ANGELINA CIRELLI MORAES

**Estabelecimento e caracterização de células embrionárias de *Amblyomma sculptum*
Berlese (Acari: Ixodidae).**

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

São Paulo
2015

ANGELINA CIRELLI MORAES

**Estabelecimento e caracterização de células embrionárias de *Amblyomma sculptum*
Berlese (Acari: Ixodidae).**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dr^a Darci Moraes Barros- Battesti

Versão Corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP(BDTD)

São Paulo
2015

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

Moraes, Angelina Cirelli.

Estabelecimento e caracterização de células embrionárias de *Amblyomma sculptum* Berlese (Acari: Ixodidae) / Angelina Cirelli Moraes. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Darci Moraes Barros Battesti.

Tese (Doutorado) – 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: Establishment and characterization of embryonic cells of *Amblyomma sculptum* Berlese (Acari: Ixodidae).

1. *Amblyomma sculptum* 2. Cultura de células 3. Células embrionárias 4. Linhagem celular 5. Biomarcadores 6. 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/SBIB0112/2015

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

Candidato(a): Angelina Cirelli Moraes

Título da Tese: Estabelecimento e caracterização de células embrionárias de
Amblyomma sculptum Berlese (Acari: Ixodidae).

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

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

() **Aprovado (a)**

() **Reprovado (a)**

Examinador (a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Cultura de células embrionárias de carrapatos (Acari: Ixodidae, Argasidae) para isolamento e cultivo de patógenos", protocolo nº 441/07, sob a responsabilidade de Darci Moraes Barros Battesti, Clarice Pinto Máximo Espíndola e Ronaldo Zucatelli, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 12/12/2007.

São Paulo, 13 de dezembro de 2007.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Dedico esta Tese a minha família, em especial às minhas netinhas, Giovanna e Carolina por serem a razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Darci Moraes Barros Battesti, por ter sido a pessoa que me deu a oportunidade de realizar um sonho, acalentado por muitos anos, ou seja fazer pesquisa. Agradeço pela aposta e pela confiança no meu trabalho e também por todos os momentos que compartilhamos. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, pela valorosa colaboração na realização dos experimentos de Citometria de Fluxo, Microscopia de Varredura e o Teste de Tumorigênese. Agradeço também pelo dispêndio de seu precioso tempo em me ensinar a interpretar todos os resultados.

A Prof^a Dr^a Irina Kerkis, pela colaboração nos experimentos com Microscopia Confocal e também pelos ensinamentos que ela me concedeu.

Ao Prof. Dr. Arlei Marcili pela realização dos experimentos de infecção por *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* e *Leishmania infantum chagasi*. A Prof^a Dr^a Fernanda Aparecida Nieri Bastos, pela realização dos experimentos de infecção com *Rickettsia* spp.

Ao Dr. João Fabio Soares, pela realização dos experimentos de confirmação celular (PCR e sequenciamento).

A Dr^a Sylvia Carneiro pela colaboração nos experimentos de Microscopia Eletrônica de Transmissão, assim como pelo auxílio na interpretação das imagens.

Ao pesquisador Ronaldo Zucatelli Mendonça, pela importante colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pesquisadores Lesley Bell-Sakyi, Timothy J Kurti e Ulrike G Munderloh pela atenção e informações dadas por eles nos congressos e também pela internet.

A minha querida amiga e colega de trabalho, Daniella Aparecida Franze, pela amizade e ajuda no extenuante trabalho de cultivo celular e também nos estudos das disciplinas que fizemos juntas.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia/Entomologia e LECZ: Valeria, Juliana, Diego, Gabriel, Maria Cristina, Fernando, Jairo, Leidiane, Thayse, Gabrielle, Livia, Thamara, Simone, pela amizade e pela presteza em me atender sempre que precisei deles.

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

A FAPESP – Projeto Nº 2007/ 57749-2, CNPq, Atena Biotecnologia e Supply Lab, pelo apoio financeiro.

"As pessoas crescem através da experiência, se elas enfrentam a vida honesta e corajosamente.
É assim que o caráter é construído."

Eleanor Roosevelt

RESUMO

MORAES, A. C. **Estabelecimento e caracterização de células embrionárias de *Amblyomma sculptum* Berlese (Acari:Ixodidae)**. 2015. 106 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Cultura *in vitro* de células de carrapatos, é uma ferramenta importante, para isolar e estudar os agentes causais de doenças transmissíveis. A espécie *Amblyomma sculptum* é o principal vetor da *Rickettsia rickettsii*, o agente da febre maculosa humana. O objetivo do presente estudo foi estabelecer e caracterizar as células deste carrapato e mostrar o seu potencial uso como substrato para o crescimento e isolamento de patógenos. As culturas primárias, que resultaram no estabelecimento da linhagem IBU/ASE-16, foram obtidas das massas de ovos de *A. sculptum* e preparadas em meio L-15B, sendo os cultivos mantidos à 30 °C. Quando as culturas atingiram a confluência necessária foram feitos os subcultivos, e após a quarta passagem iniciou-se a criopreservação. A recuperação das células criopreservadas foi bem sucedida, obtendo-se assim o estabelecimento da linhagem IBU/ASE-16. A identidade celular foi confirmada por meio de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e sequenciamento gênico. Experimentos com inoculação de patógenos como: *Rickettsia* spp, *Trypanosoma theileri* e *Leishmania infantum chagasi*, mostraram que a linhagem celular IBU/ASE-16, tem grande potencial como substrato para o crescimento destes microorganismos, bem como para estudos de interação parasita-hospedeiro. A expressão de biomarcadores de células-tronco, diferenciação e maturação das células da linhagem IBU/ASE-16, foi analisada por citometria de fluxo utilizando-se de marcadores de proliferação, pontos de checagem, reguladores do ciclo celular e morte celular. O potencial elétrico mitocondrial mostrou atividade funcional das mitocôndrias, como também a ausência de células inativas e com DNA fragmentado. A caracterização celular por microscopia confocal, realizada com o microscópio confocal de varredura (CLSM- Confocal Laser Scanning Microscope), permitiu a localização tridimensional de estruturas celulares e moléculas marcadas com fluorocromos. Na microscopia eletrônica de varredura da linhagem IBU/ASE-16, foi possível observar células em monocamada, em divisão, conexões e junções intercelulares, formação de matriz extracelular e a formação de redes neuronais. Foi realizado também teste de tumorigênese em camundongos Balb/c^{nu/nu}, não resultando em crescimento de tumores.

Palavras-chave: *Amblyomma sculptum*. Cultura de células. Células embrionárias. Linhagem celular. Biomarcadores. Patógenos.

ABSTRACT

MORAES, A. C. **Establishment and characterization of embryonic cells of *Amblyomma sculptum* Berlese (Acari: Ixodidae).** 2015.106 p.

Ph. D. (Biotechnology) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

In vitro culture of tick cells is an important tool to isolate and study causative agents of transmissible diseases. The species *Amblyomma sculptum* is the main vector for *Rickettsia rickettsii*, the causing agent of human spotted fever. The aim of the present study was to establish and characterize the cells of this tick and show their potential use as a substrate for growing and isolating pathogens. The primary cultures, which resulted in the establishment of the IBU/ASE-16 lineage, were obtained from *A. sculptum* egg masses prepared in L-15B medium and maintained at 30°C. When cultures reached the necessary confluence, subcultures were made, and after the fourth passage, cryopreservation began. The recovery of cryopreserved cells was successful and the IBU/ASE-6 lineage was established. The cellular identity was confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and gene sequencing. Experiments with inoculation of pathogens such as *Rickettsia* spp, *Trypanosoma theileri infantum* and *Leishmania chagasi* showed that the IBU/ASE-16 has great potential as a substrate for the growth of these microorganisms as well as for host-parasite interaction studies. The expression of stem cell biomarkers, differentiation and maturation of cells of the IBU/ASE-16 lineage was analyzed by flow cytometry using proliferation markers, checkpoints, cell cycle and cell death regulators. The mitochondrial electric potential showed functional activity of mitochondria, as well as the absence of inactive cells with fragmented DNA. Cell characterization using confocal microscopy, performed with the scanning confocal microscope (Confocal Laser CLSM- Scanning Microscope), allowed the three-dimensional location of cellular structures and molecules marked with fluorochromes. The scanning electron microscopy of the IBU/ASE-16 lineage showed cells in monolayers, in division, intercellular connections and junctions, extracellular matrix and neuron network formations. A tumorigenesis test was performed on Balb/c^{nu/nu} mice resulting in no growth of tumors.

Keywords: *Amblyomma sculptum*. Cell culture. Embryonic cells. Cell line. Biomarkers. Pathogens.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cultivos primários de células de <i>A. sculptum</i>	49
Figura 2 - Culturas primárias de células embrionárias de <i>Amblyomma sculptum</i>	50
Figura 3 - Células embrionárias de <i>A. sculptum</i> com diferentes períodos de cultivo....	51
Figura 4 - Culturas de células embrionárias de <i>A. sculptum</i> após os descongelamentos.....	52
Figura 5 - Células de <i>A. sculptum</i> como substrato para crescimento de patógenos.....	53
Figura 6 - Células infectadas com <i>Trypanosoma (Megatrypanum) theileri</i>	54
Figura 7 - Células IBU/ASE-16 infectadas com <i>Leishmania infantum chagasi</i>	54
Figura 8 - Morfologia das populações das células IBU/ASE-16	56
Figura 9 - Determinação da capacidade proliferativa das células IBU/ASE-16, em citometria de fluxo pelo teste do CFSE	57
Figura 10 - Análises das fases do ciclo celular das células por citometria de fluxo	58
Figura 11 - Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) pelo fluorocromo Rodamina 123	59
Figura 12 - Marcadores de proliferação, reguladores da progressão do ciclo celular, apoptose e necrose celular.....	60
Figura 13 - Marcadores de células-tronco	61
Figura 14 - Células de <i>A. sculptum</i>	62
Figura 15 - Análise da expressão de Ndel nas IBU/ASE-16 indiferenciadas	63
Figura 15a - Análise da expressão de Ndel nas IBU/ASE-16 diferenciadas espontaneamente para células neurais.....	64
Figura 16 - Análise da expressão de ABCG2 nas IBU/ASE-16 indiferenciadas.....	65
Figura 17 - Análise da expressão de CD44 nas colônias de células IBU/ASE-16 indiferenciadas.....	66
Figura 18 - Análise da expressão de Nestin nas IBU/ASE-16 indiferenciadas	67
Figura 19 - Análise da expressão de beta-tubulina III nas IBU/ASE-16	68
Figura 20 - Análise da expressão de alfa-actinina nas IBU/ASE-16 diferenciadas espontaneamente para células musculares	69

Figura 21 - Análise da expressão de Titina nas IBU/ASE-16 diferenciadas espontaneamente para células musculares	70
Figura 22 - Análise da expressão de Oct-3/4 nas IBU/ASE-16 indiferenciadas.....	71
Figura 22a - Análise da expressão de Oct-3/4 nas IBU/ASE-16 indiferenciadas	72
Figura 23 - Análise da expressão de Integrina beta-I nas IBU/ASE-16 indiferenciadas	73
Figura 24 - Fotomicroscopia eletrônica de varredura de células embrionárias da linhagem IBU/ASE-16	74
Figura 24a - Fotomicroscopia eletrônica de varredura de células embrionárias da linhagem IBU/ASE-16.....	75
Figura 25 - Baço de camundongo Balb/c ^{nu/nu} , sem inoculação de células IBU/ASE-16 (controle)	76
Figura 26 - Teste de tumorigênese em camundongo Balb/c ^{nu/nu} , utilizando a linhagem celular IBU/ASE-16	77

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Espécies de riquetsias encontradas infectando carrapatos nas Américas ...	21
Quadro 2 - Ehrlichioses, protozoonoses, vetores e distribuição geográfica	24
Quadro 3 - Anticorpos e concentrações utilizadas para caracterização celular em microscopia confocal.....	42
Tabela 1 - Datas de criopreservação, recuperação e expansão das células de <i>A.sculptum</i>	52
Tabela 2 - Pesos médios $\pm$ DP dos camundongos controle e dos órgãos (em gramas). Média de comprimento do baço (em milímetros).....	76
Tabela 3 - Pesos médios $\pm$ DP dos camundongos e dos órgãos (em gramas). Média de comprimento do baço (em milímetros), obtidos após 120 dias de inoculação com células da linhagem IBU/ASE-16	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAE2	Linhagem celular do carrapato <i>Amblyomma americanum</i>
ABCG2	Proteína transportadora conservada, que catalisa o transporte de moléculas
ADP	Difosfato de Adenosina
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATP-sintase	Complexo protéico envolvido na produção de ATP
Bax	Proteína pró-apoptótica
Bak	Proteína pró-apoptótica
Bid	Proteína pró-apoptótica
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica
Bcl-XL	Proteína anti-apoptótica
BCRP1	Proteína de resistência ao câncer de mama
BME26	Linhagem celular do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
BOD	Demanda Bioquímica do Oxigênio
BSA	Soro de Albumina Bovina
CD117	Receptor de tirosina quinase expresso em células-tronco hematopoiéticas e em progenitores mielóides
CD4- like	Proteína que se expressa na superfície de algumas células T, macrófagos, monócitos e em células dendríticas
CD29	Sinônimo de Integrina Beta-1
CD 34	Glicoproteína que funciona como fator de adesão celular
CD44	Glicoproteína que é um receptor de para o ácido hialurônico e pode também interagir com o colágeno e com as MMPs (Matriz metaloproteinases)
CD 90	Ou Thy-1, marcador de células progenitoras multipotentes
CD133	Proteína transmembrana expressa em células-tronco hematopoiéticas, gliais, medula óssea, e células progenitoras endoteliais

CD105	Glicoproteína de membrana, expressa na superfície de células endoteliais, macrófagos ativados, fibroblastos e células músculo-esqueléticas
CDK4	Ciclina dependente de kinase
CDK6	Ciclina dependente de kinase
cDNA	DNA complementar
CEUAIB	Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto Butantan
CFSE	Carboxy- Fluorescein diacetate Succinimidyl Ester
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
SNC	Sistema Nervoso Central
DAPI	Corante azul fluorescente que cora DNA
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADH ₂	Dinucleotídeo de Flavina-Adenina
FITC	Fluorescein <u>isothiocyanate</u> – corante fluorescente
FL2-H	Intensidade de fluorescência
Flt-1 e Flk-1	fms-like tyrosine kinase-1 receptor
G0	Fase do ciclo celular em que as células estão quiescentes
G1	Fase do ciclo celular em que a célula cresce devido às sínteses protéicas
G2	Fase do ciclo celular, em que a célula continua crescendo e sintetizando substâncias
HAE CT VM 7	Linhagem celular do carrapato <i>Hyalomma anatolicum anatolicum</i>
HAE CT VM	Linhagem celular do carrapato <i>Hyalomma anatolicum anatolicum</i>
HAE CT VM 9	Linhagem celular estabelecida do carrapato <i>Hyalomma anatolicum anatolicum</i>
HAE CT VM 10	Linhagem celular estabelecida do carrapato <i>Hyalomma anatolicum anatolicum</i>

HAE CT VM 11	Linhagem celular estabelecida do carrapato <i>Hyalomma anatolicum anatolicum</i>
IBU	Instituto Butantan
IBU/ASE-16	Linhagem celular do carrapato <i>Amblyomma sculptum</i>
IDE8	Linhagem celular do carrapato <i>Ixodes scapularis</i>
kDa	Quiolodaltón
KDR/Flk- 1	Kinase insert domain-containing receptor
Ki-67	Meio LEIBOVITZ para cultura de células
LIT	Liver Infusion Tryptose
M	Fase do ciclo celular em que a célula se divide (Mitose)
mdm-2	Proteína inibidora de p53
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MSCs	Células-tronco Mesenquimais
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio
Nanog	Fator de transcrição de células-tronco embrionárias e germinativas pluripotentes
Ndel	Marcador de centróssoma de células nervosas e gliais.
Oct3/4	Fator de transcrição de células-tronco embrionárias e germinativas pluripotentes
p53	Proteína que atua na progressão do ciclo celular
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídio
PCR	Polymerase Chain Reaction
PS	Fosfatidilserina
RML-14	Linhagem celular do carrapato <i>Dermacentor variabilis</i>
RML-15	Linhagem celular do carrapato <i>Dermacentor variabilis</i>
RML-16	Linhagem celular do carrapato <i>Dermacentor variabilis</i>
RML-17	Linhagem celular do carrapato <i>Dermacentor variabilis</i>
RML-18	Linhagem celular do carrapato <i>Dermacentor variabilis</i>

RML-19	Linhagem celular do carrapato <i>Dermacentor variabilis</i>
RML-20	Linhagem celular do carrapato <i>Dermacentor variabilis</i>
RNase	Nuclease que catalisa a degradação do RNA em componentes menores
S	Fase do ciclo celular em que é duplicado o DNA
SBF	Soro Bovino Fetal
SF-900	Meio de cultura para células de insetos
SPG	Tampão sucrose-fosfato-glutamato
STRO-1	Proteína de superfície celular expressa em células-tronco
Taq DNA	Enzima termoestável com atividade polimerase
TBS	Solução salina tamponada em Tris (Tris-HCl 30 mM/NaCl 0,15 M, pH 8,1)
TC-100	Meio de cultura para células de insetos e outros animais
TTC-219	Linhagem celular do carrapato <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
TTC-243	Linhagem celular do carrapato <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
TTC-257	Linhagem celular do carrapato <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
VEGF-R1	Vascular endothelial growth fator receptor

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
%	Porcentagem
$\Delta\psi_{\text{m}}$	Potencial de membrana mitocondrial
μl	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Doenças associadas aos carrapatos	20
<i>1.1.1 Rickettsioses</i>	<i>20</i>
<i>1.1.2 Borrelioses</i>	<i>23</i>
<i>1.1.3 Ehrlichioses, protozoonoses</i>	<i>23</i>
1.2 Linhagens celulares de carrapatos: histórico, importância e aplicabilidade...	26
<i>1.2.1 Histórico</i>	<i>26</i>
<i>1.2.2 Importância e Aplicabilidade</i>	<i>27</i>
1.3 Caracterização celular por Citometria de Fluxo e por Microscopia de Confocal - uso de marcadores	29
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	31
3.1 Específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Obtenção das massas de ovos	32
4.2 Análise de diferentes meios de cultura	32
4.3 Avaliação da idade ideal dos ovos de <i>A. sculptum</i> para obtenção de culturas primárias	33
4.4 Manutenção das culturas primárias	34
4.5 Confirmação da identidade celular	34
4.6 Criopreservação e recuperação das culturas	34
4.7 Eficiência da cultura de células como substrato para cultivo de Microrganismos	35
<i>4.7.1 Bactérias (<i>Borrelia</i> e <i>Rickettsia</i>)</i>	<i>35</i>
<i>4.7.2 Protozoários</i>	<i>36</i>
4.8 Caracterização celular por Citometria de Fluxo	36
<i>4.8.1 Análise da morfologia e das populações</i>	<i>37</i>

4.8.2 Determinação da capacidade proliferativa em citometria de fluxo pelo teste do CSFE	37
4.8.3 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo	37
4.8.4 Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	38
4.8.5 Marcadores de proliferação, reguladores da progressão do ciclo celular, apoptose e necrose celular	39
4.8.6 Marcadores de células-tronco.....	40
4.9 Caracterização celular por microscopia confocal	42
4.9.1 Marcadores usados para a caracterização por microscopia confocal	43
4.10 Caracterização celular por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Varredura (MEV)	47
4.11 Teste de tumorigênese.....	48
4.12 Análises estatísticas	48
5 RESULTADOS.....	49
5.1 Eficiência do meio L-15B	49
5.2 Avaliação da idade Ideal dos ovos	49
5.3 Culturas primárias e confirmação da identidade celular.....	50
5.3.1 Criopreservação e descongelamento das células	50
5.4 Eficiência das células de linhagem IBU/ASE-16 como substrato para cultivo de microrganismos	53
5.4.1 Microscopia de transmissão	54
5.5 Caracterização celular por Citometria de Fluxo.....	55
5.5.1 Análise da morfologia e das populações	55
5.5.2 Determinação da capacidade proliferativa em citometria de fluxo pelo teste do CFSE.....	55
5.5.3 Análises das fases do ciclo celular das células por citometria de fluxo	55
5.5.4 Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) pelo fluorocromo Rodamina 123	56
5.5.5 Marcadores de proliferação, reguladores da progressão do ciclo celular, apoptose e necrose celular	59
5.5.6 Marcadores de células-tronco	60
5.6 Caracterização celular por microscopia confocal	63

5.7 Caracterização celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	73
5.8 Teste de tumorigênese	75
6 DISCUSSÃO	78
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
8 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

No mundo são conhecidas aproximadamente 900 espécies de carrapatos classificadas em 3 famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (GUGLIELMONE et al., 2010; GUGLIELMONE; NAVA, 2014). As duas primeiras possuem ampla distribuição geográfica enquanto que a última está restrita ao continente africano, (MANS et al., 2011).

