DANIELLA APARECIDA FRANZE

Cultura de células embrionárias-simile de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) para isolamento e cultivo de patógenos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2014

Daniella Aparecida Franze

Cultura de células embrionárias-simile de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) para isolamento e cultivo de patógenos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dr^a Darci Moraes Barros- Battesti

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Franze, Daniella Aparecida.

Cultura de células embrionárias-simile de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari:Ixodidae) para isolamento e cultivo de patógenos / Daniella Aparecida Franze. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Darci Moraes Barros Battesti.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Cultivo celular a partir de ovos de carrapatos.

Versão do título para o inglês: Tick embryonic-like cell culture of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari:Ixodidae) for pathogen isolation and cultivation.

1. *Rhipicephalus sanguineus* 2. Células embrionárias-simile 3. Culturas primárias 4. Linhagem celular 5. Patógenos I. Battesti, Profa. Dra. Darci Moraes Barros II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0192/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Daniella Aparecida Franze.

Título da Dissertação: Cultura de células embrionárias-simile de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) para isolamento e cultivo de patógenos.

Orientador(a): Profa. Dra. Darci Moraes Barros Battesti.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 9 de outubro de 2013

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Cultura de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) para isolamento e cultivo de patógenos", protocolo nº. I-1135/13, sob a responsabilidade de Darci Moraes Barros Battesti e Daniella Aparecida Franze, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Dedico esta dissertação a minha querida família, por
caminhar ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido pai, José Edison Franze (*in memoriam*) por todas as lembranças de grandes momentos de risadas, discussões e brincadeiras que jamais serão esquecidas por mim durante toda a minha vida. Um exemplo de grande homem e pai. Você viverá eternamente no meu coração.

A minha querida mãe, que está sendo uma guerreira durante todo esse ano tão difícil para nós. Serei eternamente grata, por todo seu amor e exemplo de coragem. Não seria capaz de terminar o meu mestrado sem você ao meu lado.

A minha filha Isabella Franze, por ser essa pessoa tão jovem mas com uma alma tão especial. Somente através da sua existência em minha vida é que eu encontro forças para continuar, apesar de todos os obstáculos.

Ao meu noivo Ederson Junqueira, por toda sua paciência, carinho e compreensão. Você estava ao meu lado no pior momento da minha vida este ano, e demonstrou ser uma pessoa extraordinária. Eu não poderia ter escolhido melhor companheiro para dividir a vida.

Ao meu sobrinho Vinicius Franze Sanches Peres, sua alegria é um combustível na minha vida.

A minha querida irmã, Andrea Aparecida Franze por toda a ajuda, apoio e companheirismo. Apesar de passarmos pouco tempo juntas, esses momentos foram essenciais para eu conseguir prosseguir com o meu mestrado.

Ao meu cunhado Clebson Sanchez Peres, pelas nossas conversas e palavras de apoio. Seu ânimo e garra são exemplos para mim.

Ao meu irmão Alexandre J. Franze e minha cunhada Daniela P. Franze, que mesmo distantes estão sempre ao meu lado.

Aos meus avós de coração Lourdes e Roberto, pelo carinho e amor, por nós durante todos esses anos. Vocês são pessoas muito especiais na minha vida.

A minha segunda família: Cassia, Silvio, Renan, Murilo, Caio, Dayana e Clarinha. Todos vocês possuem um lugar muito especial no meu coração.

Aos meus amigos Katia e Dirceu, por todas as vezes que vocês estiveram ao meu lado. Sem as nossas conversas e risadas a vida ficaria sem graça.

A minha querida orientadora, Darci Moraes Barros-Battesti. Primeiramente, pela confiança em ter me aceito como aluna em um período conturbado. Por toda sua compreensão, generosidade e companheirismo. Meu agradecimento muito especial pelas horas gastas do seu

tempo comigo, me ensinando todo seu precioso conhecimento. O seu amor pela ciência é contagiante.

A minha querida amiga e colega de trabalho Angelina Cirelli Moraes, por toda sua ajuda durante o meu mestrado. Agradeço imensamente por tudo que você me ensinou, não somente na questão do trabalho como também na vida pessoal. Levarei com muito carinho todas as nossas conversas e risadas.

A todo o grupo de alunos da Dra. Darci Moraes Barros-Battesti; Diego, Gabriel, Mercedes, Jairo, Leidiane, Flávia, Ricardo, Fernando, pela excelente convivência e ajuda durante o meu mestrado.

As funcionárias e amigas do LECZ, Gabriela, Livia e Thamara, por serem tão prestativas quando precisei de algo.

Ao aluno de doutorado Dalton pela sua grande ajuda em alguns experimentos importantes para o trabalho.

Ao Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó e sua aluna Maria Marlene, pelo fornecimento dos carrapatos, algo fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. A Profa. Dra. Rosângela Machado Zacarias por ceder o inóculo de *Ehrlichia canis* (cepa Jaboticabal), sem esta gentileza não seria possível a realização dos experimentos de infecção por *E.canis*.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna por abrir as portas do seu laboratório na realização das técnicas moleculares.

Ao Dr. Jonas Moraes Filho pela realização das PCRs e por me ajudar no entendimento dos resultados.

Ao Prof. Arlei Marcili pela realização dos experimentos de infecção por *L. infantum chagasi* e *T.cruzi*. Também agradeço pelas valiosas dicas durante o projeto.

Ao prof. Marcos Rogério André pelo auxílio no esclarecimento dos resultados das lâminas.

Ao Pablo Nunes pela realização das belíssimas imagens por microscopia de transmissão e auxílio no entendimento das imagens

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo auxílio nos momentos difíceis.

A CAPES pela bolsa concedida.

“Se você não quer ser esquecido quando morrer,
escreva coisas que valham a pena serem lidas ou
faça coisas que valham a pena escrever a
respeito”.

Benjamin Franklin

RESUMO

FRANZE, D. A. **Cultura de células embrionárias-simile de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) para isolamento e cultivo de patógenos.** 2014. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

As principais doenças transmitidas por carrapatos são riquetsioses, borrelioses, ehrlichioses e protozoonoses. Essas duas últimas são causadas por bioagentes transmitidos, em sua maioria, por carrapatos do gênero *Rhipicephalus*. Alguns desses microrganismos de importância clínica não crescem em meios de cultura sintéticos, daí a necessidade de cultivá-los em células de carrapatos para isolamento e produção de antígenos. Diversas linhagens de células embrionárias de carrapatos já foram estabelecidas em outras regiões do mundo, e são utilizadas para isolar e propagar patógenos. A obtenção de cultivos de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus s.l.*¹ (Latreille) é um dos objetivos do presente estudo, pois uma vez a linhagem estabelecida, ela poderá ser usada como substrato para crescimento de agentes transmitidos por esta e outras espécies de carrapatos. Para tanto, o presente estudo foi dividido em dois capítulos, o primeiro abordando a obtenção dos cultivos primários e estabelecimento da linhagem celular e o segundo, utilizando as culturas como substrato para infecção com agentes patogênicos. As massas de ovos de *R. sanguineus* foram preparadas em meio L-15B e os cultivos foram mantidos à 30°C, sendo o meio substituído semanalmente. Quando monocamadas celulares se tornaram confluentes, as culturas foram repicadas e/ou congeladas em diferentes passagens. O descongelamento dos cultivos criopreservados a partir da terceira passagem foi bem sucedido. A identidade celular foi confirmada por sequenciamento utilizando o fragmento 16S rDNA mitocondrial. As células foram infectadas com *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum chagasi* e *Trypanosoma cruzi*. Apenas para *E. canis*, as células de *R. sanguineus* mostraram-se eficientes como substrato para crescimento desse patógeno.

Palavras-chave: *Rhipicephalus sanguineus*. Células embrionárias-simile. Cultivos primários. Linhagem celular. Patógenos.

¹ Sensu lato: foi citado somente aqui e explicado na página 17

ABSTRACT

FRANZE, D.A. **Tick embryonic-like cell culture of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) for pathogen isolation and cultivation.** 2014. 62 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The main zoonosis transmitted by ticks are rickettsiosis, borreliosis, ehrlichiosis and protozoonoses. These last two are caused by bioagents transmitted mostly by ticks of the genus *Rhipicephalus*. Some of important clinically microorganisms don't grow in synthetic culture medium, hence the need to cultivate them in tick cells for isolation and production of antigens. Several lines of embryonic cells of ticks already been established in other regions of the world, and are used to isolate and propagate pathogens. Obtaining cultures of embryonic cells of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) is one objective of the present study, because once the lineage established, it can be used as a substrate for growth of agents transmitted by this and other species of ticks. Thus, the present study was divided into two sections, the first addressing obtaining primary cultures and established cell line and the second, using as a substrate for cultures infected with pathogens. The egg masses of *R. sanguineus* were prepared in L-15B medium and cultures were maintained at 30 °C, with the medium replaced weekly. When a confluent cellular monolayer was obtained, the cultures were passaged and / or frozen in different passages. Defrosting of cryopreserved cultures from the third passage was successful. Cell identity was confirmed by sequencing using 16S rDNA gene fragment. Cells were infected with *Erhlichia canis*, *Leishmania infantum chagasi* and *Trypanosoma cruzi*. Only for *E. canis* the cells of *R. sanguineus* were effective as a substrate for growth of this pathogen.

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus*. Embryonic-like cell. Primary cultures. Cell line. Pathogens.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1- Ovos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> com diferentes idades e culturas realizadas com esses ovos.....	29
Figura 2.2 - Diferentes colheitas de cultivos primários de células embrionárias-simile de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	31
Figura 2.3 - Cultivos primários de células embrionárias de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> nas colheitas 5-6 e descongelamento.....	32
Figura 2.4 - Gel de agarose 2,0% para visualização da PCR com iniciadores 16S- e 16S+...33	
Figura 2.5 - Blastn do sequenciamento de uma porção do gene 16S rDNA do cultivo de células embrionárias-simile de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (=Query).....	34
Figura 3.1 - Resultado da PCR em tempo real realizada em amostras de culturas de células embrionárias de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> infectadas com <i>Ehrlichia canis</i> , 30 dias após infecção.....	47
Figura 3.2 - Microscopia óptica de células embrionárias-simile de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , sem infecção (controle) e com infecção por <i>Ehrlichia canis</i>	47
Figura 3.3 - Microscopia eletrônica de transmissão de culturas de células embrionárias-simile de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (5 ^a . colheita).....	48
Figura 3.4 - Microscopia eletrônica de transmissão de culturas de células embrionárias-simile de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (5 ^a . colheita), infectadas com <i>Ehrlichia canis</i>	49

LISTA DE ESQUEMAS E TABELAS

Esquema 1 Classificação das famílias de carrapatos.....	16
Esquema 2 Classificação dos gêneros e espécies dentro da família Ixodidae. *Duas linhagens presentes no Brasil.....	16
Tabela 2.1 Número de células embrionárias de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , em diferentes colheitas, momentos antes da criopreservação.....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 A espécie <i>R. sanguineus</i> (Latreille, 1806)	17
1.1.1. Situação taxonômica	17
1.2 Agentes transmitidos pela picada de <i>R. sanguineus</i>	18
1.3 O papel de <i>R. sanguineus</i> na transmissão de patógenos comuns a outros vetores	19
1.4 Linhagem de células embrionárias de carrapatos	20
1.4.1 Histórico	20
1.4.2 Aplicabilidade do cultivo de células de carrapato	21
1.5 Justificativa	21
1.6 Objetivos.....	22
2 CAPÍTULO 1 – PADRONIZAÇÃO DE CULTIVO DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS-SIMILE DE <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (ACARI:IXODIDAE)..	23
2.1 Introdução	23
2.2 Objetivos.....	24
2.3 Materiais e métodos.....	25
2.3.1 Origem dos carrapatos.....	25
2.3.2 Desinfecção das fêmeas de <i>R. sanguineus</i>	25
2.3.3 Testes da idade ideal dos ovos e Culturas Primárias	25
2.3.4 Culturas primárias.....	26
2.3.5 Confirmação da identidade celular	26
2.3.5.1 Extração de DNA.....	26
2.3.5.2 PCR.....	27
2.3.6 Criopreservação e recuperação das culturas	27
2.4 Resultados	28
2.4.1 Concentração de SFB em meio L-15B	28
2.4.2 Avaliação da idade Ideal dos ovos.....	28
2.4.3 Culturas Primárias	28
2.4.4 Criopreservação e descongelamento das células	30
2.4.5 Confirmação da identidade celular	30
2.5 Discussão	35
2.6 Conclusões	39

3 CAPÍTULO 2 - CÉLULAS EMBRIONÁRIAS-SIMILE DE <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (ACARI: IXODIDAE) COMO SUBSTRATO PARA O CULTIVO DE PATÓGENOS	40
3.1 Introdução	40
3.2 Objetivos.....	42
3.3 Materiais e métodos.....	43
<i>3.3.1 Infecções de células embrionárias-simile de R. sanguineus com L. infantum chagasi (CBT-153) e T. cruzi (CBT 118)</i>	<i>43</i>
<i>3.3.2 Infecção das células embrionárias-simile de R. sanguineus com Ehrlichia canis (cepa Jaboticabal, mantida em meio DH82, pela Profa. Rosangela Zacarias Machado, UNESP)</i>	<i>43</i>
<i>3.3.3 PCR em tempo real (realizado somente para células infectadas por E. canis)..</i>	<i>44</i>
<i>3.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (realizada somente para células infectadas com E. canis).....</i>	<i>45</i>
3.4 Resultados	46
3.5 Discussão	50
3.6 Conclusões	53
4 CONCLUSÕES GERAIS.....	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os carrapatos são artrópodes de grande interesse na saúde humana e animal, por serem hematófagos de diversos vertebrados, incluindo o homem (GUGLIELMONE et al., 2006). Devido ao seu comportamento alimentar podem acarretar danos diretos além de atuarem como vetores e agentes de doenças, algumas consideradas letais (DANTAS-TORRES, 2007).

