

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Cultura primária *in vitro* de células embrionárias de
Rhipicephalus (Boophilus) microplus e *Amblyomma*
cajennense como substrato para cultivo de
Borrelia burgdorferi

Jania de Rezende

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

*Cultura primária in vitro de células embrionárias de
Rhipicephalus (Boophilus) microplus e Amblyomma
cajennense como substrato para cultivo de
Borrelia burgdorferi*

Jania de Rezende

Sob a Orientação do Professor
Aivaldo Henrique da Fonseca

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre** em Ciências,
Área de Concentração em
Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

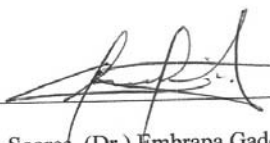
Jania de Rezende

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/ 02/ 2008.



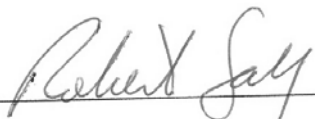
Adivaldo Henrique da Fonseca. (Dr.) UFRRJ
(Orientador)



Cleber Oliveira Soares. (Dr.) Embrapa Gado de Corte



Ângela de Oliveira. (Dr^a) UFRRJ



Roberto de Souza Salles. (Dr.)UFF

**“Tudo quanto te vier à mão para fazer,
faze-o com toda a sua força.
Pois não há para onde vais, não há atividade
nem planejamento, não há conhecimento
nem sabedoria”
Eclesiastes 9: 10**

**“E tudo quanto fizerdes,
fazei-o de todo o coração...”
Colossenses 3: 23**

DEDICO

“A Deus que a nós se dirige constantemente como um caminho, um livro, um amigo”.

O caminho que Ele conduz é a natureza. O livro que Ele fala é a Bíblia. O amigo que nos confidencia na intimidade, coração a coração, é o próprio Deus.

Jacques Laew.

A toda minha família que amo de coração, que mesmo distante apoiou-me, e aos amigos que fazem parte de minha história.

Ao meu orientador Adivaldo Henrique da Fonseca pela confiança e generosidade.

AGRADECIMENTOS

Acima e a frente de todos, agradeço ao Senhor Deus. Devo tudo àquele que me deu sabedoria para escolher minha vocação e força para superar todos os obstáculos.

Ao meu querido orientador Adivaldo Henrique da Fonseca, o meu respeito, admiração, gratidão e afeto por confiar em mim e sempre se mostrar disponível com sua humildade. E também agradeço a sua esposa Marília Fonseca, por ser sempre generosa e acolhedora.

Ao Dr. Raul Henrique Kessler, por me ingressar na pesquisa científica, sempre gentil e atencioso, pessoa de grande sabedoria e humildade.

À Dr^a Carina Elisei, Dr^a Alessandra Scofield e Dr. Cleber Soares que me incentivou a partir para a pós-graduação, demonstrando total apoio e confiança. Obrigada pelo carinho, convívio e amizade!

À tia Oneide Donádio, pelos conselhos incentivadores, muito obrigada pelo carinho e consideração!

Aos grandes amigos que conviveram comigo desde que cheguei na Universidade Rural, Nathalie Cunha, Renata Madureira, Cátia Marques, Luciana de Almeida, Fabiola Nascimento, Charles Rangel, Luis Eduardo Tavares, Raquel Saucier, Priscila Fraga, Cristina Assis, Cristiane Assis, Rita de Cássia Silva e Rosane Tunála. Amizade essencial seria difícil sem vocês, obrigada de coração!

Àqueles que contribuíram para realização do trabalho experimental, Charles Rangel, Nathalie Cunha e Rafaela Teixeira. A todos os meus colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias, Fábio Jorge da Silva, Jenevaldo Barboza, Daniel Guedes Junior, Raquel Lisboa e Mateus Cordeiro.

Aos amigos de turma do curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias-CPGCV, Guilherme Verocai, Leonardo Burlini, Wyslaine Cruz, Joice Vilela, Andréia Terra, Saulo Caldas e Marcus Pires.

Aos professores do CPGCV, muito obrigada por contribuir para meus conhecimentos!

A todo pessoal do Laboratório Coccidios e Coccidioses, em especial ao Dr. Carlos Wilson Lopes, Walter Flausino e Walter Teixeira Filho, obrigada pelo respeito e a utilização do laboratório.

À CAPES, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro indispensável.

RESUMO

Rezende, Jania. **Cultura primária *in vitro* de células embrionárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Amblyomma cajennense* como substrato para cultivo de *Borrelia burgdorferi***. 2008. 22p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Células embrionárias de carrapatos mantidas *in vitro* constituem uma importante ferramenta para cultivo e estudo da biologia de *Borrelia burgdorferi*. A espiroqueta *B. burgdorferi* é o agente etiológico da borreliose de Lyme nos EUA e Europa, onde é transmitida por carrapatos do gênero *Ixodes*. O objetivo deste trabalho foi cultivar *in vitro* *Borrelia burgdorferi* (Cepa Americana G39/40) em cultura primária de células embrionárias dos carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Amblyomma cajennense*. A partir da cultura primária de células embrionárias de *R. (Boophilus) microplus* foram realizados subcultivos mantidos com meio Leibovitz's L-15 livre de antibiótico, que posteriormente foi trocado pelo meio Barbour-Stoener-Kelly (BSK). Após a adição do BSK na cultura, inoculou-se *B. burgdorferi* e também em Tubo de Leighton (TL) com BSK livres de células (controle), numa concentração final de 6×10^6 espiroquetas/mL. As células embrionárias de *A. cajennense* foram inicialmente cultivadas em meio L-15 com antibiótico, o qual foi substituído pelo BSK. Posteriormente, inoculou-se $1,1 \times 10^7$ espiroquetas/mL cultivadas em meio BSK, e também em TL controle livre de células. Todos os cultivos foram incubados em estufa bacteriológica a 34°C. O desenvolvimento dos cultivos foram observados em microscópio de contraste de fase invertido, assim como as contagens de *B. burgdorferi* realizados em câmara de Neubauer. As lamínulas dos TL foram coradas com Giemsa. Foi constatado pela observação em microscópio de contraste de fase invertido a sobrevivência, aderência e multiplicação de *B. burgdorferi*, nas células embrionárias de *R. (Boophilus) microplus* e *A. cajennense*. Não houve diferenças na contagem final de espiroquetas cultivadas em células de *R. (Boophilus) microplus* quando comparada ao controle livre de células, mas sobre células de *A. cajennense* o valor total de aproximadamente $1,9 \times 10^7$ espiroquetas/mL, e enquanto no tubo controle livre de células foi 1×10^6 espiroquetas/mL. O cultivo de células do carrapato *R. (Boophilus) microplus* e *A. cajennense* têm potencial para ser utilizado como substrato para cultivo de *B. burgdorferi* e para estudo de seu desenvolvimento.

Palavras chave: Cultivo celular, *Borrelia* sp, carrapato.

ABSTRACT

Rezende, Jania. **Primary culture *in vitro* of embryonic cells of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Amblyomma cajennense* as substratum for culture of *Borrelia burgdorferi*.** 2008. 22p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences, Animal Parasitology). Institute of Veterinary, Universidade Federal Rural, Seropédica, R J, 2008.

Embryonic cells of tick *in vitro* constitute an important one tool for culture and study of the biology of *B. burgdorferi*. Spirochetes *Borrelia burgdorferi* is the aetiologic agent of borreliose of Lyme in U.S.A. and Europe, where it is transmitted by tick of the *Ixodes* genus. The aim of this work was *in vitro* to cultivate *B. burgdorferi* (American Cepa G39/40) in primary culture of embryonic cells of *Rhipicephalus (B.) microplus* and the *A. cajennense*. From the primary culture of embryonic cells of *R. (B.) microplus* were performed subculture maintained with medium Leibovitz's (L-15) free of antibiotic, that later it were changed by medium Barbour-Stoener-Kelly (BSK). After the addition of the BSK inoculated *B. burgdorferi* of and also in Tube of Leighton (TL) with free BSK of cells (control) in a final concentration of 6×10^6 spirochetes/mL. The embryonic cells of the *A. cajennense* initially were cultivated in medium L-15 with antibiotic, which was substituted by the BSK. Later, $1,1 \times 10^7$ spirochetes/mL in medium BSK cultivated was inoculated, and also in TL controlled free of cells. All the culture was incubated at 34°C. The development of the culture was observed in microscope of inverted contrast of phase, as well as the countings of *B. burgdorferi* performed in chamber of Neubauer. Cover glass of the TL had been stained with Giemsa. It was evidenced by the observation in microscope of inverted contrast of phase the survival, attach and multiplication of *B. burgdorferi*, in the embryonic cells of *R. (B.) microplus* and *A. cajennense*. It did not have differences in the finale counting of spirochetes cultivated in cells of *R. (B.) microplus* when compared with the free control of cells, but on with cells of the *A. cajennense*, the number amount approximately was $1,9 \times 10^7$ spirochetes/mL, and while in the tube it has controlled free of cells was 1×10^6 spirochetes /mL. The culture of cells of tick *R. (B.) microplus* and the *A. cajennense* have potential to be used as substratum for culture of *B. burgdorferi*, and study of its development.

Key words: Cellular culture, *Borrelia* sp., Tick.

