)

Figura 2.3: Cultivo primário e 1º subcultivo de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem temperada)



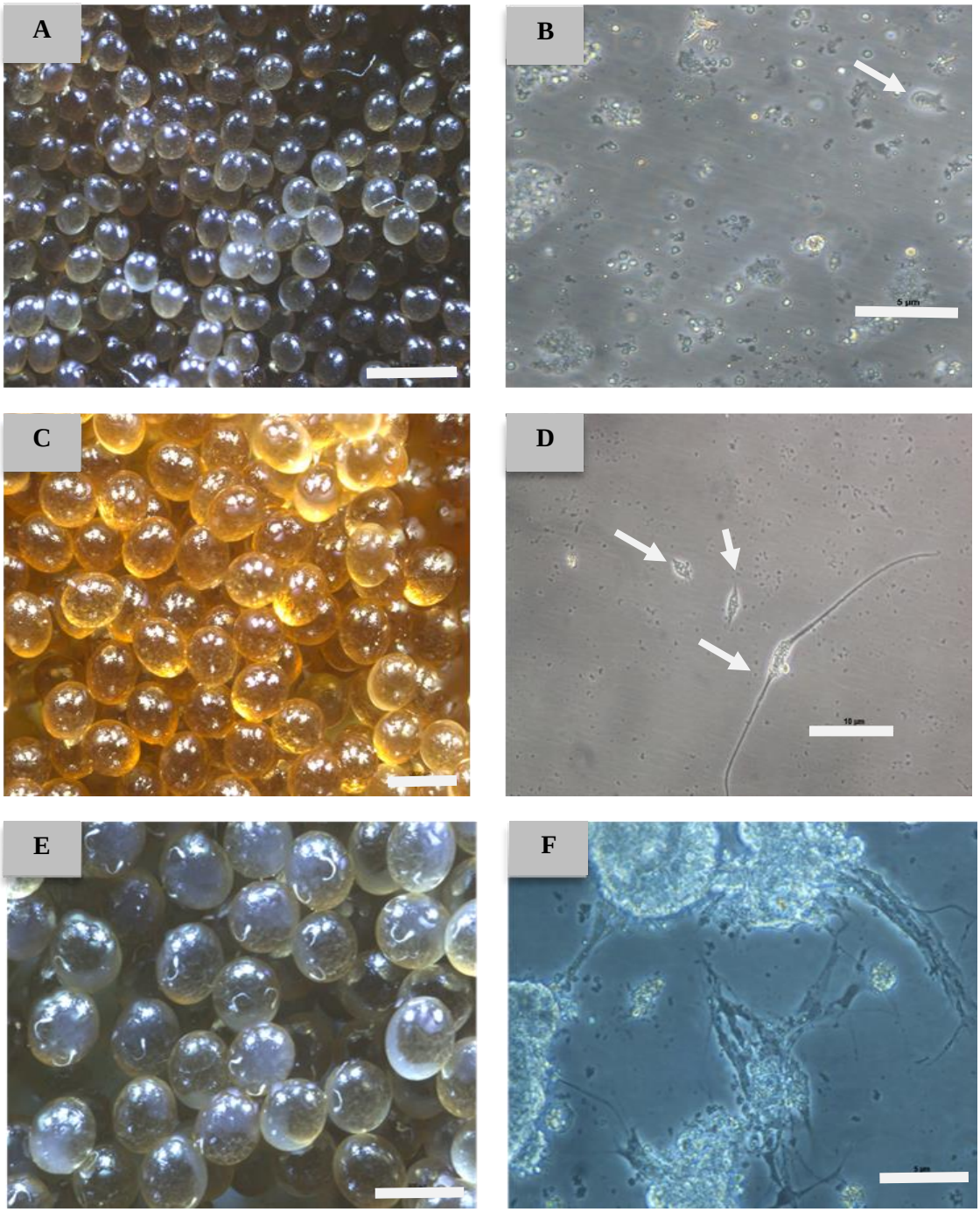
A-B: Células de *R. sanguineus* (origem temperada) após 10 dias do primeiro subcultivo, barras 5µm.

Fonte: LIMA-DUARTE (2017)

Em relação às idades das massas testadas de ovos de *R. sanguineus* (de ambas as origens), foi observado que células obtidas com ovos de 10 dias (Figura 2. 4) além de apresentarem uma baixa produção de células, mostraram dificuldade de aderência, e a maioria permaneceu no sobrenadante. Nos cultivos de ovos com idade de 16 dias, os embriões já estavam muito desenvolvidos, também dificultando a aderência. Foi observado que ovos com 10 dias se apresentaram com um aspecto "vitrificado", enquanto que os ovos com idade de 12 e 14 dias apresentaram aspecto condensado em um dos polos.

Os ovos de idade de 12 e 14 dias de idade (Figura 2.4) produziram maior número de células viáveis que rapidamente aderiram à garrafa. Com 14 dias, os ovos continham embriões segmentados com apêndices visíveis, já os ovos de 16 dias (Figura 2.5) apresentaram uma estrutura branca e circular, e foi possível observar a formação da cutícula envolvendo os embriões.

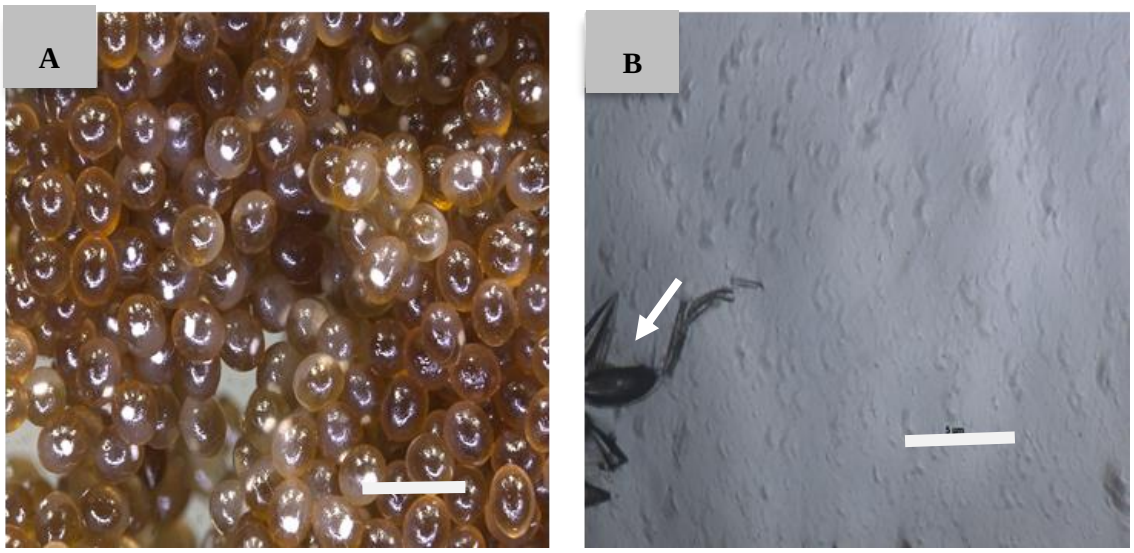
Figura 2.4. Massas de ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (linhagem temperada) com diferentes idades e culturas realizadas com esses ovos



A: Ovos com 10 dias de idade. **B**: Culturas de ovos com idade de 10 dias de idade, barra 5 µm, poucas células aderidas. **C**: Ovos com 12 dias de idade. **D**: Culturas de ovos com 12 dias, barra 50 µm; células aderidas. **E:** Ovos com 14 dias de idade. **F**: Culturas de ovos com idade de 14 dias de idade, barra 5 µm, muitos grupos de células aderidas, e presença de células tronco.

Fonte: LIMA-DUARTE (2017)

Figura 2.5: Ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (linhagem temperada) com 16 dias de idade e culturas realizadas com esses ovos.



A: Ovos com 16 dias de idade. **B:** Culturas de ovos com 16 dias, barra 5 µm não a presença de células aderidas, no campo é possível observar fragmentos do carrapato

Fonte: LIMA-DUARTE (2017)

Os congelamentos foram iniciados desde o primeiro subcultivo (P1), e após 3 meses foram iniciados os primeiros descongelamentos. Depois de 2 dias do descongelamento, foi realizada troca de meio, para remover os *debris* celulares (fragmento de células). Porém, nenhuma das células congeladas de *R. sanguineus* (de ambas as origens), puderam ser recuperadas após criopreservação. No entanto, os esforços continuam para a obtenção dessas linhagens celulares.

Os resultados das reações de sequenciamento das amostras de células no terceiro subcultivo (P3) de *R. sanguineus* (origem tropical), mostrou 100% de similaridade e *score* máximo com uma porção do genoma mitocondrial completo de *R. sanguineus* do município de Uberlândia (GU553074) confirmando a identidade celular dessa espécie. As comparações foram realizadas utilizando o Blastn com o banco de dados *Nucleotide collection (nr/nt)* do NCBI. A sequência foi depositada sob o código GenBank (MF187515).

As sequências das amostras de células no P3 de *R. sanguineus* (origem temperada), mostrou 100% de similaridade e *score* máximo com as sequências que são provenientes do Rio

Grande do Sul (KX533942.1) e Uruguai (JX195167.1), de *R. sanguineus* de origem temperada. A sequência foi depositada sob o código GenBank (MF477856).

As culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem tropical), infectadas por *E. canis* no quinto subcultivo mantiveram o agente por pelo menos 40 dias, antes da destruição parcial das células. A infecção foi confirmada por PCR quantitativa em tempo real.

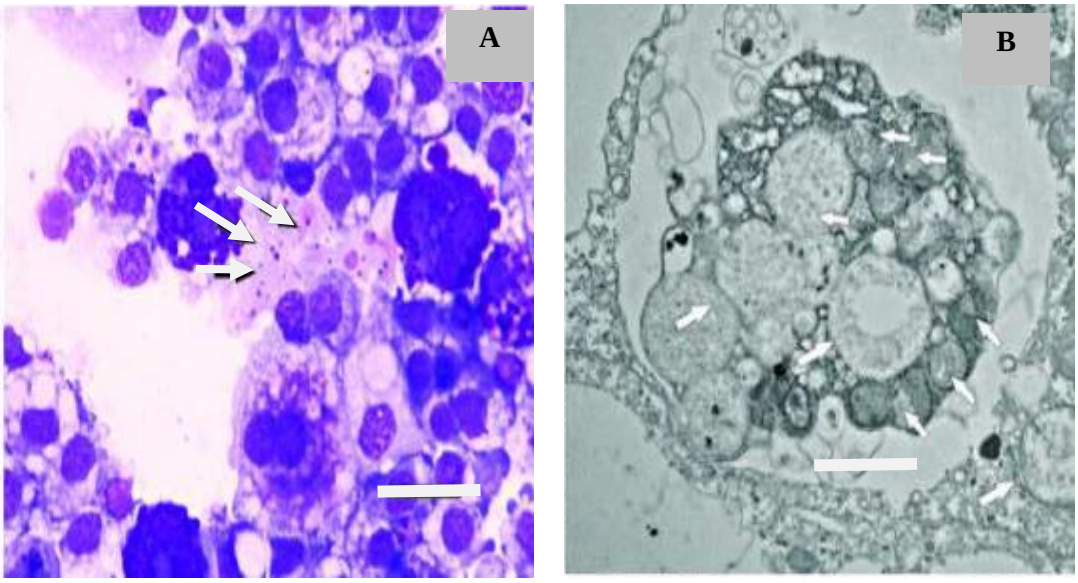
As mórulas de *E. canis* apareceram nas células após 15 dias da inoculação e 30 dias após a propagação. As células infectadas foram criopreservadas, e após descongelamento, ao serem inoculadas em novos cultivos de células de *R. sanguineus* (origem tropical), infectaram essas culturas.

As culturas infectadas foram propagadas após 40 dias, e a microscopia eletrônica de transmissão permitiu a observação do patógeno dentro das células (Figura 2.6 -2.7).

A TEM mostrou células não infectadas e células infectadas por propagação e após descongelamento (Figura 2.7). Após a criopreservação a presença de mórulas de *E. canis* foram observadas na entre a 2-4 semanas pós infecção.

No entanto, as culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem temperada), não foram capazes de se infectar e de manter *E. canis*.

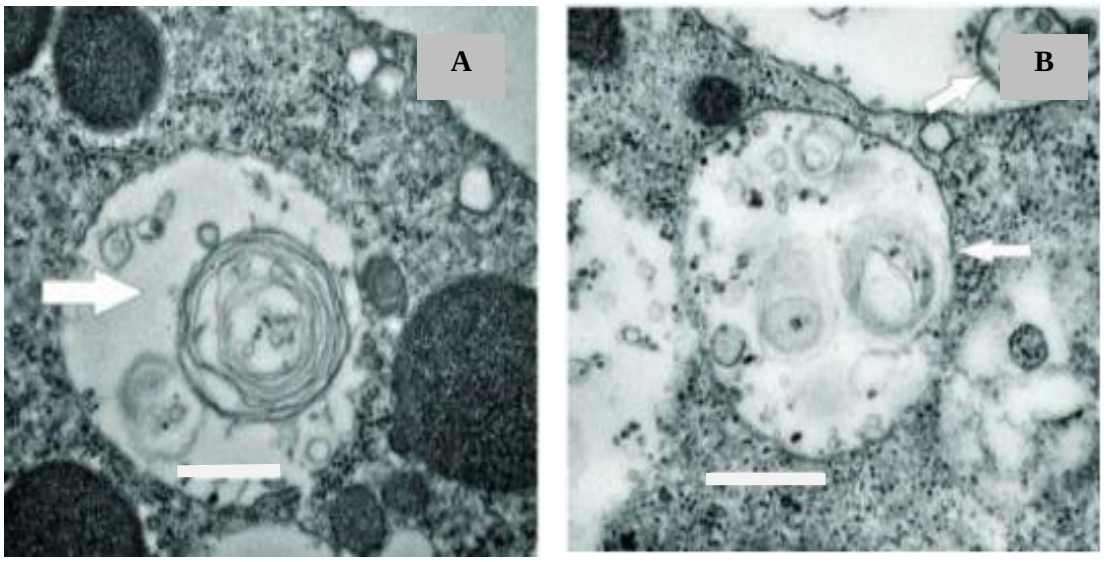
Figura 2.6: Microscopia eletrônica de transmissão e Microscopia óptica de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem tropical), infectadas com *E. canis*.



A: Esfregação de cultura com infecção, corado com Panótico Rápido, barra 10 µm, setas indicando mórulas de *E. canis*. **B:** Mórulas formada por corpúsculos de *E. canis*, barra 1 µm. Setas indicam mórulas

Fonte: LIMA-DUARTE (2017)

Figura 2.7: Microscopia eletrônica de transmissão de culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem tropical), infectadas com *E. canis*.



A: Vacúolo em intensa atividade digestiva (seta), barra 0,5 µm**. B:** Vacúolos em intensa atividade de digestão (setas), barra 0,5 µm.

Fonte: LIMA-DUARTE (2017)

2.4 Discussão

A suplementação do meio L15-B com SFB a 20% foi essencial para o sucesso do cultivo das células de *R. sanguineus* de ambas as origens, pois o meio L-15B já contém vários fatores que auxiliam o crescimento e quando acrescido de SFB proporciona mais fonte de aminoácidos, proteínas, vitamina (particularmente vitaminas lipossolúveis como A, D, E e K), carboidratos, lipídios, hormônios, fatores de crescimento, minerais e oligoelementos (VON; MACMORINE, 1975). A concentração de SFB no meio de cultivo pode ser modificada dependendo da espécie do carrapato, variando de 5 a 20% (KURTTI; MUDERLOH; SAMISH, 1988).

