

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

DISSERTAÇÃO

**Co-cultivo de *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales:
Spirochaetaceae) em cultura primária de células
embrionárias de *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae)**

Bruna de Azevedo Baêta

2011



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

**CO-CULTIVO DE *Borrelia burgdorferi* (SPIROCHAETALES:
SPIROCHAETACEAE) EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS
EMBRIONÁRIAS DE *Dermacentor nitens* (ACARI: IXODIDAE)**

BRUNA DE AZEVEDO BAÊTA

Sob a Orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2011

636.08969244 Baêta, Bruna de Azevedo, 1984-
B142c Co-cultivo de *Borrelia burgdorferi*
T (Spirochaetales: Spirochaetaceae) em
cultura primária de células embrionárias
de *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) /
Bruna de Azevedo Baêta. - 2011.
39f. : il.

Orientador: Adivaldo Henrique da
Fonseca.

Dissertação (mestrado)- Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: p. 20-28.

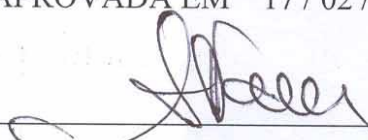
1. *Borrelia burgdorferi* - Teses. 2.
Carrapato - Teses. 3. Células - Cultura e
meios de cultura - Teses. I. Fonseca,
Adivaldo Henrique, 1953- . II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

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

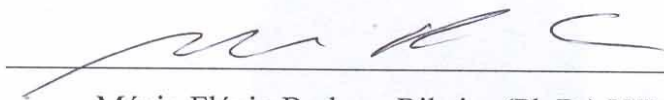
BRUNA DE AZEVEDO BAÊTA

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 Animal.

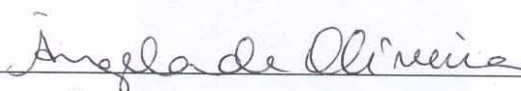
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17 / 02 / 2011.



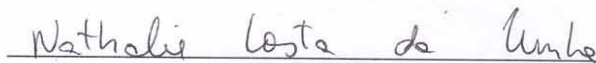
Adivaldo Henrique da Fonseca (Ph.D.) UFRRJ
(Orientador)



Múcio Flávio Barbosa Ribeiro (Ph.D.) UFMG



Ângela de Oliveira (Dr.^a) UFRRJ



Nathalie Costa da Cunha (Dr.^a) FIOCRUZ

Dedico esse trabalho à minha família que sempre me incentivou a seguir em frente e me apoiou de todas as formas, aos meus pais Baêta e Ivone, às minhas irmãs Daniele e Michele, ao meu namorado Felipe e à minha cachorrinha Liz, obrigada por tudo!

“Há duas coisas a buscar na vida: primeiro, conseguir o que se quer; depois, saborear o conseguido. Só os mais sábios conseguem a segunda.”

Logan Pearsall Smith

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por sempre ter me acompanhado dando forças para seguir a diante e iluminando um caminho quando parece não haver mais nada a fazer.

Agradeço ao Professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca, por seus ensinamentos, sua humildade e seu apoio durante todos esses anos no Laboratório de Doenças Parasitárias, deixo aqui registrada minha gratidão e admiração.

À EMBRAPA Agrobiologia – Seropédica/RJ, em especial ao técnico Geraldo Baêta da Cruz, pela disponibilidade dos equipamentos, além da atenção e vontade de ajudar.

À Prof^a. Marília Massard da Fonseca, pela forma gentil e carinhosa com que sempre nos recebeu em sua casa.