Na região Neotropical ocorrem cerca de 200 espécies de carrapatos que, juntamente com seus hospedeiros, constituem grande proporção da biodiversidade total. No Brasil, são 22 carrapatos argasídeos e 45 ixodídeos, totalizando 67, mas esse número deve ser aumentado, porque novas espécies estão sendo descritas (BARROS-BATTESTI et al., 2015; DANTAS-TORRES et al., 2012).

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos de diversos vertebrados, inclusive do homem, sendo responsáveis pela transmissão de agentes causadores de zoonoses. Infestações em animais domésticos podem ocasionar grandes perdas econômicas na pecuária, especialmente em decorrência da transmissão de agentes patogênicos e diminuição da produção animal, além do comprometimento da qualidade do couro (GUGLIELMONE et al., 2003, 2006).

Algumas espécies podem representar risco real ou potencial na transmissão de agentes patogênicos. As principais zoonoses transmitidas por carrapatos são rickettsioses, borrelioses, ehrlichioses e protozoonoses.

As rickettsioses estão principalmente associadas ao gênero *Amblyomma*, enquanto que as borrelioses estão mais associadas ao gênero *Ixodes* e aos argasídeos do gênero *Ornithodoros*. As ehrlichioses e protozoonoses são transmitidas, em sua maioria, pelo gênero *Rhipicephalus*.

1.1 Doenças associadas aos carrapatos

1.1.1 *Rickettsioses*

A *Rickettsia rickettsii* é o agente causador da Febre Maculosa nas Américas. Várias outras riquetsias encontradas infectando carrapatos no continente americano podem ser observadas no Quadro 1. A maioria delas pertence ao grupo da Febre Maculosa com exceção de *R. belli* (LABRUNA, 2009; NIERI-BASTOS, 2012).

Quadro 1 - Espécies de riquetsias encontradas infectando carrapatos nas Américas.

Rickettsia	Espécies de Carrapato	Localidades	Referências
<i>R. rickettsii</i>	<i>Amblyomma sculptum</i> Berlese (<i>citado como Amblyomma cajennense</i>) <i>Amblyomma aureolatum</i> (Pallas) <i>Amblyomma longirostre</i> Koch <i>Ixodes loricatus</i> Neumann <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille) <i>Amblyomma americanum</i> (Linnaeus) <i>Amblyomma imitator</i> Kohls <i>Dermacentor andersoni</i> (Stiles) <i>Dermacentor variabilis</i> (Say) <i>Dermacentor nitens</i> Neumann <i>Haemaphysalis leporispalustris</i> (Packard)	Brasil, México, USA, Panamá, Costa Rica, Colombia, Argentina	Labruna e Machado (2006), Oliveira et al. (2010), Labruna et al. (2011a), Ogrzewalska et al. (2012), Nava (2013), Parola et al. (2013), Almeida et al. (2013) Szabó et al. (2013) Martins et al. (2014)
<i>R. parkeri</i>	<i>Amblyomma maculatum</i> Koch <i>Amblyomma triste</i> Koch <i>Amblyomma tigrinum</i> Koch <i>Amblyomma ovale</i> Koch <i>Amblyomma calcaratum</i> Neumann <i>Amblyomma dubitatum</i> Neumann <i>A. ovale</i>	Brasil, Bolívia, Argentina, Uruguai, USA Brasil	Padock et al. (2004), Labruna e Machado (2006), Tomassone et al. (2010), Szabó et al. (2013), Parola et al. (2013), Nava (2013) Ogrzewalska et al. (2013), Grasperge et al. (2014), Monge et al. (2014), Martins e Martins (2014) Labruna e Machado (2006), Szabó et al. (2013), Ogrzewalska et al. (2013), Almeida et al. (2013)
<i>R. parkeri</i> -like			
<i>R. rhipicephali</i>	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i> Cooley	Brasil	Labruna (2009), Labruna et al. (2011a)
<i>R. bellii</i>	<i>A. dubitatum</i> <i>A. aureolatum</i> <i>Amblyomma incisum</i> Neumann <i>A. ovale</i> <i>Amblyomma oblongoguttatum</i> Koch <i>Amblyomma rotundatum</i> Koch <i>Amblyomma humerale</i> Koch <i>Amblyomma scalpturatum</i> Neumann <i>Amblyomma neumanni</i> Ribaga <i>Amblyomma nodosum</i> Neumann <i>H. juxtakochi</i> <i>I. loricatus</i> <i>Amblyomma varium</i> Koch	Brasil, Peru, Argentina	Labruna (2009), Tomassone et al. (2010), Labruna et al. (2011a), Ogrzewalska et al. (2012), Almeida et al. (2013), Martins e Martins (2014), Sakai et al. (2014)

<i>R. amblyommii</i>	<i>A. sculptum</i> (citado como <i>A. cajennense</i>), <i>Amblyomma coelebs</i> Neumann, <i>A. longirostre</i> <i>A. neumanni</i> <i>Amblyomma auricularium</i> (Conil)	Argentina, Brasil, Panamá, Guiana Francesa, Costa Rica	Labruna et al. (2011a), Saraiva et al. (2013)
<i>R. massiliae</i>	<i>R. sanguineus</i>	Argentina USA	Labruna (2009), Beeler et al. (2011), Nava (2013)
<i>Cadidatus</i> “ <i>R. andeanae</i> ”	<i>Ixodes boliviensis</i> Neumann, <i>A. maculatum</i> , <i>A. triste</i> <i>Amblyomma parvum</i> Aragão	Peru, Chile, Brasil, Argentina, USA	Blair et al. (2004); Pacheco et al. (2006); Abarca et al. (2012); Nieri-Bastos et al. (2014), Ferrari et al. (2013)
<i>R. monteiroi</i>	<i>A. incisum</i>	Brasil	Pacheco et al. (2011)
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>A. incisum</i> <i>A. dubitatum</i> <i>I. boliviensis</i>	Brasil, Costa Rica Argentina	Pacheco et al. (2011), Martins e Martins (2014), Matias et al. (2015), Monge et al. (2015).

O principal gênero de carrapato envolvido na transmissão é *Amblyomma*, embora outros gêneros também possam participar dos ciclos de transmissão (LABRUNA, 2009; PACHECO et al., 2011; PINTER; LABRUNA, 2006). As espécies de carrapatos *A. sculptum* (citado como *A. cajennense*)¹ e *A. aureolatum* são comprovadamente os principais vetores de *R. rickettsii* na região metropolitana de São Paulo (LABRUNA, 2009; PINTER; LABRUNA, 2006) e em outras áreas do sudeste brasileiro. A espécie *A. dubitatum* parece relacionada com o ciclo enzoótico da Febre Maculosa Brasileira (SAKAI et al., 2014). Segundo estes autores, embora *A. dubitatum* possa, naturalmente, estar infectada com *R. bellii*, isto não a impede de adquirir e transmitir *R. rickettsii* para cobaias em condições laboratoriais. Uma riquetsiose mais branda causada por *R. parkeri* ocorre no estado de Santa Catarina (MEDEIROS et al., 2011) e o carrapato envolvido na transmissão é *A. aureolatum*.

¹ A espécie *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888, juntamente com *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, foram durante muitos anos, sinônimas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). Porém, recentemente, estudos morfológicos e moleculares de populações de *A. sculptum* na América do Sul (BEATI et al., 2013; NAVA et al., 2014) demonstraram que existe um complexo de espécies sob este táxon, o qual foi desmembrado em 6 espécies: *A. cajennense* “sensu strictu” distribui-se na região Amazônica, ocorrendo até o Estado do Mato Grosso (Martins, 2014), enquanto que a *A. sculptum* ocorre desde as áreas úmidas do norte da Argentina, áreas adjacentes da Bolívia e Paraguai, bem como na região costeira e centro-oeste brasileiro. A espécie *A. mixtum* está presente desde o Texas ao oeste do Equador, e as três espécies novas, *Amblyomma patinoi* Labruna, Nava & Beati, *Amblyomma tonelliae* Nava, Beati & Labruna, 2014 e *Amblyomma interandinum* Beati, Nava & Cáceres, 2014 (Nava et al., 2014), ocorrem, respectivamente, no leste da cordilheira da Colômbia, áreas secas da região do Chaco estendendo-se desde o centro-norte argentino à Bolívia e Paraguai, e na parte norte do vale interandino do Perú.

Outras espécies como *A. triste* e *A. ovale* (SABATINI et al., 2010; VENZAL et al., 2004, 2008), também são vetores para esta riquettsiose.

1.1.2 Borrelioses

As borrelioses são enfermidades infecciosas determinadas por espiroquetas intracelulares do gênero *Borrelia*, transmitidas principalmente por argasídeos e piolhos (HOOSTRAAL, 1985). Exceção ocorre com a *Borrelia burgdorferi*, agente etiológico da Doença de Lyme no hemisfério norte, transmitido por carrapatos do gênero *Ixodes*, especialmente aquelas espécies do complexo “*Ixodes ricinus*” (STEERE, 1994). No Brasil, em áreas com casos humanos, foi detectada uma enfermidade com entidade nosológica desconhecida, denominada de Doença de Lyme símile ou Síndrome Baggio-Yoshinari, mas o agente etiológico nunca foi isolado. (FONSECA et al., 2005; MANTOVANI et al., 2007, 2012; YOSHINARI et al., 1999). No hemisfério sul, a presença de borrelíias do grupo “*B. burgdorferi*” foi confirmada recentemente no Uruguai (BARBIERI et al., 2013), no Chile (IVANOVA et al., 2014) e Argentina (NAVA et al., 2014), infectando carrapatos do gênero *Ixodes*.

1.1.3 Ehrlichioses, protozoonoses

Apesar das ehrlichioses e protozoonoses estarem associadas principalmente aos membros da subfamília Rhipicephalinae, elas também podem ser transmitidas por outros gêneros como demonstrado no (Quadro 2). Embora os casos humanos não tenham sido confirmados molecularmente, nos Estados Unidos a ehrlichiose humana parece ser causada por *E. chaffeensis* e *E. ewingii* (DUMLER et al., 2001) e os vetores envolvidos são *Amblyomma americanum* (Linnaeus) e *Ixodes scapularis* Say. Na Ásia e Europa os vetores são *Ixodes persulcatus* Schulze e *Ixodes ricinus* (Linnaeus), respectivamente (DUMLER et al., 2007). No Brasil os raros casos relatados foram apenas por suspeitas clínicas e pesquisa sorológica (CALIC et al., 2004; LABRUNA et al., 2007).

Quadro 2- Ehrlichioses, protozoonoses, vetores e distribuição geográfica

Patógeno	Espécie de carrapato	Localidade e Referência	
<i>E. canis</i>	<i>R. sanguineus</i>	América Latina, Brasil	Labruna e Machado (2006), Aguiar et al. (2007), Vieira et al. (2011)
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	<i>Amblyomma variegatum</i> (Fabricius) <i>Amblyomma</i>	Continente Africano, Caribe, Brasil	Labruna e Machado (2006) Vieira et al. (2011)
<i>Anaplasma marginale</i>	<i>R. microplus</i>	Neotrópico Filipinas	Labruna e Machado (2006), Ybañes et al. (2013)
<i>Babesia bovis</i> , <i>Babesia bigemina</i> <i>Babesia divergens</i> <i>Babesia microti</i>	<i>R. microplus</i> <i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i>	Cosmopolita Europa, América do Norte	Labruna e Machado (2006), Heekin et al. (2013) Labruna e Machado (2006) Wójcik - Flata et al. (2009)
<i>Babesia canis</i>	<i>R. sanguineus</i> , <i>Amblyomma</i> sp. <i>Dermacentor</i> spp., <i>Ixodes</i> spp., <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Vários países do Neotrópico Norte de Portugal	Labruna e Machado (2006), Cardoso et al. (2010)
<i>Theileria equi</i>	<i>Hyalomma</i> sp., <i>Dermacentor</i> sp. <i>Rhipicephalus</i> sp.	Países do Velho Mundo e Neotrópico	Souza et al. (2000), Labruna e Machado (2006), Mealey et al. (2012)

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 o carrapato de maior repercussão na clínica

de pequenos animais. No Brasil há duas “linhagens” de *R. sanguineus*, sendo uma temperada (que abrange o estado do Rio Grande do Sul, Argentina, Uruguai, Chile e Itália) e outra tropical que ocorre no restante do país, norte da Argentina, Paraguai, Colômbia, África do Sul, Moçambique (BURLINI et al., 2010; LEVIN et al., 2012; MORAES-FILHO et al., 2011; SZABÓ et al., 2005). Entretanto, parece que, até o momento, apenas a linhagem tropical está envolvida na transmissão das ehrlichioses (MORAES-FILHO, 2013). No caso dos bovinos, a espécie de carrapato envolvida na transmissão é *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini), porém a bactéria é *Anaplasma bovis* que anteriormente era citada como *Ehrlichia bovis*. Ambas as espécies de *Rhipicephalus* apresentam especificidade parasitária com cães e bovinos, respectivamente, porém, eventualmente podem picar humanos.

Com relação às protozoonoses, mais de 100 espécies de protozoários do gênero *Babesia* já foram relatadas em animais, porém, a babesiose humana é considerada uma doença zoonótica emergente (LABRUNA; MACHADO, 2006).

O primeiro caso de babesiose humana foi identificado na Croácia (SKRABALO; DEANOVIC, 1957). Em 1968, a espécie *B. divergens* foi relatada como agente causador da doença na Europa. Casos humanos foram notificados na Ásia, África do Sul e no continente americano, causados por outras espécies de babesias (KIM et al., 2007; MARATHE et al., 2005). Vannier et al. (2008) nos Estados Unidos e Senanayake et al. (2012) na Austrália registraram a *B. microti* em humanos.

A presença de *B. bovis* em humanos, também já foi noticiada na Colômbia e em Cuba (HERNÁNDEZ et al. 1997). Alecrim et al. (1983), descreveram a doença em um paciente com suspeita clínica de malária benigna, em Pernambuco. Quando o sangue foi analisado, os autores observaram a presença de protozoários do gênero *Babesia*, sendo esse o primeiro relato registrado no Brasil. A co-infecção entre babesia e doença de Lyme símile foi demonstrada pela detecção de anticorpos contra *B. burgdorferi* e altos títulos de anticorpos IgM contra *B. bovis* (YOSHINARI et al., 2003).

Nos animais, Smith e Kilborne (1983) relataram pela primeira vez a doença em bovinos nos Estados Unidos, citando *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Say) (citado como *B. annulatus*) como vetor.

A espécie *Theileria equi* é o agente etiológico da piroplasmose equina, também conhecida como babesiose equina ou nutaliose (LABRUNA; MACHADO, 2006).

Essa doença, acomete os equinos de forma endêmica no Brasil e em diversos outros países tropicais e subtropicais, sendo considerada uma das mais importantes doenças de equinos, causando danos à saúde animal e consideráveis perdas econômicas (BALDANI et al., 2011). Infecções agudas resultam em queda no desempenho físico e reprodutivo dos acarretando prejuízos a proprietários e treinadores.

No velho Mundo a *T. equi* é transmitida por carrapatos dos gêneros *Hyalomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus*, enquanto que no neotrópico o vetor é o *R. microplus*. No entanto, há evidências epidemiológicas para um possível papel de *A. sculptum* (citado como *A. cajennense*) como vetor de *T. equi* no Estado de São Paulo (LABRUNA; MACHADO, 2006).

1.2 Linhagens celulares de carrapatos: histórico, importância e aplicabilidade

1.2.1 Histórico

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 & Fanzago. A duração do cultivo foi de apenas oito dias. Outras culturas celulares de diferentes espécies de carrapatos foram obtidas posteriormente, como: *Hyalomma dromedarii* Koch, *Hyalomma anatolicum excavatum* Koch, *R. sanguineus*, *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, *Dermacentor marginatus* (Sulzer), *Dermacentor reticulatus* (Fabricius) (= *Dermacentor pictus*), *D. andersoni*, *R. annulatus* (citado como *Boophilus annulatus*), *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *decoloratus* (Koch) (citado como *Boophilus decoloratus*), *R. microplus* (citado como *Boophilus microplus*) e *I. ricinus* (PUDNEY et al., 1973). Subcultivos de células embrionárias de *Hyalomma asiaticum asiaticum* Schulze & Schlottke foram obtidos até a décima passagem (MEDVEDEVA et al., 1972). Pudney et al. (1973) subcultivaram células embrionárias de *R. microplus* até a vigésima passagem, porém, segundo os autores, após a última, as células atingiram o estágio de senescência.

Apesar dos consideráveis avanços desde os primeiros trabalhos até o início dos anos 70, o sucesso do cultivo de células de carrapatos *in vitro* se limitava às culturas primárias. Varma et al. (1975) estabeleceram as três primeiras culturas de células de linhagem de carrapatos (TTC-219, TTC-243 e TTC-257), cultivadas a partir de *R. appendiculatus*. Bhat e Yunker (1977) estabeleceram a linhagem RML-14, utilizando

células embrionárias de *Dermacentor parumapertus* Neumann. Quatro anos depois, seis novas linhagens de *D. variabilis* e de *D. parumapertus* (RML-15, RML-16, RML-17, RML-18, RML-19 e RML-20) foram estabelecidas por Yunker et al. (1981). Após uma década, 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) descreveram um método que permitia a viabilidade celular mesmo após o congelamento e descongelamento das células. Assim, foram estabelecidas novas linhagens utilizando células embrionárias de *I. scapularis*, sendo a IDE8 a mais conhecida. Outras linhagens, incluindo células de algumas espécies de argasídeos já estão estabelecidas (BEL-SAKYI et al., 2009; MATTILA et al., 2007).

Entre 2001 e 2009, houve um aumento significativo no estabelecimento de linhagens com 39 linhagens de diferentes espécies de carrapatos estabelecidas e outras em fase de estabelecimento. Muitas linhagens anteriormente estabelecidas estão depositadas em Pirbright, Surrey (Reino Unido), no banco denominado “Biobank” (<http://www.pirbright.ac.uk/research/Tickcell/Default.aspx>). Até a presente data este banco possui 35 linhagens estabelecidas de carrapatos duros e 4 linhagens de carrapatos moles. 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 do biobank, tem sido de responsabilidade técnica de Lesley Bell-Sakyi, que foi a idealizadora do banco celular.

Quando se compara o número de linhagens celulares de insetos, (mais de 500) de aproximadamente 120 espécies diferentes, (GAW et al., 1959; GRACE 1962; YEH et al., 2007), é grande o contraste com o número de linhagens celulares de carrapatos disponíveis.

1.2.2 Importância e Aplicabilidade

Muitos microrganismos transmitidos por carrapatos não crescem em meios de cultura artificiais. Mesmo em células primárias, algum sucesso foi obtido no cultivo de vírus e bactérias do gênero *Rickettsia* (REHÁCEK, 1971, 1972; YUNKER, 1971). Mas a partir do estabelecimento das primeiras linhagens, as culturas de células dos diferentes órgãos e tecidos de carrapatos foram efetivamente utilizadas para o

isolamento de vários microrganismos, tais como arbovírus (LEAKE et al., 1980; VARMA et al., 1975; YUNKER et al., 1981); clamídias (SHATKIN et al., 1977); protozoários (BHAT et al., 1979), micoplasmas (TULLY et al., 1981), borrelíias (KURTTI et al., 1993; OBONYO et al., 1999; VARELA et al., 2004), ehrlichias (MUNDERLOH et al., 1996), riquetsias (SIMSER et al., 2001) e anaplasmas (BLOUIN et al., 2002).

À exceção de *R. microplus* (México) e *R. sanguineus* (USA), que são espécies distribuídas em praticamente todos os continentes, as células de linhagem estabelecidas até o momento não são do neotrópico. Daí a importância de se obter o estabelecimento de células de linhagem de *A. sculptum* e de outras espécies neotropicais, uma vez que todas elas podem ser potencialmente vetores de microrganismos, alguns de alta letalidade como as riquetsias do grupo da Febre Maculosa.