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1. Contagem de <i>Borrelia burgdorferi</i> cultivada sobre células embrionárias de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e <i>A. cajennense</i> e em BSK livre de células.....	14
---	----

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1- Células embrionárias de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> cultivadas em meio Leibovitz's L-15 no Tubo de Leighton.....	9
Figura 2- Células embrionárias de <i>Amblyomma cajennense</i> cultivadas em meio Leibovitz's L-15 no Tubo de Leighton.....	10
Figura 3- Células embrionárias de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> mantidas em meio Leibovitz's L -15 em frasco de 25cm ²	11
Figura 4 – (A) <i>Borrelia burgdorferi</i> aderidas em células embrionárias epitelióides e/ou redondas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> coradas com Giemsa. (B) <i>Borrelia burgdorferi</i> aderidas em células embrionárias fibroblastóides e/ou alongadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> coradas com Giemsa.....	12
Figura 5- Células embrionária de <i>Amblyomma cajennense</i> mantidas em meio Leibovitz's L-15 no frasco de 25cm ²	12
Figura 6 – (A . B) <i>B. burgdorferi</i> aderidas em células embrionárias fibroblastóides e/ou alongadas de <i>Amblyomma cajennense</i> coradas com Giemsa.....	13

LISTA DE ABREVIACÕES

TL tubo de Leighton

CC controle com células

TLC controle livre de células

TTC tubo teste com células

L-15 Leibovitz's

BSK Barbour-Stoenner-Kelly

BOD biological oxygen demand

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Cultivo celular.....	2
2.2 Carrapatos <i>R. (Boophilus) microplus</i> e <i>A. cajennense</i>	3
2.3 Gênero <i>Borrelia</i> spp.	4
2.4 Biologia de <i>Borrelia</i> sp. no carrapato.....	5
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1 Origem das amostras.....	7
3.2 Local de execução do trabalho experimental.....	7
3.3 Cultivo de células embrionárias de carrapato.....	7
3.4 Manutenção das células embrionárias de <i>R. (Boophilus) microplus</i> e <i>A. cajennense</i>	7
3.5 Manutenção de <i>B. burgdorferi</i>	8
3.6 Inóculo de <i>B. burgdorferi</i> no cultivo de células embrionárias do carrapato embrionárias do carrapato <i>R. (Boophilus) microplus</i>	8
3.7 Inóculo de <i>B. burgdorferi</i> no cultivo de células embrionárias do carrapato embrionárias do carrapato <i>A. cajennense</i>	9
4 RESULTADOS.....	10
4.1 Cultivo de <i>B. burgdorferi</i> com células embrionárias de <i>R. (Boophilus) microplus</i>	11
4.2 Cultivo de <i>B. burgdorferi</i> com células embrionárias de <i>A. cajennense</i>	12
5 DISCUSSÃO.....	15
6 CONCLUSÃO.....	18
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

1 INTRODUÇÃO

Sistemas de cultura *in vitro* com células de vetores de patógenos têm sido desenvolvidos desde décadas passadas. Atualmente, novas metodologias têm ajudado substancialmente a aplicação desta ferramenta para soluções de problemas, como por exemplo, o isolamento e diagnóstico de agentes patogênicos, contribuindo nas áreas de medicina e agricultura.

Culturas *in vitro* de células de carrapato além de fornecer sistemas de interações vetor e patógeno, substrato para produção de diagnósticos com baixo custo, produção de vacinas, ainda substitui experimentos com animais, que na prática requerem alto custo além de implicações éticas.

As culturas de células de carrapatos podem originar-se de ovos embrionados, órgãos como o intestino, ovário e tubos de Malpighi. Com poucas semanas de cultivo, dependendo do sucesso de manipulação do preparo, as células formam uma monocamada propícia para receber um patógeno, ou estas células podem ser cultivadas indefinidamente, passando a ser linhagem celular.

Alguns fenômenos que ocorrem em cultura, como células epiteliais que formam extensivas lâminas como de um epitélio intacto, são acessíveis para estudar eventos que não são possíveis de serem estudados em tecidos *in vivo* (ALBERTS, et al., 1997).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasita principalmente bovinos e *A. cajennense* têm baixa especificidade ao hospedeiro animal, com predileção pelos equinos e é um dos carrapatos que mais parasita humano nas fases imaturas. Ambos carrapatos, na pesquisa científica do Brasil são importantes principalmente por estarem envolvidos na transmissão de bactérias e protozoários para animais e humanos.

As bactérias *Borrelia* spp. são transmitidas para humanos, animais domésticos e silvestres por carrapatos da família Ixodidae. *Borrelia burgdorferi* é o agente etiológico da borreliose de Lyme nos Estados Unidos da América. A patologia foi descoberta em 1975 pelo Dr. Allen C. Steere (1977), e mais tarde Burgdorfer (1982), encontrou espiroquetas em carrapatos da espécie *Ixodes scapularis*, e Johnson (1984) após estudos com estas espiroquetas, caracterizou-as e denominou-as como *B. burgdorferi*.

Devido tentativas sem sucesso de cultivo, em meios líquidos artificiais como o Babour Stonner Kelly (BSK), com espiroquetas isoladas de humanos e animais no Brasil (MANTOVANI et al., 2007), atualmente linhas de pesquisa buscam também outras formas de cultivo, isolamento e identificação de *Borrelia* spp. Uma grande expectativa é o cultivo *in vitro* de *B. burgdorferi* com células embrionárias de carrapatos vetores, pela observação de sua biologia *in vitro*, como as formas de aderência celular e multiplicação, podendo ser semelhante para outras bactérias deste gênero ainda não cultivadas. O cultivo de células dos diferentes órgãos e tecidos dos carrapatos pode constituir-se num substrato para cultivo de agentes por eles transmitido.

Células embrionárias de carrapatos cultivadas *in vitro* constituem uma importante ferramenta para cultivo e estudo da biologia desta espiroqueta *B. burgdorferi* (cepa americana). E com este ensaio é promissor no futuro o cultivo do espiroquetídeo encontrado no Brasil, que é transmitido ao homem e animais pela picada de carrapatos. O objetivo deste trabalho foi cultivar *in vitro* *B. burgdorferi* (Cepa Americana G39/40) em cultura primária de células embrionárias dos carrapatos *R. (Boophilus) microplus* e *A. cajennense*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultivo Celular

Culturas preparadas diretamente de tecidos de um organismo, com ou sem uma etapa inicial de fracionamento das células, são chamadas culturas primárias. Na maioria dos casos, células em cultura primária podem ser retiradas da placa de cultura e usadas para formar um número razoável de culturas secundárias; elas podem ser repetidamente sub-cultivadas desta forma, por semanas ou meses. Tais células se proliferarão indefinidamente e poderão ser propagadas como uma linhagem de célula (ALBERTS, et al., 1997).

Em 1952, Weyer tentou transferir rickettsias a partir de intestino coletado de piolhos infectados para tecidos não infectados do carrapato *Rhipicephalus bursa* cultivados *in vitro*. O meio de cultura consistiu de plasma, baço, testículo de coelho e extrato de piolhos (YUNKER, 1987).

Řeháček (1958 apud Řeháček 1976, p. 25), transplantou para frascos, tecidos de carrapatos adultos *Dermacentor marginatus*, cultivando-os em vários meios de cultura e observou o crescimento de células fibroblastóides por 6 dias. A partir desta observação, conduziu experimentos para melhorar a condição do crescimento *in vitro* de tecidos de carrapatos, e marcou início da cultura de células de carrapatos (YUNKER 1987).

Após o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo, resultou no estabelecimento da primeira linhagem de células do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus* por Varma (1975). Subseqüentes linhagens de células de várias espécies de carrapatos vêm sendo cultivadas (YUNKER 1987).

O primeiro estabelecimento de cultura de células embrionárias foi do carrapato *Hyalomma asiaticum*, realizado por Medvedeva (1972), enquanto Pudney (1973), estabeleceu o segundo cultivo, de ovos de *R. (Boophilus) microplus*. Estes autores, observaram as formas celulares fibroblastóides e epitelióides após algumas semanas de cultivo (Řeháček 1976).

Interações celulares e moleculares entre patógenos e células de carrapatos *in vitro* têm sido raramente examinadas. As culturas de células de carrapatos oferecem um simplificado sistema de vetor *in vitro*, que podem ser particularmente útil para estudos de patógenos intracelular e epicelular. A aderência e invasão por *B. burgdorferi* nas células de carrapato cultivadas *in vitro* é análogo aos eventos no carrapato vetor (MUNDERLOH; KURTTI, 1995).

Culturas de células embrionárias de carrapato vêm sendo utilizada com objetivo de estudar modulação de expressão de genes pela *B. burgdorferi*, por esta ser a responsável pela doença de Lyme (OBONYO et al., 1999; BUGRYSHEVA et al. 2002). Obonyo et al., (1999) relataram que a manipulação de sistemas de células de carrapato poderá ser uma ferramenta para estudos na regulação de proteínas de superfície externa (Osp) e até permitir a eficácia de vacinas para doença de Lyme baseada em Osps recombinantes.

Schwan, et al. (1988) reportaram, o cultivo de *B. burgdorferi* em meio BSK além da baixa infectividade, ocorre a redução do número de plasmídios. E ainda Obonyo et al. (1999) observaram que a diferencial expressão de proteínas OspA e OspB de *B. burgdorferi* cultivada com células de carrapato *Ixodes scapularis* foi similar ao que observaram em *Borrelia* parasitando o mesmo carrapato no momento da sua alimentação. E também observaram o declínio em produção de OspA e um aumento em produção de OspC, a qual foi mais pronunciada em espiroquetas cultivadas com células de carrapato a 37°C, do que aquelas cultivadas em meio BSK na mesma temperatura.