Aos amigos e bolsistas do laboratório de Doenças Parasitárias do Prédio da Sanidade Animal do Convênio EMBRAPA/UFRRJ, pelo auxílio e instruções durante a realização do trabalho, Fábio Jorge Moreira da Silva, Charles Passos Rangel, Rafaella Câmara Teixeira, Renata Kazuko Sakai e Jania de Rezende, sem eles nada disso seria possível. Aos demais amigos Raquel da Silva Lisbôa, Nathalie Costa da Cunha, Fabíola do Nascimento Corrêa, Jenevaldo Barbosa da Silva, Fábio Silva de Souza, Matheus Dias Cordeiro, Celso Eduardo de Souza, Antônio Amélia dos Santos Mucalane Tembue e Ana Carolina Nunes de Moraes pelo convívio, amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos pesquisadores do Laboratório da UFMG - ICB, Mucio Flávio Barbosa Ribeiro, Maria Mercês C. Vasconcelos, Bruna Torres Silvestre e Júlia Angélica Gonçalves da Silveira, pela ótima receptividade e hospitalidade e pelos ensinamentos indispensáveis para a realização deste trabalho.

À minha família querida e ao meu grande amor Felipe Matos de Oliveira, por estarem sempre presentes nos bons e maus momentos, confortando, incentivando e acreditando em mim.

Aos grandes amigos da UFRRJ, principalmente a Ísis Daniele Alves Costa Santolin, Mayara Almeida Martins, Riscelly Santanna Magalhães, Raquel Rodrigues Costa Mello e Kelly Cristina da Silva pelos divertidíssimos momentos de descontração e pela amizade incontestável que construímos.

Aos queridos amigos que me acompanharam durante o curso de Medicina Veterinária na UFRRJ e que de alguma forma não se deixaram esquecer mesmo após o término da graduação, Fábio Augusto Costa Ferreira Rebouças, Anna Barreto Fernandes, Heloísa Helena Miranda Verdán, Duanne Alves da Silva, Lyanna Carvalho e Silva, Fábio Lindenberg dos Santos, Fernanda Nogueira Ayres, Michelle Mendes Ferreira Cabral, Bruno Oliveira Carvalho e Juliano Martins Santiago.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, pelos ensinamentos.

À CAPES pela concessão de bolsa durante o período de Mestrado.

A todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho, meu muito obrigada!

BIOGRAFIA

Bruna de Azevedo Baêta, filha de Antônio Geraldo Baêta da Cruz e Ivone de Azevedo Baêta, nasceu em 28 de maio de 1984, na cidade de Volta Redonda, estado do Rio de Janeiro.

Concluiu o ensino fundamental na Escola Nossa Senhora de Fátima em 1998 e o ensino médio no Colégio Macedo Soares (rede MV1), concluído em dezembro de 2001, ambos localizados na cidade de Volta Redonda, Rio de Janeiro.

No ano de 2003, ingressou no curso de Medicina Veterinária da UFRRJ, colando grau e obtendo o título de Médica Veterinária em agosto de 2008.

Durante o período acadêmico realizou estágios em diversas áreas, participando de projetos de pesquisa no Departamento de Parasitologia Animal e no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública-UFRRJ, onde realizou 18 publicações científicas, entre artigos em revistas científicas indexadas e em congressos e eventos científicos nacionais e internacionais.

Foi monitora da disciplina de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública-UFRRJ de outubro de 2007 a julho de 2008.

Em março de 2009, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Sanidade Animal, em nível de Mestrado, da UFRRJ, onde foi bolsista da CAPES até o presente momento. Nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