Linhagens de células embrionárias de carrapatos têm sido estabelecidas com o propósito de servirem de substrato para o crescimento e isolamento de patógenos. Também são utilizadas para compreender as relações hospedeiro-vetor-patógeno, genômica, proteômica e manipulações genéticas, evidenciando, portanto, o grande potencial de suas aplicações. Ainda, as linhagens de células são ferramentas essenciais para o desenvolvimento e o aprimoramento de várias tecnologias tais como: expressão de proteínas de interesse; agentes vacinais; produção de antígenos e anticorpos; manutenção de microrganismos; *screening* seletivo de drogas e fármacos de uso humano e veterinário; genotipagem; detecção de biomarcadores e estudo de doenças neurológicas, neurodegenerativas e autoimunes, entre outras.

De maneira geral, os bioagentes são transmitidos através da saliva injetada no local da picada, que por sua vez, apresenta toxinas, substâncias anestésicas, analgésicas e anticoagulantes, estes últimos com aplicabilidade terapêutica. Após a construção da biblioteca de cDNA a partir de glândulas salivares de *A. sculptum* (citado como *A. cajennense*) (BATISTA et al., 2008), foi eleita uma proteína recombinante, denominada Amblyomin-X, que demonstrou além da capacidade anticoagulante, também uma ação antitumoral (SIMONS et al., 2011).

1.3 Caracterização celular por Citometria de Fluxo e por Microscopia de Confocal - uso de marcadores

Esteves et al. (2008) avaliaram células da linhagem BME26 de *R. microplus* como potenciais microbicidas e autofágicas, através de uma caracterização citológica por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Esses autores também relataram o uso de técnicas de biologia molecular para caracterização celular. A Citometria de Fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Permite a análise de vários parâmetros simultaneamente, sendo conhecida também por citometria de fluxo multiparamétrica. Através de um aparelho de detecção óptico-eletrônico, são possíveis análises de características físicas e/ou químicas de uma simples célula (SAELENS et al., 2004). O microscópio confocal de varredura a laser (CLSM - Confocal Laser Scanning Microscope) é uma ferramenta importante na pesquisa biológica, na análise química e de materiais, permitindo a localização tridimensional de estruturas e moléculas marcadas com fluorocromos nas células.

A caracterização por meio de marcadores de células-tronco e de diferenciação celular ainda não foi explorada para as células de carrapatos.

2 JUSTIFICATIVA

Uma vez a linhagem celular estabelecida a partir de células embrionárias de *A. sculptum* ela representou baixo custo, rapidez de resultados e redução no uso de animais de laboratório, o que vem de encontro às normas estabelecidas pelo Conselho de Ética em Experimentação Animal. Dessa forma a relevância do presente estudo foi obter a linhagem celular, caracterizar os tipos celulares e verificar a viabilidade celular como substrato para o crescimento *in vitro* de alguns agentes patogênicos. O isolamento e caracterização das células de *A. sculptum* por meio de marcadores de maturação e diferenciação de origem mesenquimal e embrionária, por Citometria de Fluxo e por microscopia confocal a laser, possibilitaram novos conhecimentos. Assim, o uso de biomarcadores pode revelar características celulares, bioquímicas e moleculares, pelas quais os processos fisiológicos e patológicos, podem ser reconhecidos ou monitorados.

3 OBJETIVOS

Geral: Estabelecer e caracterizar células embrionárias de carrapatos da espécie *Amblyomma sculptum*.

3.1Específicos:

- Obter cultivos primários de *A. sculptum* e estabelecer a linhagem celular;
- Confirmar a identidade celular por meio de PCR e sequenciamento gênico;
- Verificar se a linhagem celular estabelecida constitui-se em bom substrato para o cultivo de microrganismos;
- Caracterizar as células por meio de biomarcadores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das massas de ovos

Para a obtenção das massas de ovos, as fêmeas de *A. sculptum*, foram alimentadas em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) cedidos pelo Biotério Central do IBU, de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUAIB No. 441/07). Essa espécie de carrapato é procedente da colônia mantida no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, originária de Pirassununga, SP.

Após caírem naturalmente do hospedeiro, as fêmeas totalmente ingurgitadas, foram lavadas com água de torneira e com água destilada. Em uma capela de fluxo laminar horizontal, foram rapidamente lavadas em álcool 70% e hipoclorito a 1%, sendo em seguida mergulhadas em solução de cloreto de benzalcônio a 1% por quinze minutos, e em água destilada esterilizada contendo antibióticos por cinco minutos, adaptando-se a técnica utilizada por Kessler et al. (1999). Depois de secas em gaze esterilizadas, foram individualmente colocadas em placas de Petri estéreis e mantidas em estufa biológica com demanda de Oxigênio (BOD) a 27 °C e umidade de 80-85% para realizarem a postura.

4.2 Análise de diferentes meios de cultura

Considerando que os meios de cultura interferem de maneira significativa no crescimento celular, os cultivos foram realizados em diferentes meios (Leibovitz L-15, TC-100 e SF-900), sendo testado apenas para *A. sculptum*. Diferentes concentrações dos suplementos foram utilizadas para o enriquecimento dos meios de cultura, como caldo de Triptose Fosfato e Soro Fetal Bovino, respectivamente (2%, 5%, 10% e 5%, 10%, 20%). Os cultivos foram distribuídos em placas de cultura de 6 poços e mantidos em estufa à 30 °C.

Foi previamente selecionado o meio L-15B completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) para os cultivos celulares porque foi o que se mostrou mais adequado para o crescimento celular (CIRELLI-MORAES et al., 2010). Segue abaixo a composição do meio padronizado, o qual foi baseado em Munderloh e Kurtti (1989), com algumas modificações.

- L-15 com açúcares e aminoácidos, antibióticos e antimicótico
- L-Glutamina 2 mM

- Caldo de triptose fosfato 10%
- Lipoproteína 0,1%
- Solução Stock D 0,1%
- Solução de vitaminas 0,1%
- Soro fetal bovino 10%

4.3 Avaliação da idade ideal dos ovos de *A. sculptum* para obtenção de culturas primárias

As seguintes idades das massas de ovos postos pelas fêmeas foram analisadas: 12, 15, 18 e 21 dias. Também foram testadas massas de ovos com idade superior a 22 dias. O período que vai desde a oviposição do ovo até a eclosão da larva, para esta espécie, é de 30 dias. As massas de ovos, pesando 0,13 g cada uma, foram desinfetadas conforme protocolo proposto por Munderloh et al. (1994) e Bell-Sakyi (1991) com algumas modificações como segue:

- 10 minutos em cloreto de benzalcônio 1%
- Lavagem com água miliq autoclavada
- 10 minutos em álcool 70% filtrado
- Lavagem com água miliq autoclavada
- 15 minutos em solução de água miliq autoclavada com antibióticos e anfotericina B
- 5 minutos em hipoclorito de sódio 5%
- Três lavagens com água miliq autoclavada

Os ovos foram quebrados gentilmente em meio L-15 B completo suplementado com 10% de SBF. A suspensão celular foi centrifugada a 100 g por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 4 mL de meio L-15 B completo e 10% SBF (com 4 µl de penicilina/estreptomicina e 0,8 µl de anfotericina B) e colocado em garrafa de 25 cm², sendo então o cultivo incubado a 30 °C em estufa da marca Memmert (Celsius - 2007). Desse volume foram retirados 200 µl para a contagem de células em câmara de Neubauer. As células foram observadas diariamente, em microscópio de contraste de fase (Phase Contrast Microscopy) da marca Nikon, modelo Eclipse TS100, e o meio foi trocado semanalmente.

4.4 Manutenção das culturas primárias

Os subcultivos foram realizados de acordo com o crescimento celular e, a cada passagem, a quantidade de antibiótico utilizada foi diminuindo até sua completa ausência. Quando cerca de 90% do tapete celular foi confluyente, as células foram retiradas da garrafa através de raspagem com *cell scraper* (rodinho), sendo centrifugadas em tubo falcon com 6 mL de meio completo. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 8 mL de meio, o qual foi dividido em 2 garrafas, expandindo o crescimento celular. Quando o número de repiques foi expressivo, em torno de 4 passagens, as células começaram a ser criopreservadas.

4.5 Confirmação da identidade celular

A identidade das células foi confirmada por meio de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), com *primers* descritos por (BLACK; PIESMAN, 1994).

O DNA foi isolado usando a Puregene DNA Purification System (Gentra Systems, Minneapolis, MN) e ressuspensão em água Milli-Q. A PCR foi realizada com um volume de 50 microlitros usando 1,25 U Taq DNA polymerase, 10 x buffer, 0,2 mM dNTP mix, 1,5 mM MgCl₂, 0,25 mM primers e 1 microlitro de tampão. O termociclador foi programado como segue: temperatura inicial - 95 °C por 5 minutos (etapa de denaturação), 10 ciclos de 92 °C (1 minuto), 48 °C (1 minuto), 72 °C (1,5 minuto), 32 ciclos de 92 °C (1 minutos), 54 °C (35 s), 72 °C (1,5 minutos) e a extensão final de 72 °C por 7 minutos. Após a confirmação da positividade da amostra por PCR, o material amplificado foi purificado usando um QIAquick PCR Purification Kit. O material foi sequenciado no Genoma e as sequências dos fragmentos de DNA das células foram analisadas por Blast.

4.6 Criopreservação e recuperação das culturas

Uma alíquota da suspensão celular (corada com Azul de Tripan) foi utilizada para a contagem celular em câmara de Neubauer com a finalidade de calcular a concentração de células/mL a ser utilizada no processo de criopreservação, conforme protocolo proposto por Munderloh et al. (1994). Após a contagem celular (8×10^5

células/mL), a suspensão foi centrifugada a 100 g por 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em meio de cultura contendo 20% de Soro Fetal Bovino (SBF) e 10% de Dimetil Sulfoxido (DMSO), sendo então distribuído em tubos de criopreservação. Os criotubos foram mantidos por 4 horas à 4 °C em caixa de congelamento denominada “freezing container”, e em seguida permaneceram 24 horas em freezer -80 °C, e finalmente transferidos para os tambores de 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 com 10% de soro fetal. Após a centrifugação (100 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 a 30 °C.

4.7 Eficiência da cultura de células como substrato para cultivo de microorganismos

4.7.1 Bactérias (*Borrelia* e *Rickettsia*)

Amostras de sangue de pacientes suspeitos, colhidas em EDTA (sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético), foram cedidas pelo Laboratório de Doença de Lyme-símile, da disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O sangue desses pacientes foi inoculado nos cultivos primários de *A. sculptum* e as culturas foram mantidas nas mesmas condições já descritas. Além do sangue, os carrapatos alimentados artificialmente com sangue de pacientes suspeitos foram também testados.

A espécie *Borrelia burgdorferi* (cepa 39/40) foi igualmente testada, sendo inoculada nos cultivos primários de *A. sculptum* na concentração de aproximadamente 40.000/mL.

Alíquotas de 1 mL de *Rickettsia bellii* e *Rickettsia parkeri* foram inoculadas nos cultivos primários de *A. sculptum*. Após agitar lentamente por 1 hora, as culturas contendo L-15B + SFB 5% + riquetsias, foram mantidas à 28 °C.

A cada três dias os cultivos foram avaliados para medir o nível de infecção, através da coloração de Giménez (GIMÉNEZ, 1964). Para tanto, monocamadas de células que demonstraram infecção próxima a 100% foram raspadas, e a suspensão celular foi centrifugada. O sedimento foi ressuspensionado em tampão sucrose-fosfato-glutamato (SPG), pH 7.0, estéril, e congelado a -80 °C.

4.7.2 Protozoários

Duas espécies de tripanossomatídeos, *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* e *Leishmania infantum chagasi*, provenientes de culturas axênicas, mantidas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) e acrescidas de 10 % SFB, foram utilizadas para avaliar a infecção nos cultivos de *A. sculptum*. Para tanto, alíquotas de 10^9 parasitas de cada espécie (epimastigotas e promastigotas, respectivamente) foram inoculadas nas culturas celulares e estas foram incubadas na temperatura de 30 °C. A infecção na monocamada celular foi acompanhada por 30 dias.

4.8 Caracterização celular por Citometria de Fluxo

O citômetro de fluxo permite analisar até quatro marcações independentes na amostra. As características de potência de cada laser, voltagem dos detectores e de compensação entre vários lasers - de modo que uma amostra de células não marcadas não permita a presença de eventos positivos para nenhum tipo de fluorescência - são previamente definidas pela utilização de controles negativos e positivos para cada fluorocromo utilizado. As amostras marcadas e não marcadas com anticorpos específicos vão confirmando os eventos positivos para a fluorescência esperada em cada amostra testada.

As células, na sexta passagem de cultivo, foram retiradas da garrafa com 1 ml de tampão FACS e centrifugadas a 800 g por 10 minutos. O pellet foi ressuspendido e seis tubos para citômetro contendo 1 mL de suspensão celular cada foram preparados, adicionando-se outras substâncias conforme a seguir: Tubo 1: Ácool RNase – 2 mL; Tubo 2: Ácool RNase – 2 mL; Tubo3: Marcadores - Paraformaldeído 4% pH 7 – 2 mL; Tubo 4: Marcadores - Paraformaldeído 4% pH 7 – 2 mL; Tubo 5: Mitocôndria – Paraformaldeído 4% pH 7 – 2 mL; Tubo 6: Mitocôndria - Paraformaldeído 4% pH 7 – 2 mL. Os tubos foram vedados com parafilme, invertidos levemente por três vezes e guardados no -20 °C. Todo o procedimento foi realizado em gelo.

4.8.1 Análise da morfologia e das populações

Após o crescimento e expansão das culturas de células de *A. sculptum*, alíquotas foram recolhidas de células de sexta passagem, nos períodos entre 10 a 35 dias de cultivo. Em seguida foram analisadas por citometria de fluxo em relação ao volume (FSC-H) e a proporção de grânulos em seu citoplasma (SSC-H). Os resultados foram analisados no programa Cell-Quest e os *dots plots* analisados no programa WinMDI 2.9.

4.8.2 Determinação da capacidade proliferativa em citometria de fluxo pelo teste do CFSE

A atividade proliferativa das células de *A. sculptum*, foi avaliada através do ensaio de proliferação com o marcador carboxifluoresceína (CFSE - *Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl Ester* - Molecular Probes). Foi padronizado o protocolo para utilização deste marcador nas células para identificação da concentração ideal do CFSE. Este marcador, diluído em PBS 0,1% albumina humana em diferentes concentrações, foi adicionado ao meio com as células. O tempo de marcação foi de 10 minutos a 37 °C, homogeneizando a cada 3 minutos. A marcação foi interrompida adicionando cinco vezes o volume de meio L-15B 10% de SBF e incubando-se por 5 minutos em gelo e no escuro. As células foram, então, lavadas três vezes com 20 mL de meio L-15 B 10% de SBF e ressuspensas para a contagem. Uma alíquota foi separada para verificar a intensidade de marcação das células com CFSE, no dia da marcação (dia zero), em citômetro de fluxo. As aquisições foram analisadas pelo programa Wizard Proliferation.

4.8.3 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

As culturas de células de *A. sculptum* foram raspadas com "*cell scraper*," centrifugadas por 10 minutos a 900 g, o sobrenadante foi descartado e as células, ressuspensas em tampão para citometria (FACs Flow - BD). As células foram novamente centrifugadas durante 3 minutos a 1000 g e o sobrenadante, descartado. As células foram cuidadosamente ressuspensas em 1 mL de etanol 70% RNase, transferidas para microtubos e armazenadas a uma temperatura de -20 °C.

As células foram incubadas com solução de iodeto de Propídeo (1,8 mg/mL), para a avaliação da quantidade e da integridade do DNA nas fases do ciclo celular. A distribuição das fases do ciclo celular foi avaliada por citômetro de fluxo. Os resultados obtidos pelo programa de aquisição *Cell-Quest*, em média de 10.000 eventos adquirido no citômetro, foram analisados pelo software WinMDI 2.9, e o conteúdo de DNA medido em intensidade de fluorescência (FL2-H).

Os números foram expressos em porcentagem média de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular: DNA fragmentado - apoptose, G0/G1, S e G2/M.

As amostras de células, previamente fixadas, foram centrifugadas a 1000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 1 mL de tampão de citometria e centrifugadas novamente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em solução de PI, preparada a partir 5 mL de PBS ao qual foram adicionados 5 microlitros de triton 100 (0,01% v/v), 50 microlitros de RNase A (2 mg/mL) e 20 µl de iodeto de propídio (5 mg/mL).

Em seguida, a aquisição dos dados em Citômetro de Fluxo FACSCalibur foram obtidos em 10.000 eventos e, para análise, foi utilizado o programa WinMDI 2.9.

4.8.4 Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi utilizado o fluorocromo Rodamina 123 (Invitrogen, EUA). A mitocôndria é uma organela citoplasmática relacionada ao metabolismo energético. Na membrana mitocondrial interna, está localizada a cadeia transportadora de elétrons que produz energia a partir do fluxo de elétrons e consequente fosforilação oxidativa.

A Rodamina 123 é uma sonda fluorescente que é captada quando elétrons são doados para a cadeia respiratória. Quando o gradiente eletroquímico é formado, a Rodamina 123 é captada ocorrendo a diminuição da emissão de sua fluorescência. A Rodamina 123 permeia a membrana da mitocôndria e inibe processos de transporte, especialmente a cadeia transportadora de elétrons, retardando a respiração interna.

As células foram raspadas com "*cell scraper*" (rodinho), centrifugadas a 900 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, e adicionados 5 microlitros de Rodamina 123 (5 mg/mL). A seguir, as células foram incubadas em estufa a 37 °C por 30 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados; o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em 100 µl de solução tampão para

citometria, FACsFlow (BD). A análise da marcação com a Rodamina 123 nas células de *A. sculptum* foi realizada em Citômetro de Fluxo FACScalibur (BD) pela aquisição de 10.000 eventos. Os dados foram analisados pelo programa WinMDI 2.9.

4.8.5 Marcadores de proliferação, reguladores da progressão do ciclo celular, apoptose e necrose celular

- **Caspase -3 Fosforilada FL2-H** (Santa Cruz): cisteíno-protease aspartato executora; sinaliza para que ocorra a apoptose. Cliva substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos. Indica morte celular por apoptose (GRIVICICHI et al., 2007).
- **Ki-67** (Dako- clone DM1): antígeno nuclear expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 (PEÑA et al., 1998).
- **Ciclina-D1** (Santa Cruz): proteína reguladora das CDK's (quinases dependente de ciclinas), envolvidas na fase G1/S. A amplificação ou aumento da expressão altera a progressão do ciclo celular (COQUERET, 2003).
- **p53** (Santa Cruz): atua impedindo a progressão do ciclo celular na transição G1/S, na presença de danos à molécula de DNA (TRIEB; KOTZ, 2001).
- **BCL-2 anti-apoptótica** (Dako): é uma proteína repressora de morte por apoptose que participa ativamente da regulação da apoptose, pois previne a liberação de citocromo *c*. A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria. A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. A Bcl-2 (antiapoptótica) é superexpressa em adenomas e carcinomas colorretais.
- **PI-iodeto de propídio**: é um fluorocromo que se intercala estequiometricamente às duplas fitas de DNA. A fluorescência captada em FL-2 é proporcional ao conteúdo de DNA da célula. Em células 2n que se encontram nas fases G0/G1, e G2/M do ciclo celular, a emissão de sinais é menos intensa do que em células na fase S. As células situadas no pico hipodiplóide (Sub-G1) possuem conteúdo de DNA menor que 2n e podem

representar aumento na ocorrência de debris celulares e DNA fragmentado, eventos característicos de morte celular.

- **Anexina V (Assay Designs):** é destinada a detecção de apoptose em vários tipos celulares, pela dosagem de fosfatidilserina (PS). PS é predominantemente observada na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol. Nas células no início da apoptose, onde a membrana celular ainda permanece intacta, mas sofre uma desorganização, a PS é translocada para a superfície exterior da bicamada. O aparecimento de PS na superfície celular é reconhecido pelos fagócitos, que captam este sinal e removem a célula que sinalizou seu “suicídio” ao ambiente. AnexinaV é uma proteína que se liga a fosfolipídeos e possui alta afinidade por PS na presença íons de cálcio. Mudanças nesta assimetria da membrana, que é analisada através da medição da aderência de Anexina V à membrana celular, podem ser detectadas antes das alterações morfológicas associadas ao início da apoptose e antes da perda da integridade da membrana. Ao conjugar a Anexina V ao FITC (Isotiocianato de fluoresceína) é possível identificar e quantificar as células apoptóticas em citometria de fluxo.