Kurtti et al. (1988, 1993), trabalharam com várias linhagens de células de carrapato e observaram o melhor desenvolvimento da espiroqueta *B. burgdorferi* somente nas células

embrionárias de *Rhipicephalus apendiculatus* (RAE 25). Segundo Kurtti et al. (1988), o cultivo de tecidos de carrapatos pode contribuir para esclarecimento dos mecanismos de aderência celular, migração dentro do hospedeiro, mecanismos de transmissão e a interação da espiroqueta com células do hospedeiro.

Kurtti et al. (1993) finalizaram o cultivo de *B. burgdorferi* com linhagens de células de *Rhipicephalus apendiculatus* (RAE 25), fazendo inóculo das espiroquetas intraperitoneal em hamsters. Coletaram destes, urina da bexiga, o coração e o fluído sinovial, os quais foram cultivados separadamente em meio BSK. Relataram baixa infectividade para hamsters, embora a infectividade foi mantida comparada com *B. burgdorferi* cultivada só com meio BSK. A capacidade de *B. burgdorferi* para induzir edema de articulação (artritogenicidade) foi perdida até 30 repiques da cultura com células de carrapato e a infectividade após 51 repiques. Em contraste bactérias cultivadas somente em meio BSK perderam a artritogenicidade após 11 repiques.

Rezende et al. (em análise) mantiveram cultura primária de células embrionárias do carrapato *R. (Boophilus) microplus*, em estufa para BOD, a 31°C, tendo detectado espiroquetas infectando naturalmente estas células. Devido ao exame morfológico do microrganismo e por ter sido encontrado em carrapato *R. (Boophilus) microplus*, sugeriram ser *Borrelia* spp.

Varela et al. (2007), reportaram o primeiro isolado de *Borrelia lonestari* cepa LS-1 em cultura de células embrionárias de *Ixodes scapularis* (ISE6), ressaltando que organismos cultivados são importantes para o desenvolvimento de testes para um diagnóstico seguro.

Muitos especialistas em pesquisa com cultura de células de invertebrados, têm abandonado o uso de culturas primárias de tecidos devido aos laboriosos métodos ou preparações. Muito interesse é direcionado ao desenvolvimento com células de linha (ŘEHÁČEK 1976).

2.2 Carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Amblyomma cajennense*

Os carrapatos *R. (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887), Murrel; Baker, 2003 e *A. cajennense* Fabricius 1787, pertencem ao filo Artropoda, classe Arachnida, Ordem Acarina, família Ixodidae (GOMES 1998).

O carrapato *R. (Boophilus) microplus* é um ectoparasita hematófago originário da Ásia, amplamente distribuído nos grandes rebanhos bovinos da América, África, Oceania, entre os paralelos 32° N e 32° S, com alguns focos nos paralelos 35° (LEAL et al., 2003; WHARTON 1974; NUÑEZ et al., 1982). Existem citações de que *R. (Boophilus) microplus* teria vindo para o Brasil através bovinos comprados do Chile no início do século XVII e teria entrado no país através do Rio Grande do Sul (GOMES 1998). O principal hospedeiro deste carrapato é o bovino, porém outros animais podem ser parasitados. Quando ocorre alta infestação em bovinos este carrapato pode eventualmente parasitar humanos durante a manipulação do animal (BARROS-BATTEST et al., 2006).

R. (Boophilus) microplus é tipicamente homoxeno, as larvas infestam o gado na pastagem e se alimentam por 6-8 dias até sofrerem muda para ninfas, as quais atingem o estágio adulto entre 7-9 dias, o período total do parasitismo varia de 18-22 dias, podendo se estender até 30 dias (GOMES 1998). A fase do parasitismo é pouco influenciada pelas condições climáticas, já a fase não parasitária depende do clima regional. Em condições apropriadas, com alta umidade e temperatura em torno de 24-28° C, uma fêmea ingurgitada pode transformar 50-60% de seu peso corporal em 2000 a 4000 ovos (BARROS-BATTEST et al., 2006).

O carrapato *R. (Boophilus) microplus* é vetor dos agentes etiológicos responsáveis pela “tristeza parasitária bovina”, causada por protozoários do gênero *Babesia* e *Anaplasma*.

No Brasil são endêmicos na maior parte do território onde se criam bovinos. *Babesia bovis* é transmitida ao gado pelas larvas infectadas, e a transmissão de *B. bigemina* se dá nos estágios de ninfas e adultos. A transmissão transovariana ocorre, tanto em *B. bigemina* e *B. bovis*. (KESSLER; SHENK 1998)

Nas áreas com altas infestações por *R. (Boophilus) microplus*, os danos produzidos pelo carrapato levam a grandes prejuízos. Nas áreas com infestações baixa ou restrita a alguma época do ano, a importância da “Tristeza parasitária bovina” assume grandes proporções, verificando assim, que em ambas condições, o *R. (Boophilus) microplus* é uma fonte de prejuízo à bovinocultura (GONZALES 1975).

No estado de Mato Grosso do Sul - Brasil, foi encontrado *Borrelia* spp. parasitando uma cepa de *R. (Boophilus) microplus* mantida em laboratório por quatro anos, com a manutenção da cepa realizada em bovinos estabulados. Com os exames da hemolinfa e ovos macerados, corados com Giemsa foi possível a visualização das espiroquetas (REZENDE et al., em análise).

O carrapato *A. cajennense* vulgarmente conhecido como “carrapato estrela”, originário da Região Neotropical, foi primeiramente encontrado na cidade de Cayena – Guiana Francesa, de onde se deriva seu nome específico. Distribui-se por todo o continente americano, desde o sul dos EUA, América Central, até o norte da Argentina, com exceção do Chile, Uruguai e o extremo Sul do Brasil (BARROS-BATTEST et al., 2006).

Nos estágios imaturos o *A. cajennense* se caracteriza principalmente, por parasitar humanos em maior intensidade que qualquer outra espécie de carrapato no Neotrópico. Os adultos têm preferência em parasitar grandes mamíferos como equínos, bovinos, antas e capivaras (BARROS-BATTEST et al., 2006).

Barros-Battest et al. (2006); Labruna et al. (2003) relataram que *A. cajennense* é trióxeno, necessita de três hospedeiros para fechar seu ciclo parasitário e realiza apenas uma geração por ano sob condições naturais nas áreas estudadas, que incluem o Sudeste brasileiro e o Norte da Argentina. E que este padrão se caracteriza pelo predomínio do estágio larval de abril a julho, do ninfal de julho a outubro, e do adulto de outubro a março. Um aspecto importante na fase parasitária é a curta duração do *A. cajennense* sobre o hospedeiro. Cada larva ou ninfa alimenta-se por apenas quatro a cinco dias em média e as fêmeas por apenas sete a dez dias (Lopes et al. 1998; Pinter et al., 2002).

Labruna et al. (2004) relataram, que com a baixa especificidade, o *A. cajennense* assume um importante papel na transmissão de patógenos entre os animais e o homem. Este carrapato é o principal vetor de *Rickettsia rickettsii*, o agente causal da Febre Maculosa no Neotrópico, e também um vetor eficiente para o vírus da encefalite equina venezuelana, existindo um indicativo de que esta espécie de carrapato pode produzir paralisia em animais domésticos (BARROS-BATTEST et al., 2006).

Ainda, *A. cajennense* pode estar envolvido na transmissão de um agente causal desconhecido, responsável pela borreliose de Lyme *simile* em humanos e animais no Brasil (YOSHINARI et al., 1997; FONSECA et al., 2005; BARROS-BATTEST et al., 2006; MANTOVANI et al., 2007).

2.3- Gênero *Borrelia* spp.

A primeira observação de uma espiroqueta foi feita por Leeuwenhoek, em 1681, na mucosa bucal e intestinal do homem. No entanto, sua importância só foi reconhecida em 1863, após Obermeier observá-la no sangue de pacientes com febre recorrente (PESSÔA,

1963; PAVLOVSKY, 1965). E a partir de 1948, após receber diversas classificações, bacteriologistas e sistematistas as colocaram em um grupo especial entre as bactérias.

As diferentes espécies de espiroquetas dentro do gênero *Borrelia* foram classificadas de acordo com a especificidade da relação parasita-vetor-hospedeiro (HOOGSTRAAL, 1985), porém, existem espiroquetas que não são transmitidas por uma única espécie de vetor, assim como, não infectam uma única espécie de hospedeiro. Desta forma, atualmente sua identificação ocorre pela associação entre estudos biológicos, bioquímicos e moleculares (BARBOUR; HAYES, 1986; SILVA; FIRKRIG, 1997).

Como membro da ordem Spirochaetales e família Spirochaetaceae, *Borrelia* spp. são bactérias Gram negativas; podem crescer à temperatura de 33°C em meios líquidos artificiais, e podem ser visualizadas à microscopia de campo escuro, contraste de fase e em tecidos por técnicas de impregnação pela prata (BARBOUR e HAYES, 1986; QUINN et al., 1994). Todas as espécies descritas possuem formato helicoidal que pode variar de 3 a 10 espiras, medem de 4 a 30 µm e se reproduzem por fissão binária transversal (AUSTIN, 1993; PFISTER et al., 1994; SOARES et al., 2000). Estruturalmente são formadas por um cilindro protoplasmático constituído por uma membrana interna preenchida por citoplasma e peptídeoglicano coberta por uma membrana celular externa. Possuem flagelos que, em estrutura, são semelhantes aos de outras bactérias flageladas, localizados no espaço periplasmático, inseridos na terminação do cilindro de protoplasma (KRIEG; HOLT, 1984; BARBOUR; HAYES, 1986). Para o cultivo *in vitro* é necessário muito nutriente por serem microrganismos exigentes. Poucas espécies de *Borrelia* têm sido cultivadas *in vitro* em meio líquido e baixos níveis de crescimento são freqüentemente obtidos (KRIEG et al., 1984).