São conhecidas aproximadamente 900 espécies de carrapatos no mundo, distribuídas nas famílias Nuttalliellidae, Argasidae e Ixodidae (GUGLIELMONE et al., 2010) (Esquema 1).

Até recentemente acreditava-se que a família Nuttalliellidae fosse filogeneticamente intermediária entre as outras duas. Entretanto, um estudo realizado por Mans et al. (2011) demonstrou que ela ocupa, de fato, a posição basal. É representada por apenas uma espécie e sua distribuição geográfica compreende a África do Sul (LABRUNA; MACHADO, 2006), excluindo a Tanzânia (MANS et al., 2011). A família Argasidae possui aproximadamente 195 espécies (GUGLIELMONE et al., 2010; NAVA et al., 2010) no mundo, e a região Neotropical inclui 87 delas, dentre as quais 21 ocorrem no Brasil (BARROS-BATTESTI et al., 2013). A família Ixodidae (cujos membros são conhecidos como “carrapatos duros” pela presença de escudo em todos os estágios) possui uma posição sistemática e filogenética melhor estabelecida, sendo a mais evoluída, mais numerosa em espécies, e a mais estudada do ponto de vista taxonômico, biológico e epidemiológico. Mundialmente está representada por cerca de 700 espécies, com aproximadamente 200 na região Neotropical, dentre as quais, 45 ocorrem no Brasil. Os gêneros que compõem a família Ixodidae são: *Amblyomma* (± 30 espécies), *Dermacentor* (1 espécie), *Haemaphysalis* (3 espécies), *Ixodes* (9 espécies) e *Rhipicephalus* (2 espécies), este último contendo o subgênero *Boophilus*. *Rhipicephalus* (*B.*) *microplus* (Canestrini) apresenta maior especificidade em parasitar bovinos enquanto que *R. sanguineus* é comum aos cães, ambas sendo responsáveis, respectivamente, pela tristeza parasitária bovina e canina (Esquema 2). Entretanto, um estudo demonstrou que existem duas populações distintas de *R. sanguineus* na América do Sul (MORAES-FILHO et al., 2011; SZABÓ et al., 2005). As duas linhagens ocorrem no Brasil, sendo, a de origem tropical, encontrada na maioria dos Estados com exceção do Rio Grande do Sul; enquanto que a de origem temperada ocorre neste Estado e também no Centro Sul da Argentina, Uruguai e Chile, além de alguns países europeus (NAVA et al., 2012).

Esquema 1: Classificação das famílias de carrapatos (GUGLIELMONE et al., 2010).

Esquema 2: Classificação dos gêneros e espécies dentro da família Ixodidae. *Duas linhagens presentes no Brasil (SZABÓ et al., 2005).

1.1 A espécie *R. sanguineus* (Latreille, 1806)

Este carrapato é denominado popularmente como “carrapato marrom do cão” ou “carrapato dos canis”. Parasita especialmente dos cães, mas pode, eventualmente, parasitar outros hospedeiros, incluindo os seres humanos. O ciclo biológico desta espécie ocorre em 3 hospedeiros (espécie trioxena). Pode haver de 2-3 gerações ao ano (GUGLIELMONE et al., 2006), embora este número possa variar conforme a região geográfica. As fêmeas ingurgitadas realizam posturas de milhares de ovos (em torno de 3000 a 4000) e os períodos de pré-oviposição e incubação variam de 17-27 dias. Após a eclosão, as larvas com idade de 2 a 3 semanas estão prontas para o repasto sanguíneo, que se realiza entre 3 e 5 dias. A larva ingurgitada sofre ecdise e muda para ninfa nesse mesmo período de tempo e quando a cutícula endurece (de 15-20 dias), as ninfas estão prontas para procurar um hospedeiro. A alimentação da ninfa leva em torno de 5-7 dias. As ninfas ingurgitadas sofrem ecdise depois de 2 a 3 semanas, tornando-se adultos (machos e fêmeas). Em 15-20 dias a cutícula endurece e os adultos procuram o hospedeiro para alimentação e acasalamento. As fêmeas ingurgitadas possuem um hábito diferenciado das outras espécies de ixodídeos. Elas sobem em locais altos para realização da postura, e os carrapatos passam de uma casa a outra, escalando os muros e paredes. Trata-se de um carrapato urbano e muito adaptado às habitações domésticas. Além disso, é considerado um vetor de diversos agentes causadores de doenças, como por exemplo, *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* e *Rickettsia rickettsii* (DANTAS-TORRES, 2008a). Ocorre tanto em áreas rurais como urbanas apresentando um grande potencial de adaptação para viverem dentro de habitações humanas. São ativos durante todo o ano não somente nas regiões tropicais e subtropicais, mas também em algumas áreas temperadas. Um estudo recente demonstrou que esse carrapato, quando exposto a altas temperaturas, possui a capacidade de se fixar e alimentar mais rapidamente em humanos e coelhos. Essa observação sugere que o risco de parasitismo por *R. sanguineus* poderia aumentar em zonas atingidas por verões mais quentes e consequentemente, aumentaria o risco de transmissão de agentes zoonóticos (DANTAS-TORRES, 2010a) ao homem.

1.1.1 Situação taxonômica

Durante anos, diversos estudos moleculares tentaram avaliar a variabilidade genética de *R. sanguineus*. Szabó et al. (2005) verificaram evidências biológicas e moleculares indicando duas populações distintas de *R. sanguineus* nas Américas. Esses estudos foram

confirmados evidenciando a existência de duas linhagens divergentes dentro de *R. sanguineus* (BURLINI et al., 2010; LEVIN et al., 2012; MORAES-FILHO et al., 2011). Segundo Nava et al. (2012), a “linhagem sul” compreende as espécies temperadas e a “linhagem norte”, as espécies tropicais. A linhagem sul inclui carrapatos da Argentina, Uruguai, Chile, Itália e França, enquanto que a linhagem norte abrange os carrapatos do Brasil, Paraguai, Colômbia, África do Sul, Moçambique e duas localidades do norte da Argentina. De acordo com os dados genéticos preliminares, os autores sugeriram que a linhagem norte representa uma espécie diferente de *R. sanguineus* s.s., ao passo que os carrapatos da linhagem sul representam, provavelmente, os verdadeiros *R. sanguineus* s.s. Dantas-Torres et al. (2013) sugeriram que seria fundamental uma nova descrição de *R. sanguineus* s.s. baseando-se em morfologia biologia e genética, porém, não se sabe onde está o tipo “verdadeiro” (GUGLIELMONE et al., 2003). Aqueles autores também sugeriram que até que a espécie seja redescrita com base em um consenso entre os taxonomistas, o uso do nome *R. sanguineus* s.s. deve ser evitada. No presente estudo, citamos “s.l.” apenas no resumo, para não ficar repetitivo ao longo do texto (nota de rodapé).

1.2 Agentes transmitidos pela picada de *R. sanguineus*

Na maioria dos casos as ehrlichioses e protozoonoses são transmitidas pelo gênero *Rhipicephalus* (MASSARD; FONSECA, 2004).

Apesar das ehrlichioses e protozoonoses se apresentarem associadas principalmente ao gênero *Rhipicephalus*, elas também podem ser transmitidas por outros gêneros de carrapatos. Nos Estados Unidos, a Ehrlichiose em humanos é causada por *E. chaffeensis* e *E. ewingii* (DUMLER et al., 2001) e os vetores envolvidos são *Amblyomma americanum* e *Ixodes scapularis* (EUA) e *Ixodes persulcatus* (Ásia) e *I. ricinus* (Europa) (DUMLER et al., 2007). No Brasil casos de Ehrlichiose humana foram relatados apenas por suspeitas clínicas e pesquisa sorológica (CALIC et al., 2004; LABRUNA et al., 2007).

Em cães, a doença é principalmente causada pela bactéria *Ehrlichia canis* (DAGNONE et al., 2003; DUMLER et al., 2001; MOREIRA et al., 2003), que é transmitida por *R. sanguineus* sendo este carrapato o de maior repercussão na clínica de pequenos animais. O diagnóstico é clínico e laboratorial. No neotrópico, *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus microplus* (Canestrini), são os principais vetores, ainda que ambas tenham especificidade parasitária com cães e bovinos, e ocasionalmente picam humanos

(MASSARD; FONSECA, 2004). O ciclo da *E. canis* é constituído de três fases principais: (1) penetração dos corpúsculos nos monócitos; (2) multiplicação do agente, por um período de 3 a 5 dias, com a formação do corpo inicial; e (3) formação das mórulas (são colônias intracitoplasmáticas), sendo estas constituídas por um conjunto de corpos elementares envoltos por uma membrana (McQUISTON; McCALL; NICHOLSON, 2003). Além de *Ehrlichia canis* que compromete a saúde dos cães em praticamente todas as regiões do mundo, outra espécie, *Ehrlichia ruminantium*, compromete a saúde de rebanhos nas áreas de ocorrência de *Amblyomma variegatum* (Fabricius) que também é vetor de *Rhickettsia africae* que acomete humanos nas regiões subsaarianas da África (LORUSSO et al., 2013).

1.3 O papel de *R. sanguineus* na transmissão de patógenos comuns a outros vetores

Carrapatos estão sendo apontados como potenciais vetores de agentes zoonóticos patogênicos geralmente transmitidos por outros tipos artrópodes, tais como mosquitos (Leishmaniose) e pulgas (Bartonelose) (BANETH, 2014). Recentemente, houve debate científico focado em *Leishmania infantum*, o agente zoonótico canino causador da leishmaniose visceral humana. Esta doença é naturalmente causada pela picada de flebotomíneos infectados. A epidemiologia da Leishmaniose frequentemente se sobrepõe a outras infecções caninas causadas por *Ehrlichia canis* e *Babesia vogeli*. Estes dois patógenos são de fato transmitidos por *R. sanguineus* (DANTAS -TORRES, 2008). Existem relatos da presença do DNA de *Leishmania infantum* em carrapatos pesquisados em áreas endêmicas de leishmaniose (DANTAS-TORRES et al., 2010b; TROTTA et al., 2012).

A tripanossomíase canina é causada por protozoários do gênero *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) e as espécies que infectam cães no Brasil são *Trypanosoma evansi* (FRANCISCATO et al., 2007; HERRERA et al., 2005; SAVANI et al., 2005) e *Trypanosoma cruzi* (HERRERA et al., 2005; MAYWALD et al., 1996). Os vetores são triatomíneos hematófagos, popularmente conhecidos como “barbeiros”. Esses insetos são da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae (LENT; WYGODZINSKY, 1979). É possível que a espécie *Trypanosoma rangeli* (LUCHEIS et al., 2005) também seja transmitida aos cães, mas normalmente não é patogênica (DANTAS-TORRES, 2008b). Os vetores de *T. cruzi* pertencem aos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (Hemiptera: Triatominae). A infecção com *T. cruzi* em cães é predominante em todas as regiões, exceto no Sul (FALAVIGNA-GUILHERME et al., 2004). Carrapatos *R. sanguineus* que se alimentam

de cães infectados pelo *T. cruzi* podem adquirir a infecção (PINTO DIAS et al., 2005). Entretanto, não há nenhuma evidência confirmando o desenvolvimento do patógeno nos carrapatos e a subsequente transmissão para cães saudáveis (DANTAS-TORRES, 2008b).

1.4 Linhagem de células embrionárias de carrapatos

1.4.1 Histórico

Alguns dos agentes patogênicos transmitidos por picadas de carrapatos são muito difíceis de serem cultivados em meios de cultura tradicionais. 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. As linhagens também servem para a produção de anticorpos e antígenos para testes diagnósticos e para estudos das relações entre hospedeiro-vetor-patógenos. Sistemas de cultivo *in vitro* contribuem para a redução do uso de animais de experimentação, visto que permitem a produção de grandes quantidades de material antigênico sem o uso de sistemas espécie-específicos *in vivo* (PASSOS, 2012).