As amostras de células previamente fixadas foram centrifugadas a 1000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspendidas em 1 mL de tampão de citometria e centrifugadas novamente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em solução de PI, preparada a partir 5 ml de PBS ao qual foram adicionados 5 µl de triton 100 (0,01% v/v), 50 µl de RNase (2 mg/mL) e 20 µl de iodeto de propídio (5 mg/mL). Em seguida, a aquisição dos dados em Citômetro de Fluxo FACSCalibur foram obtidos em 10.000 eventos e, para análise, foi utilizado o programa WinMdi 2.9.

4.8.6 Marcadores de células tronco

- **CD34** (R&D Systems): é uma molécula de adesão, sialomucina, expressa em células endoteliais e células progenitoras hematopoiéticas. Pode estar expressa em alguns tipos de tumor indicando potencial de angiogênese (BURNDEN et al., 2009).
- **VEGF-R1** (Santa Cruz): ou fator de crescimento endotelial vascular é uma proteína homodimérica, envolvida na angiogênese normal, tumoral

e metástase. Também estimula o recrutamento de células tronco (ERIKSSON; ALITALO; 2002; KAYA et al., 2002).

- **CD117** (Santa Cruz): ou c-Kit é um marcador de tirosina-quinase expresso em células tronco hematopoiéticas, em progenitores mielóides e tumores gastrointestinais (SARLOMO-RIKALA et al., 1998).
- **CD4-like** (BD- Biociences): o anticorpo CD4, uma molécula que se expressa na superfície de algumas células T, macrófagos, monócitos e na célula dendrítica.
- **CD90** (R&D Systems): tem mostrado interação com integrina, tirosinas quinases, fatores de crescimento e citocinas, promovendo eventos celulares como adesão, apoptose, proliferação e migração. Normalmente, o CD90 é utilizado como marcador de MSC, embora também seja expresso em células como neurônios, células endoteliais, células T e outros tipos celulares imunes e não imunes (BARKER, HAGOOD, 2009). Recentemente, o CD90 vem sendo utilizado como marcador de células progenitoras multipotentes, como as de medula óssea, tecido sinovial, âmnio, gordura e outros (MAFI et al., 2011).
- **CD133** (Santa Cruz): é uma proteína transmembrana, expressa em células tronco hematopoiéticas, gliais, de medula óssea e células progenitoras endoteliais (SHMELKOV et al., 2008).
- **STRO-1** (Santa Cruz): é o mais conhecido marcador de células tronco mesenquimais (MSC, *mesenchymal stem cells*).
- **OCT3/4 e Nanog** (Santa Cruz): determinantes em células tronco embrionárias e germinativas, são fatores de transcrição envolvidos na regulação da supressão de genes que levam à diferenciação e manutenção da pluripotência (SICLARI; QIN, 2010).
- **CD105** (Santa Cruz): é uma glicoproteína de membrana expressa na superfície de células endoteliais, macrófagos ativados, fibroblastos e células músculo- esqueléticas (SANZ-RODRIGUES et al., 2004).

As células foram fixadas em tampão FACSflow com paraformaldeído (2,5%) por 1 hora e as membranas permeabilizadas com Triton X-100 (0,1%), por 30 minutos a 4 °C. As suspensões celulares foram lavadas e resuspendidas em tampão FACS flow

e adicionado 1 µg do anticorpo primário específico para cada o marcador. Após 1 hora de incubação, as células foram centrifugadas 1500 rpm por 10 minutos, e adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (Alexa-Fluor® 488 – Invitrogen) e incubado por mais 1 hora à 4 °C protegidos da luz. Após a ligação específica dos anticorpos, as células foram lavadas e resuspensas em 200 µl de tampão FACSFlow. A aquisição da expressão do marcador foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur em canal de fluorescência FL2-H (PE).

4.9 Caracterização celular por microscopia confocal

O microscópio confocal de varredura a laser (CLSM - Confocal Laser Scanning Microscope) é uma ferramenta importante na pesquisa biológica, na análise química e de materiais, permitindo a localização tridimensional de estruturas e moléculas marcadas com fluorocromos. Os marcadores utilizados nesta caracterização estão relacionados no Quadro 3.

Quadro 3 - Anticorpos e concentrações utilizadas para caracterização celular em microscopia confocal

Anticorpo Primário	Tipo	Origem	Diluição	Procedência
Ndel	Monoclonal	Camundongo	1:100	Santa Cruz
ABCG2	Monoclonal	Camundongo	1:100	Chemicon
CD44	Monoclonal	Camundongo	1:100	Sigma
Nestin	Monoclonal	Cabra	1:100	Santa Cruz
Beta-tubulina III	Monoclonal	Camundongo	1:100	Sigma
Actinina	Monoclonal	Camundongo	1:100	Sigma
Titina	Monoclonal	Camundongo	1:100	Santa Cruz
Oct- 3/4	Monoclonal	Camundongo	1:100	R&D Systems
Beta-I- Integrina	Monoclonal	Camundongo	1:100	Abcam

4.9.1 Marcadores usados para a caracterização por microscopia confocal

- **Ndel (Santa Cruz):** é uma proteína expressa no testículo, cérebro, coração, hipotálamo, fígado, pulmão, baço e estômago, especificamente no centrossoma (interfase) e o fuso mitótico. Essa proteína interage com LIS1 para sustentar a função da dineína, impactando assim a organização dos microtúbulos, translocação nuclear e posicionamento neuronal. Ndel é fosforilada durante a mitose e parece amarrar a dineína e a dineína ao centríolo mãe para ancoragem de microtúbulos. A perda da função de Ndel no neocórtex em desenvolvimento prejudica o posicionamento neuronal e desacopla o centrossoma e núcleo. Ndel pode também afetar o transporte ou função mitocondrial, iniciando uma cascata de eventos que pode culminar em doenças psiquiátricas como lisencefalia e esquizofrenia.
- **ABCG2 (Chemicon):** proteína transportadora conservada, que catalisa o transporte de moléculas através das membranas extracelulares e intracelulares por meio da energia da hidrólise de ATP. É também conhecida como transportador placenta específico (ABC) e proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP1). ABCG2 confere resistência para uma variedade de agentes quimioterápicos, incluindo antraciclinas, mitoxantrona, bisantrene e topotecan. Em condições normais ela pode servir para uma função protetora, removendo as toxinas da célula e desempenha um papel importante na regulação da diferenciação de células tronco. ABCG2 é amplamente expressa em uma grande variedade de células tronco, tornando-se um marcador importante para estas células e manifesta-se abundantemente na placenta, fígado, intestino e células tronco.
- **CD44 (Sigma):** glicoproteína de superfície celular, envolvida na interação célula-célula, desempenha importante papel na embriogênese e desenvolvimento. Atua também na hematopoiese, ativação de linfócitos e metástases de tumor. Funcionando como um receptor de ácido hialurônico (Ah) e interagindo com ligantes como osteopontina (PN) a CD44 medeia interações célula-célula e célula-matriz, assim,

desempenha um papel essencial na adesão celular e migração celular. CD44 possui um domínio para eventos de *splicing* alternativo e é expressa em muitas isoformas denominadas CD44R, CDw44, CD44S, CD44H (hematopoiéticas) e CD44E (epitelial). Enquanto a maioria destas isoformas é expressa em tecidos pelo corpo, uma isoforma específica, chamada CD44H, é expressa em altos níveis em tecidos cancerosos, sugerindo um importante papel desta proteína na progressão do tumor.

- **Nestin (Santa Cruz):** é uma proteína de grande filamento intermediário (IF) 200-220 kDa de células progenitoras de SNC embrionário. É também um componente da rede dinâmica IF, durante o desenvolvimento do músculo, onde polimeriza com Desmina e Vimentina. Nestin em conjunto com vimentina ou α -internexina forma moléculas heterodímeras. Exclusão do domínio IF altera localização de nestin em células precursoras do SNC e células gliais radiais *in vivo*. Nestin é um marcador para células tronco neuroepiteliais, células do glioma e células endotéliais tumorais durante seu rápido crescimento. Durante a elongação do axônio na diferenciação de neurônios, essa proteína é localizada no crescimento dos cones e deve desempenhar um papel no crescimento e direcionamento dos cones. Em glândulas adreais de ratos, nestin é expressa pela zona fasciculata e pela zona reticular. Também é expressa por células dermatomais e por mioblastos durante os primeiros estágios da miogênese.
- **Beta-Tubulina III (Sigma):** é o maior componente do citoesqueleto, possuindo cinco formas distintas, denominadas α , β , γ , δ e ϵ tubulina. As formas α e β reúnem-se em heterodímeros e constituem um filamento de microtúbulo. Múltiplas isoformas de β tubulina (β 1, β 2, β 3, β 4, β 5, β 6 e β 8) tem sido caracterizadas e expressas em tecidos de mamíferos. No citoplasma encontram-se β 1 e β 4, β 2 está presente nos núcleos e nucleoplasma, e β 3 é uma proteína de citoesqueleto neurônio - específico. A forma γ tubulina forma o gamassomo, que é necessário para a nucleação dos filamentos de microtúbulos no centróssoma. Tanto a δ tubulina como a ϵ tubulina estão associadas ao centróssoma. A δ tubulina é um homólogo da δ tubulina Uni3 de *Chlamydomonas* e

é encontrada em associação com centríolos, considerando que a α -tubulina localiza o material pericentriolar. A β -tubulina exibe um padrão de ciclo celular específicas de localização; primeiro associando apenas o mais antigo dos centrossomas em um par recentemente duplicada e mais tarde associar dois centrossomas.

- **Actinina (Sigma):** também chamadas de α -actininas. Existem quatro tecidos específicos α -actininas, ou seja, α -actinina-1, α -actinina-2, α -actinina-3 e 4- α -actinina, que são localizadas para músculo e células não musculares, incluindo esquelético, cardíaco e células de músculo liso, bem como dentro do citoesqueleto. Cada proteína α -actinina contém um domínio de ligação de actina, dois domínios homólogo-calponina, dois domínios de EF e quatro repetições de espectrina, através dos quais eles funcionam como a agregação de proteínas que podem fazer ligação cruzada com F-Actina, ancorando a actina para uma variedade de estruturas intracelulares.
- **Titina (Santa Cruz):** também conhecida como conectina, é uma grande proteína envolvida no controle temporal e espacial da formação dos sarcômeros (unidades contráteis) altamente ordenadas do músculo estriado. Além de montagem de sarcômero, a titina também funciona para manter a integridade estrutural das miofibrilas dentro do músculo e para organizar a maquinaria para a condensação dos cromossomos na divisão de células. A titina é uma proteína gigante, composta de 27.000 aminoácidos e contém um domínio catalítico do autoregulado serina quinase como uma região de ligação do cálcio/calmodulina que estão envolvidos em sua ativação. A titina ativada fosforila a proteína teletonina do músculo, uma proteína que abundante no coração e músculo esquelético, implicando a atividade da titina na reorganização do citoesqueleto durante miofibrilogênese.
- **OCT-3/4 (R&D Systems):** Oct-3/4 é um fator de transcrição de POU (domínio formado por fatores de transcrição **Pit-1**, **Oct-1**, **Oct-2** e **Unc-86**), que é expresso em células tronco embrionárias e as células germinativas. Sua expressão é necessária para sustentar autorenovação e pluripotência da célula. Oct-3/4 é o marcador mais reconhecido para células tronco embrionárias totipotentes.

- **Integrina Beta - I (Abcam):** As integrinas são proteínas transmembrana que se ligam a proteínas contidas em complexos intracelulares que se ligam ao citoesqueleto. As integrinas formam heterodímeros compostos por uma subunidade alfa e uma beta e, até o momento, são conhecidas 18 subunidades alfa e 8 subunidades beta, em mamíferos. Estas proteínas são receptores de membrana envolvidos na adesão celular e no reconhecimento de uma variedade de processos, incluindo embriogênese, homeostase, reparo de tecidos, resposta imune e difusão metastática de células tumorais. Integrina beta - também conhecida como CD29, é uma proteína que, em humanos é codificada pelo gene ITGB1. É uma unidade de integrina associada com receptores de antígenos muito tardios. Sabe-se que ela conjuga-se com a subunidade alfa-3 para criar um complexo $\alpha 3\beta 1$ que reage com moléculas, tais como a netrina-1 e reelina.

As células foram raspadas da garrafa com "*cell scraper*" (rodinho), e a suspensão celular foi colocada em um tubo falcon de 15 mL. Após a decantação o *pellet* foi ressuspensionado com meio de cultura completo e suplementado com 10% de SFB. A suspensão celular foi então distribuída em plaquinhas (Chambered $\neq$ 1.0 Borosilicate Coverglass System) sendo que cada plaquinha recebeu 1,5 mL de meio. As células aderidas sobre as lamínulas foram lavadas duas vezes em solução de PBS e posteriormente fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 1 hora. A seguir, foram lavadas com solução de TBS (Tampão de lavagem - 0,15 M NaCl (Sigma), 20 mM Tris-HCl (Sigma), e 0,05% de Tween 20 (Sigma), pH 7,4). A membrana celular foi permeabilizada com solução de 0,1% Triton X-100 (Sigma) em TBS. Após nova sequência de lavagem em TBS, as células foram incubadas em solução de soro de albumina bovina (BSA, Sigma) a 5% em PBS durante 30 minutos para o bloqueio de marcações inespecíficas, sendo então incubadas com anticorpos primários por 1 hora. Na sequência, foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ou de cabra conjugado à fluoresceína (FITC) diluído em solução de BSA a 5 % em PBS na proporção de 1:500. Essa incubação teve a duração de uma hora em temperatura ambiente e posteriormente, as células foram lavadas na mesma sequência de TBS. Para os controles negativos, os anticorpos primários foram substituídos por PBS. As

lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro, utilizando o meio de montagem específico para a imunofluorescência *Vectahield* com DAPI.

4.10 Caracterização celular por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Varredura (MEV)

Para a realização da MET, as células de *A. sculptum*, não inoculadas (controle) e as inoculadas com *Trypanosoma theileri* e com *Leishmania infantum chagasi*, foram lavadas uma vez com PBS (3mL). Em seguida foi adicionada uma solução fixadora (1,5% de aldeído glutárico, 1% de paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1M, pH7,3) por duas horas. Seguiu-se uma lavagem com tampão cacodilato e pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, durante uma hora.

Após duas lavagens no tampão, as células foram pré-contrastadas com solução de acetato de uranila 0,5%, com 13% de sacarose, durante a noite, na geladeira (10 °C). A seguir foram desidratadas em série etanólica, e, após passagem em óxido de propileno, foram incluídas em resina Epon. Cortes finos (70 nm), coletados em grades de cobre, foram contrastadas com solução aquosa de acetato de uranila a 1% e com citrato de chumbo.

As amostras foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E (Zeiss, Germany) do Laboratório de Biologia Celular (Instituto Butantan) a 80 kV. As imagens foram adquiridas por uma câmera CCd MegaView III, através do programa *iTEM – Universal TEM Imaging Platform* program (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Germany), e salvas em extensão TIF.

Para a realização da MEV, as amostras de células foram fixadas em glutaraldeído 3%, por 24 horas. Após este período as amostras foram lavadas em solução tampão cacodilato por cinco vezes e pós - fixadas em solução tampão OsO₄ 4%, durante 1 hora, sendo novamente lavadas em solução tampão. A suspensão de células foi centrifugada a 900 g por 5 minutos, ressuspensas em meio L-15B suplementado com 10% de SFB, cultivadas em placas de Petri de 2 cm², na densidade de 10⁶ células/ml. As amostras foram transferidas para cestas permeáveis do aparelho de secagem (ponto crítico-Bal-Tec), e posteriormente desidratadas em banhos duplos de álcool nas concentrações: 30, 50, 70, 80, 95 e 100%. A secagem das amostras foi realizada no aparelho de ponto crítico, usando gás carbônico e as placas receberam o recobrimento metálico com ouro por pulverização catódica (*sputtering*). Terminado o

processamento, o material foi analisado no microscópio eletrônico de varredura Philips XL30.

4.11 Teste de tumorigênese

Para o teste de tumorigênese, foram utilizados três camundongos nude Balb- $c^{nu/nu}$ (camundongo 1 pesando 21,98 g, camundongo 2 pesando 25,75 g e camundongo 3 pesando 20,7 g). A suspensão de células foi preparada (1 ml) e inoculada com seringa de insulina na concentração de 10^6 /ponto de aplicação. Foram marcados quatro pontos de inoculação, no dorso de cada animal. Em cada ponto foram injetados 0,1 mL da suspensão celular. Os camundongos foram observados diariamente, até 120 dias após a inoculação.

4.12 Análises estatísticas

Todos os valores foram expressos como $\pm$ média desvio padrão (s.d). Cada valor é a média de pelo menos três experimentos independentes em cada grupo. Uma análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas Tukey-Kramer foram realizados para identificar as diferenças entre as medidas dos grupos estudados. Gráficos obtidos por softwares Prism versão 5.0 e versão Mod Fit 3.2. Significância estatística p-valor = *p <0,05, **p <0,01 e ***p <0,001.

5 RESULTADOS

5.1 Eficiência do meio L-15B

Com exceção do meio L-15B, os outros meios testados para crescimento celular mostraram que as células podem sobreviver por poucos dias (3-4 dias) nas placas de cultura, mas sempre em suspensão.

Adesão de células no fundo da placa foi observada somente para o meio L-15B suplementado com 10% de SFB (Figura 1), por isso, ele foi o escolhido e foi utilizado para todas as culturas realizadas.

Figura 1 - Cultivos primários de células de *A. sculptum*.

A. Células embrionárias aderentes obtidas em meio L-15B. B. Células-tronco em diferenciação. Barras 20 μ m.

5.2 Avaliação da idade Ideal dos ovos

Entre as idades das massas de ovos de *A. sculptum* testadas, a idade ideal foi de 21 dias após o início da oviposição, obtendo-se maior número de células viáveis para adesão (Figura 2). Foi observado que ovos muito jovens produzem um número insuficiente de células, apresentando dificuldade de aderência e formando grumos no sobrenadante que não se desenvolvem. Também foi verificado que massas de ovos muito mais velhas apresentam pedaços de tecidos dos quais as células têm dificuldade de migração para a superfície cultivável da garrafa. Esse fato dificulta a aderência, prejudicando a formação da monocamada.

Figura 2 - Culturas primárias de células embrionárias de *Amblyomma sculptum*.

A. Células obtidas de ovos com idade de 12 dias, barra 10 μm . ($6,6 \times 10^4$ cels/mL). B. Células obtidas de ovos com idade de 15 dias, barra 10 μm . ($47,57 \times 10^4$ cels/mL). C. Células obtidas de ovos com idade de 18 dias, barra 100 μm . ($61,5 \times 10^4$ cels/mL). D. Células obtidas de ovos com 21 dias, barra 20 μm . ($78,75 \times 10^4$ cels/mL).

5.3 Culturas primárias e confirmação da identidade celular

Após o início da cultura foi observada diferenciação espontânea das células embrionárias (Figura 3) à medida que aumentava a confluência celular. Depois de dois meses foi possível o primeiro subcultivo, com aceleração do crescimento celular. O sequenciamento das células de *A. sculptum* mostrou 100% de similaridade quando comparado com outra sequência já depositada no Genbank ([gb|FJ424404.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/FJ424404.1)) previamente citada como *A. cajennense*.

5.3.1 Criopreservação e descongelamento das células

O descongelamento das células mostrou que a criopreservação foi bem sucedida (Tabela 1). Uma cultura foi congelada na passagem 13, e após o descongelamento foi subcultivada apresentando excelente recuperação celular. Com os

resultados da criopreservação e recuperação celular apresentados no quadro abaixo pode se dizer que foi estabelecida a linhagem celular de *A. sculptum* (IBU/ASE-16).

Figura 3 - Células embrionárias de *A. sculptum* com diferentes períodos de cultivo.

A. Células com 25 dias, barra 10 µm. B. Células com 30 dias, barra 20 µm. C. Células com 30 dias, barra 20 µm. D. Células com 35 dias, barra 100 µm. E. Células com 35 dias, barra 20 µm. F. Células com 60 dias, barra 20 µm.

As ilustrações das culturas criopreservadas, após o descongelamento, estão apresentadas nas Figuras 4. A linhagem celular recebeu esse nome que significa: IBU – Instituto Butantan, AS – *Amblyomma sculptum*, E – embrionárias, 16 – foi quando o subcultivo na passagem 13 foi congelado e descongelado e continuou viável mesmo sendo congelado novamente na passagem 16.