Borrelia burgdorferi lato sensu é responsável pela borreliose de Lyme, uma enfermidade infecciosa de caráter sistêmico. Borreliose de Lyme tem sido descrita na América do Norte, América Central, América do Sul, Ásia, África, Europa e Austrália; muitas vezes apresentando características clínicas distintas. Johnson et al. (1984), após cultivo e classificação descreveram *B. burgdorferi* como agente da Doença de Lyme. A transmissão efetiva de *B. burgdorferi* requer a presença de carrapatos do gênero *Ixodes* (BARBOUR et al., 1986).

Yoshinari et al. (1995) publicaram um artigo retrospectivo sobre Borreliose de Lyme no Brasil, caracterizando-a como uma zoonose emergente de interesse multidisciplinar. Mantovani et al. (2007) sugeriram que espiroquetas visualizadas em sangue de pacientes com sintomatologia para borreliose de Lyme-*simile* podem não estar correlacionadas ao gênero *Borrelia* e atuam conjuntamente com outros microrganismos como *Chlamydia* e *Mycoplasma*, levando a uma mimetização do quadro clínico. Porém, Madureira (2007), demonstrou pela primeira vez no Brasil, a caracterização genotípica de isolado brasileiro de *B. theileri*, proveniente de equino, assim como a confirmação por caracterização genética da presença de espiroquetas do gênero *Borrelia* relacionada às espécies que causam borreliose de Lyme na América do Norte e Europa. A autora demonstrou ainda a amplificação do gene 16S *rRNA* do sangue de humano com sintomatologia para borreliose de Lyme-*simile*, assim como de espiroquetas isoladas de culturas de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus*.

2.4- Biologia de *Borrelia* sp. no carrapato

Estudos demonstraram que carrapatos do gênero *Ixodes* usualmente se alimentam por 96 horas, e tanto ninfas quanto larvas adquirem rapidamente espiroquetas durante as primeiras 24 horas de fixação (SCHWAN 2000). Nos carrapatos, *Borrelia* sp. são primeiramente parasitas da superfície celular, capazes de ocasionar invasão intracelular, e a dinâmica do tropismo e sua subsequente invasão no tecido do carrapato varia entre espécies de borrelias (BURGDORFER 1989). Em *Borrelia theileri* agente da borreliose bovina, ocorre penetração

no intestino após ingestão, e a invasão de órgãos internos é intensiva, em contraste com *B. burgdorferi* que permanece principalmente no lúmen do intestino ao longo da superfície microvilar das células do intestino (BURGDORFER et al., 1989; 1982; ZUNG et al., 1989; BENACH et al., 1987). As borrelias permanecem no interior das células somente por períodos curtos, diferente das rickettsias que são parasitas intracelular obrigatório (MUNDERLOH; KURTTI, 1995).

A penetração de *B. burgdorferi* no intestino do carrapato ocorre durante o transporte ativo de nutrientes e extensiva reorganização da membrana celular epitelial (MUNDERLOH; KURTTI 1995). Na hemocele *B. burgdorferi* adere na superfície basal do epitélio do intestino, na superfície basal e lateral dos ácinos da glândula salivar e na superfície de oócitos em desenvolvimento, o qual resulta na destruição de microvilos e danificação da deposição do córion (ZUNG et al., 1989; BURGDORFER et al., 1989; BENACH et al., 1987).

Com emprego de microscopia eletrônica, detalhes da transmissão de *B. burgdorferi* foram estudados por Zung et al. (1989). Estes autores concluíram que após a alimentação de ninfas, as espiroquetas foram encontradas no lúmen e epitélio do intestino, e na glândula salivar nos ductos e ácinos. Em um grupo de ninfas não alimentadas, a borrelia foi limitada ao lúmen do intestino, e o outro grupo de ninfas alimentadas demonstrou uma infecção disseminada. Com este achado de *B. burgdorferi* em glândula salivar existe fortemente, a evidência para sua transmissão através da saliva (ZUNG et al., 1989).

Segundo Burgdorfer et al. (1988) a espiroqueta *B. burgdorferi*, multiplica-se no intestino de *Ixodes scapularis*, de onde ocasionalmente, penetra na parede intestinal e inicia a infecção sistêmica de todos os tecidos, especialmente aqueles de gânglio central, túbos de Malpighi e ovário. E ainda ocorre infecção transovariana de *B. burgdorferi* no carrapato *I. scapularis*.

Algumas proteínas de superfície externa sintetizadas por *B. burgdorferi* têm sido identificadas, como OspA e OspB (PAL; FIRKRIG, 2003). A OspA aparece primeiramente na superfície de *B. burgdorferi* durante a aquisição larval e subsequente colonização no intestino do carrapato e também media a aderência de espiroquetas nas células do intestino do carrapato (SCHWAN; PIESMAN 2000). A OspC é necessária para sua eficiente migração do intestino via glândula salivar e transmissão para novos hospedeiros (SCHWAN; PIESMAN 2002 e 2000 GILMORE; PIESMAN 2000).

Borrelias são transmitidas transovariamente em muitas espécies de carrapato. A borrelia nos ovários invade a gema do oócito a partir da hemolinfa, antes da formação da casca dos ovos. Durante o desenvolvimento embrionário, espiroquetas migram da região da gema para o gânglio (BARBOUR; HAYES, 1986). Em alguns casos as larvas da próxima geração pode não ser capaz de transmitir a borrelia, porém a ninfa após sua alimentação usualmente são transmissoras (NICOLE; ANDERSON 1927, apud BARBOUR; HAYES 1986, p.391). A transmissão transovariana pode ser muito eficiente, passagens acima de 5 a 9 gerações de carrapatos têm sido documentados em laboratório (BALASHOV 1968).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Origem das amostras

As teleóginas de *R. (Boophilus) microplus* foram coletadas de bovinos de leite mantidos na Embrapa Agrobiologia;

As teleóginas de *A. cajennense* foram coletados de eqüinos mantidos no Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ);

Borrelia burgdorferi (cepa G39/40) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Natalino Yoshinari professor de Reumatologia da Universidade de São Paulo.

3.2- Local de execução do trabalho experimental

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias, (UFRRJ).

3.3- Cultivo de células embrionárias de carrapato

No Laboratório, as teleóginas selecionadas foram lavadas primeiro com água da torneira, depois com água destilada. Em uma capela de fluxo laminar vertical, foram lavadas, rapidamente, com álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 1%. Após essas lavagens, as teleóginas foram imersas em solução de cloreto de benzalcônio a 1%, durante quinze minutos, lavadas novamente com álcool a 70% e, finalmente, com água destilada esterilizada, contendo antibióticos. As teleóginas, após secas com gaze esterilizada, foram colocadas em placas de Petri, estéreis, e incubadas, em estufa tipo BOD, a 27°C e 80% de umidade relativa, para realizar a postura.

O meio de cultura para o cultivo de células de carrapato foi o Leibovitz's L-15, suplementado com 10% de caldo triptose fosfato, 20% de soro fetal bovino, 0,1% fração V de albumina bovina e antibiótico Penicilina G.

Os ovos embrionados de *R. (Boophilus) microplus* com 12 dias de postura e de *A. cajennense* com 22 dias foram removidos para um Béquer e submetidos a uma esterilização superficial: lavando duas vezes com acetona, e, oito vezes com água destilada esterilizada. Os ovos, com 2 mL de meio de cultura, foram quebrados, por pressão, com um êmbolo de seringa hipodérmica de vidro, de 20 mL. Após a quebra da maioria dos ovos, o material em suspensão foi passado por um filtro de vidro, com porosidade 1, para a remoção dos ovos intactos e das cascas.

Após a filtragem, o material foi centrifugado a 73 x g por oito minutos em uma centrífuga de mesa. O precipitado foi ressuspensão com meio de cultura L-15, distribuído em volumes de 4 mL, em três frascos de 25 cm² da suspensão celular de *R. (Boophilus) microplus* e em um frasco de 25cm² e 2mL em dois Tubos de Leighton (TL) da suspensão celular de *A. cajennense* e foram incubados a 28°C em estufa bacteriológica.

3.4- Manutenção das células embrionárias de *R. (Boophilus) microplus* e *A. cajennense*

As culturas de *R. (Boophilus) microplus* e *A. cajennense* foram monitoradas diariamente, sendo realizada a troca semanal do meio de cultura, subcultivos quando necessário, e foram observadas em microscópio de contraste de fase invertido. Foi realizado subcultivo das células embrionárias de *R. (Boophilus) microplus* de quatro meses de cultivo, após formação de uma monocamada de células. As células foram descoladas do fundo do frasco por agitação mecânica e passadas para tubos de centrífuga de 15 mL, centrifugando a

73 x g por oito minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão com 7mL de meio L-15 suplementado, sem antibiótico. Foram distribuídos 1,5 mL da suspensão celular em cinco TL com lâminula, e incubados a 31°C. Os subcultivos das células de *A. cajennense* foram realizados somente para frascos de 25 cm², seguindo a metodologia acima. Para o teste, as células já se encontraram em TL.