Apesar de mais de 800 espécies de carrapatos mundialmente identificadas, relativamente poucas linhagens celulares foram estabelecidas até o momento. Os primeiros estudos com culturas de células de carrapatos foram realizados nos anos 50 por Weyer (1952), que obteve células, a partir tecidos de *Rhipicephalus bursa* Canestrini e Fanzago. Este cultivo teve a duração de apenas oito dias (PUDNEY; VARMA; LEAKE, 1973). Em 1975 foi estabelecida a primeira cultura contínua de células de carrapatos (VARMA; PUDNEY; LEAKE, 1975) e desde então, o número de linhagem de células estabelecidas tem aumentado, oriunda das espécies ixodídeos e argasídeos (PASSOS, 2012). Esses autores estabeleceram as três primeiras culturas de células de linhagem de carrapatos (TTC-219, TTC-243 e TTC-257), cultivadas a partir de *Rhipicephalus appendiculatus* Neuman. Bhat e Yunker (1977) estabeleceram as células de linhagem RML-14, utilizando células embrionárias de *Dermacentor parumapertus* Neumann. Seis novas linhagens a partir de células embrionárias de *Dermacentor variabilis* Say e *D. parumapertus* (RML-15, RML-16, RML-17, RML-18, RML-19 e RML-20) foram estabelecidas por Yunker, Cory e Meibos (1981). Bell-Sakyi (1991) estabeleceu cinco novas linhagens (HAE CT VM 7, HAE CT VM 8, HAE CT VM 9, HAE CT VM 10, HAE CT VM 11), a partir de células embrionárias de *Hyalomma*

anatolicum anatolicum Koch. Munderloh et al. (1994) propuseram um método que permitia a viabilidade celular mesmo após o congelamento e descongelamento das células. Deste modo, foram estabelecidas novas linhagens utilizando células embrionárias de *Ixodes scapularis* Say, sendo ISC6 e IDE8 as mais conhecidas.

1.4.2 Aplicabilidade do cultivo de células de carrapato

Sistemas de cultivo *in vitro*, têm tido aplicabilidade para vários estudos, tais como análises morfológicas, genéticas, proteômicas, incluindo genômica transcricional e expressões protéicas, permitindo comparações entre células dos hospedeiros e dos vetores. Tais sistemas constituem, portanto, uma nova abordagem para melhor entendimento das relações entre patógenos e células de carrapatos (BELL-SAKYI et al., 2007).

Bactérias de diferentes gêneros, especialmente *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Borrelia* e *Rickettsia*, e muitos arbovírus foram propagados em cultura de células de carrapatos (BELL-SAKYI et al., 2007). Dessa maneira a aplicação de linhagens celulares de carrapatos para estudos de uma série de agentes infecciosos representa um enorme potencial para o fornecimento de material antigênico em elevada quantidade e sem uso de animais experimentais (PASSOS, 2012).

Em uma abordagem proteômica foi demonstrado que proteínas expressas em macrófagos infectados são produtos dos genes que diferem daquelas expressas em células de carrapatos infectados, daí a importância de se comparar concomitantemente as duas situações *in vivo* e *in vitro* para a elaboração de produtos vacinais (BELL-SAKYI et al., 2007).

Uma primeira linhagem sulamericana foi recentemente estabelecida no Brasil (em fase de registro no CGEN), para a espécie *A. sculptum*. Os resultados da aplicabilidade do uso desta linhagem ainda não foram publicados (Projeto FAPESP 2007/57749-2) porque estão sendo analisados para obtenção de patente.

O banco de linhagens denominado “The Tick Cell Biobank” localizado em Pirbright, Surrey (Reino Unido), contém muitas outras linhagens anteriormente estabelecidas, que lá estão depositadas (<http://www.pirbright.ac.uk/research/Tickcell/Default.aspx>)

1.5 Justificativa

Muitos bioagentes transmitidos por carrapatos são autóctones e não crescem em meios sintéticos ou não se adaptam a outros substratos, sendo mantidos em sangue. Cultivo em

células podem auxiliar o diagnóstico e isolamento desses hemoparasitos. Entretanto, para a obtenção de culturas primárias de células embrionárias de carrapatos é fundamental a utilização de muitos animais de laboratório. Além disso, a manutenção dos hospedeiros demanda alto custo. Uma vez a linhagem celular estabelecida, pode significar baixo custo, rapidez de resultados e diminuição no uso de animais de laboratório, o que está em acordo às normas estabelecidas pelo Conselho de Ética em Experimentação Animal. Dessa maneira, justifica-se a relevância do desenvolvimento do presente estudo que está apresentado em dois capítulos, cujos objetivos estão abaixo.

1.6 Objetivos

Padronização de cultivo de células embrionárias-simile de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) e seu uso como substrato para o cultivo de patógenos.

2 CAPÍTULO 1 – PADRONIZAÇÃO DE CULTIVO DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS-SIMILE DE *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI:IXODIDAE)

2.1 Introdução

Há aproximadamente 870 espécies de carrapatos mundialmente conhecidas (GUGLIELMONE et al., 2010), e pouco mais de 50 linhagens celulares estabelecidas. Estudar e cultivar agentes patogênicos em cultivos primários de células e/ou de tecidos de carrapatos tem sido o desejo de muitos pesquisadores há mais de 50 anos (BELL-SAKYI, 2004). Weyer (1952) iniciou os primeiros estudos obtendo cultivos primários de células de *Rhipicephalus bursa* Canestrini e Fanzago. Porém os cultivos duraram somente oito dias (PUDNEY; VARMA; LEAKE, 1973). Varma, Pudney e Leake (1975) conseguiram estabelecer a primeira cultura contínua de células de carrapatos e desde então, o número de linhagens celulares estabelecidas aumentou, sendo mais significativo a partir da década de 90 (PASSOS, 2012). Um método de criopreservação celular permitiu o estabelecimento novas linhagens, como as de células embrionárias de *Ixodes scapularis* Say, sendo ISC6 e IDE8 as mais conhecidas (MUNDERLOH et al., 1994).

Muitas linhagens anteriormente estabelecidas estão depositadas em Pirbright, Surrey (Reino Unido), no banco de células denominado “Biobank” (<http://www.pirbright.ac.uk/research/Tickcell/Default.aspx>). As células são mantidas em parte criopreservadas e em parte em cultivos, porque algumas linhagens são comercializadas por um preço de L\$535 cada, somado ao valor do envio. A manutenção das células de carrapatos no biobank tem sido de responsabilidade técnica de Lesley Bell-Sakyi, que foi idealizadora do banco celular.

Apesar de funcionar há mais de uma década, ainda não há amostras de linhagens de carrapatos sulamericanos depositadas no banco celular de Pirbright.

Recentemente foi estabelecida no Brasil uma primeira linhagem celular de carrapato (dados ainda não publicados por motivo de submissão de pedido de patente ao NIT do Butantan). A espécie que deu origem a essa linhagem é *Amblyomma sculptum* Berlese (BEATI et al., 2013; NAVA et al., 2014), que se destaca por ser altamente antropofílica, sendo responsável pela transmissão de *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa na América Latina.

Outros carrapatos são também importantes na transmissão de agentes patogênicos, comprometendo principalmente a saúde animal, como as do gênero *Rhipicephalus*, representadas no país por *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) e *Rhipicephalus (Boophilus)*

microplus (Canestrini). 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 anaplasmoses bovina.

Conhecido como carrapato dos cães, *R. sanguineus* ocorre tanto em áreas rurais como urbanas apresentando um grande potencial de adaptação às habitações humanas. São carrapatos ativos durante todo o ano e um estudo demonstrou que ocorrem duas linhagens no Brasil (SZABÓ et al., 2005). A “temperada” também conhecida como “linhagem sul”, se distribui no Estado do Rio Grande do Sul, em parte da Argentina, Uruguai, Chile, Itália e França. A “tropical” ou “linhagem norte” abrange todas as outras regiões brasileiras com exceção do Rio Grande do Sul, Paraguai, Colômbia, África do Sul, Moçambique e duas localidades no norte da Argentina (NAVA et al., 2012).

A situação taxonômica de *R. sanguineus*, considerando as duas linhagens brasileiras, reflete o potencial de transmissão de *Ehrlichia canis*, pela linhagem tropical. Por outro lado, a linhagem temperada não tem sua competência vetorial comprovada no país e nem mesmo na América Latina (MORAES-FILHO et al., 2011).

Daí a importância de se obter culturas de células para esta espécie de carrapato (linhagem tropical), considerando que alguns dos agentes causadores de doenças não crescem em meios de cultura sintéticos.

2.2 Objetivos

Objetivo Geral: Obter cultivos primários *in vitro* a partir de ovos embrionados de *Rhipicephalus sanguineus* (origem tropical) e estabelecer uma linhagem celular.

Objetivos Específicos:

- Encontrar a idade ideal dos ovos de *R. sanguineus* para obtenção das culturas primárias.
- Confirmar a identidade celular do cultivo primário de *R. sanguineus*.
- Criopreservar as culturas celulares primárias.
- Verificar a viabilidade celular após o descongelamento das culturas primárias.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Origem dos carrapatos

Exemplares de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* foram doadas pelo Laboratório de Ixodologia da Universidade Federal de Uberlândia, (grupo do Professor Dr. Matias Juan Pablo Szabó), que possui autorização da comissão de ética de sua instituição (REGISTRO CEUA/UFU 009/13). Os lotes originários de Uberlândia, MG, foram registrados na Recepção de Animais, recebendo um número de rastreamento, no programa de informatização do IBU.

2.3.2 Desinfecção das fêmeas de *R. sanguineus*

Em uma capela de fluxo laminar horizontal, as fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* 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 26 °C $\pm$ 1 e umidade de 80-85%, para realização das posturas.

2.3.3 Testes da idade ideal dos ovos e culturas primárias

Assim que as fêmeas ingurgitadas 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 até a data exata do início dos experimentos.

O período de incubação dos ovos de *R. sanguineus* varia de 20-24 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).

Os ovos com as idades acima descritos foram lavados conforme Munderloh et al. (1994) e Bell-Sakyi (1991), com algumas modificações, como segue:

- 10 minutos em cloreto de benzalcônio 2%
- lavagem com água MilliQ autoclavada
- 10 minutos em álcool 70% filtrado

- lavagem com água MilliQ autoclavada
- 30 minutos em solução de água MilliQ autoclavada com antibióticos e anfotericina B
- 5 minutos em hipoclorito de sódio 2%
- 3 lavagens com água MilliQ autoclavada

Os ovos foram quebrados em meio L-15B completo suplementado com 20% de SFB. A suspensão celular foi centrifugada a 100 x g por 8 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* (precipitado) foi ressuspensionado em 4 mL do meio L-15B completo com 20% SFB e adicionado antibióticos (4 µl penicilina/estreptomicina) e anfotericina B (0,8 µl). O *pellet* ressuspensionado foi colocado em garrafa de 25 cm², e mantido em estufa a 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 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.

2.3.4 Culturas primárias

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 Falcon com 6 mL de meio completo (por 8 minutos a 100 x g) o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspensionado em 8 mL de meio e dividido em 2 garrafas. A partir da primeira passagem, as culturas com cerca de 8×10^5 células/mL, foram criopreservadas conforme descrito mais abaixo.

2.3.5 Confirmação da identidade celular

A identidade celular foi confirmada por meio de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) baseada em Black e Piesman (1994), utilizando o fragmento 16S rDNA mitocondrial.

2.3.5.1 Extração de DNA

Foi utilizado o kit comercial para extrações de DNA DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen®) para pequenas quantidades (200 µl), seguindo as instruções do fabricante.

2.3.5.2 PCR

Para a reação de PCR utilizou-se 5 µl da amostra extraída (1:1:1) utilizando o seguinte par de iniciadores:

16S + 1 (5'-CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC TGT GG-3')

16S – 1 (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T- 3')

Foi também utilizado a *Taq Platinum Brazilian* Invitrogen com volume final de 50 µl, seguindo as especificações do fabricante. Utilizamos o seguinte programa: Etapa inicial de 94 °C por 3 minutos foi seguida de 10 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 48 °C 30 segundos e 72 °C por 40 segundos, mais 15 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C 30 segundos. e 72 °C por 40 segundos e mais 10 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 40 segundos, finalizando com uma extensão final de 72 °C por 7 minutos. Posteriormente a reação foi totalmente aplicada em um gel de agarose 2,0 %.

2.3.6 Criopreservação e recuperação das culturas

Uma alíquota da suspensão celular (corada com Azul de Tripán) 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. O congelamento seguiu o protocolo abaixo, sugerido pelo Prof. Dr. Arlei Marcili da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (dados não publicados).