Tabela 1- Datas de criopreservação, recuperação e expansão das células de *A.sculptum*.

Congelamento	Passagem	Nº de cél/mL	Descongelamento	Expansão
27.10.11	P13	0,42 x 10 ⁵	06.12.11	P14 - 20.01.12 P15 - 23.02.12 P16 - 12.03.12
12.04.12	P16	0,68 x 10 ⁵	12.06.12	P17 - 03.07.12 P18 - 03.08.12 P19 - 11.09.12

Figura 4 - Culturas de células embrionárias de *A. sculptum* após os descongelamentos.

A. Células descongeladas após 30 dias do primeiro congelamento. B. células descongeladas após 35 dias do primeiro congelamento. C. Células descongeladas após 56 dias do segundo descongelamento. Barras 10 µm.

5.4 Eficiência das células de linhagem IBU/ASE-16 como substrato para cultivo de microrganismos

Os testes realizados com sangue de pacientes suspeitos de Borreliose, em cultivos de IBU/ASE-16, mostraram-se negativos para o crescimento de *Borrelia* spp. As fêmeas de *A. sculptum* que se alimentaram artificialmente com sangue de pacientes suspeitos, originaram posturas das quais foram obtidos cultivos celulares. As células aderiram ao fundo da garrafa como já era previsto, no entanto, o crescimento de espiroquetídeos não foi observado. No que diz respeito às riquetsias e aos protozoários, os testes foram bem sucedidos. No caso das riquetsias foi constatada infecção de mais de 90% das células utilizadas (Figura 5).

Observou-se proliferação e manutenção dos protozoários testados (Figura 6), demonstrando que as culturas celulares obtidas de *A. sculptum* são potenciais substratos para o crescimento e isolamento destes microrganismos, bem como para estudos de interação parasita-hospedeiro.

Figuras 5 - Células de *A. sculptum* como substrato para crescimento de patógenos.

A-B. Células infectadas com *R. bellii* e *R. parkeri*, respectivamente, barras 1000 μ m. C-D. Células infectadas com *L. i. chagasi* e *T. theileri*, respectivamente, barras 10 μ m.

5.4.1 Microscopia de transmissão

A Figura 6 representa a infecção celular por *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*, os quais penetraram nas células IBU/ASE-16. No entanto, apesar de sobreviverem bem nas culturas, as *Leishmania infantum chagasi* aparentemente não penetraram nas células IBU/ASE-16 (Figura 7).

Figura 6 - Células infectadas com *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*.

A-B-C –D. Células de *A. sculptum* com o *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*, em seu interior.

Figura 7 - Células IBU/ASE-16 infectadas com *Leishmania infantum chagasi*.

A-B-C –D. Células de *A. sculptum* com a *Leishmania infantum chagasi*, fora da célula.

5.5 Caracterização celular por Citometria de Fluxo

5.5.1 Análise da morfologia e das populações

As células-tronco apresentaram aspecto arredondado, enquanto que as células maduras mostraram a morfologia típica da célula em que ela se diferenciou. Ao microscópio de contraste de fase (Phase Contrast Microscopy), foram observadas não só células-tronco (imaturas), como também já diferenciadas (maduras), de vários tipos (Figura 8). Morfologicamente, observou-se a presença de células musculares, tipo neuronais, adipócitos e melanócitos, entre outras. As leituras foram realizadas após 10, 15, 20 e 35 dias, mostrando as diferentes populações de células com tamanho e granulosidades desiguais. As células-tronco estão localizadas no quadrante R2, do gráfico obtido no citômetro de fluxo, enquanto a população de células maduras ou diferenciadas estão no quadrante R1.

5.5.2 Determinação da capacidade proliferativa em citometria de fluxo pelo teste do CFSE

O protocolo utilizado com o CFSE permitiu avaliar com precisão a distribuição do marcador igualmente entre as células-filhas em cada divisão celular. O CFSE tem fluorescência muito brilhante e, portanto, localiza as células em populações de grande heterogeneidade, permitindo a análise simultânea de número celular, posição, e o *status* de divisão. Houve correlação positiva ($R^2 = 0,9899$), no índice proliferativo das culturas da linhagem IBU/ASE-16, até o período de 35 dias de cultivo (Figura 9).

5.5.3 Análises das fases do ciclo celular das células por citometria de fluxo

Houve uma tendência de aumento das células nas fases G0/G1 e G2/M, do ciclo celular, nos períodos de 10 a 35 dias, confirmando potencial de proliferação das células, ao longo do cultivo. Também mostraram boa marcação para os reguladores do ciclo (Cliclina D1 e p53) e para a proliferação (Ki67 e Bcl-2) (Figura 10).

Figura 8 - Morfologia das populações das células IBU/ASE-16.

A. Gráficos representativos do tipo *dotplot* mostrando a distribuição das populações de células-tronco e diferenciadas nos períodos de 10 a 35 dias de cultivo. Resultados obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *CellQuestPro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*. B. Gráfico de barras representando os valores médios percentuais das populações de células-tronco e diferenciadas no mesmo período. Resultados obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *CellQuestPro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*. Análise estatística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5.5.4 Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) pelo fluorocromo Rodamina 123

O potencial elétrico mitocondrial mostrou atividade funcional das mitocôndrias, ausência de células inativas, com pouco DNA fragmentado e células com grande capacidade proliferativa (G2, M), além das células quiescentes (G0, G1).

Os gráficos e os histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial das IBU/ASE-16, obtidos pela distribuição da sonda Rodamina 123 e analisados pelo programa *Cell QUEST*, mostraram viabilidade celular, ilustrada pela alta atividade mitocondrial (Figura 11).

Figura 9 - Determinação da capacidade proliferativa das células IBU/ASE-16, em citometria de fluxo pelo teste do CFSE.

A. Curva de distribuição das populações celulares em proliferação obtidas pela distribuição do marcador CFSE das células IBU/ASE-16 mantidas no período de 10 a 35 dias de cultivo. As curvas obtidas em cada figura representam o número de células em proliferação. Os histogramas foram obtidos pelo programa CellQuest e as proporções celulares, analisadas pelo programa *Wizard Proliferation*. B. Gráfico de barras representando as médias $\pm$ DP dos índices proliferativos das células IBU/ASE-16, obtidos pelo programa de análise *Wizard Proliferativo*.

Figura 10 - Análises das fases do ciclo celular das células por citometria de fluxo.

Gráficos de barras representando a média e desvio padrão das células IBU/ASE-16, no período de 10 a 35 dias de cultivo, nas diferentes fases do ciclo celular. Análise estatística (ANOVA), *** $p < 0.001$.

Figura 11 - Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) pelo fluorocromo Rodamina 123.

A. Histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial das células IBU/ASE-16, no período de 10 a 35 dias de cultivo, obtidos pela distribuição da sonda Rodamina 123. Os resultados foram analisados pelo programa *Cell QUEST* e as proporções celulares, pelo programa *Wizard proliferation*. B. Gráfico de barras representando as médias $\pm$ DP do potencial elétrico mitocondrial das células IBU/ASE-16 no período de 10 a 35 dias de cultivo. Análise estatística, * $p < 0.05$.

5.5.5 Marcadores de proliferação, reguladores da progressão do ciclo celular, apoptose e necrose celular

A marcação de Anexina V (Apoptose) e PI (Necrose) demonstrou viabilidade das células IBU/ASE-16. As células não estavam apoptóticas nem em processo de necrose, demonstrando potencial para sua manutenção e expansão em cultura. A marcação com a Caspase 3 foi positiva, assim como para os reguladores do ciclo celular (Cliclina D1 e p53). A expressão do Ki-67⁺ e Bcl -2⁺ demonstraram o potencial proliferativo das células da linhagem IBU/ASE-16 (Figura 12).

Figura 12 - Marcadores de proliferação, reguladores da progressão do ciclo celular, apoptose e necrose celular.

A. Gráficos representativos do tipo *dotplot* mostrando a expressão de cada marcador de proliferação e morte celular nas células IBU/ASE-16. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *Cell Quest Pro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*. B. Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP dos marcadores de proliferação e morte celular expressos. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *Cell Quest Pro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*.

5.5.6 Marcadores de célula-tronco

Os marcadores mais expressos por citometria de fluxo foram: STRO-1, Nanog, OCT3/4, CD4-like, CD177, VEGF-R1 e CD133, demonstrando o potencial dessa população celular em apresentar células-tronco e em manter a indiferenciação e a pluripotência (Figura 13). As células da linhagem IBU/ASE-16 não expressaram o marcador CD34 indicando a ausência de precursores endoteliais e de células progenitoras hematopoiéticas. O marcador CD105 (endogлина) teve baixa expressão indicando uma presença menor de células endoteliais, macrófagos ativados,

fibroblastos, possivelmente precursores adipogênicos, forte indicação de células indiferenciadas. Também a baixa expressão do CD90 demonstrou que a presença de células estromais, células endoteliais e células T, assim como precursores neurais.

As IBU/ASE-16 expressaram marcadores de origem embrionária, sendo fortemente marcadas pelo STRO-1, Nanog e Oct3/4, indicando a presença de células-tronco. Os marcadores CD117 e CD133 indicaram a presença de precursores neurais e melanocíticos. As células também expressaram o marcador CD4 like, sugerindo a presença de função fagocítica. Os marcadores CD34 e VEGF-R1 mostraram, respectivamente, a ausência de precursores endoteliais e possivelmente a presença do receptor para o VEGF-R1, sugerindo capacidade de induzir *vasculogênese-like*. A Figura 14, mostra células-tronco e células com diferenciação espontânea.

Figura 13 - Marcadores de células-tronco

A. Gráficos representativos do tipo *dotplot* mostrando a expressão de cada marcador de células-tronco, nas células IBU/ASE-16. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *Cell Quest Pro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*. B. Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP dos marcadores de células-tronco expressos pelas células IBU/ASE-16. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *Cell Quest Pro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*.

Figura 14 - Células de *A. sculptum*

A. Células IBU/ASE-16 mostrando células-tronco (setas amarelas). B. Células IBU/ASE-16 diferenciadas, tipo melanocíticas. C. Células IBU/ASE-16 diferenciadas, tipo neuronais. D. Células IBU/ASE-16, mostrando intensa capacidade de proliferação.

5.6 Caracterização celular por microscopia confocal

Os marcadores expressos nas IBU/ASE-16 por microscopia confocal foram: Ndel, ABCG2, CD44, Nestin, β -III tulina, α -actinin, titina, OCT3/4, e integrina β 1 demonstrando potencial dessa população celular em apresentar células-tronco pluripotentes com comprometimento de diferenciação neural e muscular (Figs. 15 - 23).

Figura 15 - Análise da expressão de Ndel nas IBU/ASE-16 indiferenciadas

A1-A2. Expressão de Ndel no citoplasma, nota-se a marcação do centrôssoma (seta). B1-B2. Célula em divisão mitótica, com os cromossomos marcados por PI e o centrôssoma marcado com Ndel (seta). C1-C2. Marcação de Ndel no citoplasma das IBU/ASE-16. Núcleos corados com PI (vermelho). (A1, B1 e C1 = fluorescência - microscopia confocal, A2, B2 e C2 = fluorescência + transmitida (DIC) - microscopia confocal). Objetiva 63X.

Figura 15a - Análise da expressão de Ndel nas IBU/ASE-16 diferenciadas espontaneamente para células neurais.

D1-D2. Expressão de Ndel (verde) no corpo celular, nota-se a marcação do centróssoma (seta). E1-E2. Marcação de Ndel (verde) no axônio das células diferenciadas para neurônios (seta). F1-F2. Marcação de Ndel (verde) no citoplasma das células diferenciadas para células gliais. Núcleos corados com PI (vermelho). (D1, E1 e F1 = fluorescência - microscopia confocal, D2, E2 e F2 = fluorescência + transmitida (DIC) - microscopia confocal). Objetiva 20X.

Figura 16 - Análise da expressão de ABCG2 nas IBU/ASE-16 indiferenciadas.

A1-A2. Expressão de ABCG2 (verde) no citoplasma, nota-se a marcação pontual. B1-B2. É possível notar uma expressão diferencial entre as células para o marcador ABCG2 (verde). C1-C2. Marcação de ABCG2 (verde) no citoplasma das colônias de IBU/ASE-16. Núcleos corados com PI (vermelho). (A1, B1 e C1 = fluorescência - microscopia confocal, A2, B2 e C2 = fluorescência + transmitida (DIC) - microscopia confocal). Objetiva 40X.

Figura 17 - Análise da expressão de CD44 nas colônias de células IBU/ASE-16 indiferenciadas.

A1-A2. Expressão de CD44 (verde) no citoplasma e na membrana das células. B1-B2. Forte marcação do anticorpo (verde) nas células constituintes das colônias. Núcleos corados com PI (vermelho). (A1, B1 = fluorescência - microscopia confocal, A2, B2 = fluorescência + transmitida (DIC) - microscopia confocal). Objetiva 40X.

Figura 18 - Análise da expressão de Nestin nas IBU/ASE-16 indiferenciadas.

A-A1. Expressão de Nestin (verde) formando o citoesqueleto de algumas células. B-B1. Forte marcação do anticorpo (verde) nas células em colônias. C-C1. Células individualizadas expressando Nestin (verde). Núcleos corados com PI (vermelho). (A, B, C = fluorescência - microscopia confocal, A1, B1 e C1 = fluorescência + transmitida (DIC) - microscopia confocal). A, A1, C e C1 = Objetiva 20X; B e B1 = Objetiva 40X.

Figura 19 - Análise da expressão de beta-tubulina III nas IBU/ASE-16

A-A1. Expressão de beta-tubulina III (verde) nas células indiferenciadas constituintes das colônias. B-B1. Marcação de beta-tubulina III (verde) nas células diferenciadas espontaneamente para neurônios. C-C1. Marcação de beta-tubulina III (verde) no citoplasma das células indiferenciadas. Núcleos corados com PI (vermelho). (A, B e C = fluorescência - microscopia confocal, A1, B1 e C1 = fluorescência + transmitida (DIC) - microscopia confocal). A e A1 = Objetiva 10X, B e B1 = Objetiva 20X, C e C1 = Objetiva 63X.

Figura 20 - Análise da expressão de alfa-actinina nas IBU/ASE-16 diferenciadas espontaneamente para células musculares.

A-A1. Expressão de alfa-actinina (verde) formando o citoesqueleto das células, é possível notar a marcação diferencial entre as células. Núcleos corados com PI (vermelho). (A e A1 = fluorescência + transmitida (DIC) - microscopia confocal). A e A1 = Objetiva 20X.

Figura 21 - Análise da expressão de Titina nas IBU/ASE-16 diferenciadas espontaneamente para células musculares.

A-A1. Expressão de Titina (verde) formando o citoesqueleto das células. B-B1. É possível notar a marcação diferencial (verde) entre as células. Núcleos corados com PI (vermelho). (A e A1 = fluorescência + transmitida (DIC) - microscopia confocal). A e A1 = Objetiva 20X, B e B1 = Objetiva 40X.

Figura 22 - Análise da expressão de Oct-3/4 nas IBU/ASE-16 indiferenciadas.

Na linha A. Expressão de Oct-3/4 (verde) no núcleo celular (seta). Na linha B. Expressão de Oct-3/4 (verde) no citoplasma das células em colônia. Na linha C. Expressão de Oct-3/4 (verde) no núcleo celular (seta) das células em colônias. Núcleos corados com PI (vermelho). Em amarelo, sobreposição da fluorescência verde (anticorpo) e da fluorescência vermelha (núcleo). (Nas três primeiras colunas fluorescência - microscopia confocal, na última coluna = fluorescência + transmitida (DIC) - microscopia confocal). Na linha A = Objetiva 20X, Nas linhas B e C = Objetiva 10X.

Figura 22a - Análise da expressão de Oct-3/4 nas IBU/ASE-16 indiferenciadas.

A. Transmitida (DIC) de uma célula com três núcleos (setas). B. Célula binucleada com núcleos marcados com PI (vermelho). C. Expressão de Oct-3/4 (verde) na célula binucleada. D. Sobreposição da expressão de Oct-3/4 (verde) e núcleos (vermelho) na célula binucleada. E. Sobreposição da expressão de Oct-3/4 (verde) e núcleos (vermelho) na célula binucleada em adição da transmitida (DIC). F. Célula com núcleo marcado com PI (vermelho). G. Mesma célula que em (F), porém demonstrando a expressão de Oct-3/4 (verde) no citoplasma da célula. H. Sobreposição de (F) e (G). Em (I) adição da transmitida (DIC) a imagem (H). Núcleos corados com PI (vermelho). Em amarelo, sobreposição da fluorescência verde (anticorpo) e da fluorescência vermelha (núcleo). (Em A, E e I fluorescência + transmitida (DIC)- microscopia confocal, Em B, C, D, F, G e H = fluorescência - microscopia confocal). A e B = Objetiva 63X; C, D e E = Objetiva 40X e F, G, H e I = Objetiva 20X.

Figura 23 - Análise da expressão de Integrina beta-I nas IBU/AS-16 indiferenciadas.

A-B. Expressão de Integrina beta-I (verde) no citoplasma e na membrana das células. C. É possível notar a fraca marcação do anticorpo (verde) nas células constituintes da colônia. D-E. É possível notar a expressão (verde) diferencial entre as células. F. É possível notar a expressão diferencial (verde) entre as células constituintes da colônia. Núcleos corados com PI (vermelho). (A, C e D = fluorescência - microscopia confocal; B, E e F = fluorescência + transmitida (DIC) - microscopia confocal). Objetiva 20X.

5.7 Caracterização celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com a microscopia eletrônica de varredura foi possível observar: células em monocamada (A e B), em divisão (C, D e F), conexões e junções intercelulares (G,H,I e J) formação de matriz extracelular (K ,M e N), e a formação de redes neuronais (K e L) representadas nas Figuras 24- 24a.

Figura 24 - Fotomicroscopia eletrônica de varredura de células embrionárias da linhagem IBU/ASE-16.

A-B. Células em monocamada. C a F. Células em divisão. G-H. Conexões e junções intercelulares.

Figura 24a - Fotomicroscopia eletrônica de varredura de células embrionárias da linhagem IBU/ASE-16.

I-J. Conexões e junções intercelulares. K-M-N. Formação de matriz extracelular. K -L. Formação de redes neuronais.

5.8 Teste de tumorigênese

Nos três camundongos utilizados para o teste de tumorigênese não houve crescimento de tumores cutâneos. As médias do controle estão na Tabela 2 e uma fotografia do baço do controle está na Figura 25. A necrópsia, além de confirmar a inexistência de tumores internos, mostrou também que não ocorreram alterações significativas nos órgãos (baço; fígado, rins e pulmão), como pode ser observado pelas médias das medidas da Tabela 3, e pela Figura 26.

Tabela 2 – Pesos médios $\pm$ DP dos camundongos controle e dos órgãos (em gramas). Média de comprimento do baço (em milímetros).

Camundongos	Baço	Rim	Fígado	Pulmão	Comp. do Baço
n=3					
22,81 $\pm$ 1,3	0,57 $\pm$ 0,06	0,36 $\pm$ 0,04	1,97 $\pm$ 0,36	0,28 $\pm$ 0,03	20,4 X 7,42

Figura 25 - Baço do camundongo Balb/c ^{nu/nu}, sem inoculação das células IBU/ASE-16 (controle).

Tabela 3 – Pesos médios $\pm$ DP dos camundongos e dos órgãos (em gramas). Média de comprimento do baço (em milímetros), obtidos após 120 dias de inoculação com células da linhagem IBU/ASE-16

Camundongos	Baço	Rim	Fígado	Pulmão	Comp. do Baço
n = 3					
22,81 $\pm$ 1,3	0,48 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,06	2,26 $\pm$ 0, 6	0,39 $\pm$ 0,02	23,97 X 7,69

Figura 26 - Teste de tumorigênese em camundongo Balb/c^{nu/nu}, utilizando a linhagem celular IBU/ASE-16.

A. Ausência de tumores cutâneos. B. Em destaque na seta, linfonodo regional inguinal normal após injeção celular. C-D. Largura e comprimento do baço (6,62 mm x 18,90 mm, respectivamente), após injeção celular.