Para obtenção da linhagem de *R. sanguineus* (RSE8), Kurtti et al. (1982) utilizaram SFB a 20% e Triptose Fosfato a 10%. No presente estudo, para a manutenção dos cultivos de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem temperada e tropical) utilizamos o meio L-15B suplementado com 20% de SFB e 10% de triptose fosfato, e o crescimento e adesão celular foram satisfatórios com essa formulação de meio.

Segundo Kurtti et al., (1988) a concentração de triptose fosfato também pode variar conforme a espécie de carrapato.

Além do SFB, outros soros são utilizados para suplementação do meio de cultivo de células de carrapato, como o Soro Calf (derivado de bezerros) que foi empregado em linhagens já estabelecidas de *R.*(*B.*) *microplus* (BME/CTVM2 e BME/CTVM6), *I. scapularis* (ID8*), I. ricinus* e *Rhipicephalus decolaratus* (BDE/CTVM12 e BDE/CTVM14) (LALLINGER et al., 2010).

Um fator fundamental para o sucesso dos cultivos primários foi a determinação da idade ideal dos ovos. Foi observado que os ovos com 12 e 14 dias de idade mantidos em estufa BOD a 25ºC e UR> 90% ± 10% produziram maior número de células viáveis que rapidamente aderiram a garrafa.

Os primeiros dias do cultivo primário sem dúvida é a fase mais crítica, uma vez que os *debris* celulares, cascas de ovos e leveduras dificultam a aderência celular. Pudney et al., (1973), sugeriram que a quantidade de tecidos celulares proveniente dos ovos é elevada no cultivo inicial. Sendo, a utilização de antibióticos e antifúngicos nos dias subsequentes ao cultivo foi fundamental nas primeiras semanas. Além disso, embora a troca de meio de cultivo

deva ser realizada semanalmente (MUNDERLOH et al. 1994), no presente estudo, nos primeiros dias do cultivo realizamos trocas de meio duas vezes na semana, com o objetivo de diminuir o excesso de resíduos indesejáveis.

Yunker (1987) relatou que as células de carrapato iniciam à aderência na garrafa de cultivo após algumas horas. No presente trabalho, foi observado que a aderência celular iniciou após alguns minutos do cultivo. Porém, esse tempo pode variar, pois em culturas de *Ornithodoros capensis* (NEUMANN, 1901), que é um carrapato argasídeo, as células embrionárias aderiram à garrafa somente após 1 a 2 semanas (MATILLA et al., 1980).

Inicialmente o crescimento celular das culturas primárias de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem tropical e temperada) foi lento, a confluência total da garrafa só foi atingida após 60 dias, e assim permitiu a realização do primeiro subcultivo. Bell-Saky et al. (2007) descreveram que as células de carrapato não exibem inibição por contato e os resultados obtidos no presente estudo corroboram com isso, pois as células tiveram divisão celular contínua formando uma nova camada por cima do tapete celular já existente.

Após o primeiro subcultivo, as culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem temperada) apresentaram crescimento celular mais lento em comparação as células embrionárias de *R. sanguineus* (origem tropical). O subcultivo de células de carrapato pode levar meses e até mesmo anos para se estabelecer (MUNDERLOH et al., 1994). E algumas linhagens celulares de carrapato podem levar 5 anos para serem estabelecidas (BELL-SAKYI et al., 2007).

Culturas de células de carrapatos geralmente compreendem dois ou mais tipos de células que se fazem presentes em proporções variadas dentro de uma única cultura (YANKER, 1987; BELL-SAKYI, 2007). Nos cultivos de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem tropical e temperada) foi observado este comportamento celular.

A necessidade de manter as células vivas por um longo período sem a perda de suas funções levou ao desenvolvimento de técnicas de criopreservação, que têm como objetivo parar reversivelmente todas as funções biológicas dos tecidos vivos em uma temperatura ultrabaixa (SANTIS; PRATA, 2009). Protocolos para criopreservação de células de carrapatos já foram descritos (KURTTI et al.,1982, LALLINGER et al.,2010), no entanto a criopreservação a longo prazo em nitrogênio líquido não garante a recuperação bem-sucedida de uma linhagem celular (BELL-SAKYI, 2007). Para o armazenamento de culturas utiliza-se temperaturas entre 4 ºC a 12 ºC (KURTTI et al., 1988; BASTOS et al., 2006)

Lallinger et al.,2010, relataram o sucesso da criopreservação a curto prazo de células derivadas de *R. (B.) decoloratus*, *R. microplus* e *I. ricinus*, utilizando DMSO e sacarose-

fosfato-glutamato (SPG) como crioprotetores. Os crioprotetores desempenham um papel fundamental na criopreservação, pois atuam substituindo parcialmente a água no interior da célula ligando-se ao hidrogênio das moléculas de água intracelular, aumentando a viscosidade e reduzindo o ponto de congelamento da célula (JAIN; PAULSON, 2006).

Para a criopreservação dos cultivos de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem temperada e tropical), utilizamos o método de congelamento lento e DMSO como solução criopreservante. O congelamento lento é caracterizado por uma redução gradual da temperatura, com o objetivo de reduzir o estresse térmico na fase de transição das soluções do estado líquido para o estado sólido (SANCHES, 2009). Até o momento, não obtivemos sucesso na criopreservação.

As linhagens de células de carrapato têm sido utilizadas para propagação de vários patógenos, sobretudo para cultivos de bactérias do gênero *Ehrlichia* e *Anaplasma* (BELL-SAKYI et al., 2007).

O carrapato *R. sanguineus* é o principal vetor da bactéria *E. canis*, essa bactéria é o agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina (EMC). Porém, um estudo recente indicou que apenas *R. sanguineus* (origem tropical) tem competência vetorial de transmissão de *E. canis* (MORAES FILHO et al., 2015). Quanto ao cultivo *in vitro* desse microrganismo, trata-se de uma bactéria difícil de ser isolada (WALKER, 2000).

E. canis já foi cultivada *in vitro* em células DH82, linhagem originária de monócitos caninos (WELLMAN et al., 1988). Cultivos desse patógeno também foram realizados em linhagens de carrapato de *I. scapularis* (ID8) (MUNDERLOH et al., 1998; MUNDERLOH et al., 1989; EWING et al., 1955) e *Ixodes ricinus* (IRE/CTVM18) (SINGU et al., 2006). Zweygarth et al. (2014) relataram isolamento e propagação de duas cepas sul-africanas e espanholas de *E. canis* em células *I. scapularis* (IDE8).

Ewing et al. (1995) não obtiveram sucesso utilizando uma linhagem de *R. sanguineus* não especificada para isolar *E. canis*. Ferrolho et al. (2016) obtiveram sucesso ao realizar infecção de *E. canis* em uma linhagem celular de *R. sanguineus* (RSE8), sendo a infecção mantida por 4 semanas. Essa linhagem celular é originária dos EUA (KURTTI et al., 1982), portanto, possivelmente as células são derivadas de *R. sanguineus* (origem tropical).

No presente estudo, as culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem tropical) foram utilizadas com o objetivo de testar sua eficiência como substrato de *E. canis.* O meio de cultivo foi suplementado por SFB (Hyclone™®-Chicago, Illinois, EUA) e as culturas infectadas por *E. canis* mantiveram o agente por pelo menos 40 dias. O Estabelecimento da infecção em uma linhagem de células derivada do vetor natural, abre uma nova oportunidade

para expandi o conhecimento sobre o ciclo de vida da *E. canis* no carrapato (FERROLHO et al., 2016). No entanto, as culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem temperada), até o momento não foram capazes de manter *E. canis*. Dessa forma, nossos resultados corroboram com os encontrados por Moraes-Filho et al. (2013), em relação à competência vetorial da linhagem tropical e temperada de *R. sanguineus.*

De acordo com estudos realizados sobre a propagação de linhagens de células de carrapatos infectadas com *A. marginale* (MUNDERLOH et al., 1996; BASTOS et al., 2009; BAÊTA, 2015), *Anaplasma centrale* (BELL-SAKYI et al., 2015) e *Anaplasma phagocytophilum* (anteriormente *Ehrlichia equi*) (MUNDERLOH et al., 1996), o meio L15-B foi suplementado com baixa concentração de $NaHCO_3$ como requisito para garantir o crescimento desses patógenos. Além disso, também foi necessário reduzir a concentração oxigênio e aumentar a concentração de CO_2 em 100 vezes, indicando que alguns agentes de *Anaplasmataceae* são sensíveis à oxidação e exigem concentração de CO_2 elevada para o crescimento (MUNDERLOH et al., 1996).

Para culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem tropical) não foi necessário suplementar o meio com $NaHCO_3$ e a bactéria *E. canis* (cepa Jaboticabal) cresceu bem em BOD (sem CO_2). Isso sugere que nem todas as cepas de agentes de *Anaplasmataceae* necessitam dessas condições para crescer em células de carrapato.

A suplementação do meio L-15B com SFB (Hyclone™®-Chicago, Illinois, EUA) na célula infectada variaram de 2 a 5% para diminuir o crescimento celular e melhorar o crescimento de *E. canis*. Desta forma, a redução na concentração de 2% de soro de Hyclone™ foi ideal para o crescimento e manutenção das bactérias nessas células

2.5 Conclusão

- Culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* de origem tropical, mostraram-se eficientes como substrato para o crescimento de *E. canis* (cepa Jaboticabal), permitindo sua propagação em novos cultivos após o descongelamento. Entretanto, no presente estudo as culturas de células embrionárias *R. sanguineus* de origem temperada até o momento não foram capazes de manter *E. canis*.

Referências

AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z.; LABRUNA, M.B. Serological diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis with Brazilian antigen of *Ehrlichia* canis. Ciência Rural, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007

BAÊTA, B. A.; RIBEIRO, C. C.; TEIXEIRA, R. C.; CABEZAS-CRUZ, A.; PASSOS, L. M.; ZWEYGARTH, E.; FONSECA, A. H. Characterization of two strains of *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Rio de Janeiro, Brazil, after propagation in tick cell culture. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 6, n. 2, p. 141-145, 2015.

BELL-SAKYI, L.; WEISHEIT, S.; RÜCKERT, C.; BARRY, G.; FAZAKERLEY, J.; FRAGKOUDIS, R. Microscopic Visualisation of Zoonotic Arbovirus Replication in Tick Cell and Organ Cultures Using Semliki Forest Virus Reporter Systems. Veterinary Sciences, v. 3, n. 4, p. 28, 2016.

BELL-SAKYI L.; PALOMAR, A. M.; BRADFORD, E. L.; SHKAP, V. Propagation of the Israeli vaccine strain of *Anaplasma* centrale in tick cell lines. **Veterinary microbiology**, v. 179, n. 3, p. 270-276, 2015.

BELL-SAKYI, L.; ZWEYGARTH, E.; BLOUIN, E. F.; GOULD, E. A.; JONGEJAN, F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. Trends in **Parasitology**, v. 23, n. 9, p. 450-457, 2007.

BELL-SAKYI, L. Continuous cell lines from the tick Hyalomma anatolicum anatolicum. The Journal of **Parasitology**, p. 1006-1008, 1991.

BLACK, W.C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.91, n.21, p.10034-10038, 1994.

BLOUIN, E. F.; DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; SAUER, J. R., SALIKI, J. T.; KOCAN, K. M. Applications of a cell culture system for studying the interaction of *Anaplasma marginale* with tick cells. **Animal health research reviews**, v. 3, n. 2, p. 57-68, 2002.

BOWMAN, D. D. Introduction to the alpha-proteobacteria: *Wolbachia* and Bartonella, *Rickettsia*, *Brucella*, *Ehrlichia* , and *Anaplasma*. Topics in companion animal medicine, v. 26, n. 4, p. 173-177, 2011.

BURLINI, L.; TEIXEIRA, K. R.; SZABÓ, M. P.; FAMADAS, K. M. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus*(Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern?. **Experimental and Applied Acarology**, v. 50, n. 4, p. 361-374, 2010.

DE OLIVEIRA P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; SAITO, K. C.; NUNES, E. T.; SZABÓ, M. P. J.; MATHIAS, M. I. C. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus*(Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1, p. 139-147, 2005.

FERROLHO, J.; SIMPSON, J.; HAWES, P.; ZWEYGARTH, E.; BELL-SAKYI, L. Growth of *Ehrlichia canis*, the causative agent of canine monocytic ehrlichiosis, in vector and non-vector ixodid tick cell lines. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 4, p. 631-637, 2016.

FLECHTMANN, Carlos HW. Ácaros de importância médico-veterinária. **NBL Editora**, 1973.

JAIN, J. K.; PAULSON, R. J. Oocyte cryopreservation. Fertility and sterility, v. 86, n. 4, p. 1037-1046, 2006.

KESSLER, R. H.; GOMES, A.; CAPIBARIBE, P. R.; SILVA, D. D.; SCHENK, M. A. M. Estabelecimento de cultura *in vitro* de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus*. Embrapa Gado de Corte-Séries anteriores (INFOTECA-E), 1999.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; AHLSTRAND, G. G.; JOHNSON, R. C. BORRELIA burgdorferi in tick cell culture: growth and cellular adherence. **Journal of medical entomology**, v. 25, n. 4, p. 256-261, 1988.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; SAMISH, Michael. Effect of medium supplements on tick cells in culture. The Journal of **Parasitology**, p. 930-935, 1982.

LALLINGER, G.; ZWEYGARTH, E.; BELL-SAKYI, L.; PASSOS, L. M. Cold storage and cryopreservation of tick cell lines. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 37, 2010.

MATTILA, J. T.; BURKHARDT, N. Y.; HUTCHESON, H. J.; MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Isolation of cell lines and a *Rickettsia*l endosymbiont from the soft tick Carios capensis (Acari: Argasidae: Ornithodorinae). **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 6, p. 1091-1101, 2007.

MONIUSZKO, A.; RÜCKERT, C.; ALBERDI, M. P.; BARRY, G.; STEVENSON, B.; FAZAKERLEY, J. K.; BELL-SAKYI, L. Coinfection of tick cell lines has variable effects on replication of intracellular bacterial and viral pathogens. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 4, p. 415-422, 2014.

MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus*group in Latin America. **Acta tropica**, v. 117, n. 1, p. 51-55, 2011.

MORAES-FILHO, J.; KRAWCZAK, F. S.; COSTA, F. B.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus*group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. PLoS One, v. 10, n. 9, p. e0139386, 2015.

MUNDERLOH, U. G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; GE, N. L.; EDWARDS, W. L.; KURTTI, T. J. Establishment of the tick (Acari: Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (*Rickettsia*les: *Anaplasma*taceae) in tick cell culture. **Journal of medical entomology**, v. 33, n. 4, p. 656-664, 1996.

MUNDERLOH, U. G.; LIU, Y.; WANG, M.; CHEN, C.; KURTTI, T. J. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis* . The Journal of **Parasitology**, p. 533-543, 1994.

MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Formulation of medium for tick cell culture. **Experimental and Applied Acarology**, v. 7, n. 3, p. 219-229, 1989.