RESUMO

BAÊTA, Bruna de Azevedo. **Co-cultivo de *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) em cultura primária de células embrionárias de *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae)**. 2011. 28p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Os objetivos do presente estudo foram estabelecer o cultivo primário de células embrionárias de *Dermacentor nitens* e avaliar a influência dos meios Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) e Leibovitz's L-15B no co-cultivo com *Borrelia burgdorferi* (cepa americana G39/40). A cultura foi estabelecida a partir de ovos embrionados de fêmeas ingurgitadas de *D. nitens* com 13 dias após o início da postura, utilizando o meio de cultivo Leibovitz's L-15B suplementado. Após a formação da monocamada nos frascos de 10cm², o meio de cultura L-15B foi retirado dos tubos. Foram formados três grupos com meios distintos, um grupo com meio constituído apenas de BSK (grupo I), um grupo com meio L-15B com 40% de BSK (grupo II) e um terceiro grupo com meio L-15B com 10% de BSK (grupo III). Para cada grupo foram realizadas três repetições, as quais receberam os inóculos de espiroquetas de *B. burgdorferi*, apresentando concentração final de aproximadamente 1,1 x 10⁶ espiroquetas/mL. Foi preparado mais um tubo sem células de carrapato com 5mL de BSK, com a finalidade de avaliar o desenvolvimento das espiroquetas na ausência de células embrionárias. A contagem de *B. burgdorferi* foi realizada três dias após a inoculação das espiroquetas. A partir do segundo dia de início de cultivo foi observada a fixação da maioria das células na superfície do frasco, com inúmeros agregados celulares. Após fixação, foi observada uma grande variedade de tipos celulares que começaram a se diferenciar em células fibroblastóides e posteriormente, células epitelióides e arredondadas. Houve grande multiplicação das espiroquetas cultivadas com células embrionárias quando comparada à concentração inicial. A maioria das espiroquetas se apresentava epicelular e estava aderida às células longitudinalmente ou pelas suas extremidades, com poucas espiroquetas livres. O grupo II, demonstrou melhores resultados, visto que, os meios causaram menores danos às células de carrapato quando comparados ao grupo I e com boa multiplicação de espiroquetas quando comparados aos grupos III e controle. Embora *D. nitens* não seja espécie vetora específica de *B. burgdorferi*, o cultivo da espiroqueta no estudo foi bem sucedido, demonstrando ser uma ferramenta útil na tentativa de isolamento de cepas ou espécies de *Borrelia* spp.

Palavras-chave: carrapato, espiroquetas, cultivo celular.

ABSTRACT

BAÊTA, Bruna de Azevedo. **Co-culture of *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) in primary culture of embryonic cells from *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae)**. 2011. 28p. Dissertation (Master Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

The aims of this study were to establish the primary culture of embryonic cells from *Dermacentor nitens* and evaluate the influence of the Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) and Leibovitz's L-15B media in co-culture with *Borrelia burgdorferi* (American strain G39/40). The culture was established from embryonated eggs of ingurgitated females of *D. nitens* with 13 days of laying, using the Leibovitz's L-15B medium supplemented. After the formation of monolayer in flasks of 10cm², the L-15B medium was removed from the flasks. Three groups with different media were formed. A group consisting only of BSK medium (group I), a group with L-15B medium with 40% BSK (group II) and a third group with L-15B medium with 10% BSK (group III). For each group three repetitions were done, which received the spirochetes inoculum of *B. burgdorferi*, with final concentration of approximately 1.1 x 10⁶ spirochetes/mL. It was prepared another flask without tick cells with 5 mL of BSK, in order to assess the development of spirochetes in the absence of embryonic cells. The count of *B. burgdorferi* was performed three days after inoculation of spirochetes. Since the second day of culture it was observed fixation of most cells on the surface of the flask, with numerous cell aggregates. After fixation, it was observed a wide variety of cell types that began to differentiate into fibroblastoid cells and posteriorly they start to differentiate into epithelioid and rounded cells. There was extensive proliferation of spirochetes cultured with embryonic cells in comparison to the initial concentration. Most spirochetes was epicellular and was attached to the cells longitudinally or by their edges, with few free spirochetes. Group II showed the best results, since the medium caused less damage to tick cells in comparison to Group I with good multiplication of spirochetes in comparison to groups III and control. Although *D. nitens* is not species-specific vector of *B. burgdorferi*, the spirochete culture in this study was successful, proving to be a useful tool in the isolation of strains or species of *Borrelia* spp.

Key-words: ticks, spirochetes, cell culture.