6 DISCUSSÃO

Já era esperado que o meio L15-B fosse o melhor para as células de carrapatos uma vez que Kurtti et al. (1982) fizeram um estudo prévio sobre a adequação de suplementos capazes de promover crescimento celular de *I. scapularis*, evidenciando o sucesso do meio também para outras espécies. Com relação à porcentagem de SFB, foi observado que em alta concentração (por exemplo, 20%) causa toxicidade às células de *A. sculptum*. Por outro lado, baixa concentração (por exemplo, 5%) pode ser ótima para algumas linhagens, mas inadequada para outras. Isto demonstra que é preciso testar os meios e suplementos porque cada espécie tem suas exigências.

Foi verificado que a aderência das células de *A. sculptum* na garrafa de cultura é essencial para o crescimento e diferenciação celular, formando monocamadas. Aquelas células que ficam no sobrenadante entram em senescência e morrem após algumas semanas. A idade dos ovos é importante para o sucesso dos cultivos primários (MATTILA et al., 2007), mas o peso da massa de ovos também tem relevância. No presente estudo, foi verificado que a quantidade de ovos em 130 mg foram suficientes para promover o início do cultivo (CIRELLI-MORAES et al., 2010). Estes resultados estão de acordo com (EIDE; CALDWELL, 1973), que embora não tenham citado o peso dos ovos, utilizaram massas de ovos de *Amblyomma americanum* (L.) com idade entre 17 e 20 dias. Os cultivos de *A. sculptum* realizados com ovos de 10-11 dias de idade resultaram em células imaturas para desenvolvimento das culturas. No caso de *A. sculptum*, embriões com menos de 17 dias podem até conter células, porém em número insuficiente para uma boa adesão celular. Considerando que 1000 mg de ovos desta espécie possui em torno de 16.400 ovos (LABRUNA et al., 1997; PRATA; DAEMON, 1997), no presente estudo, o número de ovos em 130 mg foi de aproximadamente 2130 ovos. Portanto, foi observado que a idade ideal dos ovos para os cultivos primários é pouco acima da metade do período de incubação, ou seja, desde a postura do primeiro ovo até a eclosão da primeira larva (LOPES et al., 2008).

Com relação à outras espécies, segundo Pudney et al. (1973), em geral, o melhor período corresponde aproximadamente à 50% do desenvolvimento embrionário. Esses autores conseguiram culturas de células primárias de *R. microplus* com ovos de 12-13 dias de idade, embora o mesmo sucesso tenha sido obtido com ovos de 10 dias para a mesma espécie (COSSIO-BAYUGAR; MIRANDA-MIRANDA, 2007). Os cultivos primários de massas de ovos de *R. sanguineus* realizados com 14 dias também foram bem sucedidos (FRANZE, 2014). Portanto, o

conhecimento do ciclo biológico de cada espécie é fundamental para a avaliação do momento de se fazer o cultivo primário. Para a espécie *A. triste*, em condições de laboratório, o período de incubação é de cerca de 18 a 20 dias (LABRUNA et al. 2003). Assim em cultivos primários desta espécie os ovos foram preparados com 21 dias de idade (dados não publicados). Mattila et al. (2007) conseguiram cultivos primários de *Ornithodoros capensis* Neumann quando os ovos apresentaram apêndices visíveis e antes da formação da cutícula que em geral ocorre a partir da metade do período de incubação, mas não relataram a idade da postura.

As culturas primárias de *A. sculptum* foram criopreservadas e recuperadas sucessivamente após o primeiro congelamento. Até o início dos anos 80 as linhagens de células de carrapatos eram mantidas no próprio meio de cultura, em estufas (PUDNEY et al., 1973). Somente no final dos anos 80 foi possível criopreservar as linhagens celulares de carrapato, e que, após os descongelamentos, tornaram-se viáveis (KURTTI; MUNDERLOH; SAMISH, 1988). Segundo Yunker (1987), normalmente as linhagens de células de carrapatos se tornam estabelecidas após um longo período que pode ser 1 a 3 anos. A linhagem de células embrionárias de *A. sculptum* (IBU/ASE-16) foi estabelecida, pois, após os 60 dias iniciais do cultivo primário, os repiques passaram a ser feitos em intervalos regulares, ou seja, a cada 15-30 dias, mesmo depois dos sucessivos congelamentos e descongelamentos, e a identidade celular da linhagem foi comprovada por sequenciamento gênico. A confirmação da pureza e identidade das culturas de células foi uma etapa importante da avaliação da conformidade do material biológico, uma vez que, atualmente, temos outras linhagens celulares em estabelecimento no laboratório.

No caso de carrapatos argasídeos, o crescimento celular é lento para espécies dessa família (MATTILA et al., 2007), tanto que existem apenas 10 linhagens de duas espécies (BELL-SAKYI et al., 2012). Há 4 linhagens de *O. capensis* (citada como *Carios capensis*) (MATTILA et al., 2007) e 6 linhagens de *Ornithodoros moubata* (Murray). Esta última estabelecida em 2009 partir de ovos com idade de 7 dias (BELL-SAKYI et al., 2009).

Em relação ao uso de linhagens celulares de carrapatos para o cultivo de microrganismos, no presente estudo, foram testadas três bactérias (*B. burgdorferi*, *R. parkeri* e *R. bellii*) e dois protozoários (*T. theileri* e *L. i. chagasi*). As culturas celulares inoculadas com sangue de pacientes suspeitos de borreliose, como os cultivos realizados com a massa de ovos de fêmeas alimentadas artificialmente com o mesmo

sangue, foram negativos para o crescimento deste patógeno. Como se tratava de sangue de pacientes com suspeita da doença, esse resultado já era esperado. No entanto, caso fosse realmente sangue positivo para *Borrelia*, seria esperado uma multiplicação nas células do carrapato. Kurtti et al. (1993) observaram a adesão e invasão da borrelia em células de *R. appendiculatus* infectadas experimentalmente, tanto quanto em outras linhagens de diferentes espécies de carrapatos. Rezende et al. (2008) utilizando culturas primárias de células embrionárias naturalmente infectadas de *R. microplus* provenientes do estado do Mato Grosso do Sul, conseguiram isolar uma borrelia ainda não identificada, sete dias depois de iniciado o cultivo. Dessa forma, a linhagem IBU/ASE-16 pode ser funcional e interessante para estudos de interação patógeno/vetor, no caso das borrelias.

Com relação às infecções por riquetsias, no presente estudo, o sucesso obtido nas culturas de *A. sculptum* infectadas com *R. belli* e *R. parkeri* corrobora a literatura, como foi mostrado no Quadro 1. Historicamente Ricketts (1909) foi o primeiro a observar a transmissão de riquetsias para porquinhos da Índia, a partir de tecidos de carrapatos infectados e inoculados nesses animais. Em geral, as riquetsias estão associadas com vários artrópodes (insetos, carrapatos e ácaros), os quais podem agir como vetores, reservatórios e amplificadores do seu ciclo de vida, mas os carrapatos são principais vetores de rickettsioses (RAOULT; ROUX, 1997).

Com relação aos tripanossomatídeos (*T. theileri* e *L. i. chagasi*), estas duas espécies foram investigadas nas células porque, apesar dos tabanídeos e o mosquito palha serem considerados os vetores de *T. theileri* (RODRIGUES et al., 2003) e de *Leishmania*, respectivamente, existem relatos sobre a possibilidade da transmissão ocorrer por carrapatos (DANTAS-TORRES, 2007; LABRUNA; MACHADO, 2006). Os protozoários *T. theileri* penetraram e se mantiveram ativos nas culturas, sugerindo que pode haver transmissão por *A. sculptum* na natureza. De fato, há suspeitas de que os carrapatos *D. nitens* e *A. sculptum* possam ser vetores de *T. theileri* no estado de São Paulo (LABRUNA; MACHADO, 2006). Formas epimastigotas deste tripanossomatídeo foram encontradas em carrapatos *R. microplus* no Rio Grande do Sul (MARTINS et al., 2008). Morzaria et al. (1986) também mostraram algumas evidências de transmissão de *T. theileri* pelo carrapato *Hyalomma anatolicum anatolicum*. No caso de *L. i. chagasi*, as células de *A. sculptum* inoculadas com este protozoário, aparentemente não se infectaram. As formas promastigotas permaneceram ativas por vários dias, mas aparentemente não penetraram nas células.

Segundo Bell-Sakyi et al. (2007) as arboviroses são estudadas em linhagens celulares de carrapatos há mais de trinta anos. Billeter et al. (2009) obtiveram sucesso ao infectar a linhagem do carrapato *A. americanum* (AAE2), com espécies de *Bartonella*, uma bactéria Gram negativa transmitida por insetos, incluindo pulgas, mosquito e piolhos.

Portanto a eficiência de culturas celulares, como potencial substrato para cultivo e isolamento de microrganismos, é uma realidade. Segundo Bell-Sakyi et al. (2007) e Kurtti et al. (2008), com a disponibilidade de ferramentas genômicas, as linhagens de células de carrapatos se tornaram extremamente importantes como um complemento para estudos de determinadas doenças e também como modelo para genômica funcional dos patógenos e carrapatos.

Quanto à caracterização celular com uso de biomarcadores em linhagens de células de carrapatos, há pouquíssimo relato na literatura. Esteves et al. (2008) utilizaram a Rodamina 1,2,3 para avaliar a atividade mitocondrial que evidenciou alta taxa de metabolismo respiratório nas células de linhagem de *R. microplus* BME-26. Dessa forma, no presente estudo, as populações celulares da linhagem IBU/ASE-16 puderam ser identificadas por meio de biomarcação e este fato é realmente novo para a literatura. Além disso, foi possível verificar a capacidade proliferativa das diferentes células, bem como, análise das fases do ciclo celular, avaliação do potencial elétrico mitocondrial, apoptose e necrose.

As células da linhagem IBU/ASE-16 com 10-15 dias de cultivo, analisadas por citômetro de fluxo, mostraram expressivas populações de células-tronco e, após 20-35 houve diminuição destas células, e aumento das diferenciadas (maduras). Estudos utilizando culturas primárias de células de intestino médio de lepidópteros já destacavam que a morfologia celular é um importante requisito para distinguir a maturidade celular (LOEB; HAKIM, 1996; SADRUD-DIN et al., 1996). Hakim et al. (2009, 2010), salientaram a relevância dessas células como modelo para estudar o desenvolvimento, fisiologia e resposta para intoxicações do epitélio do intestino desses insetos. Castagnola et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes aos do presente estudo, ao analisarem células do intestino médio de larvas do lepidóptero *Heliothis virescens* por citometria de fluxo. Esses autores discriminaram quantitativamente células maduras (diferenciadas) de células tronco (indiferenciadas) em culturas primárias. Ainda demonstraram a utilidade do citômetro de fluxo para monitorar a proliferação e a diferenciação de células-tronco.

O ensaio proliferativo utilizando-se o marcador carboxifluoresceína (CFSE - *Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl Ester* - Molecular Probes) confirmou a grande capacidade proliferativa das células da linhagem IBU/ASE-16. Desde a sua introdução em 1994, a técnica de diluição do corante CFSE, tornou-se a melhor maneira para se monitorar a divisão celular vinculada à diferenciação dos linfócitos e células hematopoiéticas. Também tem sido usada para a investigação da cinética de proliferação durante respostas imunes (LYONS; DOHERTY 2004, LYONS et al. 2001). Estes autores, também verificaram em linfócitos B ou T, mais de oito divisões sequenciais.

Carboxyfluorescein diacetato succinimidil éster é um corante que se divide igualmente entre células-filhas com notável fidelidade. Esse corante tem sido mais eficiente nesse tipo de marcação quando comparado a outros. Técnicas como a incorporação de bromodeoxiuridina permitem a visualização de um número limitado de divisões celulares, enquanto que a incorporação de timidina tritiatada serve apenas para quantificar a proliferação.

O perfil do ciclo celular de cada população de células corresponde ao seu estágio funcional, ou seja, as células-tronco mais primitivas estão em estado quiescente (em G0 do ciclo). A maioria das células-tronco que estão se auto renovando estão em G1 e ciclam lentamente. Aquelas que já estão comprometidas com alguma diferenciação estão ativamente no ciclo celular em efetiva expansão (FURUKAWA, 1998). Estas informações corroboram os resultados obtidos no presente estudo, onde a distribuição das populações de células IBU/ASE-16 nos períodos de 10 a 35 dias mostrou aumento significativo das células nas fases G0/G1 e G2/M, do ciclo celular.

No presente estudo as células da linhagem IBU/ASE-16 quando submetidas à análise do $\Delta\psi_m$ pelo fluorocromo Rodamina 123 por citometria de fluxo, mostraram alta atividade mitocondrial, confirmando a viabilidade das células da linhagem IBU/ASE-16, e também corroborando os outros parâmetros estudados, como a proliferação e a diferenciação dessas células. Esteves et al. 2008 utilizaram marcação com Rodamina 123 em células de carrapato da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (linhagem BME26), porém não avaliaram o $\Delta\psi_m$, por citometria de fluxo.

O potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\psi_m$) é um indicador da saúde ou injúria da célula. A avaliação do $\Delta\psi_m$ através de corantes fluorescentes, (também chamados de sondas fluorescentes), tem se tornado uma valiosa ferramenta para monitorar

alterações no comportamento fisiológico da mitocôndria, e suas implicações na capacidade desta organela gerar ATP por fosforilação oxidativa (PERRY et al., 2011).

Segundo Ehrenberg et al. (1988) e Johnson et al. (1981) as sondas fluorescentes são compostos catiônicos tipicamente lipofílicos, e acumulam-se no espaço interno da mitocôndria (matriz mitocondrial) na proporção inversa ao $\Delta\psi_m$. Assim, quanto mais negativo for o $\Delta\psi_m$, (ou seja, mais polarizado), maior quantidade de corante irá acumular-se no interior da matriz e vice-versa (PERRY et al., 2011).

Esse potencial negativo é consequência do bombeamento de H^+ , que ocorre da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, realizado pela cadeia transportadora de elétrons (cadeia respiratória). Além desse potencial, também se forma um gradiente de concentração transmembrânico (pH). Ao serem transportados pelas proteínas da membrana interna da mitocôndria, os elétrons (vindos da NADH e da $FADH_2$), liberam energia que permitirá a expulsão dos H^+ para fora da matriz, contra o seu gradiente de concentração ($[H^+]_{\text{interno}} < [H^+]_{\text{externo}}$). A tendência desses H^+ é voltar para o interior da matriz. Porém, a membrana mitocondrial interna é impermeável aos H^+ , e estes então terão que passar pelos complexos protéicos localizados nessa membrana. Essa volta de H^+ é realizada pela força próton-motriz, que é a soma do potencial elétrico mais gradiente de concentração. Ao passarem pelo complexo ATP-sintase, produzirão energia necessária para a ligação do ADP com o P_i , originando então o ATP.

O $\Delta\psi_m$, destaca-se por sua disponibilidade, alta sensibilidade, especificidade, não invasibilidade, além da baixa interferência em processos metabólicos subjacentes. As alterações no acúmulo desse corante produzem mudanças no sinal de fluorescência, indicando mudanças no $\Delta\psi_m$ (CHEN et al., 1982; CHEN LB., 1988; EMAUS et al., 1986).

As células da linhagem IBU/ASE-16 foram fortemente marcadas pela Caspase -3 fosforilada. Isto, a princípio, poderia contradizer a marcação pela AnexinaV, onde se observa a ausência de células em apoptose. Segundo Fernando et al. (2002) a Caspase -3, é uma proteína conhecida como promotora de apoptose, mas, também é requerida para a diferenciação celular. Estudos prévios relataram que a Caspase-3 está envolvida na regulação de funções não apoptóticas, como por exemplo, na extrusão nuclear no epitélio do cristalino, na diferenciação de queratinócitos e na ativação de linfócitos T (ALAM et al, 1999; ISHIZAKI et al, 1998; WEIL et al, 1999). Os dados, em conjunto estão de acordo com a expressão do marcador de proliferação celular Ki-

67 utilizado em células da linhagem IBU/ASE-16, e sugerem que efetores de morte pró-apoptótica também podem desempenhar papéis importantes em vários processos de diferenciação celular. Segundo Fernando et al. (2002), a elevada atividade da Caspase-3 é normalmente associada à diferenciação e não estritamente à apoptose, o que foi corroborado pelos resultados obtidos na nossa pesquisa.

Em relação a boa expressão da ciclina D1 nas células da linhagem IBU/ASE-16 os resultados do presente estudo estão de acordo com as propriedades dessa proteína. As ciclinas são subunidades reguladoras das quinases dependentes de ciclina (cdks) que exercem papel fundamental na coordenação do ciclo celular. A ciclina D1 é uma proteína de 36 kD, que está ativa na fase G1 do ciclo, formando complexos com as quinases CDK4 e CDK6, iniciando assim uma cascata de sinalizações, que fazem com que as células passem pelo ponto de restrição (em G1) e o ciclo celular possa progredir (GUERRA et al.2005). Estes autores salientaram o importante papel que ciclina D1 exerce na proliferação celular.

A expressão da proteína p53 nas células IBU/ASE-16, sugere que estas estão em G1, aguardando que a fase S se complete e assim possam continuar a progressão do ciclo celular. Essa proteína medeia o ponto de checagem em G1, sendo fundamental para a manutenção da integridade celular. Desempenha importante papel no desencadeamento de senescência, apoptose e detenção do ciclo celular em praticamente todos os tipos de células (VOUSDEN; LANE, 2007), permitindo a ação de mecanismos de reparo do DNA ou de remoção de células danificadas através do processo de apoptose (LEMOINE, 1990). Danos no DNA promovem a superexpressão e consequente ativação da p53, resultando na parada do ciclo celular em G1 e iniciando o reparo do DNA. Depois de realizado o reparo, a p53 aumenta a transcrição da proteína mdm-2 que age como inibidora da p53. A proteína mdm-2 se associa à p53, revertendo o bloqueio do ciclo celular e promovendo o avanço para a fase S (SHERR, 2000).

As células da linhagem IBU/ASE-16, foram fortemente marcadas pela proteína Bcl-2, repressora de morte celular. Esse marcador biológico pertence a uma família de proteínas que compartilham aspectos estruturais, e desempenha um papel importante regulando positivamente e negativamente as vias apoptóticas mitocondriais (VOUSDEN; LANE, 2007). A família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e

repressoras de morte por apoptose que participam ativamente da regulação da apoptose (BORNER, 2003). Seus membros, como Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são chamados de reguladores antiapoptóticos. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (HENGARTNER, 2000). A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabiliza o potencial de membrana da mitocôndria (VANDER HEIDEN; THOMPSON, 1999). A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas.

A literatura relacionada aos marcadores de superfície utilizados no presente trabalho é inexistente, quando se trata de células de carrapatos. A maioria das pesquisas que utilizam marcadores de superfície, foi realizada com células de mamíferos, e mesmo assim é grande ainda a controvérsia e o conflito sobre a positividade ou negatividade em sua expressão. Nesse sentido, Mafi et al. (2011) fizeram uma revisão da literatura resumindo todas as informações disponíveis sobre a caracterização da superfície celular, da expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais humanas. Esses autores ressaltaram a importância do emprego de biomarcadores na caracterização das células de uma linhagem, que pode revelar características celulares, bioquímicas e moleculares, pelas quais processos normais e anormais, podem ser reconhecidos ou monitorados.

A ausência de expressão nas células da linhagem IBU/ASE-16, para o marcador CD34, uma proteína que se expressa em células precursoras hematopoiéticas, e que desempenha um papel importante na hematopoiese precoce, sugere a ausência dessas células na linhagem estudada. No lugar do sangue dos vertebrados, os carrapatos possuem hemolinfa, um fluido que contém vários tipos celulares. Assim como existem as células sanguíneas no sangue dos vertebrados, em invertebrados existem os hemócitos, que podem ser classificados em: pro-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos e oenócitos. Os pro-hemócitos são as células-tronco que darão origem aos outros tipos celulares da hemolinfa. Infelizmente não há dados disponíveis sobre a caracterização das células da hemolinfa de carrapatos com marcadores. Ling et al. (2005) constataram que a diferenciação dos hemócitos, dentro dos órgãos linfáticos larvais do bicho-da-seda *Bombyx mori*, não é demorada, bastando de 10 a 30 minutos de cultura de hemócitos isolados, para aparecerem muitos granulócitos e plasmatócitos jovens. Pode ser que no momento do nosso ensaio, essas

células que expressar CD34, já não estivessem mais presentes. Também é possível que este marcador não seja expresso para a formação do tubo vascular ou pericardiaco existentes nos sinus de carrapatos.