NAVA, S.; MASTROPAOLO, M.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus*sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3, p. 547-555, 2012.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E. B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. Trends in **Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 157-163, 2009.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

PUDNEY, M.; VARMA, M. G. R.; LEAKE, C. J. Culture of embryonic cells from the tick *Boophilus microplus* (Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v. 10, n. 5, p. 493-496, 1973.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of cell biology**, v. 17, n. 1, p. 208, 1963.

SANCHES, B. V. Uso de propanediol ou DMSO na vitrificação de embriões produzidos *in vitro*, cultivados ou não na presença de forskolin. 2009.

SANCHES, G. S.; ÉVORA, P. M.; MANGOLD, A. J.; JITTAPALAPONG, S.; RODRIGUEZ-MALLON, A.; GUZMÁN, P. E.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus*sensu lato (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 215, p. 78-87, 2016.

SANTIS, G. C.; PRATA, K. L. Criopreservação de células-progenitoras hematopoéticas. Medicina (Ribeirao Preto. Online), v. 42, n. 1, p. 36-47, 2009.

STICH, R. W.; SCHAEFER, J. J.; BREMER, W. G.; NEEDHAM, G. R.; JITTAPALAPONG, S. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 256-273, 2008.

SZABÓ, M. P.; MANGOLD, A. J.; JOAO, C. F.; BECHARA, G. H; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus*tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 1, p. 131-140, 2005.

VON SEEFRIED, A.; MACMORINE, H. G. The use of foetal, calf and adult bovine sera for the growth of serially subcultivated diploid cells. Developments in biological standardization, v. 37, p. 83-89, 1976.

WAKLER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. Accounts of individual species occurring outside the Afrotropical region. The genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae): A guide to the brown ticks of the world. 2000.

YUNKER, C. E. Preparation and maintenance of arthropod cell cultures: Acari, with emphasis on ticks. 1987.

ZWEYGARTH, E.; JOSEMANS, A. I.; SPICKETT, A. M.; STEYN, H. C.; PUTTERILL, J.; TROSKIE, P. C.; KOCAN, K. M. *In vitro* cultivation of a South African isolate of an *Anaplasma sp*. in tick cell cultures. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 4, p. 251-255, 2006.

Anexo A- Protocolo do Meio L15B

Solução 1: Triptose fosfato

Reagentes	Quantidade (Volume final 1L)
Bacto™ Tryptose Phosphate Brot (BD, USA)	29,5 g
H_2O autoclavada	1 L

1. Autoclavar a solução a 121 °C por 15 minutos.
2. Armazenar a solução a 2-8°C

Solução 2: StockD suplementado

Reagentes	Quantidade (Volume final 15 ml)
Stock A (Vitrocell)	150 µl
Stock B (Vitrocell)	150 µl
Stock C (Vitrocell)	150 µl
Stock D (Vitrocell)	14,55 ml

1. Armazenar a 2-8 °C

Solução 3: Preparo do meio L15B

Reagentes	Quantidade (Volume final 501 ml)
L-15 Leibovitz (Vitrocell)	450 ml
L-Glutamina concentração 200 mM (3%)	0,15 g
Solução 1: Triptose fosfato (BD)	50 ml
Solução 2: Stock D suplementado (Vitrocell)	500 µl
Lipoproteína (GIBCO)	500 µl

1. Em uma Capela de Segurança Biológica misturar os reagentes e filtra o meio em 0,22µm
2. Armazenar a 2-8 °C

Anexo B- Preparação de gel de agarose 1%

1. Para 100 ml de gel, pesar 1 g de agarose;

2. Diluir a agarose em 100 ml de tampão TAE 1X (solução 1);

3. Fundir a solução em forno microondas (aproximadamente 1 minuto e 10 seg- evitar fervura);

4. Aguardar a solução esfriar em temperatura ambiente;

5. Acrescentar 4µl de Brometo de Etídio (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), misturar com agitação leve;

6. Despejar a solução na cuba de eletroforese na presença de um "pente" para formar poços para aplicação das amostras;

7. Aguardar a polimerização do gel.

Solução 1 TAE 1X

Reagentes	Quantidade
Tris Base 40 mM ph 7,2	4,84g
EDTA 0,5 M	2 ml
Ácido Acético Glacial	1,15 ml
H_2O Milli-Q autoclavada	1 L

3. CAPÍTULO II PADRONIZAÇÃO DE CULTIVO DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* E SEU USO PARA CULTIVO DE *Anaplasma marginale*

RESUMO

A espécie *Rhipicephalus* (*Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887), conhecida popularmente como "carrapato do boi", é um carrapato monoxeno que tem bovinos como principais hospedeiros. O carrapato *R. microplus* é responsável por transmitir agentes causadores da babesiose e anaplasmose, sendo considerado o principal vetor de *Anaplasma marginale*. Linhagens celulares de carrapatos foram desenvolvidas nos últimos 40 anos e têm sido amplamente utilizadas para a propagação de microrganismos patogênicos. No presente trabalho, **as** culturas de células embrionárias de *R. microplus* foram preparadas com massas de ovos de diferentes idades e mantidas à 30 C° em meio de cultura L-15B, suplementado com 20% de SFB. Subcultivos foram realizados após a formação da monocamada celular confluente. As identidades celulares foram confirmadas pela PCR e sequenciamento, utilizando um fragmento do gene mitocondrial 16S rDNA. As sequências das culturas de células de *R. microplus* foram depositadas no GenBank (MF422023). Essas culturas de células foram infectadas com *Anaplasma marginale* (cepa Jaboticabal), e mantidas em meio L-15B (Vitrocell) suplementado com SFB enriquecido com ferro (Hyclone™), nas concentrações de 2% e 5%. As células infectadas foram mantidas em propagações sucessivas até a terceira passagem, para novas culturas de células, sendo então criopreservadas. Criopreservações no 12º subcultivo foram bem-sucedidas e as células foram estabelecidas em uma linhagem jovem (IBU/RBM-12). O DNA extraído das células infectadas e não infectadas de *R. microplus* foi analisado pela PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Microscopia Eletrônica de Transmissão foi realizada para as células infectadas evidenciando a presença do patógeno. Propagações de células infectadas para as novas culturas de células de *R. microplus* foram bem-sucedidas, confirmando sua eficiência como substrato para crescimento de *Anaplasma marginale* (cepa Jaboticabal).

Palavras-chave: *Rhipicephalus microplus*, culturas de células embrionárias, estabelecimento de linhagem, IBU/RBM-12, *Anaplasma marginale*

3.1 Introdução

A espécie *R. microplus* (Canestrini, 1887), conhecido popularmente como "carrapato do boi", é um carrapato monoxeno que tem bovinos como principais hospedeiros, podendo ser encontrado também em outros animais domésticos e em alguns ungulados silvestres (GUGLIELMONE et al., 2006).

As infestações acarretam grandes perdas para bovinocultura, resultando em prejuízos anuais de bilhões de dólares na pecuária nacional (MARTINEZ et al., 2006; RODRIGUES et al.,2014; MILKPOINT, 2017).

Este carrapato é responsável por transmitir os patógenos das enfermidades que integram o complexo Tristeza Parasitária Bovina (TPB), que inclui os protozoários do gênero *Babesia* (*Babesia bigemina* e *Babesia bovis*) e bactérias do gênero *Anaplasma* (*Anaplasma marginale*) (PÉREZ DE LEÓN et al., 2010).

Estudos epidemiológicos indicam que a espécie *R. microplus* é a principal vetora de *A. marginale* agente etiológico da anaplasmose bovina (GUGLIELMONE, 1995, KESSLER, 2001; DE CAMPOS PEREIRA et al., 2008).

Anaplasma marginale é uma bactéria intracelular obrigatória compreendida na ordem *Rickettsiales*, com distribuição mundial, sendo encontrada principalmente na região tropical e subtropical (JONGEJAN; UILENBERG 2004; AUBRY; GEALE, 2011). A anaplasmose bovina provoca alta morbidade e mortalidade em bovinos (BARROS et al., 2005; GUEDES JÚNIOR et al., 2008; KOCAN et al., 2010).

Culturas de células de carrapatos oferecem um simplificado sistema de vetor *in vitro*, que são úteis para estudos de patógenos intracelulares, agregando um maior conhecimento sobre a biologia e interação hospedeiro-vetor-patógeno (VARMA. et al., 1975; BELL-SAKYI et al., 2007).

Linhagens de células a partir do carrapato *R. microplus* já foram estabelecidas há algumas décadas (HOLMAN; RONALD, 1980; KURTTI et al.,1988; COSSIO-BAYUGAR et al., 2002; BELL-SAKYI, 2004). A bactéria *A. marginale* tem sido propagada em linhagens de células do carrapato vetor e também de carrapatos não vetores (MUNDERLOH et al.,1996; BLOUIN et al., 2002; BELL-SAKYI et al.,2007; MONIUSZKO et al. 2014). As linhagens mais utilizadas como substrato para o crescimento de *A. marginale* são: ISE6 e IDE8, ambas obtidas de *Ixodes scapularis* Say, 1821; IRE/CTVM18 (obtida de *Ixodes ricinus* (L.) e BME26 (obtida de *R.*

microplus) (MUDERLOH et al.,1996; BLOUIN et al., 2003; MUDERLOH et al.,2004; ZWEYGARTH et al.,2006; BASTOS et al., 2009; ESTEVES et al., 2009; VILLAR et al., 2010; AYLLON et al., 2013). No presente estudo, culturas de células embrionárias de *R. microplus* foram obtidas para avaliar a possibilidade da utilização como substrato para *A. marginale* (cepa Jaboticabal).

3.2 Material e métodos

3.2.1 Origem dos carrapatos

Fêmeas de *R. (B) microplus*, ingurgitadas, foram fornecidas pela Fazenda Angus Itú, localizada na cidade de Itú, SP.

3.2.2 Desinfecção das fêmeas de *R. (B) microplus*

Em uma capela de fluxo laminar horizontal, as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram lavadas em álcool 70% e mergulhadas em solução de cloreto de benzalcônio 2% por 15 minutos. A seguir, os espécimes foram lavados em água destilada esterilizada contendo antibióticos por 5 minutos, adaptando-se a técnica utilizada por Kessler et al. (1999). Depois de secas em gazes esterilizadas, as fêmeas foram colocadas individualmente em placas de Petri estéreis, e mantidas em uma estufa biológica com demanda de oxigênio (B.O.D), à 27 ^{o}C ± 1 e umidade de 90% ± 5, para realização das posturas.

Assim que as fêmeas iniciaram a oviposição, os ovos foram separados dia-a-dia (até o final da postura), em placa de Petri estéril, sendo mantidos em estufa BOD nas mesmas condições acima, até a data exata do início dos experimentos.

O período de incubação dos ovos de *R. microplus* varia de 22-26 dias. Dessa forma, as seguintes idades das massas de ovos foram analisadas em microscópio estereoscópico da marca Leica, modelo EZ4: 10, 12 e 14 dias de idade. O desenvolvimento embrionário foi observado conforme Mattila et al. (2007).

3.2.3 Cultivos primários

Os ovos foram pesados e depositados em um tubo cônico tipo Falcon de 50 ml, as lavagens foram realizadas em uma capela de segurança biológica conforme protocolo proposto por Munderloh et. al. (1994) e Bell-Sakyi (1991).

O processo de lavagem iniciou-se com a imersão dos ovos em Cloreto de Benzalcônio 2% (TPP) e centrifugados a 400 x g, por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado (esse processo de centrifugação e descarte de sobrenadante, foi realizada ao final de cada etapa, antes da adição das diferentes soluções). Os ovos foram lavados durante 10 minutos em álcool 70% e em água destilada autoclavada por 5 minutos. Em seguida, os ovos foram lavados em solução de agua destilada autoclavada com 50 µl de anfotericina B e 100 µl de antibióticos (Penicilina e Streptomicina) por 25 minutos. Após, os ovos foram imersos em hipoclorito de sódio 2% durante 5 minutos, e então foi realizada a última etapa de lavagem com água destilada autoclavada.

Os ovos foram quebrados em meio L-15B completo (Vitrocell) (Anexo B) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino – (SFB) (Vitrocell) e a Triptose fosfato (TTB).

A suspenção celular foi centrifugada a 100 x g por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 2,5 ml de meio L-15B (Vitrocell) completo com 20% de SFB com antibióticos (com 2,5 µl de penicilina/estreptomicina e 2,5 µl de anfotericina B) e colocado em garrafas de 25 cm2, incubadas à 30°C. As culturas foram vistoriadas diariamente em Microscópio de Luz Invertida da marca Nikon, modelo Elipse. O meio foi trocado semanalmente. No entanto, na primeira semana do cultivo, as trocas foram mais frequentes para evitar perda de células viáveis durante a remoção do meio. Todas as vezes em que houve necessidade de remover o meio para substituição por um novo.Os ovos foram quebrados em meio L-15B completo (Vitrocell) (Anexo B) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino – (SFB) (Vitrocell) e a Triptose fosfato (TTB).

A suspenção celular foi centrifugada a 100 x *g* por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 2,5 ml de meio L-15B (Vitrocell) completo com 20% de SFB com antibióticos (com 2,5 µl de penicilina/estreptomicina e 2,5 µl de anfotericina B) e colocado em garrafas de 25 cm^2, incubadas à 30°C.

As culturas foram vistoriadas diariamente em Microscópio de Luz Invertida da marca Nikon, modelo Elipse. O meio foi trocado semanalmente. No entanto, na primeira semana do cultivo, as trocas foram mais frequentes para evitar perda de células viáveis durante a remoção

do meio. Todas as vezes em que houve necessidade de remover o meio para substituição por um novo, o sobrenadante foi colocado em outra garrafa até que não houvesse mais células aderentes.

3.2.4 Subcultivos

Os subcultivos foram realizados de acordo com o crescimento celular, e a partir da segunda passagem, os antibióticos foram suprimidos. Quando a confluência alcançou 90%-100%, as células foram retiradas da garrafa através de raspagem (*cell scraper*). Após centrifugação em tubo cônico tipo Falcon com 6 ml de meio L15-B (por 8 minutos a 100 x *g*) o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspendido em 8 ml de meio e dividido em 2 garrafas. A partir da primeira passagem, as culturas com cerca de $8x10^5$ células/ml (contadas em câmara de Neubauer), foram criopreservadas conforme descrito mais abaixo.

Para avaliar a cinética do crescimento celular foi realizada uma curva de crescimento com culturas de células no 8ª subcultivo, seguindo as orientações de Prescott et al. (1996).

As células foram retiradas da garrafa através de remoção mecânica (*cell scraper*) e semeadas em placas de cultura com seis poços e incubadas a 30°C. A contagem celular foi realizada a cada 24 horas durante 10 dias, em câmara de Neubauer, levando em consideração as células distribuídas nos quatro quadrantes, seguindo as orientações de WIGG et al. (2003). A viabilidade celular foi analisada com o reagente azul de Tripan (Gibco).

Para contagem, as células foram retiradas da placa através de raspagem, transferidas para tubo cônico tipo Falcon de 15 ml e centrifugadas a 100 x *g*, por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em meio L-15B (Vitrocell). Foram homogeneizados 10 µl da suspensão de células com igual volume de azul de Tripan. Uma amostra de 10 µl dessa solução foi pipetada na superfície da câmara para a contagem.