3.5- Manutenção de *B. burgdorferi*

As amostras de *B. burgdorferi* têm sido mantidas criopreservadas em nitrogênio líquido a -196°C, no laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ.

Para o desenvolvimento do trabalho, *B. burgdorferi* foram descongeladas, e cultivadas no meio de cultura Barbour- Stoenner- Kelly (BSK) suplementado com 6% de soro de coelho, e incubadas a 34°C em tubo de centrifuga de 15 mL. Com três dias de cultivo observou acidez do meio BSK, em observação no microscópio de campo escuro e contraste de fase, avaliou-se quanto a motilidade, tamanho e quantidade de espiroquetas. Então se realizou repique para outros dois tubos de centrifuga, retirando-se 500µl da amostra para 5mL de meio BSK, e novamente o cultivo foi incubado a 34°C. Novamente, com três dias de cultivo, em observação em microscópio de contraste de fase e campo escuro, as espiroquetas se multiplicaram e apresentavam grande motilidade.

3.6- Inóculo de *B. burgdorferi* no cultivo de células embrionárias de *R. (Boophilus) microplus*

Com observação em microscopia de contraste de fase invertido após uma semana do repique de células embrionárias de carrapatos para os TL, verificou-se o desenvolvimento celular (**Figura 1**), e então foi trocado 2mL do meio de cultura L-15 por 2mL de meio BSK de quatro TL, tendo permanecido apenas um TL controle só com células (CC) de *R. (Boophilus) microplus*. As espiroquetas em cultivo no meio BSK foram contadas em câmara de Neubauer, com resultado de aproximadamente 4×10^7 espiroquetas /mL. Em seguida, 300µl da amostra do cultivo de *B. burgdorferi* foram inoculadas ao meio celular com concentração final de aproximadamente 6×10^6 espiroquetas/mL, e também inoculado em três TL controles livres de células (TLC) com 2mL de meio BSK e foram incubadas a 34°C. Observações para avaliar o desenvolvimento do cultivo através da coloração do meio (presença de acidez ou alcalidade) foram realizadas diariamente à vista desarmada. A primeira observação do cultivo em microscópio de contraste de fase invertido foi realizada após 24 horas.

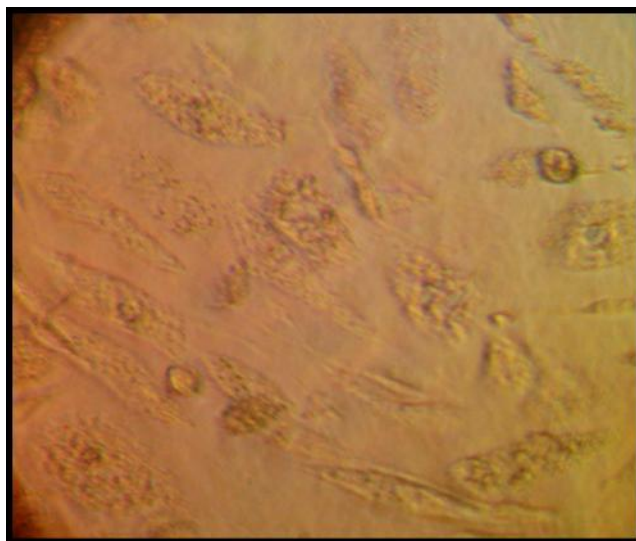


Figura 1. Células primária embrionárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cultivadas em meio L-15 no tubo de Leighton. Contraste de fase invertido, (aumento de 400).

Com 72 horas de cultivo, após observação de muita acidez do meio BSK, confirmada pela multiplicação de *B. burgdorferi* visualizadas em microscópio de contraste de fase invertido, procedeu-se à contagem em câmara de Neubauer. Primeiramente foram contadas as espiroquetas do inóculo com células, dois TL foram agitados mecanicamente, para que as espiroquetas se desgrudassem das células, e os outros dois sem agitar. Em seguida, foram contadas as do TLC. Amostras dos cultivos foram retiradas colocadas na câmara de Neubauer, com auxílio de um micropipeta de (10 a 100 µl de volume), e uma lâminula foi sobreposta na amostra. A contagem foi realizada em microscópio de contraste de fase na objetiva de 40x, com auxílio de um contador manual. As lamínulas dos TL dos cultivos de células embrionárias com *B. burgdorferi* e TLC foram retiradas com auxílio de uma espátula de metal, sobreposta em lâminas de vidro, secas, fixadas com metanol por um minuto e coradas com GIEMSA por 40 minutos e observadas em microscópio de luz, com objetiva de imersão de 100x e ocular de 10x.

Foi realizado um teste para acompanhamento da viabilidade das espiroquetas cultivadas com células de carrapato, onde 300 µl da amostra em cultivo foram passados para 3 mL de meio BSK e incubadas à 34°C.

3.7- Inóculo de *B. burgdorferi* no cultivo de células embrionárias de *A. cajennense*

Após 21 dias de cultivo e com a formação da monocamada de células na lamínula do TL, 2mL do meio L-15 foi substituído por 2mL de meio BSK em um dos tubos de Leighton (tubo teste - TTC) com células de *A. cajennense* (**Figura 2**), sendo o outro TL com células embrionárias (CC) mantido com meio L-15. Posteriormente, inoculou-se $1,1 \times 10^7$ espiroquetas/mL cultivadas em meio BSK, no TTC e em 2mL do tubo de Leighton livre de células de carrapato (TLC controle). O cultivo foi incubado em estufa comum a 34°C. O acompanhamento do cultivo foi em microscópio de contraste de fase invertido e também pela coloração do meio BSK.



Figura 2. Células primárias embrionárias de *Amblyomma cajennense* cultivadas em meio L-15 no tubo de Leighton – microscópio de contraste de fase invertido, (aumento de 400).

Após 96 horas, devido à presença de muita acidez do meio BSK pela multiplicação das espiroquetas, realizou-se a contagem das espiroquetas em câmara de Neubauer, em microscópio de contraste de fase. Assim como para as células de *R. (Boophilus) microplus*, utilizou-se a mesma metodologia para observação das lamínulas coradas do cultivo de células de *A. cajennense*.

4 RESULTADOS

4.1- Cultivo de *B. burgdorferi* sobre células de *R. (B.) microplus*

As células embrionárias de *R. (B.) microplus* cultivadas em meio L-15, desenvolveu uma monocamada celular confluyente com agrupamento com diferentes tipos celulares, consistindo a maioria em fibroblastóides, algumas células com vacúolos (**Figura 3**), originaram seis subcultivos dentro de quatro meses, o primeiro foi com 23 dias de cultivo. Estas células embrionárias degeneraram após seis meses de cultivo.

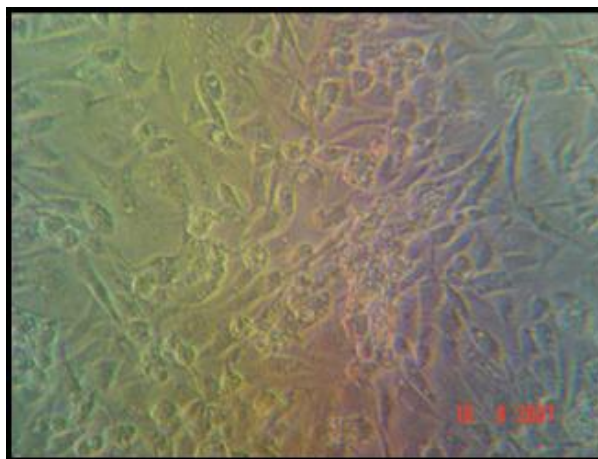


Figura 3. Células embrionárias primária de *R. (Boophilus) microplus* cultivadas em meio L-15 em frasco de 25cm² - microscópio de contraste de fase, (aumento 400x).

Após 72 horas de cultivo, houve massiva multiplicação de *B. burgdorferi* com células embrionárias de *R. (Boophilus) microplus*, em comparação ao inóculo inicial de 6×10^6 (**Tabela 1**), o mesmo observado na contagem de *B. burgdorferi* do TLC (**Tabela 2**). Nas lamínulas do cultivo de *B. burgdorferi* com células embrionárias coradas com Giemsa observou-se aderência de *B. burgdorferi* nas células embrionárias do carrapato *R. (B.) microplus*. As células embrionárias com morfologia epitelióide arredondadas, poliédricas e globosas e do tipo fibroblastóide e/ou alongada, algumas células com citoplasma vacuolizado e com o núcleo excêntrico. (**Figura 4A e 4B**). As células embrionárias permaneceram aderidas na lâminula do TL mesmo quando cultivadas com meio de cultura BSK. Embora as células embrionárias não continuaram a se multiplicar, e no final do cultivo, apresentaram-se degeneração, isso não impediu a avaliação do cultivo, as células controle CC também apresentaram um pouco de degeneração. No teste da viabilidade das espiroquetas *B. burgdorferi*, em observação no microscópio de contraste de fase, estas multiplicaram-se e estavam móveis após três dias de cultivo em meio BSK.