Após a contagem celular, a suspensão (oriunda da raspagem contendo células + 8 mL de meio L-15B) foi centrifugada a 100 x g por 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura contendo Soro Fetal Bovino (SFB) na concentração de 25% acrescido de Dimetil Sulfóxido (DMSO) na concentração de 10%. Os criotubos foram mantidos por 45 minutos em gelo seco e, em seguida, transferidos para nitrogênio líquido. Para recuperação das células criopreservadas, cada criotubo foi rapidamente descongelado em banho-maria a 37 °C. O conteúdo foi transferido para tubo Falcon de 15 mL contendo 5 mL meio de cultura (L-15B) com de soro fetal a 20%. Após a centrifugação (100 x g por 8 minutos), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 4 mL de meio, sendo a seguir incubado em garrafa de 25 cm².

2.4 Resultados

2.4.1 Concentração de SFB em meio L-15B

Inicialmente o meio L-15B foi suplementado com 10% SFB, porém as células não aderiram ao fundo da placa. A adesão celular somente aconteceu quando o meio L-15B foi suplementado com 20% de SFB. Diante disso, essa concentração foi escolhida e utilizada em todas as etapas (esmagamento dos ovos e troca de meio). O total de posturas utilizadas no presente estudo foi proveniente de 100 fêmeas.

2.4.2 Avaliação da idade ideal dos ovos

Além do tempo de maturação dos ovos (período de incubação), o aspecto externo também foi levado em consideração para a viabilidade do cultivo.

Ovos com idade de 10 dias se apresentaram com um aspecto “vitrificado” (Figura 2.1A). Nessa fase as células demonstraram dificuldade de aderência (embora algumas tenham aderido ao fundo da garrafa), e a maioria permaneceu no sobrenadante (Figura 2.1B). Já os ovos com idade de 12 dias mostraram-se com o formato de “gema”, ou seja, mais condensados em um dos polos (Figura 2.1C), o que também produziu pouca célula aderente (Figura 2.1D). Com 14 dias os ovos apresentavam uma estrutura em seu interior, branca e afilada (intestino em formação). Imediatamente após o seu aparecimento, os ovos foram cultivados (Figura 2.1E). Ovos com essa idade produziram maior número de células viáveis que rapidamente se aderiram ao fundo da garrafa, e também vários grupos de células-tronco. Estas, por sua vez, ficaram sobre as que aderiram (Figura 2.1F), sendo observadas todas as vezes que os cultivos foram preparados, quando a idade dos ovos foi de 14 dias. Em cultivos com idade inferior a 14 dias, as células-tronco estão em número reduzido (Figuras 2.1B e 2.1D). A aderência celular começou a ocorrer algumas horas após o cultivo e se manteve nas duas próximas trocas de meio.

2.4.3 Culturas primárias

O crescimento das células de *R. sanguineus* foi bastante lento no início e somente em torno de 60 dias foi possível a obtenção de confluência total de células na garrafa para a

primeira colheita (harvest). Houve uma aceleração no crescimento celular entre 10 e 30 dias de intervalo para a colheita subsequente.

Figura 2.1 - Ovos de *Rhipicephalus sanguineus* com diferentes idades e culturas realizadas com esses ovos.

A) Ovos com 10 dias de idade, aum. 40x - a seta evidencia o aspecto vitrificado do ovo (lembra vidro temperado). B) Cultura de ovos com 10 dias de idade, barra 10 μ m - as poucas células raramente aderem. C) Ovos com 12 dias de idade, aum. 30x - a seta mostra a opacidade em um dos polos do ovo. D) Cultura de ovos com 12 dias, barra 5 μ m - a seta mostra células aderidas sob a célula-tronco, mas a quantidade de grupos aderidos é insuficiente para a viabilidade do cultivo. E) Ovos com 14 dias, aum. 25x - a seta evidencia o intestino dentro dos ovos. F) Culturas originadas de ovos com 14 dias de idade, barra 5 μ m - a seta indica grupos celulares aderidos abaixo da célula-tronco.

A partir daí, o tempo entre as próximas colheitas foi mantido em 30 dias. Após várias colheitas, as culturas primárias de *R. sanguineus* foram sofrendo modificações visíveis em sua morfologia (Figura 2.2).

Nos primeiros dias das primeiras colheitas, as células se espalharam na garrafa de forma desordenada, para se organizarem em conjunto de células de diversas morfologias (cultura heterogênea) até a confluência. Este quadro se manteve até a quarta colheita. A partir daí os grupos celulares se apresentaram mais homogêneos.

Atualmente as culturas já estão na 10a. colheita (360 dias após o início do cultivo), embora tenham sido criopreservadas desde a colheita 3 (Figura 2.3).

2.4.4 Criopreservação e descongelamento das células

Os congelamentos foram realizados desde a primeira colheita, considerando-se o número de células existentes na garrafa de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ células/mL (Tabela 2.1) e a quantidade de células-tronco. Até o momento, foram congeladas culturas na primeira, segunda e terceira colheitas. Após 2 dias do descongelamento, foi realizada troca de meio, devido aos debris celulares nos primeiros dias. Mesmo estando em confluência celular total na garrafa, assim como a presença de 3 conjuntos de células-tronco por campo microscópico, as células das passagens iniciais (P1 e P2), quando descongeladas, não aderiram ao fundo da garrafa. Entretanto, as células da terceira colheita mostraram-se viáveis com excelente recuperação. Inicialmente elas foram colonizando timidamente o fundo da garrafa. No entanto, após uma semana percebemos que as células começaram a crescer e depois de 60 dias, houve confluência total (Figuras 2.3E-3F). Células nas colheitas 4 – 6 também foram criopreservadas. Ainda estamos na fase de descongelamento e recongelamento. Mas, considerando que elas estão em crescimento contínuo, mesmo após o segundo e terceiro congelamento, é altamente sugestivo que estabelecemos a linhagem.

2.4.5 Confirmação da identidade celular

A preparação da amostra de células na terceira colheita foi satisfatória, apresentando uma boa amplificação por PCR (Figura 2.4). Os resultados das reações de sequenciamento geraram uma sequência consenso de 371 bases com 100% de alinhamento. A comparação utilizando o Blastn com o banco de dados *Nucleotide collection (nr/nt)* do NCBI, mostrou

100% de similaridade e score máximo com uma porção do genoma mitocondrial completo de *R. sanguineus* (JX416325.1), confirmando a identidade celular dessa espécie (Figura 2.5).

Figura 2.2 - Diferentes colheitas de cultivos primários de células embrionárias-simile de *Rhipicephalus sanguineus*.

A-B. Primeira colheita, células após 24h e 15 dias, respectivamente, barras 10 μ m e 20 μ m. C-D. Segunda colheita, células após 24h e 15 dias, respectivamente, barras 20 μ m e 10 μ m. E-F. Terceira colheita, células após 24h e 15 dias, respectivamente, barras 20 μ m e 10 μ m. G-H. Quarta colheita, células após 24h e 15 dias, respectivamente, barras 10 μ m. As setas apontam para os conjuntos de células-tronco.

Figura 2.3 - Cultivos primários de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus* nas colheitas 5-6 e descongelamento.

A-B) Quinta colheita, células após 24h e 15 dias, respectivamente, barras 5 μ m e 10 μ m. C-D) Sexta colheita, células após 24h e 15 dias, respectivamente, ambas as barras 10 μ m. E-F) Células após 15 dias e 60 dias do descongelamento, respectivamente, barras 5 μ m e 10 μ m. As setas indicam os conjuntos de células-tronco.

Tabela 2.1 - Número de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus*, em diferentes colheitas, momentos antes da criopreservação.

Congelamento	Passagem	Nº de cél/mL	Descongelo
14.11.13	P1	4,5 X 10 ⁵	29.11.13
14.11.13	P2	4,0 X 10 ⁵	29.11.13
23.01.14	P2	3,0 X 10 ⁵	13.01.14
23.01.14	P3	7,5 X 10 ⁵	15.02.14

Figura 2.4 - Gel de agarose 2,0% para visualização da PCR com iniciadores 16S- e 16S+.

A) marcador de pares de base 1kb Ladder; B) controle negativo; C) controle positivo; D – E) 3ª colheita de células embrionárias-simile de *Rhipicephalus sanguineus*.

Figura 2.5 - Blastn do sequenciamento de uma porção do gene 16S rDNA do cultivo de células embrionárias-simile de *Rhipicephalus sanguineus* (=Query).

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	686 bits(371)	0.0	371/371(100%)	0/371(0%)	Plus/Plus	
Query	1	ACTTCtttttttAATATCTTCATTAAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAAC	60			
Sbjct	6960	ACTTCtttttttAATATCTTCATTAAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAAC	7019			
Query	61	TTTTTTGTCAATATGATCTATCAAAAAATATAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACAT	120			
Sbjct	7020	TTTTTTGTCAATATGATCTATCAAAAAATATAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACAT	7079			
Query	121	AAAATCATTAATAATGGATCATTTTATTTTAAAAAGTTCATAATATTTTCTAGCCGCC	180			
Sbjct	7080	AAAATCATTAATAATGGATCATTTTATTTTAAAAAGTTCATAATATTTTCTAGCCGCC	7139			
Query	181	CAGCCAAAATTTTCTAATAGTAATTACATATTAAATAAAAAATTTAATAAATTCATAGGG	240			
Sbjct	7140	CAGCCAAAATTTTCTAATAGTAATTACATATTAAATAAAAAATTTAATAAATTCATAGGG	7199			
Query	241	TCTTCTGTCTTTAATATAAATAATTGTTTCTGCACaaattaaaaaaacttcaattttta	300			
Sbjct	7200	TCTTCTGTCTTTAATATAAATAATTGTTTCTGCACAAATTAAAAAACTTCAATTTT	7259			
Query	301	atttaaaaaaagtttttttCTGGACTTCCATTCTCTTAGCATTCAATTAAATCTTATTT	360			
Sbjct	7260	ATTTAAAAAAGTTTTTCTGGACTTCCATTCTCTTAGCATTCAATTAAATCTTATTT	7319			
Query	361	CAATACCTTTG	371			
Sbjct	7320	CAATACCTTTG	7330			

*100% de identidade com uma porção do Genoma completo mitocondrial de *Rhipicephalus sanguineus* JX416325.1 (=Sbjct).

2.5 Discussão

Em cultivos primários de células de carrapato, é preciso testar concentrações diferentes de Soro Fetal Bovino e de outros componentes que estimulam crescimento e adesão celular, para as diferentes espécies. Em geral, a literatura recomenda de 5 a 20% de SFB e de 0 a 10% de triptose fosfato (KURTTI; MUNDERLOH; SAMISH, 1988). O SFB promove a expansão e adesão celular devido à presença de componentes e fatores hormonais (MAURER, 1986). Se por um lado a concentração mais elevada estimula o crescimento celular para algumas espécies, para outras, pode ser tóxica. Segundo Kurtti, Munderloh e Samish (1988), além do SFB, a concentração de triptose fosfato também pode variar conforme a espécie de carrapato. Ao compararem uma linhagem celular já estabelecida de *R. appendiculatus*, com linhagens jovens desta espécie e de *R. sanguineus*, esses autores verificaram que as concentrações de 20% de SFB e de 10% de triptose fosfato foram as melhores para as linhagens jovens. No entanto, obtiveram excelente propagação em novas garrafas para a linhagem mais antiga de *R. appendiculatus* em concentração reduzida de SFB (5%), mantendo a concentração de triptose fosfato em 10%. No presente estudo, os cultivos celulares primários de *R. sanguineus* (linhagem tropical) tiveram ótimo crescimento e adesão somente quando a porcentagem de SFB foi de 20% e a de triptose fosfato foi de 10%, corroborando esses autores.

Outros soros também podem ser utilizados para culturas de células de carrapatos. Em linhagens já estabelecidas, tais como, *R. microplus* (BME/CTVM2 e BME/CTVM6), *Ixodes ricinus* (Linnaeus) e *I. scapularis* (IDE8), bem como em duas linhagens jovens derivadas de *Rhipicephalus decoloratus* Koch (BDE/CTVM12 e BDE/CTVM14), Lallinger et al. (2010) conseguiram ótimos resultados usando Soro Calf (derivado de bezerros) a 20%.

Por outro lado, as mesmas técnicas e formulações dos meios de cultura recomendados para cultivo de células de carrapatos ixodídeos (MUNDERLOH et al., 1994; SIMSER et al., 2001) também podem funcionar muito bem para culturas de carrapatos argasídeos. Assim, seguindo as formulações e as técnicas de preparo celular já publicadas por aqueles autores, Mattila et al. (1980) obtiveram com sucesso duas linhagens de células de carrapatos argasídeos da espécie *Onithodoros capensis* (Neumann) (CCE2 e CCE3) (citado como *Carios capensis*).