As células vivas e mortas foram então observadas e contadas em microscópio de luz invertida da marca Nikon, modelo Elipse, utilizando-se objetiva 10 X. A contagem das células foi feita, usando o fator de conversão de volume para $1mm^2$, que é de 10^4

$$\frac{\text{n° total de células contadas x } 10^4 \text{ x fator de diluição} = \text{n° de células/ml}}{\text{número de quadrados contados}}$$

Após a determinação da curva de crescimento, foram calculadas a velocidade máxima específica de crescimento (μ) e o tempo de duplicação [Td (h^{-1})] da fase exponencial.

Os números da fase exponencial foram então transformados em logaritmo neperiano (ln), para obtenção do gráfico de tendência linear que permitiu determinar a equação angular da reta (Y=X+A).

A velocidade máxima específica de crescimento (μ) foi calculada a partir da divisão do X(Biomassa) pelo tempo (24 horas), fórmula:

$$\mu: X/\text{tempo}$$

Já o tempo de duplicação foi obtido segundo a fórmula:

$$Td: \ln 2.\ \mu_{max}$$

3.2.5 Criopreservação e recuperação das culturas

O processo de criopreservação foi realizado segundo protocolo adaptado de Lallinger et al. 2010. Uma alíquota da suspensão celular (corada com Azul de Tripan) foi utilizada para a contagem celular em câmara de Neubauer. O processo de criopreservação foi realizado seguindo protocolo adaptado de Lallinger et al. (2010).

Uma alíquota da suspensão celular (corada com Azul de Tripan (Gibco) foi utilizada para a contagem celular em câmara de Neubauer para o cálculo da concentração de células/ml a ser utilizada no processo de criopreservação.

Após a contagem celular, a suspensão (oriunda da raspagem contendo células) com 8 ml de meio L-15B (Vitrocell) foi centrifugada a 100 x *g* por 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 1 ml de meio L15B contendo 10% de SFB (Vitrocell) e 500 µl de meio L15B contendo 25% de Dimetil Sulfóxido (DMSO) (HYBRI-MAX™). O conteúdo foi pipetado em um criotubo de 1,8 ml e transferido para um contender de congelamento NALGENE® Frosty™, e mantido no freezer -80 ^{o}C por 24 horas. Em seguida foi armazenado em nitrogênio líquido.

Para recuperação das células criopreservadas, cada criotubo foi rapidamente descongelado em banho-maria a 37 ºC. O conteúdo foi transferido para tubo cônico tipo Falcon contendo 5 ml meio de cultivo (L-15B) com de soro fetal a 20%. Após a centrifugação (100 x *g* por 8 minutos em temperatura ambiente), os sobrenadantes foram descartados e o *pellet* ressuspendido em 4 ml de meio, sendo a seguir incubado em garrafa de 25 cm^2 e mantidas

3.2.6 Confirmação da identidade celular

A identidade celular foi confirmada utilizando um ensaio de PCR convencional com base em 16S rRNA mitocondrial (Black e Piesman, 1994). As amostras de células (4 ml) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram raspadas dos frascos (25 cm^2) e processadas para extração de DNA usando o kit de extração de tecido DNeasy (Qiagen, Chatsworth, CA), seguindo as instruções do fabricante.

A mistura tinha tampão de PCR 10X (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), MgCl2 1,0 mM (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), desoxinucleótido trifosfato 0,2 mM (dNTPs) (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 1.5U Taq DNA Polymerase (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA) e 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador 16S + 1 (5'-CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC TGT GG-3 ') e 16S - 1 (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T- 3 ') (Integrated DNA Technologies®, Coralville, IA, EUA). As amplificações foram realizadas com 10 ciclos iniciais de 92 ° C por 1 min, 48 ° C por 1min e 72 ° C por 1min, seguido de 32 ciclos de 92°C por 1 min, 54 ° C por 35 seg e 72 °C por 1,35 min, e extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% (Anexo C) corado com brometo de etídio (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA). Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta usando o Image Lab Software versão 4.1 (Bio-Rad®). Os produtos da reação de PCR foram purificados usando o kit comercial DNA Silica Bead (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EUA). O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado por meio de sistema automatizado baseado no método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo Sanger utilizando o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EUA)

e ABI PRISM 310DNA Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA). A identidade foi confirmada utilizando o programa BLAST.

3.2.7 Infecção das culturas primárias de células embrionárias de *R. microplus* com *A. marginale* (cepa Jaboticabal)

A bactéria *A. marginale* foi isolada de bezerro altamente parasitado, oriundo de Jaboticabal-SP (dados não publicados). A cepa tem sido mantida por passagens em bezerros esplenectomizados, e criopreservada em dimetil sulfóxido (DMSO) a 10%, em nitrogênio líquido, a - 196° C. Essa amostra foi utilizada para a infecção de células de *R. microplus*.

Para a primeira infecção, o patógeno foi inoculado em meio L15 sem suplementação de soro, em tubo cônico tipo Falcon com meio L-15B (Vitrocell) sem adição de antibióticos e sem SFB. O tubo cônico tipo Falcon foi invertido algumas vezes para homogeneização e centrifugado à temperatura ambiente por 15 minutos a 400 x *g*. A suspensão foi novamente homogeneizada e centrifugada por 15 minutos a 400 x g. Este procedimento foi repetido três vezes.

Essa amostra foi inoculada em duas garrafas de 25 cm2 com células de R. sanguineus (linhagem tropical e temperada). O meio L-15B (Vitrocell) suplementado com SFB (Hyclone™®-Chicago, Illinois, EUA) sob duas concentrações diferentes (2% e 5%) e substituídas parcialmente semanalmente. Após quatro semanas, as culturas positivas foram propagadas em novas culturas de células ou foram ultra centrifugadas a 9000 xg para extrair os agentes patogênicos semi-purificados antes da criopreservação.

Lâminas contendo amostras das culturas células de *R. microplus*, foram fixadas com metanol (100%) por 5 minutos. Para a preparação das lâminas e coloração com Panótico Rapído, utilizou-se o aparelho Cytospin (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

3.2.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras das células de *R. microplus* não infectadas (controle) e infectadas com *A. marginale* foram fixadas em solução de Karnovsky (mistura de glutaraldeído e paraformaldeído) (Karnovsky, 1965) em 0,1 M de tampão de cacodilato de pH 7,2 durante 2 horas. Foram então pós-fixadas numa solução de tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão durante 1 hora. Após a lavagem, foram imersas em solução de acetato de uranila a 0,5% com 13,3% de sacarose e mantidas a 4 °C durante 24 horas. A desidratação foi realizada em série de etanol. Após a passagem em óxido de propileno, as amostras foram infiltradas com 1:1 mistura de Óxido de propileno com resina epon durante 2-3 horas 1. As suspensões de células foram transferidas para BEEM cápsula com resina pura e centrifugou-se a 900 g durante 5 minutos. Após a substituição da resina e novamente centrifugada para sedimentar as células, as cápsulas foram secas a 60 °C para a polimerização durante 2 a 3 dias. Secções ultrafinas (60-70 nm) foram colocadas em grelhas de cobre, em contraste com uma solução aquosa de acetato de uranila a 2% durante 10 minutos, citrato de chumbo, durante 3 a 5 minutos (REYNOLDS, 1963), e, em seguida, examinadas sob um microscópio TEM LEO 906E (Zeiss, Alemanha). As imagens foram capturadas pela câmera CCD MegaView III através do item de programa - Universal TEM imagem Platform (Olympus macio Imaging Solutions GmbH, Alemanha).

3.2.9 PCR em tempo real

A reação de qPCR das amostras de DNA das células infectadas por *Anaplasma marginale* foi realizada segundo descrito por Carelli et al. (2007), para o gene msp1.

A reação foi realizada com volume final de mistura de 10 µL, contendo 1 µL de DNA genômico, 5,0 µL de TaqMan® Gen Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 10 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (AM forward: 5'-TTGGCAAGGCAGCAGCTT 3' e AM-inversa: 5-'TTCCGCGAGCATGTGCAT-3') e 10 µM da sonda de hidrólise (AM-sonda: 6FAM-5’-TCGGTCTAACATCTCCAGGCT TTCAT-3’-

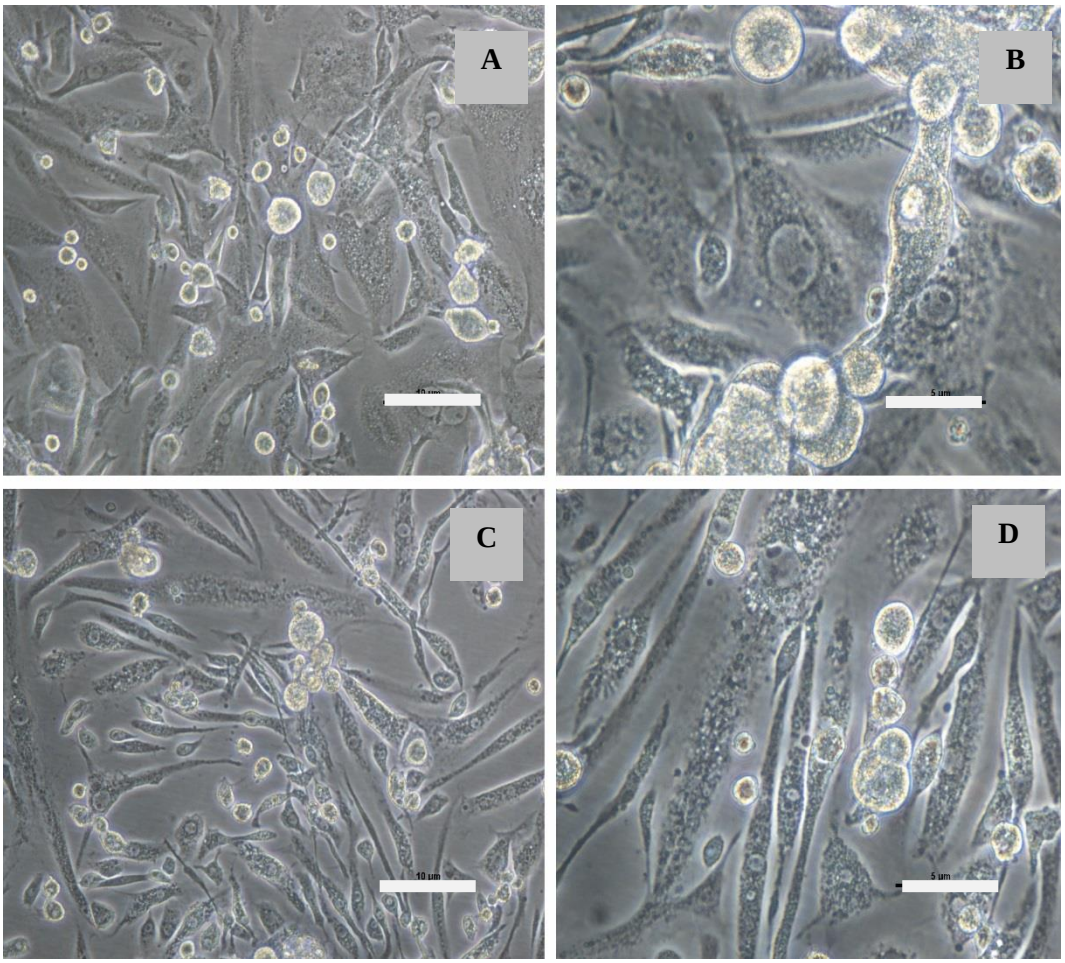
BHQ1). Os ciclos foram realizados sob as seguintes condições: 2 min/50 °C, 10 min/95 °C e 40 ciclos de 15seg/95 ºC e 1 min/60 ºC. As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador CFX96 Thermal Cycler® (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos).

3.3 Resultados

As células embrionárias de *R. microplus* cultivadas utilizando massas de ovos com idade de 15 dias, desenvolveram uma monocamada celular confluente com agrupamento e diferentes tipos celulares. Essa idade dos ovos foi a melhor para adesão e crescimento celular.

O primeiro subcultivo só foi possível após 12 meses do início do cultivo primário (Figura 3.1). O primeiro subcultivo (P1) por sua vez, só pode ser repicado após 6 meses, resultando em sucesso para a segunda subcultivo (P2). Após a P2, as células começaram a crescer rapidamente. Atualmente as culturas estão no 22ª subcultivo.

Figura 3.1: Cultivos de células embrionárias de *R. (B.) microplus*



A-B: Células de *R. (B.) microplus* P6(7° subcultivo) ', barra 10µm e 5 µm, respectivamente. **B-C:** Células de *R. (B.) microplus* após P6(6º subcultivo), barra 10 µm. e 5 µm, respectivamente

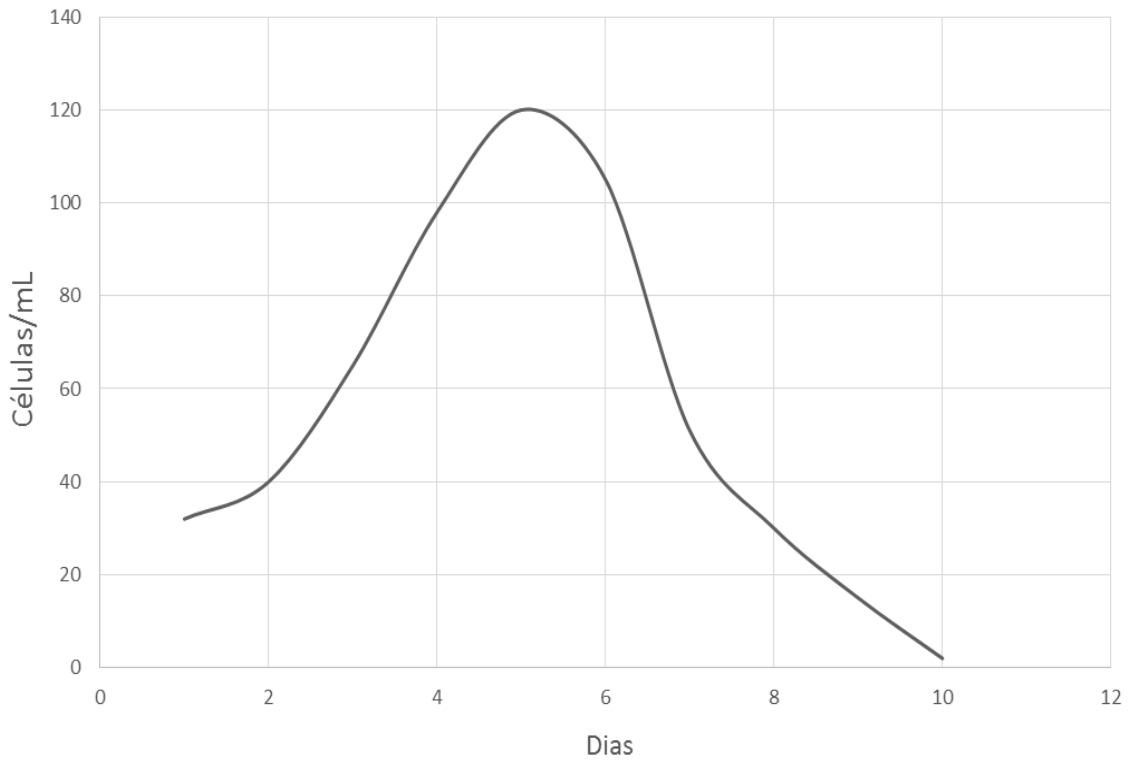
Fonte: LIMA-DUARTE (2017)

Durante o crescimento celular em meio L15-B, as células apresentaram uma curva de crescimento padrão (Gráfico 3.2 e 3.3), composta por quatro fases distintas: fase lag, fase exponencial de crescimento, fase estacionária e fase de declínio.