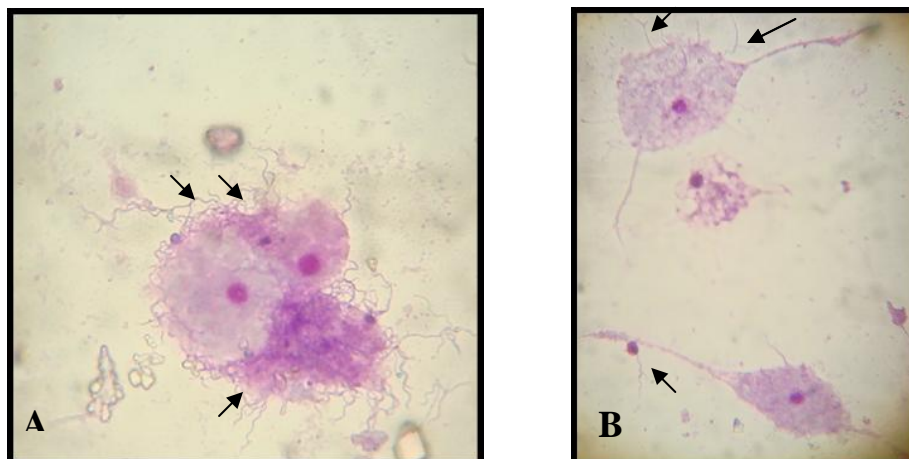


Figura 4. (A) Aderência de *Borrelia Burgdorferi* em células embrionárias epitelióides e/ou redondas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* coradas com Giemsa, objetiva de 100x. (B) Aderência de *B. Burgdorferi* em células embrionárias fibroblastóides e/ou alongadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* coradas com Giemsa, (aumento 1000).

4.2- Cultivo de *B. burgdorferi* com células embrionárias de *A. cajennense*

As células embrionárias de *A. cajennense* com 30 dias de cultivo em meio L-15 e com formação da monocamada celular confluenta sem agrupamentos, originaram o primeiro subcultivo (**Figura 5**). Morfologicamente, células fibroblastóides apresentaram-se finas e alongadas e espessas, foi observado em microscópio de contraste de fase invertido, a nítida junção de uma célula a outra. Após 43 dias de cultivo das células de *A. cajennense*, houve contaminação microbiana, e estas foram descartadas.

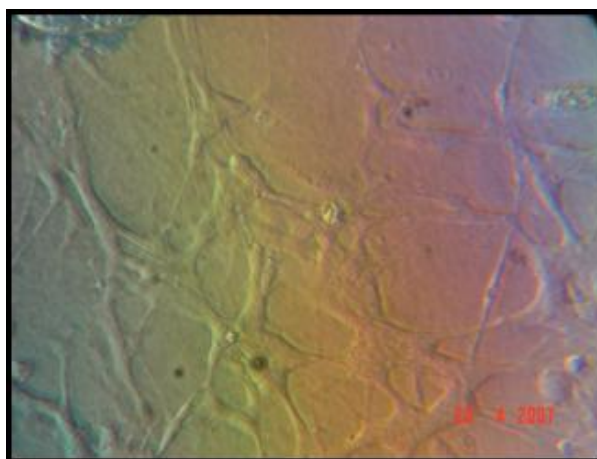


Figura 5. Células primária embrionárias de *Amblyomma cajennense* cultivadas em meio L-15 no frasco de 25cm², microscópio de contraste de fase, (aumento 400).

Além da massiva multiplicação por até 96 horas de *B. burgdorferi* no cultivo com células embrionárias de *A. cajennense*, nas amostras coradas com Giemsa observou-se aderência da espiroqueta nas células embrionárias de carrapato (**Figura 6A e 6B**), as quais estavam com aspecto de degeneração. *B. burgdorferi* cultivada somente em meio BSK livre de células de carrapato se desenvolveu pouco, comparada com aquelas cultivadas em células

de carrapato. Foi possível observar que a maioria das células de carrapato de *A. cajennense* teve a forma fibroblastóide, as células sempre alongadas e algumas formas estreladas, o núcleo bem corado excêntrico. E as células embrionárias de *A. cajennense* permaneceram aderidas na lamínula do TL mesmo cultivadas com meio BSK, que também foi observada em microscópio de contraste de fase invertido.

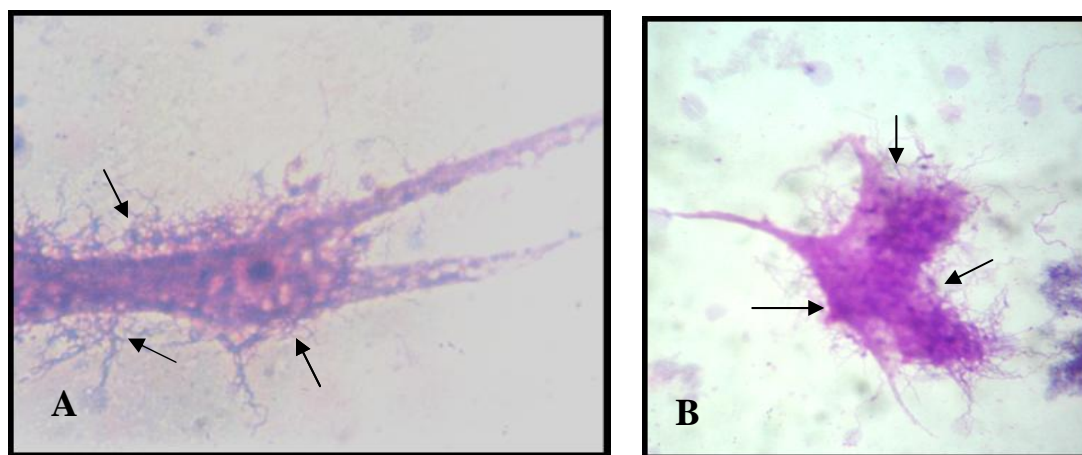


Figura 6. (A-B) *Borrelia Burgdorferi* aderida em células primárias embrionárias fibroblastóides e ou alongadas de *Amblyomma cajennense*, coradas com Giemsa, (aumento de 1000).

No cultivo de *B. burgdorferi* com células embrionárias de *A. cajennense*, observou-se uma maior diferença na contagem de ambos TT e TLC. A contagem de *B. burgdorferi* do TTC foi de $1,9 \times 10^7$ espiroquetas/mL e no TLC foi 1×10^6 espiroquetas/mL, sendo notável a grande diferença.

A adição de Penicilina G no meio de cultura L-15 utilizado para cultivo das células embrionárias de *A. cajennense* não interferiu no desenvolvimento de *B. burgdorferi* no cultivo de células com meio BSK.

Tabela 1- Contagem em câmara de Neubauer de *Borrelia burgdorferi* cultivadas com células de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Sistemas de Cultivo	Número de Espiroquetas/ml	
Meio BSK e Células de <i>R. (B.) microplus</i>	TL*1 – sem agitação	3×10^7
	TL*2 – com agitação	5×10^7
	TL*3 – com agitação	4×10^7
	TL*4 – sem agitação	4×10^7
Meio BSK (TLC) ^a	TL*1 – controle	5×10^7
	TL*2 – controle	5×10^7
	TL*3 – controle	5×10^7
Meio BSK e Células de <i>A. cajennense</i>	TL*1 – sem agitação	$1,9 \times 10^7$
Meio BSK (TLC) ^a	TL*1 - controle	1×10^6

TL* = Tubo de Leighton

TLC^a = Tubo Livre de Células

5 DISCUSSÃO

Yunker (1987) relatou que as células de carrapatos iniciam com aderência na superfície do frasco após algumas horas de cultivo, porém por alguns dias a aderência pode não ser completa. O grupo de células que inicialmente se observa, são as fibroblastóides e as células epitelióides globosas, poliédricas e estreladas aparecendo em seguida, algumas células com núcleo excêntrico e citoplasma vacuolizado, (REZENDE et al. 2003). No presente estudo estas observações foram realizadas em microscópio de contraste de fase invertido e quando as células estavam coradas.

Ainda, segundo Yunker (1987), as células podem proliferar, e completamente cobrir a superfície do frasco, até este estágio, as células podem ser subcultivadas ou ainda que não confluenta completamente à camada de células. No presente estudo, houve formação da monocamada das células embrionárias de *R. (Boophilus) microplus* e *A. cajennense* em poucos dias de cultivo, onde em seguida foram subcultivadas. Yunker (1987) observou a sensibilidade de células de carrapato, principalmente em cultura jovem, á substâncias tóxicas em componentes biológicos do meio de cultura. Isto é questionado como sendo um dos fatores responsáveis pela degeneração das células de *R. (Boophilus) microplus*, que ocorreram no presente estudo.

Obonyo et al. (1999), Kurtti et al. (1993), indicaram que sistema de cultura de células de carrapato é um bom modelo para reproduzir *in vitro* aqueles eventos que ocorrem no momento que espiroquetas estão no carrapato, como a aderência celular e migração em hospedeiro. E estudos com ultraestrutura da invasão em células de carrapato por *B. burgdorferi in vitro* têm revelado detalhes que são dificultados na observação *in vivo* (MUNDERLOH; KURTTI, 1995).

O cultivo de *B. burgdorferi* com células embrionárias de *R. (Boophilus) microplus* e *A. cajennense* foi bem sucedido, embora estes carrapatos não sejam os vetores específicos desta espiroqueta. Kurtti et al. (1993) reportaram que *B. burgdorferi* não parece ser altamente específica, embora têm sido observadas diferenças em suas afinidades por células embrionárias de diferentes espécies de carrapato. A habilidade de *B. burgdorferi* interagir com uma variedade de tipos de células pode ser importante fator contribuinte para sua infectividade em diferentes hospedeiros.