Considerando que os *debris* celulares, cascas de ovos e muitas leveduras persistem nos primeiros dias de cultivo, essa fase foi a mais crítica para a aderência dos tecidos celulares de

R. sanguineus. Pudney, Varma e Leake (1973), ao fazerem cultivos primários de *R. microplus*, sugeriram que a quantidade de tecidos celulares provenientes de ovos embrionados deve ser densa no meio de cultura (cerca de 10 posturas em 4 mL de meio), a fim de proporcionar um “start” de crescimento e adesão celular. No entanto, pela nossa experiência, se o número de ovos embrionados for muito grande, também pode resultar em muita “sujeira celular” o que pode facilitar contaminação. Embora o meio de cultura deva ser substituído semanalmente (MUNDERLOH et al., 1994), no presente estudo, foi essencial aumentar a frequência de troca de meio nos dias subsequentes ao cultivo de *R. sanguineus*. Esta foi a maneira de contornarmos o problema de excesso de resíduos no sobrenadante, já que utilizamos posturas de 16-20 fêmeas a cada vez. Porém, foi preciso muito cuidado para não remover células viáveis, conforme recomendado por Mattilla et al. (1980) e Munderloh et al. (1994).

Outro fator que contribuiu fundamentalmente para o sucesso dos cultivos primários de *R. sanguineus* foi a idade dos ovos. Mattilla et al. (1980), ao prepararem as culturas dos ovos de *O. capensis*, que originaram as linhagens CCE2 e CCE3, recomendaram que o cultivo primário só deve ser realizado quando os apêndices embrionários estão aparentes. Nossos resultados comprovaram isso. Ou seja, quando os apêndices (aparelho intestinal) se tornaram visíveis nos ovos de *R. sanguineus* (com idade de 14 dias), os cultivos celulares preparados tiveram ótimo desenvolvimento. No entanto, o tempo para adesão celular no fundo da garrafa também é variável. Aqueles autores observaram que os tecidos embrionários de *O. capensis*, começaram a aderir ao fundo da garrafa entre 1-2 semanas. Relataram ainda que, nas culturas mais jovens de *O. capensis*, foram comuns diversos tipos de células aderentes e não aderentes, além da presença de vesículas. Porém, à medida que o número de passagens foi aumentando houve uma diminuição de células não aderentes e de vesículas no sobrenadante. No caso de *R. sanguineus*, observamos o mesmo, com exceção de que a adesão celular começou no mesmo dia em que os ovos foram preparados.

Verificamos que houve uma modificação na morfologia celular à medida que as culturas foram sendo propagadas e congeladas. Pudney, Varma e Leake (1973) observaram modificações semelhantes nas células de *R. microplus*, mas comentaram que elas aconteciam conforme o tipo de garrafa utilizada nos cultivos. Naquela época era comum o uso de garrafas de vidro. Por outro lado, Munderloh et al. (1994) relataram que, nos cultivos primários da linhagem ISE18 (*I. scapularis*), os mioblastos apareceram em células jovens assim como conjuntos de células achatadas em desorganização. Mas as células diferenciadas em tecidos

musculares declinaram em culturas acima de 10 subcultivos. Segundo esses autores, o número e a diversidade morfológica das células tendem a diminuir nas linhagens, sobrando apenas 1 ou 2 tipos celulares que se tornam dominantes. Dessa forma, a linhagem de *R. sanguineus*, à medida que for sendo subcultivada, deve se modificar ainda mais.

Apesar da existência de protocolos relativamente padronizados para estabelecer culturas primárias, algumas espécies de carrapatos apresentam mais dificuldades do que outras para produzirem culturas contínuas. Espécies como *R. appendiculatus* e *R. microplus* (*B. microplus* IX, VII-SCC, BME26, BME/CTVM2, 4, 5,6) já proporcionaram a obtenção de várias linhagens em diversos laboratórios (VARMA, 1989). A espécie *Dermacentor andersoni* Stiles, foi uma das primeiras a ser utilizada em experimentos com cultivo celular (YUNKER, 1987), mas o estabelecimento da linhagem levou mais de 30 anos.

A maior parte das linhagens estabelecidas foi conseguida a partir de ovos embrionados, sem a seleção de tecidos específicos (BEL-SAKYI, 1991; KURTTI; MUNDERLOH; SAMISH, 1988; MUNDERLOH et al., 1994). Dessa maneira, os cultivos de células de carrapatos geralmente possuem dois ou mais tipos celulares (YANKER, 1987) que podem estar presentes em uma ou em diferentes passagens. No entanto, a mistura dessas células parece ser essencial para a sobrevivência do cultivo, já que experimentos de clonagem com esse tipo de célula falharam (MUNDERLOH et al., 1994).

No primeiro cultivo de células de *R. sanguineus* o crescimento celular se apresentou bastante lento e somente em torno de 60 dias foi possível uma confluência total na garrafa para a realização da colheita. Quando a garrafa atingiu a confluência de 100%, as células tiveram divisão celular contínua, formando uma nova camada por cima da já existente. Bell-Sakyi et al. (2007), descreveram que as células de carrapatos não exibem inibição por contato e a maioria cresce facilmente em 3 dimensões, e isso foi constatado no presente estudo.

Nos anos 70-80 as linhagens eram mantidas em estufa, no próprio meio de cultura (PUDNEY; VARMA; LEAKE, 1973). Estes autores iniciaram 10 cultivos primários de *R. microplus*, mas somente uma linhagem foi obtida após 14 subcultivos (TTC256). Entretanto, nenhuma amostra foi congelada, uma vez que a criopreservação só foi padronizada no final dos anos 80 (KURTTI; MUNDERLOH; SAMISH, 1988). O primeiro subcultivo de células primárias de carrapatos pode levar meses e até mesmo um ano. Este é o caso da espécie *I. scapularis* (MUNDERLOH et al., 1994), atualmente com várias linhagens. Segundo Bell-Sakyi et al. (2007) algumas linhagens celulares de carrapatos podem levar até 5 anos para serem estabelecidas.

O armazenamento de culturas sob temperaturas de 4 °C - 12 °C parece ser o ideal já que a criopreservação também é limitada. Bell-Sakyi et al. (2007) relataram que células de algumas espécies de carrapato podem ser muito difíceis de serem reanimadas após criopreservação. Segundo esses autores, quando mantidas em nitrogênio líquido, as culturas contínuas podem sobreviver por pelo menos 12 anos. Para garantir que as linhagens celulares sejam contínuas, uma parte deve ser mantida em armazenamento e outra criopreservada.

O número de células também tem que ser levado em consideração, tanto no momento de propagação em novas garrafas como no congelamento (BELL-SAKYI et al., 2007). Portanto, as primeiras colheitas e congelamentos de células de *R. sanguineus* foram realizados quando as células atingiram um número em torno de $7,5 \times 10^5$ /mL, estando em confluência total na garrafa.

Uma vez congeladas e mantidas em nitrogênio líquido, as células de terceira colheita de *R. sanguineus* foram descongeladas com sucesso, sendo uma parte congelada por mais duas vezes, e outra parte mantida em novas propagações. Porém a viabilidade celular, após criopreservação, foi altamente dependente não só da idade da cultura como também da quantidade de células-tronco no momento do congelamento.

Por definição, as células-tronco possuem capacidade de auto-replicação, e apresentam potencial para se diferenciar em diversos tipos celulares (<http://www.ghente.org/temas/celulas-tronco/index.htm>). No caso específico de carrapatos, a caracterização celular e molecular foi reportada recentemente para a linhagem BME26 (*R. microplus*) por Esteves et al. (2008). Até então, as linhagens permaneceram sem caracterização celular e molecular. Apesar de não termos feito uma caracterização das células de *R. sanguineus* no presente estudo, podemos dizer que as células-tronco estão presentes nas culturas de células de carrapatos, e esta presença foi confirmada por Cirelli-Moraes (2012) para células da espécie *A. sculptum*.

Assim, podemos dizer que estamos com a linhagem celular praticamente estabelecida, mas faltando a caracterização celular e molecular que será assunto do doutorado.

2.6 Conclusões

- A idade ideal para a viabilidade de cultivos primário de células a partir de ovos embrionados de *R. sanguineus* é de 14 dias.
- A concentração ideal de SFB (soro fetal bovino) para viabilizar os cultivos primários de células, a partir de ovos embrionados de *R. sanguineus*, foi de 20%, pelo menos em culturas livres de patógenos.
- A confluência celular total na garrafa de 25cm², não foi suficiente para manutenção das células. Foi necessário respeitar o intervalo de 30 dias entre as propagações, para viabilizar as culturas de células de *R. sanguineus*, e de 60 dias da primeira para a segunda propagação.
- A recuperação das células de *R. sanguineus*, após a criopreservação, somente foi viável a partir da 3^a. propagação, ou seja, em culturas com cerca de 150 dias a contar do início do cultivo.

3 CAPÍTULO 2 - CÉLULAS EMBRIONÁRIAS-SIMILE DE *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) COMO SUBSTRATO PARA O CULTIVO DE PATÓGENOS

3.1 Introdução

Algumas espécies de carrapatos estão envolvidas na transmissão de diversos tipos de agentes patogênicos, através da sua picada. Riquetsioses, borrelioses, ehrlichioses e rotozoonoses são exemplos das principais doenças transmitidas por esses artrópodes. No Brasil, até a última década, a única doença humana reconhecidamente causada por agente etiológico transmitido por carrapatos era a Febre Maculosa Brasileira (FMB). Esta doença, causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii* é relatada no país desde os anos 20 e a letalidade pode chegar a mais de 80%, em casos não tratados. Em São Paulo, a letalidade variou de 35 a 40% nos últimos 20 anos (ANGERAMI et al., 2006; GALVÃO, 1996). As espécies de carrapatos *Amblyomma sculptum* Berlese (citado como *Amblyomma cajennense*) (BEATI et al., 2013; NAVA et al., 2014) e *Amblyomma aureolatum* (Pallas) são comprovadamente vetores de *R. rickettsii* na região metropolitana de São Paulo (PINTER; LABRUNA, 2006). Uma riquetsiose mais branda, também do grupo da FMB, causada por *R. parkeri*, ocorre no estado de Santa Catarina (MEDEIROS et al., 2011) e o carrapato envolvido na transmissão é *A. aureolatum*. Em áreas endêmicas de FMB, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) é considerado um vetor suspeito ou potencial (LABRUNA, 2009; PINTER; LABRUNA, 2006). Pacheco et al. (2010) encontraram *R. sanguineus* infectados por *R. rickettsii* na região de Juiz de Fora, MG, em uma área onde nenhum *A. sculptum* (citado como *A. cajennense*) coletado estava infectado.

As borrelioses podem ser transmitidas aos animais e aos humanos por diferentes grupos de carrapatos. Uma delas, Borreliose de Lyme, é transmitida principalmente por carrapatos do gênero *Ixodes* e comprovadamente no hemisfério norte. No Brasil, e em alguns países da América Latina, uma doença similar foi diagnosticada a partir dos anos 90, sem o isolamento do agente etiológico (RODRIGUES; MEIRELES; BRAZ, 2007; YOSHINARI et al., 2003). Somente recentemente bactérias do complexo “*Borrelia burgdorferi*” foram encontradas em dois países sulamericanos, Uruguai (BARBIERI et al., 2013) e Chile (IVANOVA et al., 2014), comprovando sua existência no hemisfério sul.

Apesar das ehrlichioses e protozoonoses se apresentarem associadas principalmente ao gênero *Rhipicephalus*, elas também podem ser transmitidas por outros gêneros de carrapatos.

A ehrlichiose humana é causada por *Ehrlichia chaffeensis* e *E. ewingii* (DUMLER et al., 2001) e os vetores envolvidos são *Amblyomma americanum* Linnaeus e *Ixodes scapularis* Say (EUA), *Ixodes persulcatus* (Asia) e *I. ricinus* (Europa) (DUMLER et al., 2007). No Brasil casos humanos foram relatados apenas por suspeitas clínicas e pesquisa sorológica (CALIC et al., 2004; LABRUNA et al., 2007).

Em cães, a doença é principalmente causada pela bactéria *Ehrlichia canis* (DAGNONE et al., 2003; DUMLER et al., 2001; MOREIRA et al., 2003), que é transmitida por *R. sanguineus*, sendo este carrapato o de maior repercussão na clínica de pequenos animais. Entretanto, esta espécie de carrapato não foi encontrada infectada por *E. canis* em algumas áreas da América Latina onde ocorre a linhagem temperada “sul” de *R. sanguineus* (NAVA et al., 2012). Este fato é sugestivo de que a linhagem temperada não é responsável pela transmissão de ehrlichiose canina nessas áreas (MORAES-FILHO, 2013).

Além de *E. canis* que compromete a saúde dos cães em praticamente todas as regiões do mundo, outra espécie, *Ehrlichia ruminantium*, compromete a saúde de rebanhos nas regiões subsaarianas da África (LORUSSO et al., 2013).