A duração da fase Lag foi curta e a fase Log ou exponencial de crescimento foi naturalmente a fase com maior viabilidade e atividade metabólica da população celular, apresentando velocidade máxima específica de crescimento (µ) de 0,018 e tempo de duplicação (Td) de 42,2 horas.

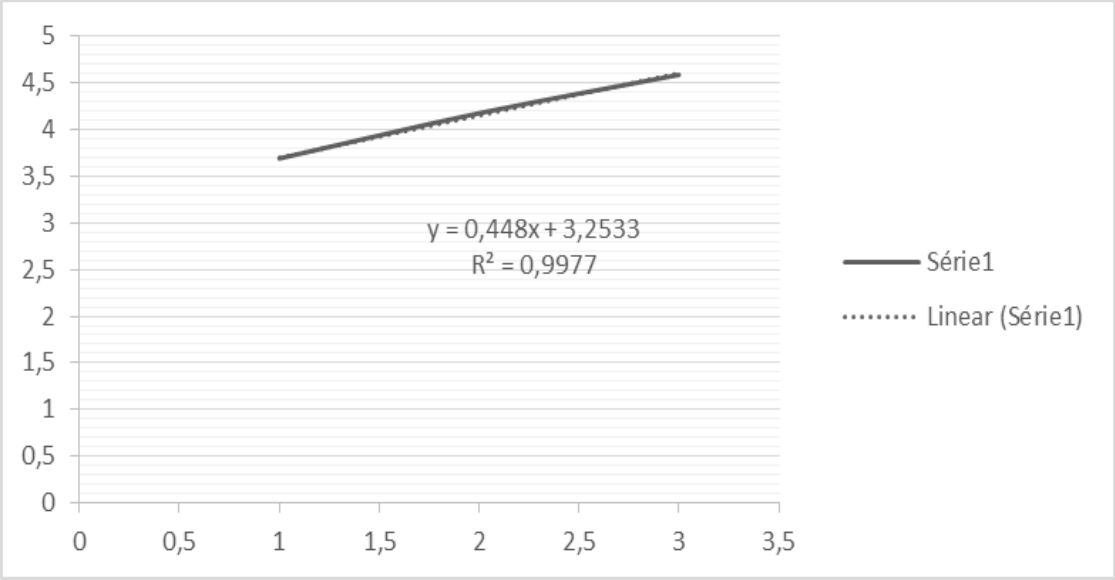
Na fase estacionária sucedeu a formação de um número máximo de células (X max) que foi de 120 x 10^4, que ocorreu no 5ª dia (Tmax-days). Nesse ponto do gráfico podemos observar que a velocidade de crescimento diminuiu e o número de morte se equivaleu ao número de células novas. Após a fase estacionária ocorreu uma redução drástica no número de células, característica típica da fase de declínio. Pode-se observar também que o número de morte celular foi maior que o número de células em divisão.

Gráfico3.2: Curva de crescimento de células embrionárias de *R. (B) microplus* no 8º subcultivo



Fonte: LIMA-DUARTE (2017)

Gráfico 3.3: Gráfico de tendência linear



Fonte: LIMA-DUARTE (2017)

À medida que as células entraram em crescimento rápido (P3), passamos a criopreservá-las. No entanto, após 3 meses de congelamento, as células ao serem descongeladas não foram recuperadas nessa passagem. Somente após 12º subcultivo foi possível a recuperação das células, que por sua vez se tornou contínua (denominada: IBU/RBM-12) depositada no Instituto Pasteur[2].

Os resultados das reações de sequenciamento das amostras de células no 12° subcultivo de *R. microplus*, mostrou 100% de similaridade e *score* máximo com uma porção do genoma mitocondrial completo de *R. microplus* (KY020993.1) confirmando a identidade celular dessa espécie. A sequência foi depositada sob o código GenBank (MF422023).

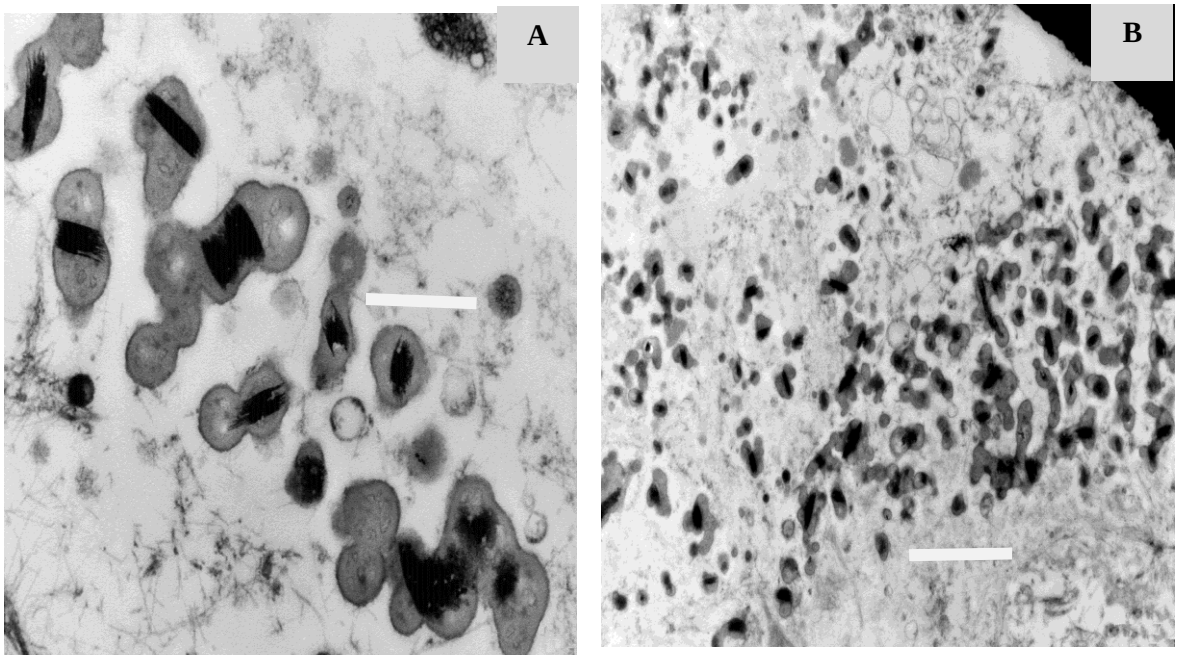
As infecções com *A. marginale* foram realizadas nos cultivos primários. No início, as concentrações de SFB, eram de 5 %, mas padronizamos para 2% nas culturas com *A. marginale*. Nessa concentração, o crescimento celular desacelerou compensando o aumento do patógeno e invasão de novas células.

No total, foram infectadas com *A. marginale* mais de dez garrafas de cultura de células de *R. (B) microplus*, que posteriormente foram propagadas para novas garrafas e também foram criopreservadas. Células infectadas na 4ª propagação foram analisadas pela PCR quantitativa em tempo Real. As curvas demonstraram que o material infectante foi transmitido para novas células, mesmo após congelamento. As imagens em MET evidenciam a presença de *A. marginale* nas células (Figura 3.2).

---

[2] Número de deposito: CNCM I-5170 (Instituto Pasteur)

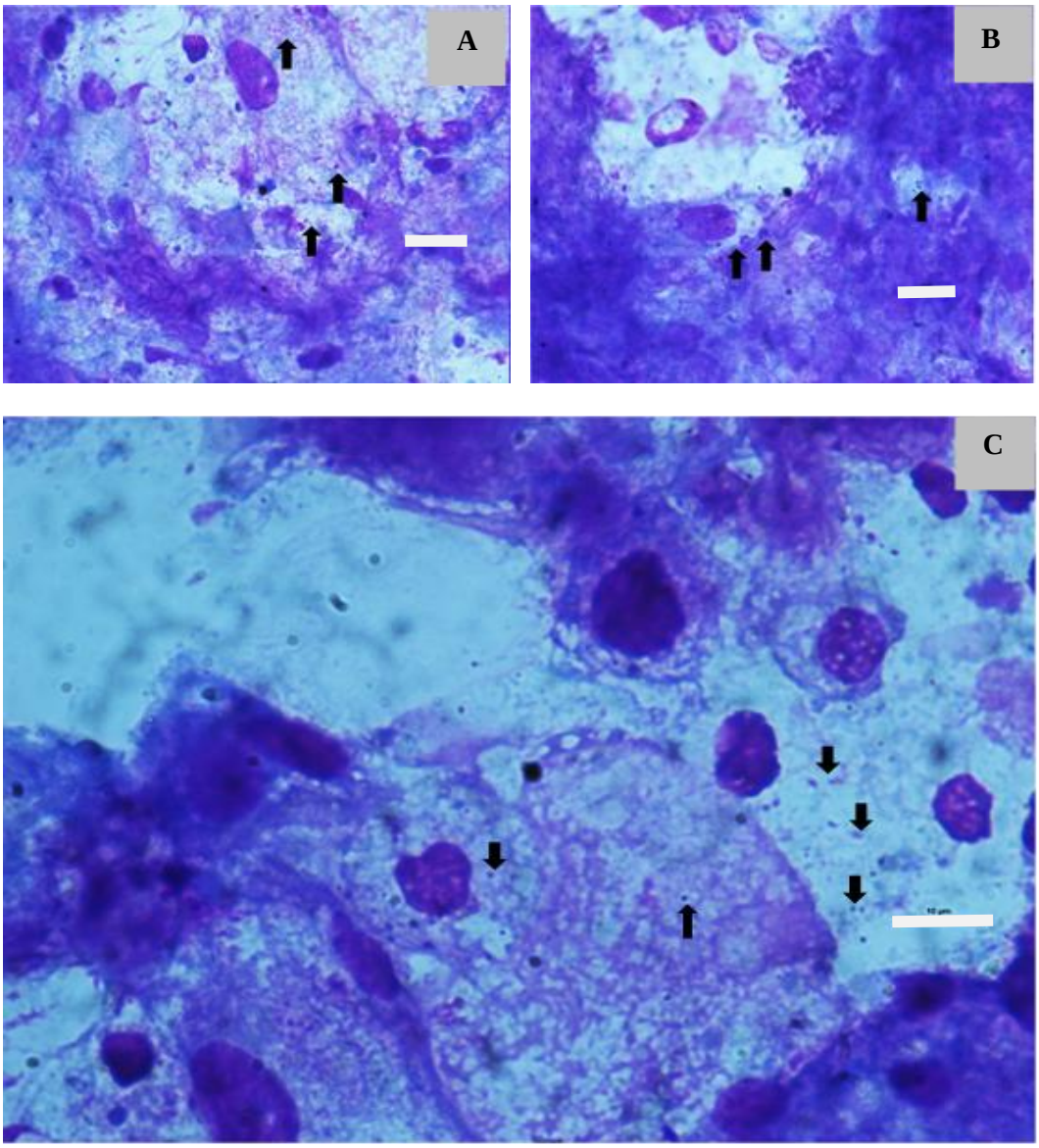
Figura 3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão de culturas de Célula embrionárias de *R.(B.) microplus* infectadas com bactérias *A. marginale* .



A-B: Célula de *R.(B.) microplus* totalmente destruída, evidenciando as bactérias *A. marginale*, em aumento de 20.000x e 7000x, respectivamente

Assim, confirmamos que as culturas de células embrionárias *R. microplus* são bons substratos para a manutenção e propagação de *A. marginale*. Por outro lado, nem todas as células se infectam, o que sugere que existem mecanismos de defesa em algumas células *R. microplus* diferenciadas. Extraimos *A. marginale* dessas culturas e inoculando nas células que não foram infectadas embora estivessem em contato com o patógeno. Foram ainda preparadas lâminas dessas culturas infectadas (coradas com Panótico rápido) para visualização dos corpúsculos de *Anaplasma* nas células (Figura 3.3).

Figura 3.5 Fotomicrografias ópticas de culturas de células embrionárias de *R.* (*B*) *microplus* infectadas com *A. marginale*, coradas com Panótico rápido.



A-C: Célula de *R. microplus* coradas com Panótico rápido, aumento de 1000x. barras 10 µm.

3.4 Discussão

Apesar da existência de protocolos relativamente padronizados para estabelecer culturas primárias de células embrionárias de carrapatos, algumas espécies apresentam maior dificuldade do que outras para produzirem culturas de células contínuas.

Estudos anteriores evidenciaram que as células de carrapatos em cultivo passam a aderir à superfície da garrafa após horas ou até mesmo semanas, no caso dos argasídeos (YUNKER et al., 1987). Para as culturas de células embrionárias de *R. microplus* observou-se que o processo de adesão se deu rapidamente (poucos minutos após o cultivo).

No presente estudo, o crescimento celular foi muito lento, sendo que as células só puderam ser subcultivadas pela primeira vez após 12 meses do cultivo inicial, e apesar da viabilidade celular e confluência necessária morriam quando tentávamos subcultivá-las. Esse fato está de acordo com observações feitas por Munderloh et al. (1994). Após o 2º subcultivo percebemos a intensificação da expansão celular, e consequentemente os subcultivos passaram a ser realizados em intervalos de 30 dias.

Os protocolos de criopreservação mais utilizados para as células de carrapatos são os estabelecidos por Kurtti et al. (1982) e Lallinger et al. (2010). Contudo, nem todas as linhagens de células de carrapato respondem positivamente a esse método, não sendo recuperadas após a criopreservação (BELL-SAKYI et al. 2007). Para garantir que as linhagens celulares sejam contínuas, uma parte deve ser armazenada e outra criopreservada. Quando mantidas em nitrogênio líquido, as culturas contínuas podem sobreviver por no mínimo 12 anos (BELL-SAKYI et al. 2007) e o armazenamento de culturas deve ser realizado à temperatura de 4 ºC a 12 ºC (KURTTI et al., 1988; BASTOS et al., 2006).

Para a criopreservação dos cultivos de células embrionárias de *R. microplus*, utilizamos o método de congelamento lento com DMSO como solução crioprotetora, conforme protocolo de Lallinger et al. (2010) com algumas modificações. As células puderam ser recuperadas no 12º subcultivo, estando atualmente no 25º subcultivo.

A linhagem de *R. microplus* que existe no banco celular da Universidade de Minesota, em Mineapolis/St. Paul, USA (BME-26), necessitou de 26 subcultivos, antes do sucesso na criopreservação. A caracterização celular e molecular dessa linhagem foi reportada por Esteves et al. (2008).

A contagem celular é uma técnica empregada para monitorar a reprodução de células em meios de cultivo de interesse em ensaios biológicos. Esses ensaios permitem o controle da

proliferação de células em tecidos vivos e estudos de cinética celular (FUSSENEGER; BAILEY, 1998; ABU-ABSI et al., 2003). O crescimento das culturas de células é composto por quatro fases distintas: fase lag, fase log, fase estacionária e fase de declínio (KOCH; HIGGINS, 1982; KONEMAN et al., 2012). A fase lag, compreende a fase de latência ou adaptação, nesta fase ocorrem as sínteses de enzimas de diferentes macromoléculas necessárias à divisão celular (BROOKS et al., 2000). Na fase log, ou exponencial de crescimento, os números de massa celular aumentam em escala logarítmica, com um tempo de geração constante. A fase estacionária é caracterizada por manter as taxas de reprodução e de mortalidade em equilíbrio. Por fim, a fase de declínio, corresponde a perda irreversível da capacidade de divisão celular, no qual a taxa de mortalidade excede a taxa de proliferação equilíbrio (BURTON; ENGELKIRK, 1998).