Na contagem de *B. burgdorferi* não houve diferença nos valores obtidos, tanto no cultivo com células embrionárias de *R. (Boophilus) microplus* como no controle de *B. burgdorferi* livre de células (TLC). Ressaltando a pequena diferença do número de *B. burgdorferi* nas contagens dos TL1- 3×10^7 espiroquetas/mL e TL4 - 4×10^7 espiroquetas/mL sem agitação, que foi menor comparada ao TL2 e/ou igual ao TL3 que foram agitados (**Tabela 1**). Isto representa o sucesso do cultivo, podendo ser explicado pela grande aderência de *B. burgdorferi* nas células embrionárias de *R. (Boophilus) microplus*, as quais não puderam ser contadas, e nos TLC com aproximadamente 5×10^7 espiroquetas/mL, (**Tabela 2**) podendo ser explicado pela ausência de células embrionárias.

O número total de $1,9 \times 10^7$ espiroquetas/mL, cultivada nas células de *A. cajennense*, contrastou com o número total de 1×10^6 espiroquetas/mL do TLC, quando comparada ao inóculo inicial de $1,1 \times 10^7$ e também quando comparada ao controle TLC de *R. (Boophilus) microplus*, que não apresentou diferenças nos valores, quando comparada com o número total de *B. burgdorferi* cultivada nas células.

Pela sensibilidade do próprio cultivo em si não pode ser realizado mais que uma contagem após o inóculo, pois a temperatura ambiente poderia influenciar no desenvolvimento das espiroquetas e das células embrionárias, além do risco de contaminações microbianas do ambiente.

Kurtti et al. (1988) inocularam nas células embrionárias de carrapato 1×10^6 a 2×10^6 espiroquetas/mL e recuperaram mais que 10^8 espiroquetas/mL, após desprenderem a camada de células com pipetagens. E Kurtti et al. (1993) determinaram o número de espiroquetas que se desenvolveram no meio celular, através de análise de variância para destacar a porcentagem significativa de células com *B. burgdorferi*.

Devido estar no início da padronização de cultivo de células embrionárias de *A. cajennense*, não foi possível realizar mais subcultivos para maiores repetições e comparações como feito com as células de *R. (Boophilus) microplus*, no entanto já se pode observar o desenvolvimento de *B. burgdorferi* nas células embrionárias de *A. cajennense*, que é um dos carrapatos incriminados de transmitir o espiroquetídeo do gênero *Borrelia* no Brasil, que acomete animais e humanos (FONSECA et al., 2005). Munderloh; Kurtti (1995) defenderam que a adesão de *B. burgdorferi* nas células de *Rhipicephalus appendiculatus* correlaciona com sua infectividade e viabilidade. Porém podem ter acontecido estes estímulos no momento que *B. burgdorferi* aderiu nas células de *A. cajennense* o que contribuiu para seu desenvolvimento, diferente do que foi observado no seu desenvolvimento em cultivo com meio BSK livre de células de carrapato.

Até o presente não há relatos de cultivo de células embrionárias de *A. cajennense*. Eide; Caldwell (1973) publicaram um trabalho relatando o cultivo com células de *A. americanum*, embora com apenas 30 dias de cultivo e sem nenhum repique. No presente trabalho, o primeiro repique foi realizado com 30 dias de cultivo após a formação da monocamada celular. Para o cultivo de células de *A. cajennense*, fez-se uma adaptação do que já existe para células de *R. (Boophilus) microplus* (Rezende et al., 2005; RH Kessler, dados não publicado).

Kurtti et al. (1988; 1993) trabalharam com células embrionárias de várias espécies de carrapatos utilizando o meio L-15B suplementado e mais 10% de meio BSK, livres de antibióticos. No presente trabalho, as células embrionárias de *A. cajennense* foram cultivadas em meio L-15 suplementado e com Penicilina G, as quais serviram de substrato para cultivo de *B. burgdorferi*, contrastando com o cultivo em células de *R. (Boophilus) microplus*, as quais foram cultivadas sem antibiótico.

Varela et al. (2007), utilizaram meio L-15B com BSK suplementados, e com antibióticos, para cultivar *Borrelia lonestari*. Estas espiroquetas foram isoladas do carrapato *Amblyomma americanum*, e cultivadas em células de linhagem de *Ixodes scapularis*. Observaram pela coloração com Giemsa, *B. lonestari* livres e aderidas as células do carrapato. A espiroquetas *B. lonestari* quando passadas em meio de cultura livre de células não foram viáveis em cultura após 30 dias.

Kurtti et al. (1988, 1993) estudaram o desenvolvimento de *B. burgdorferi* cultivadas em várias linhagens de células embrionárias de carrapato em diferentes meios de cultura, o L15B/S, L15B/S com 10% de BSK e somente BSK, cada um com suplementações diferentes, mas todos livres de antibióticos. Constataram, melhor aderência da espiroqueta em células de *Rhipicephalus appendiculatus* (RAE 25) e *Ixodes dammini* e também o melhor meio de cultura, primeiro o BSK e em segundo L15B/S com 10% de BSK. Nas linhagens de células do carrapato *Dermacentor variabilis* (RML 15) e *R. (Boophilus) microplus* (BME 26) e *Anocentor nitens* (ANE 58) ocorreu pouca aderência celular da espiroqueta.

Bugrysheva et al. (2002) estudaram modulação de expressão de genes de *B. burgdorferi*, cultivada com linhagens de células embrionárias de carrapatos, consideraram que o meio de cultura BSK aparenta insuficiência nutricional, devido observarem maior expressão de genes em cultivo com células de carrapato do que somente com meio BSK.

Kurtti et al. (1988) relataram que as amostras de células embrionárias de carrapato cultivadas com *B. burgdorferi* coradas pelo Giemsa, revelou células embrionárias normais e degeneradas. Zung et al. (1989); Burgdorfer et al. (1989); Benach et al. (1987) demonstraram

em carrapato que *B. burgdorferi* aderida em superfície de oócitos em desenvolvimento, ocorreu a destruição de microvilos e danificação da deposição do córion. Aparentemente isto é análogo as células embrionárias de carrapatos cultivadas *in vitro*. No presente trabalho, também houve degeneração das células embrionárias, após o inoculo de *B. Burgdorferi*, mas isso era esperado.

Kurtti et al. (1988) concluíram ainda, que não houve crescimento das células de carrapato, em meio BSK, e as células se desprenderam da superfície do frasco com 2 a 3 dias de cultivo, somente as células RAE 25 permaneceram com a aparência normal. E relataram que as células de carrapato não promoveram crescimento de *B. burgdorferi*, tendo a parte, o crescimento da espiroqueta na linhagem de células de *R. sanguineus* (RSE 8) porém não houve aderência nas células e com 3 a 10 dias de cultivo a espiroqueta não pode mais ser detectada pelo microscópio de luz. Kurtti et al. (1993) utilizaram três cepas de *B. burgdorferi* para o inoculo nas linhagens de células de carrapatos, ao decorrer desse cultivo realizaram repiques das culturas tendo até 51 passagens, observaram que com muitas passagens *B. burgdorferi* perde sua infectividade e diminui sua aderência nas células.

No presente estudo, *B. burgdorferi* além de se multiplicar, cresceram em meio BSK em cultivo com as células embrionárias, e estas células embrionárias tanto de *R. (Boophilus) microplus* como de *A. cajennense*, não continuaram a se multiplicar, mas a maioria permaneceu aderida na lamínula. Embora não tenha sido possível utilizar células de linhagem dos carrapatos *R. (Boophilus) microplus* e *A. cajennense*, isto não foi um fator limitante para cultivo de *B. burgdorferi*.

Serão necessários mais experimentos com cultivo das células de carrapatos e da espiroqueta *B. burgdorferi*, uma vez que são poucos os relatos na literatura. Tentativas de cultivo de *Borrelia* spp. isoladas de carrapatos, animais e humanos no Brasil, o que poderá ser um fator contribuinte para melhoria de diagnóstico da borreliose. Não somente cultura com células embrionárias, mas também com órgãos de carrapato como intestino e ovário. Também serão necessários estudos moleculares de *B. burgdorferi* e *Borrelia* spp. enquanto cultivada com células de carrapato.

6 CONCLUSÃO

As células embrionárias dos carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Amblyomma cajennense*, desenvolveram-se em cultivo com meio Leibovitz's L-15, e originaram subcultivos.

B. burgdorferi tornou-se viável, cresceu, multiplicou, e aderiu nas células embrionárias dos carrapatos *R. (Boophilus) microplus* e *A. cajennense*.