Entre as protozoonoses, destacam-se a leishmaniose e as algumas tripanossomíases, que são zoonoses transmitidas principalmente por insetos flebotomíneos e triatomíneos, respectivamente. Em cães, a epidemiologia da leishmaniose (causada por *Leishmania infantum chagasi*) frequentemente se sobrepõe a outras infecções, como as causadas por *E. canis* e *Babesia vogeli*, ambas transmitidas por *R. sanguineus* (DANTAS -TORRES, 2008). A tripanossomíase canina é causada por protozoários do gênero *Trypanosoma* (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*), e as espécies que infectam cães no Brasil são *Trypanosoma evansi* (FRANCISCATO et al., 2007; HERRERA et al., 2005; SAVANI et al., 2005) e *Trypanosoma cruzi* (HERRERA et al., 2005; MAYWALD et al., 1996). É possível que a espécie *Trypanosoma rangeli* (LUCHEIS et al., 2005) também seja transmitida aos cães, mas, normalmente não é patogênica (DANTAS-TORRES, 2008b). Portanto, não há evidência do envolvimento de carrapatos na transmissão dessas tripanossomíases, entretanto, carrapatos *R. sanguineus* que se alimentam em cães infectados por *Trypanosoma cruzi* podem adquirir a infecção (PINTO DIAS et al., 2005). A espécie *T. cruzi* ocorre exclusivamente no continente americano parasitando mamíferos a milhões de anos. Em humanos, este protozoário hemoflagelado causa a Doença de Chagas (ou tripanossomíase americana) que é considerada uma das mais importantes infecções parasíticas da América Latina (MARCILI et al., 2009).

Infecção com *T. cruzi* em cães é predominante em todas as regiões, exceto no Sul (FALAVIGNA-GUILHERME et al., 2004).

Considerando que as linhagens celulares de carrapatos têm sido utilizadas em outras regiões do mundo, como substratos para isolamento e propagação de patógenos, ou mesmo para estudos de expressões proteicas, no presente estudo, as culturas primárias obtidas de *R. sanguineus* foram testadas como substrato para o crescimento de alguns patógenos.

3.2 Objetivos

Objetivo Geral: Testar células obtidas *in vitro*, a partir de ovos embrionados de *Rhipicephalus sanguineus* (origem tropical) como substrato para o crescimento de alguns agentes patogênicos.

Objetivos Específicos:

- Testar as células de *R. sanguineus* para infecção com *L. infantum chagasi* (CBT-153)
- Testar as células de *R. sanguineus* para infecção com *T. cruzi* (CBT 118)
- Testar as células de *R. sanguineus* para infecção com *E. canis* (cepa Jaboticabal)

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 Infecções de células embrionárias-simile de *R. sanguineus* com *L. infantum chagasi* (CBT-153) e *T. cruzi* (CBT 118)

Etapas realizadas no Laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, sob a supervisão do Dr. Arlei Marcili.

Duas espécies de tripanossomatídeos, *L. infantum chagasi* (CBT153 - isolado obtido de cão no estado do Maranhão) e *T. cruzi* (CBT 118 - isolado obtido de triatomíneo no estado do Piauí), foram utilizadas nos experimentos. Para tanto, alíquotas de 10^7 parasitas de cada espécie (promastigotas e epimastigotas, respectivamente) foram inoculadas em 2 garrafas de 25 cm² contendo culturas primárias de células embrionárias-simile de *R. sanguineus* de 2^a. colheita (preparadas e mantidas conforme descrição dos itens 2.3 - 2.4, do capítulo 1).

As culturas infectadas e não infectadas (controle) foram incubadas na temperatura de 28 °C e a infecção na monocamada celular foi acompanhada.

3.3.2 Infecção das células embrionárias-simile de *R. sanguineus* com *Ehrlichia canis* (cepa Jaboticabal, mantida em meio DH82, pela Profa. Rosângela Zacarias Machado, UNESP)

Em Fluxo Laminar, as bactérias *E. canis* mantidas no meio DH82 (células de histiocitoma canino) comercializado por Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co. LLC., Saint Louis, MO, USA), foram transferidas para um tubo Falcon de 15 mL, sendo completado até o volume de 14 mL com meio de cultura L-15B, sem adição de Soro Fetal Bovino (SFB).

Em seguida, o tubo Falcon foi invertido algumas vezes para homogeneização e centrifugado por 15 minutos (aproximadamente em 4000 x g). O sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 2 mL de meio L-15B. O conteúdo foi novamente homogeneizado e centrifugado como acima. Esse procedimento se repetiu por 3 vezes, mas após a 2^a. lavagem, foram retirados 100 µl para serem usados na preparação de lâminas de microscopia, que foram coradas com Panótico Rápido comercializado pelo laboratório Laborclin (Laborclin LTDA, Pinhais, PR, Brasil). O restante foi inoculado em 2 garrafas de 25 cm² contendo células embrionárias-simile de *R. sanguineus* de 4^a. colheita (preparadas e mantidas conforme descrição dos itens 2.3 - 2.4, do capítulo 1), em meio L15-B. Foram realizadas duas infecções,

a primeira o meio foi suplementado SFB da marca HyClone com Ferro, a 20%, e a segunda com suplementação de 10%.

As culturas infectadas com *E. canis* foram mantidas nas mesmas condições das culturas livres de infecção (à 30 °C), sendo o meio trocado semanalmente, no início do experimento, mas diminuindo o número de troca após o primeiro mês. Após este período as culturas positivas foram propagadas em novas garrafas (1 mL/garrafa de 25 cm²).

Para a preparação das lâminas e coloração com Panótico Rápido, utilizou-se o aparelho Cytospin fabricado pela Thermo (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Algumas lâminas foram deixadas secar na temperatura ambiente, e, em seguida foram fixadas com metanol (100%) por 5 minutos. Após imersão rápida nos 3 reagentes que compõem o kit do Panótico, as lâminas foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente.

3.3.3 PCR em tempo real (realizado somente para células infectadas por *E. canis*)

As amostras de células de *R. sanguineus* infectadas com *E. canis* e não infectadas (controle) foram processadas individualmente à extração de DNA, utilizando-se o kit de extração “Dneasy Tissue Kit” (Qiagen, Chatsworth, CA), conforme instruções do fabricante. Os materiais obtidos da extração foram testados para presença de DNA, específico de *E. canis*, através de um protocolo de PCR em tempo real utilizando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores:

Dsb-321 (5' –TTGCAAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA – 3'),

Dsb-671 (5' – GCTGCTCCACCAATAAATGTATCYCCTA – 3')

A sonda TaqMan (5' – AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA-3'), 5' FAM/BHQ – 1 3'), específica para a espécie *E. canis*, foi usada como marcador, conforme previamente padronizado por Doyle et al. (2005).

A reação foi realizada em placas de 96 poços submetidas a variações térmicas correspondentes a um ciclo inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, conforme descrito 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).

3.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (realizada somente para células infectadas com E. canis)

Amostras das culturas de células embrionárias-simile de *R. sanguineus* infectadas com *E. canis* e não infectadas (controle) foram fixadas em solução de Karnovsky, em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 durante 2 horas. Em seguida foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, durante 1 hora. Após lavagem no mesmo tampão, foram imersas em solução de acetato de uranila 0,5% com sacarose 13,3%, mantendo a 4 °C por 24 horas. A desidratação foi feita em série etanólica. Após passagem em óxido de propileno seguiu-se infiltração com mistura 1:1 de óxido de propileno com resina Epon durante 2-3 horas. As suspensões celulares foram transferidas para cápsulas BEEM com resina pura e centrifugadas a 900 x g por 5 minutos. Após substituição da resina e nova centrifugação para sedimentar as células, as cápsulas foram levadas à estufa a 60°C para polimerização, durante 2 a 3 dias.

Cortes ultrafinos (60-70 nm) coletados sobre grades de cobre foram contrastados com solução aquosa de acetato de uranila 2% por 10 minutos e com citrato de chumbo por 3 a 5 minutos (REYNOLDS, 1963). Em seguida foram examinados ao microscópio MET LEO 906E (Zeiss, Germany).

As imagens foram capturadas por câmara CCD MegaView III através do programa iTEM - Universal TEM Imaging Platform (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Germany), e salvas em extensão TIF.

3.4 Resultados

As culturas primárias de células embrionárias-simile de *R. sanguineus* não foram bons substratos para o crescimento de *L. infantum chagasi* e *T. cruzi*. Embora as células tenham sido infectadas apenas uma vez, os patógenos morreram poucos dias após a infecção.

As culturas infectadas por *E. canis*, por sua vez, mantiveram o agente por pelo menos 30-40 dias quando o meio de cultura foi suplementado por SFB Hyclone a 20%. A infecção foi confirmada pela PCR “Real Time” (Figura 3.1).

A morfologia celular não sofreu nenhuma modificação visível nas culturas (Figuras 3.2A e 2B), porém, nas lâminas coradas, foi possível visualizar a presença de mórulas de *E. canis* dentro das células infectadas (Figura 3.2D).

As culturas infectadas foram propagadas em novas garrafas depois de 30-40 dias, ou seja, logo após o resultado da primeira PCR em tempo real. Uma amostra das culturas com 60 dias da primeira infecção bem como uma das propagadas (após 30 dias de infecção por propagação), quando submetidas à PCR em tempo real, deram resultado negativo para ambas as amostras. A quantidade de DNA presente em cada uma delas foi de 370 ng/μl e 47 ng/μl, respectivamente.

Quando uma nova infecção foi realizada nas células, dessa vez utilizando suplementação do SFB Hyclone de 10%, o resultado foi positivo pela PCR em tempo real.

As PCRs foram realizadas após 30 e 45 dias de infecção, e após 40 dias de uma das culturas infectadas por propagação.

Na microscopia eletrônica de transmissão, realizada com culturas de células sem infecção (Figura 3.3) e de cultura originalmente infectada depois de 60 dias (2ª. infecção) e de uma das culturas infectadas por propagação (propagação realizada com 45 dias), foi possível observar a presença do patógeno dentro das células de *R. sanguineus* (Figura 3.4).

Figura 3.1 - Resultado da PCR em tempo real realizada em amostras de culturas de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus* infectadas com *Ehrlichia canis*, 30 dias após infecção.

A-B, culturas de células infectadas; C-D, controle negativo; E-F, controle positivo.

Figura 3.2 - Microscopia óptica de células embrionárias-simile de *Rhipicephalus sanguineus*, sem infecção (controle) e com infecção por *Ehrlichia canis*.

2A. Cultura sem infecção, barra 5 μm . 2B. Cultura com infecção, barra 5 μm . 2C. Esfregaço de cultura sem infecção, corado com Panótico Rápido, barra 10 μm . 2D. Esfregaço de cultura com infecção, corado com Panótico Rápido, barra 10 μm , as setas brancas indicam as mórulas formadas por *E. canis*.

Figura 3.3 - Microscopia eletrônica de transmissão de culturas de células embrionárias-simile de *Rhipicephalus sanguineus* (5^a. colheita).

A) Célula aumentada mostrando núcleo e citoplasma íntegros, as setas indicam mitocôndrias, barra 5 μm . B) Núcleo em destaque (seta), barra 1 μm . C) Células em menor aumento evidenciando a presença de muitos vacúolos, barra 5 μm . D) Vacúolos e mitocôndrias em evidência (setas), barra 1 μm .

Figura 3.4 - Microscopia eletrônica de transmissão de culturas de células embrionárias-simile de *Rhipicephalus sanguineus* (5^a. colheita), infectadas com *Ehrlichia canis*.

A) Vacúolo em intensa atividade de digestão (seta), barra 0,5 μm . B) Mórula formada por corpúsculos de *E. canis* indicados pelas setas, barra 1 μm . C) Corpúsculos de *E. canis* evidenciados pelas setas, barra 0,5 μm . D) Vacúolos evidenciando intensa atividade de digestão (setas), barra 0,5 μm .

3.5 Discussão

A espécie *R. sanguineus* é um carrapato importante na transmissão de patógenos que infectam cães em várias regiões do mundo, embora existam duas linhagens sob o nome “*R. sanguineus*” (NAVA et al., 2012). Os protozoários *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis*, e as bactérias *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* e *Rickettsia rickettsi*, são os bioagentes mais frequentes nessa espécie de carrapato (DANTAS-TORRES, 2008a).

As linhagens de células de carrapatos, em outras regiões do mundo, têm sido utilizadas como ferramentas para o crescimento de microrganismos, não necessariamente transmitidos por carrapatos (BELL-SAKYI et al., 2004; LAWRIE et al., 2004; PUDNEY, 1987). Esses autores, também relataram cultivo de alguns arbovírus nas linhagens celulares desses artrópodes. Um exemplo disso é o isolamento de cepas não-cultivadas de *Rickettsia felis*, na linhagem ISE6 obtida de células embrionárias de *Ixodes scapularis* (PORNWIROON et al., 2006). Esta riquetsia que tem como vetor natural a pulga que comumente parasita gatos e cães. A bactéria também foi isolada de pulgas no Brasil, em linhagem celular de mosquito (HORTA et al., 2006).

Dessa maneira, no presente estudo, as culturas de células embrionárias-simile de *R. sanguineus* (origem tropical) foram utilizadas para testar sua eficiência como substrato no crescimento de dois protozoários que são transmitidos por insetos, *L. infantum chagasi* e *T. cruzi*, e de uma bactéria, *E. canis* certamente transmitida por esse carrapato.