O anticorpo CD4, é uma molécula que se expressa na superfície de algumas células T, macrófagos, monócitos e na célula dendrítica. A linhagem IBU/ASE-16, mostrou células CD4 positivas. Isto sugere que, nesta linhagem, o CD4 marcou células de origem plasmocíticas, com função fagocitária.

No presente estudo os marcadores Stro-1, Nanog e Oct-3/4 foram fortemente expressos, demonstrando a origem, a manutenção e a pluripotência das células-tronco indiferenciadas. Estes marcadores são fatores de transcrição envolvidos na regulação da supressão de genes que levam à diferenciação e manutenção da pluripotência, sendo, portanto, fundamentais para a auto-renovação e permanência dessas células em estado indiferenciado (LIN et al., 2005; SICLARI; QIN, 2010).

O marcador CD117 foi expresso nas células da linhagem IBU/ASE-16, o que indica a existência de precursores melanocíticos e melanócitos diferenciados. Outro aspecto relevante foi a presença de células esféricas que apresentaram em seu citoplasma pigmentos de coloração acastanhada. Gibson; Cooper (2002) afirmaram que esse marcador é expresso em uma variedade de tipos celulares, incluindo os melanócitos. Miettinen; Lasota (2005) realizaram uma revisão sobre a expressão do CD117 em tecidos humanos, normais e neoplásicos e também encontraram expressão desse marcador em melanócitos epidermais normais e tumorais. Além disso, estes autores salientaram que o CD117 é importante para o próprio desenvolvimento e diferenciação do melanócito normal.

Para o marcador CD133, que é uma glicoproteína transmembrana de superfície celular, as células da linhagem IBU/ASE-16 foram positivas, indicando a presença de precursores neurais. Essa proteína, foi inicialmente reconhecida como um marcador de células-tronco neuroepiteliais, sendo depois utilizada também como marcador para muitos tecidos normais e tumorais (SICLARI; QIN, 2010). Este marcador é expresso em diversas células epiteliais, como por exemplo em neuroepitélio de murino (SHMELKOV et al. 2008). Outra informação interessante sobre este marcador, está no trabalho de Tang et al. (2012), que reportam o fato de que essa proteína é utilizada como marcador de células iniciadoras de tumor no fígado. Recentemente, o CD133, foi reconhecido como sendo um biomarcador “chave” para o isolamento e a

caracterização de células-tronco, além de atuar no crescimento celular (ZHONG, 2013).

As células da linhagem IBU/ASE-16, também foram positivas para o CD90 ou Thy-1, e para o CD 105, porém essa marcação não foi expressiva para ambos, quando comparada aos demais marcadores utilizados no presente estudo. Resultado semelhante a este foi obtido por Tsai et al. (2004), quando do isolamento de células-tronco mesenquimais (MSCs) humanas do fluido amniótico obtido por amniocentese (2º trimestre).

As células da linhagem IBU/ASE-16 foram positivas para o marcador VEGF-R1. O VEGF é essencial para a sobrevivência da célula endotelial, e liga-se especificamente a dois receptores de membrana com função de tirosine cínase, Flt-1 (fms-like tyrosine kinase-1 receptor) e KDR/Flk-1 (kinase insert domain-containing receptor). VEGFR-1 e o VEGFR-2 estão envolvidos com a capacidade de induzir formação de vasos, visto que são fatores de crescimento endotelial vascular. O VEGFR-1 também estimula o recrutamento de células-tronco (ERIKSSON; ALITALO, 2002; KAYA et al., 2002). Esses fatores associados aos seus receptores de alta afinidade de ligação, (tirosina-quinases Flt-1 e Flk-1 ligantes de VEGFR-1 e VEGFR-2 respectivamente), são considerados importantes para o desenvolvimento da vasculatura embrionária (DE VRIES et al., 1992; RAHIMI, 2006; SHIBUYA et al., 1990). Fong et al. (1995) demonstraram que Flt-1 é fundamental para a organização da vasculatura embrionária, pois embriões de ratos homozigóticos com uma mutação de Flt-1, morreram intrauterinamente, devido à má formação dos vasos sanguíneos, provocada pelo aumento do número de progenitores endoteliais, levando à desorganização vascular. O sistema circulatório de carrapato, apesar de não possuir vasos para a canalização da hemolinfa venosa (aferentes), possui um coração, vasos arteriais (eferentes) e sinus bem desenvolvidos (OBENCHAIN; OLIVER, 1976). Dessa forma, os resultados encontrados com esse marcador nas células de linhagem IBU/ASE-16 corroboram com a literatura, especialmente sobre a expansão e aumento da atividade secretória de células mesenquimais. Obenchain e Oliver (1975) relataram o envolvimento de tecidos endocrinológicos, reportando a existência e a origem de células mesenquimais em *Dermacentor variabilis*. A baixa expressão dos marcadores mesenquimais são justificados por essas observações, bem como a presença de uma

organização dos vasos arteriais e da parede dos sinus como um tecido do tipo cardiosinusal.

Com relação ao teste de tumorigênese em células-tronco permite avaliar o potencial teratogênico dessas células. No presente estudo as células IBU/ASE-16, não induziram tumorigênese. Wenceslau (2009), analisando o potencial teratogênico em células progenitoras fetais de cães, sugeriu que as mesmas podem ser utilizadas em terapia celular para esses animais, pois seus resultados foram negativos para a formação de tumores.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O meio mais indicado para cultivar células embrionárias do carrapato *A. sculptum* é o L-15 B completo, suplementado com 10% de SBF.
- A idade ideal da massa de ovos para se iniciar o cultivo de células embrionárias de carrapatos é pouco acima da metade do período de incubação da espécie.
- O peso da massa de ovos de 0,13g, quando no período ideal de incubação de *A. sculptum*, possui células suficientes para dar início ao cultivo celular.
- Após o descongelamento, as células de *A. sculptum* demoram até mais ou menos 30 dias para retomarem seu ritmo normal de proliferação.
- O tempo para o estabelecimento da linhagem IBU/AS-16, foi de aproximadamente um ano.
- O sequenciamento gênico evidenciou que a espécie que deu a origem à linhagem celular é de fato *Amblyomma sculptum*.
- Os cultivos celulares de *A. sculptum* mostraram-se eficientes para o crescimento de bactérias *R. parkeri* e *R. bellii* bem como de tripanossomatídeos *T. theileri* e *L. i.chagasi*.
- As células de linhagem IBU/AS-16 possuem receptores para os marcadores (anticorpos) usados evidenciando a presença de células-tronco e tipos celulares diferenciados.

8 CONCLUSÕES

- A linhagem celular do carrapato da espécie *A. sculptum*, obtida a partir de massas de ovos embrionados, foi estabelecida e denominada IBU/ASE-16.
- As células da linhagem IBU/ASE-16 foram caracterizadas através de biomarcadores.

REFERÊNCIAS*

- ABARCA, K.; LÓPEZ, J.; ACOSTA-JAMETT, G.; LEPE, P.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. A third *Amblyomma* species and the first tick-borne rickettsia in Chile. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 1, p. 219-222, 2012.
- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M.; LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 1, p. 126-132, 2007.
- ALAM, A.; COHEN, L. L.; AOUAD, S.; SÉKALY, R. P. Early Activation of Caspases during T lymphocyte Stimulation Results in Selective Substrate Cleavage in Nonapoptotic Cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.190, n. 11, p. 1879-1890, 1999.
- ALECRIM, I.; PINTO, B.; ÁVILA, T.; COSTA, R.; PESSOA, I. Registro do primeiro caso de infecção humana por *Babesia* spp. no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 12, n.1, p. 11-29, 1983.
- ALMEIDA, R. F. C.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; MATIAS, J.; SILVA, E. A.; MATOS, M. F. C.; ANDREOTTI, R. Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: first report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 60, p. 63-72, 2013.
- ALMEIDA, R. F.C.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; MATIAS, J.; LABRUNA M. B.; ANDREOTTI, R. The first report of *Rickettsia* spp. in *Amblyomma nodosum* in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, p. 156–159, 2013.
- BALDANI, C. D.; HILARIO, E.; NAKAGHI, A. C. H.; BERTOLINI, M.C; MACHADO, R. Z. Produção da proteína recombinante EMA-1 e sua aplicação para o diagnóstico baseado no imuno ensaio enzimático de *Theileria equi* em equinos do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 54-60, 2011.
- 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 and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 3, p. 147-153, 2013.
- BARKER, T. H.; HAGOOD, J. S. Getting a grip on Thy-1 signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, n. 5, p. 921-923, 2009.

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

BARROS-BATTESTI, D. M.; LANDULFO, G. A.; LUZ, H. R.; MARCILI, A.; ONOFRIO, V. C.; FAMADAS, K. M. *Ornithodoros faccinii* n. sp. (Acari: Ixodida: Argasidae) parasitizing the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, p.1-11, 2015.

BATISTA, I. F.; CHUDZINSKI-TAVASSI A. M.; FARIA, F.; SIMONS, S. M.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; LEÃO, L. I.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE- AZEVEDO, I. L. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Toxicon**, v. 51, n. 5, p. 823-834, 2008.

BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; GUGLIELMO, A. A.; CÁCERES, A. G.; GUZMÁN-CORNEJO, C.; LÉON, R.; DURDEN, A. L.; FACCINI, J. L. H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 1-20, 2013.

BEELE, E.; ABRAMOWICZ, K. F.; ZAMBRANO, M. L.; STURGEON, M. M.; KHALAF, N.; HU, R.; DASCH, G. A.; EREMEEVA, M. E. A focus of dogs and *Rickettsia massiliae*-infected *Rhipicephalus sanguineus* in California. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 244-249, 2011.

BELL-SAKYI, L. Continuous cell lines from the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Journal of Parasitology**, v. 77, n. 6, p. 1006-1008, 1991.

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

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

BELL-SAKYI, L.; KOHL, A.; BENTE, D. A.; FAZAKERLEY, J. K. Tick Cell Lines for Study of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus and Other Arboviruses. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.12, n.9, p. 769-781, 2012.

BHAT, U. K.; 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.

BHAT, U. K. M.; MAHONEY, D. F.; WRIGHT, I. G. The invasion and growth of *Babesia bovis* in tick tissue culture. **Experientia**, v. 35, p. 752-753, 1979.

BILLETER, S. A.; DINIZ, V. P.; BATTISTI, M. J.; MUNDERLOH U. G.; BREITSCHWERDT, E. B.; LEVY, M. G. Infection and replication of *Bartonella* species within a tick cell line. **Experimental and Applied Acarology**, v. 49, p. 193-208, 2009.

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

BLAIR, P. J.; SCHOELER, G. B.; MORON, C.; ANAYA, E.; CACEDA, R.; CESPEDES, M.; CRUZ, C.; FELICES, V.; GUEVARA, C.; HUAMAN, A.; LUCKETT, R.; MENDOZA, L.; RICHARDS, A. L.; RIOS, Z.; SUMNER, J. W.; VILLASECA, P.; OLSON, J. G. Evidence of rickettsial and leptospira infections in Andean northern Peru. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 4, p. 357-363, 2004.

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

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 11, p. 615- 647, 2003.

BURDEN, R. E.; GORMLEY, J. A.; JAQUIN, T. J.; SMALL, D. M.; QUINN, D. J.; HEGARTY, S. M.; WARD, C.; WALKER, B.; JOHNSTON, J. A.; OLWILL, S. A.; SCOTT, C. J. Antibody-mediated inhibition of cathepsin S blocks colorectal tumor invasion and angiogenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 19, p. 6042-6051, 2009.

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

CALIC, S. B.; GALVÃO, M. A. M.; BACELLAR, F.; ROCHA, C. M. B. M.; MAFRA, C. L.; LEITE, R. C.; WALKER, D. H. Human Ehrlichioses in Brazil: First Suspect Cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 268-262, 2004.

CARDOSO, L.; YISASCHAR- MEKUZAS, Y.; RODRIGUES, F. T.; COSTA, A.; MACHADO, J.; DIZ-LOPES, D.; BANETH, G. Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2010.

CASTAGNOLA, A.; EDA, S.; JURAT-FUENTES, J. L. Monitoring stem cell proliferation and differentiation in primary midgut cell cultures from *Heliothis virescens* larvae using flow cytometry. **Differentiation**, v. 1, p. 192-198, 2011.

CHEN, L. B. Mitochondrial membrane potential in living cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 4, p. 155-181, 1988.

CHEN, L. B.; SUMMERHAVES, I. C.; JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; BERNAL, S. D.; LAMPIDIS, T. J. Probing Mitochondria in Living Cells with

Rhodamine 123. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 46, n. 1, p. 141-155, 1982.

CIRELLI-MORAES, A. YOSHINARI, N. H.; FONSECA, A. H.; KURTTI, T.; MUNDERLOH, U.; LABRUNA, M. B.; MENDONÇA, R. Z.; BARROS-BATTESTI, D.M. Primary culture of embryonic cells of *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma rotundatum*, *Ixodes schulzei* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **XIII International Congress of Acarology**, p.57, 2010.

COQUERET, O. New roles for p21 and p27 cell cycle inhibitors: a function for each cell compartment? **Trends in Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 65-70, 2003.

COSSIO-BAYUGAR, R.; MIRANDA-MIRANDA, E. Heterologous gene expression in a cattle tick *Rhipicephalus microplus* embryonic cell culture. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 6, n. 10, p. 1214-1218, 2007.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**, 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*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

DANTAS-TORRES, F.; VENZAL, J. M.; BERNARDI, L. F.; FERREIRA, R. L.; ONOFRIO, V. C.; MARCILI, A.; BERMÚDEZ, S. E.; RIBEIRO, A. F.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari: Argasidae) from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 98, n.1, p. 36-45, 2012.

DE VRIES, C.; ESCOBEDO, J. A.; UENO, H.; HOUCK, K.; FERRARA, N.; WILLIAMS, L. T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. **Science**, v. 255, p. 989-991, 1992.

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*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

DUMLER, J. S.; MADIGAN, J. E.; PUSTERLA, N.; BAKKEN, J. S. Ehrlichioses in humans: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 45, p. 45-51, 2007.

EHRENBERG, B.; MONTANA, V.; WEI, M. D.; WUSKELL, J.P.; LOEW, L. M. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution cationic dyes. **Biophysical Journal**, v. 53, n. 5, p. 785-794, 1988.

EIDE, P. E.; CALDWELL, J. M. A method for obtaining primary culture of dispersed embryonic tissue from the lone star tick, *Amblyomma americanum*. North Dakota-USDA. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 66, n. 4, p. 891-893, 1973.

EMAUS, R. K.; GRUNWALD, R.; LEMASTERS, J. J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 850, n. 3, p. 436-448, 1986.

ERIKSSON, U.; ALITALO, K. VEGF-R1 receptor 1 stimulates stem-cell recruitment and new hope for angiogenesis therapies. **Nature Medicine**, v. 8, p. 775-777, 2002.

ESTEVEES, E.; LARA, F. A.; LORENZINI, D. M.; COSTA, G. H.; FUKUZAWA, A. H.; PRESSINOTTI, L. N.; SILVA, J. R.; 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**, v. 38, n. 5, p. 568-580, 2008.

FERNANDO, P.; KELLY, J. F.; BALAZSI, K.; SLACK, R. S.; MEGENEY, L. A. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 17, p. 11025-11030, 2002.

FERRARI, F. A.; GODDARD, J.; M ORARU, G .M.; SMITH, W. E.; VARELA-STOKES, A. S. Isolation of "Candidatus Rickettsia andeanea" (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in embryonic cells of naturally infected *Amblyomma maculatum* (Ixodida: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 5, p. 1118-1125, 2013.

FONG, G. H.; ROSSANT, J.; GERTSENSTEIN, M.; BREITMAN, M. L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. **Nature**, v. 376, p. 66-70, 1995.

FONSECA, A. H.; SALLES, R. S.; SALLES, S. A. N.; MADUREIRA, R. C.; YOSHINARI, N. H. Borreliose de Lyme simile: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 2, p. 171-178, 2005.

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.

FURUKAWA, Y. Cell cycle regulation of hematopoietic stem cells. **Human Cell**, v. 11, n.2, p. 81-92, 1998.

GAW, Z. Y.; LIU N. T.; ZIA T. U. Tissue culture methods for the cultivation of virus grasserie. **Acta Virologica**. v. 3 (Suppl), p. 55-60, 1959.

GIBSON, P. C.; COOPER, K. CD117 (KIT): a diverse protein with selective applications in surgical pathology. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 9, n.1, p.65-69, 2002.

GIMENEZ, D. F. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. **Stain Technology**, v. 39, p. 135 -140, 1964.

GRACE, T. D. C. Establishment of four strains of cells from Insect Tissues Grown *in vitro*. **Nature**, v. 195, p. 788-789, 1962.

GRASPERGE, B. J.; MORGAN, T. W.; PADDOCK, C. D.; PETERSON, K. E.; MACALUSO, K. R. Feeding by *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) Enhances *Rickettsia parkeri* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Infection in the Skin. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 4, p. 855-863, 2014.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUERRA, E. N. S.; PAULA, E. C.; OLIVEIRA, J. C.; JÚNIOR, D. S. P.; ARAÚJO, V. C.; ARAÚJO, N. S. Cyclin D1 and p16 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: correlation with TMN classification and location. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, n.1, p. 31-37, 2005.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical zoogeographical region. **International Consortium of Ticks and Tick-borne Diseases**, Houten, Holanda, 173 p, 2003.

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-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental & Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83-100, 2006.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R.G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, 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.

GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): valid, synonyms, incertae sedis, nomina dubia, nomina nuda, lapsus, incorrect and suppressed names - with notes on confusions and misidentifications. **Zootaxa**, v. 3767, n.1, p. 001-256, 2014.

HAKIM, R. S.; CACCIA, S.; LOEB, M.; SMAGGHE, G. Primary culture of insect midgut cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 45,p. 106-110, 2009.

HAKIM, R. S.; BALDWIN, K.; SMAGGHE, G. Regulation of Midgut Growth, Development, and Metamorphosis. **Annual Review of Entomology**, v.55, p. 593-608, 2010.

HEEKIN, A. M.; GUERRERO, F. D.; BENDELE, K. G.; SALDIVAR, L.; SCOLES, G. A.; DOWD, S. E.; GONDRO, C.; NENE, V.; DJIKENG, A.; BRAYTON, K. A. Gut transcriptome of replete adult female cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, feeding upon a *Babesia bovis*-infected bovine host. **Parasitology Research**, v. 112, n. 9, p. 3075-3090, 2013.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HERNÁNDEZ, M. S.; CASTELLANO, M. A.; MARTÍNEZ, R. P.; PÉREZ, B. S.; GONZÁLEZ, J. B.; SIBELLO, A. S. Pesquisaje de *Babesia* en trabajadores agropecuarios y donantes en La provincia de Ciego de Ávila. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 135-139, 1997.

HOOGSTRAAL, H. Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Advances in Parasitology**, v. 24, p. 135-238, 1985.

ISHIZAKI, Y.; JACOBSON, M. D.; RAFF, M. C. A Role for Caspases in Lens Fiber Differentiation. **Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 1, p. 153-158, 1998.

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.

JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; BOCKUS, B. J.; CHEN, L. B. Monitoring of Relative Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells by Fluorescence Microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 88, p. 526-535, 1981.

KAYA, M.; WADA, T.; KAWAGUCHI, S.; NAGOYA, S.; SHINDOH, M.; HIGASHINO, F.; MEZAWA, F.; OKADA, F.; ISHII, S. Increased pre-therapeutic serum vascular endothelial growth factor in patients with early clinical relapse of osteosarcoma. **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 6, p. 864-869, 2002.

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.

KIM, J. Y.; CHO, S. H.; JOO, H. N.; TSUJI, M.; CHO, R. S.; PARK, I. J.; CHUNG, G. T.; JU, W. J.; CHEUN, H. I.; LEE, H. W.; LEE, Y. H.; KIM, T. S. First case of human babesiosis in Korea: detection and characterization of a novel type of *Babesia* sp. (KO1) similar to ovine babesia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, N. 6, p. 2084-2087, 2007.

KNOWLES, D. JR. Equine babesiosis (Piroplasmosis): a problem in the international movement of horses. **British Veterinary Journal**, v. 152, n. 2, p. 123-126, 1996.

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

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

KURTTI, T. J.; MATTILA, J. T.; HERRON, M. J.; FELSHEIM, R. F.; BALDRIDGE, G. D.; BURKHARDT, N. Y.; BLAZAR, B. R.; HACKETT, P. B.; MEYER, J. M.; MUNDERLOH, U. G. Transgene expression and silencing in a tick cell line: a model system for functional tick genomics. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 963-968, 2008.