As células embrionárias de *R. (Boophilus) microplus* e *A. cajennense* têm capacidade de adesão na superfície das lamínulas, mesmo quando cultivadas com meio BSK.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A. WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 3 ed. Porto Alegre:Artes Médicas, 1997, 1294p.
- AUSTIN, F. E. Maintenance of infective *Borrelia burgdorferi* Sh-2-82 in 4% oxygen- 5% carbon dioxide in vitro. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 1103-1110, 1993.
- BALASHOV, Y. S. Transovarial transmission of the spirochete *Borrelia sogdiana* in *Ornithodoros papillipes* ticks and its effect on biological properties of the agent. **Parazitologiya**, v. 2, p.198-201,1968.
- BARBOUR, A.G.; HAYES S.F. Biology of *Borrelia* species. **Microbiology Journal**, v.50, n.4, p.381-400, 1986.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006, 223p.
- BENACH, J. L.; COLEMAN, J. L., SKINNER, R. A.; BOSLER, E. M. Adult *Ixodes dammini* on rabbits: a hypothesis for the development and transmission of *Borrelia burgdorferi*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 155, n. 6, p. 1300-1306, 1987.
- BUGRYSHEVA, J.; DOBRIKOVA, D. Y.; GODFREY H. P.; SARTAKOVA, M. L.; CABELLO, F. C. Modulation of *Borrelia burgdorferi* Stringent Response and Gene Expression during Extracellular Growth with tick Cells. New York. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 3061-3067, 2002.
- BURGDORFER, W.; BARBOUR, A.G.; HAYES, S.F. Lyme Disease: a tick-borne spirochetosis? **Science**, v. 216. p. 1317-1319, 1982.
- BURGDORFER, W.; HAYES, S.F.; BENACH.; J. L. Development of *Borrelia burgdorferi* in Ixodid tick vector. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 539, p. 172-179, 1988.
- BURGDORFER, W.; HAYES, S. F.; CORWIN, D. Pathophysiology of the Lyme Disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in *Ixodes* ticks. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 51442-51449, 1989.
- BURGDORFER W. Vector/host relationships of the Lyme disease spirochete. *Borrelia burgdorferi*. **Rheumatology Disease Clinical North American**, v.15, p.775-787, 1989.
- 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 América**, v. 66, n. 4, p. 891-893, 1973.
- 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**, São Paulo, v. 80, n. 2, p. 171-178, 2005.
- GILMORE RD, PIESMAN J. Inhibition of *Borrelia burgdorferi* migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC-immunized mice. **Infection and Immunity**, v.68, p.411-414, 2000.
- GOMES, A. O carrapato-do-boi *Boophilus microplus*: ciclo, biologia, epidemiologia, patogenia e controle.In: KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M: **Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos**. Campo Grande: Embrapa-CNPQC, 1998, 157p.

- GONZALES, J. C. **O controle do carrapato dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 1975, 103p.
- HOOGSTRAAL, H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Advances in Parasitology**, v. 24, p. 135-238, 1985.
- JOHNSON, R. C.; SCHMID, G.P.; HYDE, F.W.; STEIGERWALT, A.G. BRENNER, D.J. *B.burgdorferi* : Etiologic Agent of Lyme Disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.34, n.4, p.496-497, 1984.
- KESSLER, R. H, SHENK, M. A. M. **Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos**. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1998, 157p.
- KRIEG, N. R.; HOLT, J. G.1984. The espirochetes. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v.1. London, 8 ed., 1984, 38-70 p.
- KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U.G.; AHLSTRAND, G. G.; JOHNSON, R. C. *B. burgdorferi* in tick cell culture: growth and cellular adherence. **Journal Medical Entomology**, v. 25, n.4, p. 256-261, 1988.
- KURTTI, T. J. MUNDERLOH, U.G.; KRUEGER, D. E.; JOHNSON, R. C.; SCHWAN, T. G. Adhesion to and invasion of culture tick (Acarina: Ixodidae) cells by *B. burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) and maintenance of infectivity. **Journal Medical Entomology**, v. 30, n. 3, 1993.
- LOPES, C.M.L., R. C. LEITE, M. B. LABRUNA, P. R. OLIVEIRA, L.M.F. BORGES, Z. B. RODRIGUEZ, H. A. CARVALHO, C.M.V.FREITAS, AND C.R.V. JUNIOR. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with comments on the drop-off rhythm. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p.347-351, 1998.
- LABRUNA, M. B.; LEITE, R. C.; GOBESSO, A. A. O.; GENNARI, S. M.; KASAI, N. Controle estratégico do carrapato *A. cajennense* em eqüinos. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.34, n.1, p. 195-200, 2004.
- LABRUNA, M. B., AMAKU, M. METZNER, J. A., PINTER, A., FERREIRA, F. São Paulo, SP, Brazil. Larval Behavioral Diapause Regulates Life Cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Southeast Brazil. **Journal of Medical Entomology** ,v. 40, n. 2, 2003.
- LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ JR. I. S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta scientiae Veterinariae**, v. 1, p. 1-11, 2003.
- MADUREIRA, R. C. **Sorologia para *Borrelia burgdorferi* em equinos do Estado do Pará e Caracterização genotípica de isolados de *Borrelia* spp.** 2007. 73f. Tese (Doutorado em Ciências). Curso de Pós –Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- 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, n. 4, p. 443-456, 2007.
- MEDVEDEEVA, G. I.; BESKINA S. R.; GROKHOVSKAYA I. M. Culture of ixodid tick embryonic cells. Moscow. **Medical Parasitology**, v. 41, p. 39-40,1972.
- MUNDERLOH, U, G.; KURTTI, T. J. Cellular and Molecular Interrelationships Between Tick-Borne Pathogens. Minesota. **Annual Reviews Entomology**, v. 40, p. 221-243, 1995.
- MUREL, A. BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). Quesland/Austrália. **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 169-172, 2003.

- NUÑEZ, J.L.; MUÑOZ, M. E.; MOLTEDO, H.L. *Boophilus microplus* la carrapata comum del ganado vacuno. Buenos Aires: 1982,184p.
- 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.
- PAL, U.; FIKRIG, E. Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the vector and vertebrate host. New Haven-USA. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 659-666, 2003.
- PAVLOVSKY, E. N. **Natural Nidality of Transmissible Disease**. Peace Publishers, Moscow., 1965, 250p.
- PFISTER, H. W.; WILSKE, B.; WEBER, K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. **Lancet**, v.343, p. 1013-1016, 1994.
- PÊSSOA S.B. **Parasitologia Médica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1963, 849 p.
- PINTER, A. S., LABRUNA, M. B., FACCINI, J.L.H. Feeding period of males and females of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions, with special reference to sex ratio. **Veterinary Parasitology**, v. 105, p.79-88, 2002.
- 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.
- QUINN, P.J.; CARTER M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**, London. p.292-303, 1994.
- ŘEHÁČEK, J. Tick tissue culture and arboviruses. In: **Invertebrate tissue culture**. Academic Press, New York e London, p. 21-33, 1976.
- REZENDE, J.; KESSLER, R. H.; JARDIM, M.I.A.; MATIAS, R.; SOARES, C.O.; ARRUDA C.C.; DOURADO, D.M. Identificação e caracterização de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus* cultivadas *in vitro*. **Ensaio e Ciência**: Ed. UNIDERP, Campo Grande, v.7, n.2, p.309-318, 2003.
- REZENDE, J.; KESSLER, R. H.; SOARES, C. O.; MARTINS, O. P. Ocorrência de *Borrelia* spp. em cultura de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** (em análise).
- REZENDE, J.; COSTA, C. M.; KESSLER, R. H.; FONSECA, A. H. Sobrevivência da *Borrelia burgdorferi* em cultivo de células embrionárias de carrapato com meio Barbour-Stoener-Kelly- BSK. In: **XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2005, em Porto Alegre/RS. Cd-room...Porto Alegre, 2005**.
- SILVA, A. M.; FIRKRING, E. *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in ticks and mammals. **Parasitology Today**, v. 13, n. 7, p. 267-270, 1997.
- STEERE, A.C.; MALAWISTA, S.E.; SNYDMAN, D.R.; SHOPE, R.E.; ANDIMAN, W.A.; ROSS, M.R.; STEERE, R.M.; Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. **Arthritis and Rheumatism**, v.20, n. 7, 1977.
- SCHWAN TG, PIESMAN J. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, p.382-388, 2000.

- SCHWAN, T.G.; PIESMAN, J. Vector Interactions and Molecular Adaptations of Lyme Disease and Relapsing Fever Spirochetes Associated with Transmission by Ticks Emerging Infectious Diseases. **Emerging and Infection**, v. 8, n. 2, p.115-121, 2002.
- SCHWAN, T.G.; BURGDORFER, W.; GARON, C. F. Changes in Infectivity and Plasmid Profile of the Lyme Disease Spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a Result of *In Vitro* Cultivation. Montana. **Infection and Immunity**. v. 56, n. 8, p. 1831-1836, 1988.
- SOARES, C. O.; ISHIKAWA, M. M.; FONSECA, A. H.; YOSHINARI, N. H. Borrelioses, agentes e vetores. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 1-19, 2000.
- 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, 2007.
- 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.
- YOSHINARI, N.H.; BARROS, P.J.L.; FONSECA, A.H.; BONOLDI, V.L.N.; BATTESTI, D.M.; SCHUMAKER, T.S.; COSSERMELLI, W. Borreliose de lyme - zoonose emergente de interesse multidisciplinar. **News Laboratorial**, v. 3, n.12, p. 90-104, 1995.
- YOSHINARI, N.H.; BARROS, P.J.L.; BONOLDI, V.L.N; ISHIKAWA, M.; BARROS-BATTESTI, D.M.; PIRANA, S.; FONSECA, A.H.; SCHUMAKER, T.T.S. Perfil da borreliose de Lyme no Brasil. **Revista Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 52, p. 111-117, 1997.
- YUNKER, C. E. Preparation and maintenance of arthropod cell cultures: Acari, with emphasis on ticks. In: Yunker, C. E. **Arboviruses in arthropod cells in vitro**. Boca Raton, CRC Press, Florida, 1987, 35-51 p.
- WHARTON, R. H. RETROSPECT: Entomology and Animals. IN: **Changing Patterns in Entomology**, Queensland /Austrália, 1974, 18-26 p.
- ZUNG, J. L.; LEWENGRUB, S.; RUDZINSKA, A. M.; SPIELMAN, A.; TELFORD, S. R.; PIESMAN, J. Fine structural evidence for the penetration of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* through the gut and salivary tissues of *Ixodes dmmini*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, p. 1737-1748, 1989.