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Média da contagem de espiroquetas de *Borrelia burgdorferi* em câmara de Neubauer dos grupos testes e contagem do tubo controle, antes e após 72 horas de inoculação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cultura primária in vitro de células embrionárias de *Dermacentor nitens* cultivadas em meio Leibovitz's L-15B com sete (a), 14 (b), 21 (c) e 35 (d) dias de cultivo. Microscópio de contraste de fase invertido. 14

Figura 2. Média de crescimento de *Borrelia burgdorferi* em cultura embrionária de células de carrapato *Dermacentor nitens* nas diferentes proporções dos meios BSK e L-15B, após três dias de inoculação. 16

Figura 3. Espiroquetas *Borrelia burgdorferi*, indicadas pelas setas, aderidas às células embrionárias de *Dermacentor nitens* em cultura primária. Coloração de GIEMSA, microscópio óptico. 17

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Cultivo Celular	2
2.2 Carrapato <i>Dermacentor nitens</i>	4
2.3 O Gênero <i>Borrelia</i>	4
2.4 Borreliose de Lyme	6
2.5 Borreliose em Animais	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Local de Execução do Trabalho	10
3.2 Origem das Fêmeas de <i>Dermacentor nitens</i>	10
3.3 Cultivo Primário <i>in vitro</i> de Células Embrionárias de Carrapatos <i>Dermacentor nitens</i>	10
3.4 Origem e Manutenção de <i>Borrelia burgdorferi</i>	11
3.5 Co-cultivo de <i>Borrelia burgdorferi</i> em Células Embrionárias de <i>Dermacentor nitens</i>	11
3.6 Análise Estatística	12
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1 Cultivo Primário <i>in vitro</i> de Células Embrionárias de Carrapatos <i>Dermacentor nitens</i>	13
4.2 Co-cultivo de <i>Borrelia burgdorferi</i> em Cultivo de Células Embrionárias de <i>Dermacentor nitens</i>	14
5 CONCLUSÕES	19
6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	20

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos possuem um importante significado na economia mundial, onde podem ser prejudiciais pela sua própria ação espoliativa ou como vetores de muitos vírus, bactérias e protozoários patogênicos de importância médica e veterinária. Sistemas de cultura *in vitro*, particularmente, linhagens de células derivadas de tecidos de vetores, têm um papel inestimável e insubstituível em muitos aspectos de pesquisas de carrapatos e patógenos transmitidos por estes, incluindo biologia parasitária básica, relações hospedeiro-vetor-patógeno e controle de doença.

Devido ao clima tropical do Brasil favorecer o desenvolvimento e a multiplicação de carrapatos, cultivos primários de órgãos ou tecidos podem ser utilizados em substituição às linhagens celulares comercializadas, que não são produzidas no país e apresentam grandes dificuldades legais para sua aquisição.

No Brasil, já foram desenvolvidos com êxito cultivos primários das espécies *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma cajennense* (REZENDE, 2008) e *Rhipicephalus sanguineus* (TEIXEIRA, 2010), porém não há registro do estabelecimento de cultura primária de *Dermacentor nitens*. Esta espécie não possui uma especificidade de hospedeiros, mas é encontrada parasitando, principalmente, equídeos (SERRA-FREIRE, 1982; LABRUNA et al., 2001) e com ampla distribuição geográfica no Brasil (SERRA-FREIRE, 1982). Está associada com a transmissão de agentes patogênicos, tais como, protozoários, riquetsias e, possivelmente, vírus e microsporídios.

A Doença de Lyme é uma zoonose frequente no hemisfério Norte considerada uma enfermidade infecciosa causada por espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi sensu lato* e transmitida pela picada de carrapatos do grupo *Ixodes ricinus*. No Brasil, uma doença semelhante denominada Síndrome de Baggio-Yoshinari foi definida como enfermidade infecciosa nova e emergente, transmitida por carrapatos não pertencentes ao complexo *I. ricinus*, causada por espiroquetas de morfologia atípica e latente, que provocam manifestações clínicas semelhantes às observadas na Doença de Lyme, exceto pela ocorrência de recidivas clínicas e desordens autoimunes (YOSHINARI et al., 2010).

Alguns estudos com cultivo de células demonstraram a capacidade vetorial de algumas espécies de carrapatos no cultivo de *Borrelia* sp, possibilitando a diminuição do número de animais na experimentação, facilitando a manipulação de patógenos e, ainda, estudando interações celulares espiroqueta-carrapato para o esclarecimento sobre a especificidade do vetor e a virulência da espiroqueta.