LABRUNA, M. B.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R. Study of the Weight of Eggs from Six Ixodid Species from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n.2, p. 205-207, 1997.

LABRUNA, M. B.; FUGISAKI, E. Y. Y; PINTER, A.; DUARTE, J. M. B.; SZABÓ, M. J. P. Life cycle and host specificity of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental & Applied Acarology**, v.30, n. 4, p. 305-316, 2003.

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

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. **Experimental and Applied Acarology**, v. 43, p. 147-160, 2007.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M.; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON, P. C.; STICH, R. W.; LONG, S. W.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. A preliminary investigation of Ehrlichia species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189-195, 2007.

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

LABRUNA, M. B.; MATTAR, S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S. M.; VENZAL, J. M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; SOUSA, R.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsiosis in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Cordoba**, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, 2011a.

LEAKE, C. J.; PUDNEY, M.; VARMA, M. G. R. Studies on arboviruses in established tick cell lines. In: KURSTAK, E.; MARAMOROSCH, K.; A. DUBENDORFER, A. (eds). **Invertebrate systems in vitro**. Amsterdam: Elsevier, 1980. p. 325-335.

LEMOINE, N. R. ras oncogenes in human cancers. In: Sluyser, M. (ed) **The biology of cancer genes**. Chichester: Horwood, 1990. p. 82-118.

LEVIN, M. L.; STUDER, E.; KILLMASTER, L.; ZEMTSOVA, G.; MUMCUOGLU, K. Y. Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Experimental & applied acarology**, v. 58, n. 1, p. 51-68, 2012.

LIN, T.; CHAO, C.; SAITO, S.; MURPHY, M. E. APPELLA, E.; XU, Y. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 165-171, 2005.

LING, E.; SHIRAI, K.; KANEKATSU, R.; KIGUCHI, K. Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. **Cell and Tissue Research**, v. 320, p. 535-543, 2005.

LOEB, M. J.; HAKIM, R. S. Insect Midgut Epithelium In Vitro: an Insect Stem Cell System. **Journal of Insect Physiology**, v. 42, n. 11-12, p. 1103-1111, 1996.

LOPES, C. M. L.; OLIVEIRA, P. R.; HADDAD, J. P.; DOMINGUES, L. N.; PINHEIRO, R. R.; BORGES, L. M. F.; LABRUNA, M. B.; LEITE, R. C. Biological parameters of ticks (*Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) under field and laboratory conditions in Pedro Leopoldo, estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 14-17, 2008.

LYONS, A. B.; HASBOLD, J.; HODGKIN, P. D. Flow cytometric analysis of cell division history using dilution of CFSE, a stably integrated fluorescent probe. **Methods Cell Biol.**, v. 63, p. 375-398, 2001.

LYONS, A. B.; DOHERTY, K. V. Flow cytometric analysis of cell division by dye dilution. **Current Protocols in Cytometry**, Chapter 9: Unit 9.11, 2004.

MAFI, P.; HINDOCHA, S.; MAFI, R.; GRIFFIN, M.; KHAN, W. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature. **The Open Orthopedics Journal**, v. 5, p. 253-260, 2011.

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.

MANTOVANI, E.; COSTA I. P.; GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L. N.; HIGUCHI, M. L.; YOSHINARI, N. H. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. Is it a new tick borne disease or Lyme disease variation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 443-456, 2007.

MANTOVANI, E.; MARANGONI, R. G.; GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L.; YOSHINARI, N. H. Amplification of the *flge* gene provides evidence for the existence of a brazilian borreliosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 3, p. 153-157, 2012.

MARATHE, A.; TRIPATHI, J.; HANDA, V.; DATE, V. Human babesiosis—a case report. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 267-269, 2005.

MARTINS, J. R.; LEITE, R.C.; DOYLE, R.L. Tripanosomatides like *Trypanosoma theileri* in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 113-114, 2008.

MARTINS, T. F. **Estudo do complexo *Amblyomma cajennense* no Brasil**. 2014.113f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MARTINS, M. E. P.; MARTINS, K. C. S. Riquetsioses (*Rickettsia* spp.) transmitidas por carrapatos. **Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v. 10, n. 18, p. 2739, 2014.

MATIAS, J.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; AGUIRRE, A. A. R.; BARROS, J. C. CSORDAS, B. G.; ANDREOTTI, R. Spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma dubitatum* tick from the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, p. 107–110, 2015.

MATILA, 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). **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 6, p. 1091-1101, 2007.

MEALEY, , R. H.; KAPMEYER, L. S.; UETI, M. W.; WAGNER, B.; KNOWLES, D. P. Protective Effects of Passively Transferred Merozoite-Specific Antibodies against *Theileria equi* in Horses with Severe Combined Immunodeficiency. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 10, n. 1, p. 100-104, 2012.

MEDEIROS, A. P.; SOUZA, A. P.; 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 926-930, 2011.

MEDVEDEVA, G. I.; BESKINA, S. R.; GROKHOVSKAYA, I. M. Culture of ixodid tick embryonic cells. **Medical Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 39-40, 1972.

MIETTINEN, M.; LASOTA, J. KIT (CD117): A Review on Expression in Normal and Neoplastic Tissues, and Mutations and Their Clinicopathologic Correlation. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 13, n. 3, p. 205-220, 2005.

MONJE, L. D.; NAVA, S.; ANTONIAZZI, L. R.; COLOMBO, V. C.; BELDOMENICO, P. M. In vitro isolation and infection intensity of *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* ticks from the Paraná River Delta region, Argentina. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 14, p. 924-927, 2014.

MONGE, L. D.; NAVA, S.; EBERHARDT, A. T.; CORREA, A. I.; GUGLIELMONE, A. A. BELDOMENICO, P. M. Molecular Detection of the Human Pathogenic *Rickettsia* sp. Strain Atlantic Rainforest in *Amblyomma dubitatum* Ticks from Argentina. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 2, p.167-169, 2015.

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

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, p.141-174, 2003.

MORAES-FILHO, J. **Competência vetorial de carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* do Brasil, Argentina e Uruguai para a transmissão da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina.** 2013. 59 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MORZARIA, S. P.; LATIF, A. A.; JONGEJAN, F.; WALKER, A. R. Transmission of a *Trypanosoma* sp. to cattle by the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Veterinary Parasitology**, v.19, p. 13-21, 1986.

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

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.

MUNDERLOH, U. G.; MADIGAN, J. E.; DUMLER, J. S.; GOODMAN, J. L.; HAYES, S. F.; BARLOUGH, J. E.; NELSON, C. M.; KURTTI, T. J. Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 664- 670, 1996.

NAVA, S. Avances en el conocimiento de los principales vectores de *Rickettsia* en Latinoamérica. **Acta Médica Costarricense**, IV Congreso Latinoamericano de Enfermedades Ricktsiales, Suplemento 1, 2013.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of taxonomic status of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of the 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 and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252-276, 2014.

NAVA, S.; BARBIERI, A. M.; MAYA, L.; COLINA, R.; MANGOLD, A. J.; LABRUNA, M. B.; VENZAL, J. M. *Borrelia* infection in *Ixodes pararicinus* ticks (Acari: Ixodidae) from northwestern Argentina. **Acta Tropica**, v. 139, p. 1-4, 2014.

NIERI-BASTOS, F. A. **Avaliação da infecção de *Rickettsia parkeri* em carrapatos da espécie *Amblyomma triste***. 2012. 66 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NIERI-BASTOS, F. A.; LOPES, M. G.; CANÇADO, P. H. D.; ROSSA, G. A. R.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. *Candidatus Rickettsia andeanae*, a spotted fever group agent infecting *Amblyomma parvum* ticks in two Brazilian biomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 259-261, 2014.

OBENCHAIN, F. D.; OLIVER, J. H. Neurosecretory system of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). II. Distribution of secretory cell types, axonal pathways and putative neurohemal-neuroendocrine association; comparative histological and anatomical implications. **Journal of Morphology**, v. 145, p. 269-294, 1975.

OBENCHAIN, F. D.; OLIVER, J. H. The Heart and Arterial Circulatory System of Ticks (Acari: Ixodoidea). **Journal of Arachnology**, v. 3, p. 57-74, 1976.

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

OLIVEIRA, K. A.; PINTER, A.; MEDINA-SANCHEZ, A.; BOPPANA, V. D.; WIKEL, s. k.; SAITO, T. B.; SHELITE, T.; BLANTON, L.; POPOV, V.; TEEL, P. D.; WALKER, D. H.; GALVAO, C. M.; BOUYER, D. H. *Amblyomma imitator* Ticks as Vectors of *Rickettsia rickettsii*, Mexico. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 1282- 1284, 2010.

OGRZEWALSKA, M.; SARAIVA, D. G.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; COSTA, F. B.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v. 139, p. 1283-1300, 2012.

OGRZEWALSKA, M.; LITERAK, I.; CARDENAS-CALLIRGOS, J.; CAPEK, M.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia bellii* in ticks *Amblyomma varium* Koch, 1844, from birds in Peru. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, p. 254-256, 2012.

OGRZEWALSKA, M.; MARTINS, T.; CAPEK, M.; LITERAK, I.; LABRUNA, M. B. A *Rickettsia parkeri*-like agent infecting *Amblyomma calcaratum* nymphs from

wild birds in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, p. 145-147, 2013.

PACHECO, R. C.; VENZAL, J. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1804-1805, 2006.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P.; CATROXO, M. H.; BOUYER, D. H.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia montei* sp. nov., infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5207-5211, 2011.

PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLSMITH, C. S.; GODDARD, J.; MCLELAN, S. L. F.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A. *Rickettsia parkeri*: A newly reconized cause of spotted fever rickettsiosis in United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n.6, p. 805-811, 2004.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; SOCOLOVSCHI, C.; LABRUNA, M. B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M. Y.; STENOS, J.; BITAM, I.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p. 657-702, 2013.

PEÑA, L. L.; NIETO, A. I.; PEREZ-ALENZA, D.; CUESTA, P.; CASTANO, M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, n. 3, p. 237-246, 1998.

PERRY, S. W.; NORMAN, J. P.; BARBIERI, J.; BROWN, E. B.; GELBARD, H. A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. **Biotechniques**, v. 50, n. 2, p. 98-115, 2011.

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.

PRATA, M. C. A.; DAEMON, E. Determinação do número de ovos por grama de postura de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.4, n.2, p. 81-82, 1997.

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.

RAHIMI, N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 818-829, 2006.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Review**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997.

REHACEK, J. Tissue cultures of blood-sucking arthropods and their use for the cultivation of viruses and rickettsiae. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 46, p. 197-231, 1971.

REHÁČEK, J. Use of invertebrate cell culture for study of animal viruses and rickettsiae. In: VAGO, C. (ed.) **Invertebrate tissue culture II**. New York: Academic Press, 1972. p. 280-320.

REZENDE, J.; KESSLER, R. H.; SOARES, C. O.; MARTINS, O. P. Ocorrência de *Borrelia* spp. em culturas de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 50-52, 2008.

RICKETTS, H. T. A micro-organism which apparently has a specific relationship to Rocky Mountain spotted fever. **The Journal of the American Medical Association**, v. 52, p. 379-380, 1909.

RODRIGUES, A. C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S.; DELL' PORTO, A.; MILDER, R. V.; TAKEDA, G. F.; TEIXEIRA, M. M. G. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 185-207, 2003.

SABATINI, G. S.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an atlantic rain forest reserve in the state of São Paulo, Brazil. **Journal Medical Entomology**, v. 47, p. 913-916, 2010.

SADRUD-DIN, S. Y.; LOEB, M. J.; HAKIM, R. S. In vitro differentiation of isolated stem cells from the midgut of *Manduca sexta*. **Journal of Experimental Biology**, v. 199, p. 319-325, 1996.

SAELEN, X.; FESTJENS, N.; VANDE WALLE, L.; VAN GURP, M.; VAN LOO, G.; VANDENABEELE, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, p. 2861-2874, 2004.

SAKAI, R. K.; COSTA, F. B.; UENO, T. E. H.; RAMIREZ, D. G.; SOARES, J. F.; FONSECA, A. H.; LABRUNA, M. B.; BARROS-BATTESTI, D. M. Experimental infection with *Rickettsia rickettsii* in an *Amblyomma dubitatum* tick colony, naturally infected by *Rickettsia belli*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 917-923, 2014.

SANZ-RODRIGUEZ, F.; GUERRERO-ESTEO, M.; BOTELLA, L. M.; BANVILLE, D.; VARY, C. P. H.; BERNABÉU, C. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32858-32868, 2004.

SARAIVA, D. G.; NIERI-BASTOS, F. A.; HORTA, M. C.; SOARES, H. S.; NICOLA, P. A.; PEREIRA, L. C. M.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma auricularium* ticks in Pernambuco, northeastern Brazil:

isolation, transovarial transmission, and transtadial perpetuation. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 9, p. 615-618, 2013.

SARLOMO-RIKALA, M.; KOVATICH, A. J.; BARUSEVICIUS, A.; MIETTINEN, M. CD 117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. **Modern Pathology Journal**, v. 11, n. 8, p. 728-734, 1998.

SCHEIN, E. In: RISTIC, M. (ed.) **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 197-208.

SENANAYAKE, S. N.; PAPARINI, A.; LATIMER, M.; ANDRIOLO, K.; DASILVA, A. J.; WILSON, H.; XAYAVONG, M. V.; COLLIGNON, P. J.; JEANS, P.; IRWIN, P. J. First report of human babesiosis in Australia. **The Medical Journal of Australia**, v. 196, n. 5, p. 350- 352, 2012.

SHATKIN, A. A.; BESKINA, S. R.; MEDVEDEVA, G. I.; GROKHOVSKAYA, I. M. Cultivation of the agent of enzootic abortion of sheep in a continuous cell line of tick *Hyalomma* embryonic cells. **Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni**, v. 46, p. 420-423, 1977.

SHIBUYA, M.; YAMAGUCHI, S.; YAMANE, A.; IKEDA, T.; TOJO, A.; MATSUSHIME, H.; SATO, M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene(flt) closely related to the fms family. **Oncogene**, v.5, n.4, p. 519-24, 1990.

SHMELKOV, S. V.; BUTLER, J. M.; HOOPER, A. T.; HORMIGO, A.; KUSHNER, J.; MILDE, T.; ST.CLAIR, R.; BALJEVIC, M.; WHITE, I.; JIN, D. K.; CHADBURN, A.; MURPHY, A. J.; VALENZUELA, D. M.; GALE, N. W.; THURSTON, G.; YANCOPOULOS, G. D.; D'ANGELICA, M.; KEMENY, N.; LYDEN, D.; RAFII, S. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD 133⁺ and CD 133⁻ metastatic colon cancer cells initiate tumors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 6, p. 2111-2120, 2008.

SHERR, C. J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Research**, v. 60, n. 14, p. 3689-3695, 2000.

SICLARI, V. A.; QIN, L. Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 5, p. 1-10, 2010.

SIMONS, S. M.; JÚNIOR, P. L.; FARIA, F.; BATISTA, I. F.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 443-450, 2011.

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

SKRABALO, Z.; DEANOVIC, Z. Piroplasmosis in man: report of a case. **Documenta de Medicina Geographica Et Tropica**, v. 9, n. 1, p. 11-16, 1957.

SMITH, T.; KILBORNE, F. L. Investigation into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. **Bureau of Animal Industry**, v. 1, p. 85-114, 1983.

STEERE, A. C. Lyme disease: a growing threat to urban populations. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 91, p. 2378- 2383, 1994.

SOUZA, A. P.; BELLATO, V. SARTOR, A. A.; SILVA, A. B. Prevalência de anticorpos ANTI *Babesia equi* em equinos no planalto catarinense. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 119-121, 2000.

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 the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 131-140, 2005.

SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontier in Cellular Infection Microbiology**, v. 3, p. 1-9, 2013.

TANG, K. H.; MA, S.; LEE, T. K.; CHAN, Y. P.; KWAN, P. S.; TONG, C. M.; NG, I. O.; MAN, K.; TO, K.F.; LO, C. M.; GUAN,X. Y.; CHAN, K.W. CD133 (+) liver tumor-initiating cells promote tumor angiogenesis, growth, and self-renewal through neurotensin/interleukin-8/CXL1 signaling. **Hepatology**, v. 55, n. 3, p. 807- 820, 2012.

TSAI, M. S.; LEE, J. L.; CHANG, Y. J.; HWANG, S. M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-semester amniotic fluid using a novel model two-stage culture protocol. **Human Reproduction**, v. 19, p. 1450-1456, 2004.

TOMASSONE, L.; CONTE, V.; PARRILLA, G.; DE MENEGHI, D. Rickettsia infection in dogs and *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma tigrinum* ticks, Cochabamba Department, Bolivia. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, p. 953- 958, 2010.

TRIEB, K.; KOTZ, R. Proteins expressed in osteosarcoma and serum levels as prognostic factors. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 11-17, 2001.

TROYO, A.; MOREIRA-SOTO, A.; CARRANZA, M.; CALDERÓN-ARGUEDAS, O.; HUN, L.; TAYLOR, L. Detection of an undescribed *Rickettsia* sp. in *Ixodes boliviensis* from Costa Rica. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 883-886, 2014.

TULLY, J. G.; ROSE, D. L.; YUNKER, C. E.; CORY, J.; WHITCOMB, R. F.; WILLIAMSON, D. L. Helical mycoplasmas (spiroplasmas) from *Ixodes* ticks. **Science**, v. 212, p. 1043-1045, 1981.

VANDER HEINDEN, M. G.; THOMPSON, C.B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? **Nature Cell Biology**, v. 1, p. 209-216, 1999.

VANNIER, E.; GEWURZ, B. E.; KRAUSE, P. J. Human babesiosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, n. 3, p. 469-488, 2008.

VARELA, A. S.; LUTTRELL, M. P.; HOWERTH, E. W.; MOORE, V. A.; DAVIDSON, W. R.; STALLKNECHT, D. E.; LITTLE, S. E. First Culture isolation of *Borrelia lonestari*, putative agent of Southern tick-associated rash illness. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1163-1169, 2004.

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.

VENZAL, J. M.; PORTILLO, A.; ESTRADA PEÑA, A.; CASTRO, O.; CABRERA, P. A.; OTEO, J. A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infection Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1493-1495, 2004.

VENZAL, J. M.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; SOUZA, C. G.; FÉLIX, M. L.; NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A. *Amblyomma triste* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts and seasonality of the vector of *Rickettsia parkeri* in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 104-109, 2008.

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

VOUSDEN, K. H.; LANE, D. P. p53 in health and disease. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 4, p. 275- 283, 2007.

ZHONG, L. CD133: a stem cell biomarker and beyond. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 2, p. 1-8, 2013.

WEIL, M.; RAFF, M. C.; BRAGA, V. M. M. Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. **Current Biology**, v. 9, p. 361-364, 1999.

WENCESLAU, C. V. **Análise de células mesenquimais de saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos**. 2009. 198 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

WÓJCIK-FATLA, A.; SZYMANSKA, L.; WDOWIAK, A.; BUCSEK, A., DUTKIEWICZ, J. Coincidence of three pathogens (*Borrelia burgdorferi* sensu lato,

Anaplasma phagocytophilum and *Babesia microti*) in *Ixodes ricinus* ticks in the Lublin macroregion. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 16, p. 151-158, 2009.

YBAÑEZ, A. P.; SIVAKUMAR, T.; YBAÑEZ, R. H.; RATILLA, J. C.; PEREZ, Z. O.; GABOTERO, S. R.; HAKIMI, H.; KAWAZU, S.; MATSUMOTO, K.; YOKOYAMA, N.; INOKUMA, H. First molecular characterization of *Anaplasma marginale* in cattle and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in Cebu, Philippines. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 1, p. 27-36, 2013.

YEH, S. C.; LEE, S. T.; WU, C. Y.; WANG, C. H. A cell line (NTU-MV) established from *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Pyralidae) Characterization, viral susceptibility, and polyhedra production. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 138-146, 2007.

YOSHINARI, N. H.; BONOLDI, V. L. N.; BARROS-BATTESTI, D. M.; SCHUMAKER, T. T. S. Doença de Lyme-símile no Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 39, n. 2, p. 57-58, 1999.

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 borreliosis in patients from Cotia county, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 311-318, 2003.

YUNKER, C. E. In: WEISS, E. (ed.) **Current topics in microbiology and immunology**. New York: Springer-Verlag, 1971. p. 113-126.

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. In: **Arboviruses in arthropod cells in vitro**. Boca Raton: CRC Press, 1987. p. 35-51.