As células de *R. sanguineus* não foram eficientes em manter e propagar as cepas de *L. infantum chagasi* e de *T. cruzi* testadas. Os protozoários morreram após alguns dias de infecção. Portanto o carrapato *R. sanguineus* pode não ter nenhuma participação na transmissão desses dois bioagentes ou é pouco importante como vetor. No entanto, somente após a repetição das infecções nos cultivos celulares, seria possível confirmar que não há possibilidade desses patógenos infectarem as células de *R. sanguineus*.

O vetor natural de *T. cruzi* são insetos triatomíneos, conhecidos popularmente como “barbeiro”. Segundo Pinto Dias et al. (2005), os carrapatos *R. sanguineus* podem adquirir a infecção quando são alimentados em cães infectados naturalmente por *T. cruzi*. Entretanto, Falavigna-Guilherme et al. (2004) comentaram que não existem evidências comprovando o desenvolvimento e a transmissão das fases infectantes desse protozoário para outros cães saudáveis.

Apesar do inseto flebotomino (*Lutzomyia longipalpis*) ser o principal vetor na maioria das áreas endêmicas de leishmaniose, a suspeita de participação de *R. sanguineus* na

transmissão desse protozoário se deve ao fato de que, em determinadas áreas de alguns países, o inseto se apresenta com baixos níveis de infecção natural. Na Colômbia foi encontrado um nível de infecção nos mosquitos de 0,29-0,9% (CORREDOR et al., 1989; FERRO et al., 1995). Na Venezuela a taxa de infecção nos flebotominos varia de 0,28% (FELICIANGELI et al., 1999) e no Brasil a taxa de infecção é de 0,2-0,5% (SHERLOCK, 1999), com exceção de Santarém. Nesta cidade, Lainson et al. (1985) encontraram mosquitos infectados numa porcentagem alta (7,1%). Existem alguns relatos de infecção experimental de *L. infantum chagasi* em animais e carrapatos *R. sanguineus*. No entanto, é questionável se os carrapatos são vetores de fato, ou se são epidemiologicamente importantes na transmissão de desse patógeno. Hamsters experimentalmente infectados (intraperitoneal ou por via oral) com macerados de carrapatos que se alimentaram em cães infectados por *L. infantum chagasi*, adquiriram a infecção (COUTINHO et al., 2005). Estes autores encontraram uma taxa de 15,4% de carrapatos naturalmente infectados, por técnicas moleculares. Os macerados de carrapatos infectaram 41,2% dos hamsters inoculados e a PCR reforçou essa positividade. A presença do DNA de *L. infantum chagasi* em carrapatos procedentes de áreas endêmicas de leishmaniose também foi observada por Trotta et al. (2012). Apesar das controvérsias sobre a importância do carrapato na transmissão, Dantas-Torres, Latrofa e Otranto (2011) observaram que 4 fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*, infectadas artificialmente por inóculo via hemocele da coxa I (suspensão de 1×10^6 células por mL), foram capazes de transmitir o agente para os ovos e larvas.

Em relação à ehrlichiose canina, no final do ano de 1960, durante a Guerra do Vietnã, essa doença, causada por *E. canis*, ganhou destaque por ter provocado a morte de cerca de 200 cães pertencentes ao exército americano (GROVES et al., 1975; WALKER et al., 1970). A maioria das infecções nos cães é relatada nos períodos de primavera e verão, que coincidem com o pico da população de carrapatos nos Estados Unidos (COMER et al., 1999; EISEN; EISEN; LANE, 2002; ENG; HARKESS; FISHBEIN, 1988). No Brasil e em outros países sulamericanos, a competência vetorial da ehrlichiose canina parece depender da linhagem de *R. sanguineus* (MORAES-FILHO, 2013). Populações deste carrapato da região sudeste do Brasil (origem tropical) foram suscetíveis à infecção, enquanto que as populações do Rio Grande do Sul, bem como da Argentina e Uruguai (origem temperada) foram refratárias à infecção por essa bactéria.

Em relação ao cultivo *in vitro* de *E. canis*, trata-se de uma bactéria difícil de ser isolada (WALKER, 2000). Cultivos contínuos desse patógeno foram realizados em linhagens

de células derivadas de alguns carrapatos, em especial, em células de *I. scapularis* (MUNDERLOH et al., 1994). A bactéria foi propagada com sucesso na linhagem ID8 (também de *I. scapularis*) (EWING et al., 1995) e na linhagem IRE/CTVM18 (de *Ixodes ricinus*) (BELL-SAKYI et al., 2007). As células infectadas da linhagem ID8 permaneceram com potencial de infecção, causando ehrliquiose clínica em cães. No entanto, Ewing et al. (1995) relataram que a linhagem de células oriundas do seu vetor natural *R. sanguineus* não se infectou nos experimentos *in vitro*, diferindo dos resultados encontrados no presente estudo. Recentemente Bell-Sakyi, 2014 (comunicação pessoal)² relatou que linhagens de outras espécies carrapatos podem manter a infecção e confirmou que apenas uma linhagem de *R. sanguineus* foi capaz de se infectar com a bactéria. No presente estudo, quando as culturas infectadas foram mantidas com soro fetal bovino na concentração de 20%, a infecção desapareceu depois de 60 dias, porque nessa concentração o soro estimula o crescimento celular (KURTTI; MUNDERLOH; SAMISH, 1982). O patógeno, por sua vez, cresce lentamente e leva de 2 a 6 semanas para ser detectado (DUMLER et al., 2007), e não consegue se replicar nas células com a mesma rapidez. Uma vez, reduzindo a concentração do soro para 10%, as culturas de células de *R. sanguineus* de origem tropical, infectadas por *E. canis*, não só mantiveram o patógeno por pelo menos 60 dias, nas infecções originais e nas propagações subsequentes, como também continuam infectadas.

Dessa forma, nossos achados corroboram com os resultados encontrados por Moraes-Filho (2013), em relação à competência vetorial da linhagem tropical de *R. sanguineus*. Possivelmente as linhagens celulares de *R. sanguineus* testadas por Ewing et al. (1995) e por Bell-Sakyi, 2014 (comunicação pessoal) para infecção por *E. canis*, não sejam suscetíveis, já que carrapatos de algumas regiões da França e Espanha são de origem temperada (NAVA et al., 2012).

² Informação fornecida por Bell-Sakyi no Internacional Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens (TTP-8) em agosto de 2014

3.6 Conclusões

- Culturas de células de *R. sanguineus* de origem tropical, infectadas com *L. infantum chagasi* e *T. cruzi* não foram bons substratos para crescimento e manutenção desses protozoários.
- As culturas de células de *R. sanguineus* de origem tropical, infectadas com *E. canis*, não mantêm a infecção após 60 dias, quando o meio é suplementado com SFB enriquecido com ferro, na concentração de 20%.
- A concentração de SFB enriquecido com ferro, durante a manutenção das células de *R. sanguineus* de origem tropical, infectadas com *E. canis*, deve ser de 10% para manter a infecção e o crescimento celular em equilíbrio.
- As culturas de células de *R. sanguineus* de origem tropical, suplementada com SFB enriquecido com ferro, na concentração de 10%, foram eficientes como substrato para o crescimento de *E. canis*.
- Culturas de células de *R. sanguineus* de origem tropical, infectadas com *E. canis* puderam ser propagadas em novos cultivos e mantiveram a infecção.

4. CONCLUSÕES GERAIS

- A idade ideal para a viabilidade de cultivos primário de células a partir de ovos embrionados de *R. sanguineus* é de 14 dias.
- A concentração ideal de SFB (soro fetal bovino) para viabilizar os cultivos primários de células, a partir de ovos embrionados de *R. sanguineus*, foi de 20%, pelo menos em culturas livres de patógenos.
- A confluência celular total na garrafa de 25cm², não foi suficiente para manutenção das células. Foi necessário respeitar o intervalo de 30 dias entre as propagações, para viabilizar as culturas de células de *R. sanguineus*, e de 60 dias da primeira para a segunda propagação.
- A recuperação das células de *R. sanguineus*, após a criopreservação, somente foi viável a partir da 3ª. propagação, ou seja, em culturas com cerca de 150 dias a contar do início do cultivo.
- Culturas de células de *R. sanguineus* de origem tropical, infectadas com *L. infantum chagasi* e *T. cruzi* não foram bons substratos para crescimento e manutenção desses protozoários.
- As culturas de células de *R. sanguineus* de origem tropical, infectadas com *E. canis*, não mantém a infecção após 60 dias, quando o meio é suplementado com SFB enriquecido com ferro, na concentração de 20%.
- A concentração de SFB enriquecido com ferro, durante a manutenção das células de *R. sanguineus* de origem tropical, infectadas com *E. canis*, deve ser de 10% para manter a infecção e o crescimento celular em equilíbrio.
- As culturas de células de *R. sanguineus* de origem tropical, suplementada com SFB enriquecido com ferro, na concentração de 10%, foram eficientes como substrato para o crescimento de *E. canis*.
- Culturas de células de *R. sanguineus* de origem tropical, infectadas com *E. canis* puderam ser propagadas em novos cultivos e mantiveram a infecção.

REFERÊNCIAS³

- ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; FELTRIN, A. F. C.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E. M.; STUCCHI, R. S. B.; SILVA, L. J. Brazilian Spotted Fever: a case series from an endemic área in Southeastern Brazil – Clinical Aspects. **Ann. NY. Acad. Sci.**, v. 1078, p. 252-254, 2006.
- BANETH, G. Tick-borne infections of animals and humans: a common ground. **Int. J. Parasitol.**, v. 44, n. 9, p. 591-596, 2014.
- BARBIERI, A. M.; VENZAL, J. M.; MARCILI, A.; ALMEIDA, A. P.; GONZÁLEZ, E. M.; LABRUNA, M. B. *Borrelia burgdorferi sensu lato* infecting ticks of the *Ixodes ricinus* complex in Uruguay: first report for the Southern Hemisphere. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 13, n. 3, p. 147-153, 2013.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; RAMIREZ, D. G.; LANDULFO, G. A.; FACCINI, J. L. H.; DANTAS-TORRES, F.; LABRUNA, M. B.; VENZAL, J. M.; ONOFRIO, V. C. Immature argasid ticks: diagnosis and keys for Neotropical region. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 4, p. 443-456, 2013.
- BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; GUGLIELMONE, A. A.; CÁCERES, A. G.; GUZMÁN-CORNEJO, C. M.; LEÓN, R.; DURDEN, L. A.; FACCINI, J. L. H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC. Evol. Biol.** v. 13, p. 26-36, 2013.
- BELL-SAKYI, L. Continuous cell lines from the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Journal of Parasitology**, v. 7, n. 6, p. 1006-1008, 1991.
- BELL-SAKYI, L. *Ehrlichia ruminantium* grows in cell lines from four ixodid tick genera. **J. Comp. Pathol**, v. 130, p. 285-293, 2004.
- BELL-SAKYI, L.; ZWEYGARTH, E.; BLOUIN, F. E.; GOULD, A. E.; JONGEJAN, F. Ticks cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. **Trends in Parasitology**, vol. 23, n. 9, p. 450-457, 2007.
- BHAT, U. K. M.; YUNKER, C. E. Establishment and characterization of a diploid cell line from tick *Dermacentor parumapertus* Neumann (Acarina: Ixodidae). **Journal of Parasitology**, v. 63, n. 6, p. 1092-1098, 1977.
- BLACK, W. C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard- and- soft tick taxa (Acari:Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 91, p. 10034-10038, 1994.
- BURLINI, L.; TEIXEIRA, K. R.; SZABÓ, M. P.; FAMADAS, K. M. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with

³ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

samples throughout the world: is there a geographical pattern? **Exp. Appl. Acarol.**, v. 50, p. 361-374, 2010.

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. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 8, p. 259-262, 2004.

CIRELLI-MORAES, A.; MENDONÇA, R. Z.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; BARROS-BATTESTI, D. M. Células embrionárias de *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) como substrato para crescimento de isolamento de patógenos. In: XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Rickettsia, 2012.

COMER, J. A.; NICHOLSON, W. L.; OLSON, J. G.; CHILDS, J. E. Serologic testing for human granulocytic ehrlichiosis at a national referral center. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 558-564, 1999.

CORREDOR, A.; GALLEGU, J. F.; TESH, R. B.; MORALES, A.; CARRASQUILA, C. F.; KREUTZER, R. D.; BOSHELL, J.; PALAU, M. T., CACERES, E.; PELAEZ, D. Epidemiology of visceral leishmaniose in Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 40, p. 408-486, 1989.

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

DAGNONE, A. S.; DE MORAES, H. S.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.117, n. 4, p.285-290, 2003.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Vet. Parasitol.**, v. 149, p. 139-146, 2007.

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

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, p. 25, 2008b.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasit. Vectors**, v. 3, p. 26, 2010a.