As culturas de células embrionárias de *R. microplus* mantidas em meio L15B suplementado com 20% SFB, apresentaram uma curva de crescimento padrão contendo todas as fases acima descritas. A fase lag foi relativamente curta indicando que essas células possuem um crescimento ativo. A fase log ou exponencial de crescimento foi naturalmente a fase com maior viabilidade e atividade metabólica da população celular, apresentando velocidade máxima específica de crescimento (μ) de 0,018 e tempo de duplicação (Td) de 42,2 horas. Munderloh e Kurtti (1989) realizaram um estudo com linhagens de células de carrapatos, no qual o tempo de duplicação (Td) foi de 114 horas. Sendo assim, podemos supor que as culturas de células embrionárias de *R. microplus* no 8º subcultivo apresentam alta taxa de proliferação. Por fim, a taxa de mortalidade excedeu a taxa de reprodução e o número de células viáveis sofreu declínio. Durante essa fase, as células adquirem alterações morfológicas, de modo que se tornam de difícil reconhecimento (TRABULSI et al., 2005), o que corrobora com o observado no presente estudo.

Propagação de agentes patogênicos, como *Ehrlichia* e *Anaplasma*, já foram estabelecidos em linhagens de células de carrapatos (MUNDERLOH et al.,1996; BLOUIN et al., 2002). No presente estudo as culturas de células embrionárias de *R. microplus* demostraram ser adequadas ferramentas *in vitro* para a manutenção e propagação de A. marginale. Então, a obtenção de culturas de células estabelecidas de *R. microplus* proveniente do Brasil foi um grande avanço e o estabelecimento da linhagem IBU/RBM12 propiciará novas frentes de pesquisa na busca dos antígenos vacinais para Anaplasmose (estudos em andamento, objeto de patente). Além disso, representa uma fonte ilimitada que se auto-replica, podendo crescer, disponibilizando quantidades ilimitadas de células para outros estudos experimentais (BELL-SAKYI et al., 2007).

3.5 Conclusão

- Culturas de células embrionárias de *R. microplus* mostraram-se eficientes como substrato para o crescimento de *A. marginale* (cepa Jaboticabal).
- Foi estabelecido a linhagem das células de *R. microplus* a partir do 12ª subcultivo.

Referências

ABU-ABSI, Nicholas R. et al. Automated flow cytometry for acquisition of time-dependent population data. **Cytometry Part A**, v. 51, n. 2, p. 87-96, 2003.

AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z.; LABRUNA, M.B. Serological diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis with Brazilian antigen of *Ehrlichia* canis. Ciência Rural, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007
.

AYLLÓN, N.; VILLAR, M.; BUSBY, A. T.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; BONZÓN-KULICHENKO, E.; VÁZQUEZ, J. *Anaplasma* phagocytophilum inhibits apoptosis and promotes cytoskeleton rearrangement for infection of tick cells. **Infection and immunity**, v. 81, n. 7, p. 2415-2425, 2013.

AUBRY, P N. R.; Z.; A.; J.; B.; S. J.; & S.; F. A review of bovine anaplasmosis. Transboundary and emerging diseases, v. 58, n. 1, p. 1-30, 2011.

BARROS, S. L.; MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; MENK, C. F.; DE ALMEIDA, M. A. O.; MELO, E. P.; & KESSLER, R. H. Serological survey of Babesia bovis, Babesia bigemina, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 100, n. 6, p. 513-517, 2005.

BASTOS, R. G.; UETI, M. W.; GUERRERO, F. D.; KNOWLES, D. P.; SCOLES, G. A. Silencing of a putative immunophilin gene in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* increases the infection rate of *Babesia bovis* in larval progeny. **Parasites & vectors**, v. 2, n. 1, p. 57, 2009.

BASTOS, C. V.; DAS VASCONCELOS, M. M. C.; RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F. Use of refrigeration as a practical means to preserve viability of *in vitro*-cultured IDE8 tick cells. **Experimental and Applied Acarology**, v. 39, n. 3, p. 347-352, 2006.

BELL-SAKYI, L.; ZWEYGARTH, E.; BLOUIN, E. F.; GOULD, E. A.; JONGEJAN, F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. Trends in **Parasitology**, v. 23, n. 9, p. 450-457, 2007.

BELL-SAKYI, L.; KONEY, E. B. M.; DOGBEY, O.; WALKER, A. R. Incidence and prevalence of tick-borne haemoparasites in domestic ruminants in Ghana. **Veterinary Parasitology**, v. 124, N. 1, P. 25-42, 2004.

BLOUIN, E. F.; SALIKI, J. T.; DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; KOCAN, K. M. Antibodies to *Anaplasma marginale* major surface proteins 1a and 1b inhibit infectivity for cultured tick cells. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 2, p. 247-260, 2003.

BLOUIN, E. F.; DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; SAUER, J. R., SALIKI, J. T.; KOCAN, K. M. Applications of a cell culture system for studying the interaction of *Anaplasma marginale* with tick cells. **Animal health research reviews**, v. 3, n. 2, p. 57-68, 2002.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. Estructura celular. Jawetz, melnick & adelberg: Microbiologia médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 6-30, 2000.

BURTON, G.; ENGELKIRK, P. G.; TOROS, E. F. Microbiologia para as ciências da saúde. Guanabara Koogan, 1998.

COSSIO-BAYUGAR, R.; WAGNER, G. G.; HOLMAN, P. J. *In vitro* generation of organophosphate resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cell lines. **Journal of medical entomology**, v. 39, n. 2, p. 278-284, 2002.

DE CAMPOS-PEREIRA, M.; BAHIA-LABRUNA, M.; SZABÓ, M. P. J.; MARCONDES-KLAFE, G. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* biologia, controle e resistência. Primeira edição. São Paulo. Editorial MedVet, 2008.

DE LEÓN, A. A. P.; STRICKMAN, D. A.; KNOWLES, D. P.; FISH, D.; THACKER, E.; DE LA FUENTE, J.; KRAUSE, P.J.; WIKEL, S.K.; MILLER, R.S.; WAGNER, G.G.; ALMAZAN, C.; HILLMAN, R.; MESSENGER, M.T.; UGSTAD, P.O.; DUHAIME, R.A.; TEEL, P.D.; ORTEGA-SANTOS, A.; HEWITT, D.G.; BOWERS, E.J.; BENT, S.J.; COCHRAN, M.H.; MCELWAIN, T.F.; SCOLES, G.A.; SUAREZ, C.E.; DAVEY, R.; FREEMAN; ALMAZÁN, C. L. One Health approach to identify research needs in bovine and human babesioses: workshop report. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 36, 2010.

ESTEVES, E.; LARA, F. A.; LORENZINI, D. M.; COSTA, G. H.; FUKUZAWA, A. H.; PRESSINOTTI, L. N.; DAFFRE, S. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 5, p. 568-580, 2008.

ESTEVES, E.; BASTOS, C. V.; ZIVKOVIC, Z.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.; BLOUIN, E.; DAFFRE, S. Propagation of a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale* with appendage in a tick cell line (BME26) derived from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1, p. 150-153, 2009.

FUSSENEGGER, M.; BAILEY, J. E. Molecular regulation of cell-cycle progression and apoptosis in mammalian cells: implications for biotechnology. **Biotechnology progress**, v. 14, n. 6, p. 807-833, 1998.

GUGLIELMONE, A. A.;BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; ESTRADA-PEÑA,. Ticks (ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83-100, 2006.

GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 109-119, 1995.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S3-S14, 2004.

JUNIOR G.; DANIEL, S.; ARAÚJO, F. R.; SILVA, F. J.; RANGEL, C. P.; BARBOSA NETO, J. D.; & FONSECA, A. H. Frequency of antibodies to Babesia bigemina, B. bovis, *Anaplasma marginale*, Trypanosoma vivax and Borrelia burdgorferi in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 105-109, 2008.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.

KLAFKE, G. M.; SABATINI, G. A.; THAIS, A.; MARTINS, J. R.; KEMP, D. H.; MILLER, R. J.; SCHUMAKER, T. T. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3, p. 386-390, 2006.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F.; EWING, S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2, p. 95-107, 2010.

KONEMAN, E.; WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERBER, P.; WOODS, G. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. In: Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. Guanabara koogan, 2012.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; AHLSTRAND, G. G.; JOHNSON, R. C. BORRELIA burgdorferi in tick cell culture: growth and cellular adherence. **Journal of medical entomology**, v. 25, n. 4, p. 256-261, 1988.

LALLINGER, G.; ZWEYGARTH, E.; BELL-SAKYI, L.; PASSOS, L. M. Cold storage and cryopreservation of tick cell lines. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 37, 2010.

MARTINEZ, M. L.; MACHADO, M. A.; NASCIMENTO, C. S.; SILVA, M. V. G. B.; TEODORO, R. L.; FURLONG, J.; PRATA, M. C. A.; CAMPOS, A. L.; GUIMARÃES, M. F. M.; AZEVEDO, A. L. S.; PIRES, M. F. A.; VERNEQUE, R. S. Association of BoLA-DRB3. 2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, v. 5, n. 3, p. 513-524, 2006.

MILKPOINT. Quais os danos causados por carrapatos bovinos? 2017. Disponível em: < https://www.milkpoint.com.br/sobre-o-site/novas-do-site/video-quais-os-danos-causados-por-carrapatos-bovinos-105289n.aspx>. Acesso em: 23 05. 2017.

MUNDERLOH, U. G.; HAYES, S. F.; CUMMINGS, J.; KURTTI, T. J. Microscopy of spotted fever *Rickettsia* movement through tick cells. **Microscopy and Microanalysis**, v. 4, n. 2, p. 115-121, 1998.

MUNDERLOH, U. G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; GE, N. L.; EDWARDS, W. L.; KURTTI, T. J. Establishment of the tick (Acari: Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (*Rickettsia*les: *Anaplasma*taceae) in tick cell culture. **Journal of medical entomology**, v. 33, n. 4, p. 656-664, 1996.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. Microbiology, Wm. C. **C.** Brown, Dubuque, IA, 1996.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C.; GRISI, L.; MARTINS, J. R.; ANDREOTTI, R.; DE BARROS, A. T. M. Estimativa de perdas financeiras decorrente s do parasitismo por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* para o estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 1, p. 87-88, 2014.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia 4ª ed. São Paulo: Editora Atheneu**, 2005, 718p.

VARMA, M. G. R.; PUDNEY, M.; LEAKE, C. J. The Establishment of Three Cell Lines from the Tick *Rhipicephalus Appendiculatus* (Agari: Ixodidae) and their Infection with Some Arboviruses. **Journal of medical entomology**, v. 11, n. 6, p. 698-706, 1975.

ZWEYGARTH, E.; JOSEMANS, A. I.; SPICKETT, A. M.; STEYN, H. C.; PUTTERILL, J.; TROSKIE, P. C.; KOCAN, K. M. *In vitro* cultivation of a South African isolate of an *Anaplasma sp*. in tick cell cultures. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 4, p. 251-255, 2006.

Anexo A- Protocolo do Meio L15B

Solução 1: Triptose fosfato

Reagentes	Quantidade (Volume final 1L)
Bacto™ Tryptose Phosphate Brot (BD, USA)	29,5 g
H_2O autoclavada	1 L

1. Autoclavar a solução a 121 °C por 15 minutos.
2. Armazenar a solução a 2-8°C

Solução 2: StockD suplementado

Reagentes	Quantidade (Volume final 15 ml)
Stock A (Vitrocell)	150 µl
Stock B (Vitrocell)	150 µl
Stock C (Vitrocell)	150 µl
Stock D (Vitrocell)	14,55 ml

1. Armazenar a 2-8 °C

Solução 3: Preparo do meio L15B

Reagentes	Quantidade (Volume final 501 ml)
L-15 Leibovitz (Vitrocell)	450 ml
L-Glutamina concentração 200 mM (3%)	0,15 g
Solução 1: Triptose fosfato (BD)	50 ml
Solução 2: Stock D suplementado (Vitrocell)	500 µl
Lipoproteína (GIBCO)	500 µl

1. Após a mistura dos reagentes, filtra o meio em 0,22µm
2. Armazenar a 2-8 °C

Anexo B- Preparação de gel de agarose 1%

2. Para 100 ml de gel, pesar 1 g de agarose;

3. Diluir a agarose em 100 ml de tampão TAE 1X (solução 1);

4. Fundir a solução em forno microondas (aproximadamente 1 minuto e 10 seg- evitar fervura);

5. Aguardar a solução esfriar em temperatura ambiente;

6. Acrescentar 4µl de Brometo de Etídio (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), misturar com agitação leve;

7. Despejar a solução na cuba de eletroforese na presença de um "pente" para formar poços para aplicação das amostras;

8. Aguardar a polimerização do gel.

Solução 1 TAE 1X

Reagentes	Quantidade
Tris Base 40 mM ph 7,2	4,84g
EDTA 0,5 M	2 ml
Ácido Acético Glacial	1,15 ml
H_2O Milli-Q autoclavada	1 L

4. CONCLUSÃO GERAL

- A idade dos ovos para a viabilidade de cultivos primários de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem temperada e tropical) na temperatura de 25 ^{o}C ± 1 e umidade de 90% ± 5 é de 12 a 14 dias
- A idade para a viabilidade de cultivos primários de células a partir de ovos embrionários de *R. microplus* é de 15 dias 27 ^{o}C ± 1 e umidade de 90% ± 5
- Foi estabelecido a linhagem de células de *R. microplus* no 12 ª subcultivo.
- Culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* de origem tropical, mostraram-se eficientes como substrato para o crescimento de *E. canis* (cepa Jaboticabal), permitindo sua propagação em novos cultivos após o descongelamento.
- As Culturas de células embrionárias *R. sanguineus* de origem temperada não foram capazes de manter *E. canis.*
- Culturas de células embrionárias de *R. microplus n*mostraram-se eficientes como substrato para o crescimento de *A. marginale* (cepa Jaboticabal).

REFERÊNCIAS

ABU-ABSI, Nicholas R. et al. Automated flow cytometry for acquisition of time-dependent population data. **Cytometry Part A**, v. 51, n. 2, p. 87-96, 2003.

AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z.; LABRUNA, M.B. Serological diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis with Brazilian antigen of *Ehrlichia* canis. Ciência Rural, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007

ALBERDI, M. P.; DALBY, M. J.; RODRIGUEZ-ANDRES, J.; FAZAKERLEY, J. K.; KOHL, A.; BELL-Sakyi, L. Detection and identification of putative bacterial endosymbionts and endogenous viruses in tick cell lines. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 3, n. 3, p. 137-146, 2012.

AYLLÓN, N.; VILLAR, M.; BUSBY, A. T.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; BONZÓN-KULICHENKO, E.; VÁZQUEZ, J. *Anaplasma* phagocytophilum inhibits apoptosis and promotes cytoskeleton rearrangement for infection of tick cells. **Infection and immunity**, v. 81, n. 7, p. 2415-2425, 2013.