DANTAS-TORRES, F.; MARTINS, T. F.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, L. A.; LIMA, B. S.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. **Exp. Parasitol.**, v. 125, p. 184-185, 2010b.

DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M. S.; OTRANTO, D. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasit. Vectors**, v. 4, p. 56, 2011.

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, p. 1-17, 2013.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y. W.; CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C.; BLOCH, K. C.; LI, P.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W. Detection of medically important Ehrlichia by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the dsb gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, p. 504-510, 2005.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; 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. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

DUMLER, J. S.; MADIGAN, J. E.; PUSTERIA, N.; BAKKEN, J. S. Ehrlichioses in Human: Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v.45, p.45-51, 2007.

EISEN, L.; EISEN, R. J.; LANE, R. S. Seasonal activity patterns of Ixodes pacificus nymphs in relation to climatic conditions. **Med. Vet. Entomol.**, v.16, p.235-244, 2002.

ENG, T. R.; HARKESS, J. R.; FISHBEIN, D. B. Epidemiologic, clinical, and laboratory finding of human ehrlichiosis in the United States, 1988. **JAMA**, v. 264, p. 2251-2258, 1990.

EWING, S. A.; MUNDERLOH, U. G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; KURTTI, T. J. Ehrlichia canis in tick cell culture. **Proceedings of the 76th Conference of Research Workers in Animal Diseases**, Chicago, USA, 13 to 14 November 1995.

ESTEVEZ, E.; LARA, F. A.; LORENZINI, D. M.; COSTA, G. H. N.; FUKUZAWA, A. H.; PRESSINOTTI, L. N.; SILVA, J. R. M. C.; FERRO, J. A.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; DAFFRE, S. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, n. 38, p. 568-580, 2008.

FALAVIGNA-GUILHERME, A. L.; SANTANA, R.; PAVANELLI, G. C.; LOROSA, E. S.; ARAÚJO, S. M. Triatomine infestation and vector-borne transmission of Chagas disease in northwest and central Parana, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, n. 5, p. 1191-1200, 2004.

FELICIANGELI, M. D.; RODRIGUEZ, N.; DE GUGLIELMO, Z.; RODRIGUEZ, A. The re-emergence of American visceral leishmanioses in an old focus in Venezuela II. **Vectors and Parasites**, v. 6, p. 113-120, 1999.

FERRO, C.; MORRISON, A. C.; TORRES, M.; PRADO, R.; WILSON, M. L.; TESH, R. B. Age structure, blood-feeding behavior, and *Leishmania chagasi* infection in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, p. 618-625, 1995.

FRANCISCATO, C.; LOPES, S. T. A.; TEIXEIRA, M. M. G.; MONTEIRO, S. G.; GARMATZ, B. C.; PAIM, C. B. Cão naturalmente infectado por *Trypanosoma evansi* em Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, p. 288-291, 2007.

GALVÃO, M. A. M. **Febre maculosa em Minas Gerais**: um estudo sobre a distribuição da doença no Estado e o seu comportamento em área de foco Peri-urbano. 1996. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

GROVES, M. G.; DENNIS, G. L.; AMYX, H. L.; HUXSOLL, D. L. Transmission of Ehrlichia canis to dogs by ticks (Rhipicephalus sanguineus). **Am. J. Vet. Res.**, v. 36, p. 937-940, 1975.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PENA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. **Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical zoogeographical region**. Houten, Holanda, ICTTD-2, 2003. 173 p.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; ESTRADA-PENA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 40, n. 2, p. 83-100, 2006.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PENA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v. 2528, p. 1-28, 2010.

HERRERA, L.; D'ANDREA, P. S.; XAVIER, S. C.; MANGIA, R. H.; FERNANDES, O.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 99, p. 379-388, 2005.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; DURIGON, E. L.; SCHUMAKER, T. T. S. Isolation of *Rickettsia felis* in the mosquito cell line C6/36. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1705-1707, 2006.

IVANOVA, L. B.; TOMOVA, A.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MURÚA, R.; MORENO, C. X.; HERNÁNDEZ, C.; CABELLO, J.; CABELLO, C.; DANIELS, T. J.; GODFREY, H. P.; CABELLO, F. C. *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 1069-1080, 2014.

KESSLER, R. H.; GOMES, A.; CAPIBARIBE, P. R.; SILVA, D.; SCHENK, M. A. M. Estabelecimento de cultura *in vitro* de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus*. **Embrapa Gado de Corte, Mato Grosso do Sul**, v. 54, p. 1-4, 1999.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; SAMISH, M. Effect of medium supplements on tick cells in culture. **J. Parasitol.**, v. 68, n. 5, p. 930-935, 1982.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; SAMISH, M. Tick tissue and cell culture in vector research. **Adv.Dis.Vector Res.**, v. 5, p.87-109, 1988.

LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região Neotropical. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. (Ed.). **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. p. 155-164.

LABRUNA, M. B.; SANFILIPPO, L. F.; DEMETRIO, C.; MENEZES, A. C.; PINTER, A.; GUGLIELMONE, A. A.; SILVEIRA, L. F. Ticks collected on birds in the state of São Paulo Brazil. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 43, n. 2, p. 147-160, 2007.

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156-166, 2009.

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

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

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. **Bull. Am. Mus. Nat. History**, v. 163, p.127-520, 1979.

LEVIN, M. L.; STUDER, E.; KILLMASTER, L.; ZEMTSOVA, G.; MUMCUOGLU, K. Y. Crossbreeding between different geographical population of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Exp. Appl. Acarol**, v. 58, p. 51-68, 2012.

LORUSSO, V.; GRUSZKA, K. A.; MAJEKODUNMI, A.; IGWEH, A.; WELBURN, S.; PICOZZI, K. *Rickettsia africae* in *Amblyomma variegatum* ticks, Uganda and Nigeria [letter]. **Emerg. Infect. Dis.** Disponível em :<<http://doi:10.3201/eid1910.130389>>, 2013.

LUCHEIS, S. B.; SILVA, A. V.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P.; LANGONI, H.; MEIRA, D. A.; MACHADO, J. M. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas disease living in Botucatu town and surrounding region, São Paulo State, Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 11, n.4, p. 492-509, 2005.

MANS, B. J.; KLERK, D.; PIENAAR, R.; LATIF, A. A. *Nuttalliella namaqua*: A living Fossil and Closest Relative to the Ancestral Tick Lineage: Implications for the Evolution of Blood-Feeding in Ticks. **Plos one**, v.6, n.8, p. 1-11, 2011.

MARCILI, A.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; JUNQUEIRA, A. C. V.; SILVA, F. M.; PINTO, A. Y. N.; NAIFF, R. D.; CAMPANER, M.; COURA, J. R.; CAMARGO, E. P.; MILES, M. A.; TEIXEIRA, M. M. G. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages

TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 615-623, 2009.

McQUISTON, J. H.; McCALL, C. L.; NICHOLSON, W. L. Ehrlichiosis and related infections. **JAVMA**, v.223, n.12, p. 1750-1756, 2003.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.

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

MAURER, H. R. Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture. In: FRESHNEY, R. **Animal cell culture: a practical approach**. Oxford:IRL, 1986. Cap 2, p.13-30.

MAYWALD, P. G.; MACHADO, M. I.; COSTA-CRUZ, J. M.; GONÇALVES-PIRES, M. Leishmaniose tegumentar, visceral e doença de Chagas caninas em municípios do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.12, p. 321-328, 1996.

MEDEIROS, A. P.; DE SOUZA, A. P.; DE MOURA, A. B.; LAVINA, M. S.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari:Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 926-930, 2011.

MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; LABRUNA, M. B. Ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America: molecular evidence for the presence of two species. **Acta Tropical**, v. 117, n. 1, p. 51-55, 2011.

MORAES-FILHO, J. **Competência vetorial de carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* no Brasil, Argentina e uruguaí para transmissão da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina**. 2013. 59f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAÚJO, R. B.; SANTOS, M.; PASSOS, L. M. F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arq Brás. Med. Vet. Zootec.**, v. 25, n. 2, p. 141-147, 2003.

MUNDERLOH, U. G.; YAN, L.; WANG, M.; CHEN, C.; KURTTI, T. J. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. **The Journal of Parasitology**, v. 80, n. 4, p. 533-543, 1994.

NAVA, S.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, M. A.; LABRUNA, M. B. Description of a new argasid tick (Acari: Ixodida) from bat caves in Brazilian Amazon. **J. Parasitol.**, v. 96, n. 6, p. 1089-1101, 2010.

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. **Vet. Parasitol.**, v. 190, p. 547-555, 2012.

NAVA, S; LABRUNA, M. B; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) 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* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae) **Ticks Born. Dis.**, v. 5, n. 3, p. 252-276, 2014.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L. J; LEITE, R. C.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsia* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, n. 2, p. 148-155, 2010.

PASSOS, L. M. F. *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in tick cell lines: a review. **Ver. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 21, n. 2, p. 81-86, 2012.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals New York Academy Sciences**, v. 1078, p. 523-529, 2006.

PINTO DIAS, J. C.; SCHOFIELD, C. J.; MACHADO, E. M.; FERNANDES, A. J. Ticks, ivermectin, and experimental Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, p. 829-832, 2005.

PORNWIROON, W.; POURCIAU, S. S.; FOIL, L. D.; MACALUSO, K. R. *Rickettsia felis* from cat fleas: isolation and culture in a tick-derived cell line. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 8, p. 5589-5595, 2006.

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.

PUDNEY, M. Tick cell lines for the isolation and assay of arboviruses. In *Arboviruses in Arthropod Cells in Vitro*. (Vol. 1) (Yunker, C.E., ed.), **CRC. Press**, p. 87-101, 1987.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell. Biol.**, v. 17, n. 1, p. 208-212, 1963.

RODRIGUES, B. D.; MEIRELES, V. M. B.; BRAZ, M. N. Borreliose de Lyme-simile – Relato de caso. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 3, p. 63-67, 2007.

SAVANI, E. S. M. M.; NUNES, V. L.; GALATI, E. A.; CASTILHO, T. M.; ARAUJO, F. S.; ILHA, I. M.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N.; FLOETER-WINTER, L. M. Occurrence of co-infection by *Leishmania*(*Leishmania*) *chagasi* and *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 739-741, 2005.

SHERLOCK, L. A. Ecological interations of visceral leishmaniasis in the state of Bahia. Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 671-683, 1999.

SIMSER, J. A.; PALMER A. T.; MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Isolation of a spotted fever group rickettsia, *Rickettsia peacockii*, in a Rock Mountain wook tick, *Dermacentor andersoni*, cell line. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 546-552, 2001.

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

TROTTA, M., NICETTO, M., FOGLIAZZA, A., MONTARSI, F., CALDIN, M., FURLANELLO, T., SOLANO GALLEGGO, L. Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, and *rickettsiae* in ticks removed from dogs living in Italy. **Ticks Tick Borne Dis.**, v. 3, p. 294-297, 2012.

VARMA, M. G. R.; PUDNEY, M.; LEAKE, C. J. The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) and their infection with some arboviruses. **Journal of Medical Entomology**, v. 11, n. 6, p. 698-706, 1975.

VARMA, M. G. R. Progress in the study of human and animal pathogens in primary and established tick cell lines, pp. 119-128. In: MITSUHASHI, J. (Ed.). **Invertebrate Cell System Applications**. II Boca Raton. CRC Press Inc, 1989. p. 119-128.

WALKER, J. S.; RUNDQUIST, J. D.; TAYLOR, R.; WILSON, B. L.; AMDREWS, M. R.; BARCK. J.; HOGGE, A. L. JR.; HUXSOLL, D. L.; HIDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M. Clinical and clinic pathologic findings in tropical canine pancytopenia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 157, p. 43-55, 1970.

WALKER, D. H. The task force on consensus approach for ehrlichiosis. Diagnosis human ehrlichioses: current status and recommendations. **Am. Soc. Microbiol. News**, v.66, n. 5, p. 287-290, 2000.

WEYER, F. Explanation experiments on lice in connection with *Rickettsia* culture. **Zentralblatt Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten**, v. 159, p. 13-22, 1952.

YOSHINARI, N. H.; ABRÃO, M. G.; BONOLDI, V. L.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; SCOLFIELD, A.; MASSARD, C. L.; DA FONSECA, A. H.; Coexistence of antibodies to tick-borne agents of Babesiosis and Lyme Borrelioses in patients from Cotia country, State of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.98, n.3, p.311-318, 2003.

YUNKER, C. E.; CORY, J.; MEIBOS, H. Continuous cell lines from embryonic tissues of ticks (Acari: Ixodidae). **In Vitro**, v. 17, n. 2, p. 139-142, 1981.

YUNKER, C. E. Preparation and maintenance of arthropod cell cultures: Acari, with emphasis on ticks. In:_____. **Arbovirus arthropod cells in vitro**. II Boca Raton. CRC Press Inc, 1987. p. 35-51.