ARTECHE, C. C. P. Imunoprofilaxia da tristeza parasitária bovina (TPB) no Brasil. Uso de cepas atenuadas da Babesia spp e de cepa de *Anaplasma*. **A Hora Veterinária**, ano, v. 11, p. 39-42, 1992.

AUBRY, P N. R.; Z.; A.; J.; B.; S. J.; & S.; F. A review of bovine anaplasmosis. Transboundary and emerging diseases, v. 58, n. 1, p. 1-30, 2011.

BAÊTA, B. A.; Ribeiro, C. C.; Teixeira, R. C.; Cabezas-Cruz, A.; Passos, L. M.; Zweygarth, E.; Fonseca, A. H. Characterization of two strains of *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Rio de Janeiro, Brazil, after propagation in tick cell culture. **Ticks and tick-borne diseases,** v. 6, n. 2, p. 141-145, 2015.

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F. S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection.**Veterinary microbiology**, v. 136, n. 3, p. 321-325, 2009.

BARRÉ, N.; UILENBERG, G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. **Revue scientifique et technique**, v. 29, n. 1, p. 149, 2010.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para idenfiticação de espécies. ICTTD-3/Instituto Butantan, 2006.

BARROS, S. L.; MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; MENK, C. F.; DE ALMEIDA, M. A. O.; MELO, E. P.; & KESSLER, R. H. Serological survey of Babesia bovis, Babesia bigemina, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 100, n. 6, p. 513-517, 2005.

BASTOS, R. G.; UETI, M. W.; GUERRERO, F. D.; KNOWLES, D. P.; SCOLES, G. A. Silencing of a putative immunophilin gene in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* increases the infection rate of *Babesia bovis* in larval progeny**. Parasites & vectors**, v. 2, n. 1, p. 57, 2009.

BASTOS, C. V.; DAS VASCONCELOS, M. M. C.; RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F. Use of refrigeration as a practical means to preserve viability of *in vitro*-cultured IDE8 tick cells**. Experimental and Applied Acarology**, v. 39, n. 3, p. 347-352, 2006.

BHAT, R.; KUHN, W.; SCHNEIDER, F. W. The Stirred Flow Reactor: Base Analog Incorporation in DNA Replication and Transcription. **Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie,** v. 81, n. 12, p. 1287-1293, 1977.

BELL-SAKYI, L.; WEISHEIT, S.; RÜCKERT, C.; BARRY, G.; FAZAKERLEY, J.; FRAGKOUDIS, R. Microscopic Visualisation of Zoonotic Arbovirus Replication in Tick Cell and Organ Cultures Using Semliki Forest Virus Reporter Systems. Veterinary Sciences, v. 3, n. 4, p. 28, 2016.

BELL-SAKYI L.; PALOMAR, A. M.; BRADFORD, E. L.; SHKAP, V. Propagation of the Israeli vaccine strain of *Anaplasma* centrale in tick cell lines. **Veterinary microbiology**, v. 179, n. 3, p. 270-276, 2015.

BELL-SAKYI, L.; RŮŽEK, D.; GOULD, E. A. Cell lines from the soft tick Ornithodoros moubata. **Experimental and Applied Acarology**, v. 49, n. 3, p. 209-219, 2009.

BELL-SAKYI, L.; ZWEYGARTH, E.; BLOUIN, E. F.; GOULD, E. A.; JONGEJAN, F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 9, p. 450-457, 2007.

BELL-SAKYI, L.; KONEY, E. B. M.; DOGBEY, O.; WALKER, A. R. Incidence and prevalence of tick-borne haemoparasites in domestic ruminants in Ghana. **Veterinary Parasitology**, v. 124, N. 1, P. 25-42, 2004.

BELL-SAKYI, L.; PAXTON, E. A.; MUNDERLOH, U. G.; SUMPTION, K. J. Growth of Cowdria ruminantium, the causative agent of heartwater, in a tick cell line. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1238-1240, 2000.

BELL-SAKYI, L. Continuous cell lines from the tick Hyalomma anatolicum anatolicum. **The Journal of Parasitology**, p. 1006-1008, 1991.

BHAT, R.; KUHN, W.; SCHNEIDER, F. W. The Stirred Flow Reactor: Base Analog Incorporation in DNA Replication and Transcription. Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie, v. 81, n. 12, p. 1287-1293, 1977.

BLACK, W.C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.91, n.21, p.10034-10038, 1994.

BLOUIN, E. F.; SALIKI, J. T.; DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; KOCAN, K. M. Antibodies to *Anaplasma marginale* major surface proteins 1a and 1b inhibit infectivity for cultured tick cells. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 2, p. 247-260, 2003.

BLOUIN, E. F.; DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; SAUER, J. R., SALIKI, J. T.; KOCAN, K. M. Applications of a cell culture system for studying the interaction of *Anaplasma marginale* with tick cells. **Animal health research reviews**, v. 3, n. 2, p. 57-68, 2002.

BOUZA-MORAL.; DOLZ, G.; SOLÓRZANO-MORALES, A.; ROMERO-ZUÑIGA, J. J.; SALAZAR-SÁNCHEZ, L.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, n. 1, p. 36-40, 2017.

BOWMAN, D. D. Introduction to the alpha-proteobacteria: *Wolbachia* and Bartonella, *Rickettsia*, *Brucella*, *Ehrlichia* , and *Anaplasma*. Topics in companion animal medicine, v. 26, n. 4, p. 173-177, 2011.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. Estructura celular. Jawetz, melnick & adelberg: **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 6-30, 2000.

BURTON, G.; ENGELKIRK, P. G.; TOROS, E. F. Microbiologia para as ciências da saúde. **Guanabara Koogan**, 1998.

BURLINI, L.; TEIXEIRA, K. R.; SZABÓ, M. P.; FAMADAS, K. M. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus*(Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern?. **Experimental and Applied Acarology**, v. 50, n. 4, p. 361-374, 2010.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA IV, G. Studies of Rocky Mountain Spotted Fever in Mexico. **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, v. 8, n. 2, p. 139-141, 1947.

CALIC, S. B.; GALVÃO, M. A.; BACELLAR, F.; ROCHA, C. M.; MAFRA, C. L.; LEITE, R. C.; WALKER, D. H. Human ehrlichioses in Brazil: first suspect cases. Brazilian Journal of **Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 259-262, 2004.

CANESTRINI, G. La teoria di Darwin: Criticamente esposta. F. Dumolard, 1887.

CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V.; BUONAVOGLIA, C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary microbiology**, v. 124, n. 1, p. 107-114, 2007.

CHAO, L. L.; YEH, S. T.; HSIEH, C. K.; SHIH, C. M. First detection and molecular identification of *Babesia vogeli* from *Rhipicephalus sanguineus*(Acari: Ixodidae) in Taiwan. **Experimental and Applied Acarology**, v. 68, n. 4, p. 539-551, 2016.

CICUTTIN, G. L.; TARRAGONA, E. L.; DE SALVO, M. N.; MANGOLD, A. J.; NAVA, S. Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (*Rickettsia*les: *Anaplasma*taceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus*sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 6, n. 6, p. 724-729, 2015.

CIRELLI-MORAES, A. Estabelecimento e caracterização de células embrionárias de *Amblyomma sculptum* Berlese (Acari: Ixodidae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. Infectious diseases of livestock. Volume Three. Oxford University Press, 2004.

COIMBRA, U. "Noções básicas de cultura de células." Retrieved Maio 2008.

COSSIO-BAYUGAR, R.; WAGNER, G. G.; HOLMAN, P. J. *In vitro* generation of organophosphate resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cell lines. **Journal of medical entomology**, v. 39, n. 2, p. 278-284, 2002.

COSTA, A.P. D.; D. M.; RIBEIRO, M. F. B.; DUARTE, A. L. L.; MANGUEIRA, J. M.; PESSOA, A. F. A.; AZEVEDO, S. S.; DE BARROS, A. T. M.; RIET-CORREA, F.; LABRUNA, M. B. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 28-35, 2015.

COSTA, P. S. G. D.; VALLE, L. M. D. C.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. More about human monocytotropic ehrlichiosis in Brazil: serological evidence of nine new cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 7-10, 2006.

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus*(Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. ***Veterinary Parasitology***, v. 128, n. 1, p. 149-155, 2005.

DA COSTA MARQUES, Dorcimar. Criação de bovinos. Nobel, 1974.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus*(Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3, p. 173-185, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M. S.; WEIGL, S.; TARALLO, V. D.; LIA, R. P.; OTRANTO, D. Hepatozoon canis infection in ticks during spring and summer in Italy. **Parasitology research**, v. 110, n. 2, p. 695-698, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M. S.; ANNOSCIA, G.; GIANNELLI, A.; PARISI, A.; OTRANTO, D. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus*sensu lato from the New and Old Worlds. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 213, 2013.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Domenico. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus*group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1, p. 9-13, 2015.

DE CAMPOS-PEREIRA, M.; BAHIA-LABRUNA, M.; SZABÓ, M. P. J.; MARCONDES-KLAFE, G. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* biologia, controle e resistência. Primeira edição. São Paulo. **Editorial MedVet**, 2008.

DE LEÓN, A. A. P.; STRICKMAN, D. A.; KNOWLES, D. P.; FISH, D.; THACKER, E.; DE LA FUENTE, J.; KRAUSE, P.J.; WIKEL, S.K.; MILLER, R.S.; WAGNER, G.G.; ALMAZAN, C.; HILLMAN, R.; MESSENGER, M.T.; UGSTAD, P.O.; DUHAIME, R.A.; TEEL, P.D.; ORTEGA-SANTOS, A.; HEWITT, D.G.; BOWERS, E.J.; BENT, S.J.; COCHRAN, M.H.; MCELWAIN, T.F.; SCOLES, G.A.; SUAREZ, C.E.; DAVEY, R.; FREEMAN; ALMAZÁN, C. L. One Health approach to identify research needs in bovine and human babesioses: workshop report. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 36, 2010.

DE OLIVEIRA P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; SAITO, K. C.; NUNES, E. T.; SZABÓ, M. P. J.; MATHIAS, M. I. C. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus*(Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1, p. 139-147, 2005.

DO AMARAL, J. B.; REZENDE-TEIXEIRA, P.; FREITAS, V. M.; MACHADO-SANTELLI, G. M.MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer. Tissue Engineering Part C: Methods, v. 17, n. 11, p. 1097-1107, 2011.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y. W.; CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C.; MCBRIDE, J. W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the dsb gene. **The Journal of molecular diagnostics**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.;, BEKKER, C. P.,; DASCH, G. A.,; PALMER, G. H.; RAY, S. C.;, RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and'HGE agent'as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

ESTEVES, E.; LARA, F. A.; LORENZINI, D. M.; COSTA, G. H.; FUKUZAWA, A. H.; PRESSINOTTI, L. N.; DAFFRE, S. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 5, p. 568-580, 2008.

ESTEVES, E.; BASTOS, C. V.; ZIVKOVIC, Z.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.; BLOUIN, E.; DAFFRE, S. Propagation of a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale* with appendage in a tick cell line (BME26) derived from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1, p. 150-153, 2009.

EWING, S. A.; MUNDERLOH, U. G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; KURTTI, T. J. *Ehrlichia canis* in tick cell culture. In: Proceedings of the 76th Conference of Research Workers in Animal Diseases, Chicago, USA. 1995.

FERROLHO, J.; SIMPSON, J.; HAWES, P.; ZWEYGARTH, E.; BELL-SAKYI, L. Growth of *Ehrlichia canis*, the causative agent of canine monocytic ehrlichiosis, in vector and non-vector ixodid tick cell lines. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 4, p. 631-637, 2016.

FLECHTMANN, Carlos HW. Ácaros de importância médico-veterinária. **NBL Editora**, 1973.

FONSECA, A. H. D.; Salles, R. D. S.; & Salles, S. D. A. N. Borrelise de Lyme simile: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. **An. bras. dermatol**, v. 80, n. 2, p. 171-178, 2005.

FURLONG, J. Ecologia do carrapato *Boophilus microplus* na regiao da Zona da Mata de Minas Gerais. 1993.

FUSSENEGGER, M.; BAILEY, J. E. Molecular regulation of cell-cycle progression and apoptosis in mammalian cells: implications for biotechnology. **Biotechnology progress**, v. 14, n. 6, p. 807-833, 1998.

GOMES, A. Dinâmica populacional de *Boophilus microplus* (canestrini, 1987)(Acari: ixodidae) em bovinos nelore (bos indicus) e cruzamentos em infestações experimentais. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1995.

GONZALES, J. C.; MUNIZ, R. A.; FARIAS, A.; GONCALVES, L. C. B.; REW, R. S. Therapeutic and persistent efficacy of doramectin against *Boophilus microplus* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 107-119, 1993.

GRAF, J.-F.; Gogolewski, R.; Leach-Bing, N.; Sabatini, G. A.; Molento, M. B.; Bordin, E. L.; Arantes, G. J. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S427-S442, 2004.

GRAY J.; DANTAS-TORRES, F.; ESTRADA-PEÑA, A.; LEVIN, M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 4, n. 3, p. 171-180, 2013.

GROVES, M. G.; DENNIS, G. L.; AMYX, H. L; HUXSOLL, D. L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American journal of veterinary research**, v. 36, n. 7, p. 937-940, 1975.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; SHAO, R.; BARKER, S. C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. 2010.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.;ESTRADA-PEÑA. Ticks (ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83-100, 2006.

GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 109-119, 1995.

HOLMAN, P. J.; RONALD, N. C. A new tick cell line derived from *Boophilus microplus*. **Research in veterinary science**, v. 29, n. 3, p. 383-387, 1980.

HOOGSTRAL, H. Theobald Smith: his scientific work and impact. Bulletin of the ESA, v. 32, n. 1, p. 22-35, 1986.

HARRUS, S.; Waner, T.; Bark, H.,; Jongejan, F.,; & Cornelissen, A. W. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. Journal of Clinical Microbiology, v. 37, n. 9, p. 2745-2749, 1999.

JAIN, J. K.; PAULSON, R. J. Oocyte cryopreservation. Fertility and sterility, v. 86, n. 4, p. 1037-1046, 2006.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to Bos indicus cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1-10, 2006.
JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S3-S14, 2004.

JUNIOR, G.; DANIEL, S.; ARAÚJO, F. R.; SILVA, F. J.; RANGEL, C. P.; BARBOSA NETO, J. D.; & FONSECA, A. H. Frequency of antibodies to Babesia bigemina, B. bovis, *Anaplasma marginale*, Trypanosoma vivax and Borrelia burdgorferi in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 105-109, 2008.

KESSLER, R. H.; GOMES, A.; CAPIBARIBE, P. R.; SILVA, D. D.; SCHENK, M. A. M. Estabelecimento de cultura *in vitro* de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus*. Embrapa Gado de Corte-Séries anteriores (INFOTECA-E), 1999.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.

KLAFKE, G. M.; SABATINI, G. A.; THAIS, A.; MARTINS, J. R.; KEMP, D. H.; MILLER, R. J.; SCHUMAKER, T. T. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3, p. 386-390, 2006.

KOCAN, K. M.; MUNDERLOH, U. G.; EWING, S. A. Development of the Ebony isolate of *Ehrlichia canis* in cultured *Ixodes scapularis* cells. **In: 79th Conference of Research Workers in Animal Diseases**, Chicago. 1998.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; GARCIA-GARCIA, J. C. *Anaplasma marginale* (*Rickettsia*les: *Anaplasma*taceae): recent advances in defining host–pathogen adaptations of a tick-borne *Rickettsia*. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S285-S300, 2004.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F.; EWING, S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2, p. 95-107, 2010.

KOCH, C. L. Systematische übersicht über die Ordnung der Zecken. Archiv für Naturgeschichte, v. 10, n. 1, p. 217-239, 1844.

KOCH, A. L.; HIGGINS, M. L. Cell cycle dynamics inferred from the static properties of cells in balanced growth. Microbiology, v. 128, n. 12, p. 2877-2892, 1982

KONEMAN, E.; WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERBER, P.; WOODS, G. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. In: Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. **Guanabara koogan**, 2012.

KRAWCZAK, F. S.; MARTINS, T. F.; OLIVEIRA, C. S.; BINDER, L. C.; COSTA, F. B., NUNES, P. H., LABRUNA, M. Amblyomma yucumense n. sp. (Acari: Ixodidae), a parasite of wild mammals in southern Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 52, n. 1, p. 28-37, 2015.

KURTTI, J.; SIMSER, J. A.; BALDRIDGE, G. D.; PALMER, A. T.; MUNDERLOH, U. G. Factors influencing *in vitro* infectivity and growth of *Rickettsia* peacockii (*Rickettsia*les: *Rickettsia*ceae), an endosymbiont of the Rocky Mountain wood tick, Dermacentor andersoni (Acari, Ixodidae). **Journal of invertebrate pathology**, v. 90, n. 3, p. 177-186, 2005.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; ANDREADIS, T. G.; MAGNARELLI, L. A.; MATHER, T. N. Tick Cell Culture Isolation of an Intracellular Prokaryote from the Tick*Ixodes scapularis* . **Journal of invertebrate pathology**, v. 67, n. 3, p. 318-321, 1996.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; HAYES, S. F.; KRUEGER, D. E.; AHLSTRAND, G. G.Ultrastructural analysis of the invasion of tick cells by Lyme disease spirochetes (Borrelia burgdorferi) *in vitro*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, n. 6, p. 977-994, 1994.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; KRUEGER, D. E.; JOHNSON, R. C.; SCHWAN, T. G. Adhesion to and invasion of cultured tick (Acarina: Ixodidae) cells by Borrelia burgdorferi (Spirochaetales: Spirochaetaceae) and maintenance of infectivity. **Journal of medical entomology**, v. 30, n. 3, p. 586-596, 1993.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; AHLSTRAND, G. G.; JOHNSON, R. C. BORRELIA burgdorferi in tick cell culture: growth and cellular adherence. **Journal of medical entomology**, v. 25, n. 4, p. 256-261, 1988.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; STILLER, D. The interaction of Babesia caballi kinetes with tick cells. **Journal of invertebrate pathology**, v. 42, n. 3, p. 334-343, 1983.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; SAMISH, Michael. Effect of medium supplements on tick cells in culture. The Journal of **Parasitology**, p. 930-935, 1982.

LALLINGER, G.; ZWEYGARTH, E.; BELL-SAKYI, L.; PASSOS, L. M. Cold storage and cryopreservation of tick cell lines. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 37, 2010.

LASTA, C. S.; SANTOS, A. P. D.; MESSICK, J. B.; OLIVEIRA, S. T.; BIONDO, A. W.; VIEIRA, R. F. D. C.; GONZÁLEZ, F. H. D. Molecular detection of *Ehrlichia canis*and *Anaplasma* platys in dogs in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 360-366, 2013.

LAWRIE, C. H.; UZCATEGUI, N. Y.; ARMESTO, M.; BELL-SAKYI, L.; GOULD, E. A. Susceptibility of mosquito and tick cell lines to infection with various flaviviruses. **Medical and veterinary entomology**, v. 18, n. 3, p. 268-274, 2004.

LEMOS, A. M.; TEODORO, R. L.; OLIVEIRA, G. P.; MADALENA, F. E. Comparative performance of six Holstein-Friesian× Guzera grades in Brazil 3. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions. **Animal Science**, v. 41, n. 2, p. 187-191, 1985.

LOULY, C. C. B.; FONSECA, I. N.; DE OLIVEIRA, V. F.; BORGES, L. M. F. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus*em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2006.

MANGOLD, A. J.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 84, n. 6, p. 478-484, 1998.

MARIOTTE, C. O.; BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Specimens oí *Rhipicephalus sanguineus*found naturally infected with Rocky Mountain Spotted Fever in Sonora (Mexico). **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, v. 5, n. 4, p. 297-300, 1944.

MARTINEZ, M. L.; MACHADO, M. A.; NASCIMENTO, C. S.; SILVA, M. V. G. B.; TEODORO, R. L.; FURLONG, J.; PRATA, M. C. A.; CAMPOS, A. L.; GUIMARÃES, M. F. M.; AZEVEDO, A. L. S.; PIRES, M. F. A.; VERNEQUE, R. S. Association of BoLA-DRB3. 2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, v. 5, n. 3, p. 513-524, 2006.

MATTILA, J. T.; BURKHARDT, N. Y.; HUTCHESON, H. J.; MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Isolation of cell lines and a *Rickettsia*l endosymbiont from the soft tick Carios capensis (Acari: Argasidae: Ornithodorinae). **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 6, p. 1091-1101, 2007.

MILKPOINT. Quais os danos causados por carrapatos bovinos? 2017. Disponível em: < https://www.milkpoint.com.br/sobre-o-site/novas-do-site/video-quais-os-danos-causados-por-carrapatos-bovinos-105289n.aspx>. Acesso em: 23 05. 2017.

MONIUSZKO, A.; RÜCKERT, C.; ALBERDI, M. P.; BARRY, G.; STEVENSON, B.; FAZAKERLEY, J. K.; BELL-SAKYI, L. Coinfection of tick cell lines has variable effects on replication of intracellular bacterial and viral pathogens. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 4, p. 415-422, 2014.

MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus*group in Latin America. **Acta tropica**, v. 117, n. 1, p. 51-55, 2011.

MORAES-FILHO, J.; KRAWCZAK, F. S.; COSTA, F. B.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus*group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. PLoS One, v. 10, n. 9, p. e0139386, 2015.

MUNDERLOH, U. G.; LYNCH, M. J.; HERRON, M. J.; PALMER, A. T.; KURTTI, T. J.; NELSON, R. D.; GOODMAN, J. L. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. **Veterinary microbiology**, v. 101, n. 1, p. 53-64, 2004.

MUNDERLOH, U. G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; GE, N. L.; EDWARDS, W. L.; KURTTI, T. J. Establishment of the tick (Acari: Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (*Rickettsia*les: *Anaplasma*taceae) in tick cell culture. **Journal of medical entomology**, v. 33, n. 4, p. 656-664, 1996.

MUNDERLOH, U. G.; LIU, Y.; WANG, M.; CHEN, C.; KURTTI, T. J. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis* . The Journal of **Parasitology**, p. 533-543, 1994.

MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Formulation of medium for tick cell culture. **Experimental and Applied Acarology**, v. 7, n. 3, p. 219-229, 1989.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of Boophilus Curtice, 1891 with *Rhipicephalus*

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; ACUÑA, D. G.; MARTINS, T. F.; GUGLIELMONE, A. A. Ticks of the Southern Cone of America: Diagnosis, Distribution, and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. **Academic Press**, 2017.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp.; *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp.; and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 3, p. 252-276, 2014.

NAVA, S.; MASTROPAOLO, M.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus*sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3, p. 547-555, 2012.

NICHOLSON, W. L.; ALLEN, K. E.; MCQUISTON, J. H.; BREITSCHWERDT, E. B.; LITTLE, S. E. The increasing recognition of *Rickettsia* pathogens in dogs and people. Trends in **Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 205-212, 2010.

OBONYO, M.; MUNDERLOH, U. G.; FINGERLE, V.; WILSKE, B.; KURTTI, T. J. Borrelia burgdorferi in tick cell culture modulates expression of outer surface proteins A and C in response to temperature. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2137-2141, 1999.

OLIVEIRA, J. B.; MADRUGA, C. R.; SCHENK, M. A.; KESSLER, R. H.; MIGUITA, M.; ARAÚJO, F. R. Antigenic characterization of Brazilian isolates of *Anaplasma* marginale. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 98, n. 3, p. 395-400, 2003.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E. B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. Trends in **Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 157-163, 2009.

PADDOCK, C. D.; CHILDS, J. E. Ehrlichia chaffeensis: a prototypical emerging pathogen. Clinical microbiology reviews, v. 16, n. 1, p. 37-64, 2003.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

PASSOS, L. M. F. *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale* and A. phagocytophilum in tick cell lines: a review. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 81-86, 2012.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B. Febre maculosa: aspectos clínico-epidemiológicos. **Clínica Veterinária**, v. 3, n. 12, p. 19-23, 1998.

PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2133-2139, 1996.

POLICASTRO, P. F.; MUNDERLOH, U. G.; FISCHER, E. R.; HACKSTADT, T. E. D. *Rickettsia* rickettsii growth and temperature-inducible protein expression in embryonic tick cell lines. **Journal of medical microbiology**, v. 46, n. 10, p. 839-845, 1997.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. Microbiology, Wm. C. C. Brown, Dubuque, IA, 1996.

PUDNEY, M. Tick cell lines for the isolation and assay of arboviruses**. In Arboviruses in Arthropod Cells *in vitro***. v. 1, p. 87–101, 1987.

PUDNEY, M.; VARMA, M. G. R.; LEAKE, C. J. Establishment of cell lines from ixodid ticks. **Methods in Cell Science**, v. 5, n. 1, p. 1003-1007, 1979.

PUDNEY, M.; VARMA, M. G. R.; LEAKE, C. J. Culture of embryonic cells from the tick *Boophilus microplus* (Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v. 10, n. 5, p. 493-496, 1973.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of cell biology**, v. 17, n. 1, p. 208, 1963.

ROCHA, U. F. Biologia e controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini). 1984.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C.; GRISI, L.; MARTINS, J. R.; ANDREOTTI, R.; DE BARROS, A. T. M. Estimativa de perdas financeiras decorrente s do parasitismo por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* para o estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 1, p. 87-88, 2014.

SANCHES, B. V. Uso de propanediol ou DMSO na vitrificação de embriões produzidos *in vitro*, cultivados ou não na presença de forskolin. 2009.

SANCHES, G. S.; ÉVORA, P. M.; MANGOLD, A. J.; JITTAPALAPONG, S.; RODRIGUEZ-MALLON, A.; GUZMÁN, P. E.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical

populations of *Rhipicephalus sanguineus*sensu lato (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 215, p. 78-87, 2016.

SANTIS, G. C.; PRATA, K. L. Criopreservação de células-progenitoras hematopoéticas. Medicina (Ribeirao Preto. Online), v. 42, n. 1, p. 36-47, 2009 .

SERRA-FREIRE, N. M.; BORSOI, A. B. P. Malformação em teleógina de *Rhipicephalus sanguineus*recolhida em ambiente intradomiciliar, no Rio de Janeiro, RJ. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 53-56, 2009.

SHATKIN, A. A.; BESKINA, S. R.; MEDVEDEVA, G. I.; GROKHOVSKAIA, I. M. Cultivation of the agent of enzootic abortion of sheep in a continuous line of Hyalomma tick embryonal cells. **Meditsinskaia parazitologiia i parazitarnye bolezni**, 1977.

SIMSER, J. A.; PALMER, A. T.; FINGERLE, V.; WILSKE, B.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G. *Rickettsia* monacensis sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia*, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4559-4566, 2002.

SIMSER, J. A.; PALMER, A. T.; MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Isolation of a spotted fever group *Rickettsia*, *Rickettsia peacockii*, in a Rocky Mountain wood tick, Dermacentor andersoni, cell line. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 546-552, 2001.

SINGU,V.; PEDDIREDDI, L.; SIRIGIREDDY, K. R.; CHENG, C.; MUNDERLOH, U.; GANTA, R. R. Unique macrophage and tick cell-specific protein expression from the p28/p30-outer membrane protein multigene locus in *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1475-1487, 2006.

STICH, R. W.; SCHAEFER, J. J.; BREMER, W. G.; NEEDHAM, G. R.; JITTAPALAPONG, S. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 256-273, 2008.

SZABÓ, M. P.; MANGOLD, A. J.; JOAO, C. F.; BECHARA, G. H; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus*tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 1, p. 131-140, 2005.

SWEATMAN, G. K. Physical and biological factors affecting the longevity and oviposition of engorged *Rhipicephalus sanguineus*female ticks. The Journal of **Parasitology**, p. 432-445, 1967.

TANIKAWA, A. LABRUNA, M. B.; COSTA, A.; AGUIAR, D. M.; JUSTINIANO, S. V.; MENDES, R. S.; MELO, A.L.T.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S. S. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: Serology, molecular detection and associated factors. **Research in veterinary science**, v. 94, n. 3, p. 474-477, 2013.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia 4ª ed. São Paulo: Editora Atheneu**, 2005, 718p.

TROUGHTON, D. R.; Levin, M. L. Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 5, p. 732-740, 2007.

UNVER, A.; RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; YAMAMOTO, S. Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* platys, and Wolbachia species from canine blood in Japan. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, n. 1, p. 692-698, 2003.

VARELA-STOKES, A. S. Transmission of bacterial agents from lone star ticks to white-tailed deer. **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 3, p. 478-483, 2007.

VARMA, M. G. R. Progress in the study of human and animal pathogens in primary and established tick cell lines. 1989.

VARMA, M. G. R.; PUDNEY, M.; LEAKE, C. J. The Establishment of Three Cell Lines from the Tick *Rhipicephalus Appendiculatus* (Agari: Ixodidae) and their Infection with Some Arboviruses. **Journal of medical entomology**, v. 11, n. 6, p. 698-706, 1975.

VIEIRA, R. F. D. C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P. D.; SANTOS, R. P. D.; DUTRA, L. H.; DINIZ P. P. V. P.; MORAIS H. A.; MESSICK J. B.; LABRUNA M. B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 01-12, 2011.

VILLAR, M.; AYLLÓN, N.; BUSBY, A. T.; GALINDO, R. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; VÁZQUEZ, J. Expression of heat shock and other stress response proteins in ticks and cultured tick cells in response to *Anaplasma spp*. infection and heat shock. **International journal of proteomics**, v. 2010, 2010.

VON SEEFRIED, A.; MACMORINE, H. G. The use of foetal, calf and adult bovine sera for the growth of serially subcultivated diploid cells. Developments in biological standardization, v. 37, p. 83-89, 1976.

WAKLER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. Accounts of individual species occurring outside the Afrotropical region. The genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae): A guide to the brown ticks of the world. 2000.

WELLMAN, M. L.; KRAKOWKA, S.; JACOBS, R. M.; KOCIBA, G. J. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. ***In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 24, n. 3, p. 223-229, 1988.

WEYER, F. Explantationsversuche bei Lausen in Verbindung mit der Kulture von Rickettsien. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Abt 1 159: 13-22, 1952.

WOLF, W.; ARAGONA, M.; MUNOZ-LEAL, S.; PINTO, L. B.; MELO, A. L. T.; BRAGA, I. A.; LABRUNA, M. B. Ticks and Tick-borne Diseases. 2016.

YUNKER, C. E. Preparation and maintenance of arthropod cell cultures: Acari, with emphasis on ticks. 1987.