Ainda não foi possível o isolamento de espiroquetas na forma espiralada a partir de materiais biológicos no Brasil, mesmo utilizando meios de cultivo próprios para este microrganismo. Sendo assim, o cultivo *in vitro* de *B. burgdorferi* em células de carrapatos pode auxiliar na compreensão e tentativas de isolamento de cepas ou espécies de *Borrelia* no país.

Neste sentido, objetivou-se estabelecer o cultivo primário de células embrionárias de *D. nitens* e avaliar a influência dos meios Barbour-Stoenner-Kelly e Leibovitz's L-15B no co-cultivo com *B. burgdorferi* (cepa americana G39/40).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultivo Celular

Cultura de tecidos foi desenvolvida no início do século XX a partir do crescimento de fibras nervosas de embriões de sapos (HARRISON, 1907) e de tecido conjuntivo de aves jovens (CARREL, 1912) como um método para estudar o comportamento das células animais livres de variações sistêmicas que poderiam surgir *in vivo*. Apesar das afirmações de que o conhecimento amplo da fisiologia e bioquímica apresenta um papel importante no desenvolvimento de meios adequados para o cultivo de tecidos de vertebrados (MARTIGNONI, 1960), o sucesso neste campo parece estar associado a um grau acentuado sobre o uso de extratos de tecidos e embriões. Trager (1935), ao utilizar um meio contendo ingredientes conhecidos por favorecerem o crescimento de tecidos vertebrados, observou migração de células oriundas de tecidos ovarianos do bicho da seda, motivando assim numerosos estudos.

Weyer (1952) reportou a primeira tentativa de cultivo de tecidos de carrapatos, quando tentou manter riquetsias oriundas de intestino de piolhos em tecidos não infectados do carrapato *Rhipicephalus bursa* cultivados *in vitro*, mantendo a cultura por aproximadamente oito dias. O meio de cultivo era constituído de plasma, baço e testículo de coelho e extrato de piolhos. Novas tentativas foram realizadas com ninfas, em que foi observada a sobrevivência das células por aproximadamente cinco meses (MARTIN; VIDLER, 1962; YUNKER; CORY, 1965). Em seguida, ovos de carrapatos passaram a ser material de estudo para tentativas de cultivos primários (EIDE; CALDWELL, 1973).

As culturas de células de carrapatos podem se originar de ovos embrionários e de órgãos como intestino, ovário e tubos de Malpighi. O primeiro estabelecimento de cultura de células embrionárias foi de *Hyalomma asiaticum*, realizado por Medvedeva et al. (1972), enquanto Pudney et al. (1973) estabeleceram o segundo cultivo com ovos de *Rhipicephalus microplus*. Segundo Kurtti e Büscher (1979), os dois estágios mais comumente utilizados para o cultivo de células é a ninfa e os ovos. Durante esses estágios existem consideráveis atividades mitóticas, no entanto, o período para melhor utilização desses tecidos varia com a espécie e é influenciado pela temperatura.

Para o cultivo de células de carrapatos, inicialmente, Řeháček e Brzostowski (1969) formularam um meio baseado na composição bioquímica da hemolinfa do carrapato na tentativa de criar condições fisiológicas para o cultivo *in vitro* das células desses artrópodes. Entretanto, a formulação não promoveu o crescimento celular contínuo previsto, levando assim à utilização de meios de cultivo empregados para células de vertebrados. As condições usadas para propagar células de carrapatos ainda estão longe de serem ideais, porém o meio Leibovitz's L-15, originalmente formulado para células de mamíferos e, embora tenha pouca semelhança com a hemolinfa, quando suplementado com soro fetal bovino e caldo triptose fosfato, permitiu o isolamento e a manutenção de células de diversas espécies de ixodídeos (KURTTI; MUNDERLOH, 1982; KURTTI et al., 1982). Após a identificação de alguns dos importantes componentes para o crescimento celular de carrapatos *in vitro*, o meio L-15 foi modificado pela adição de traços de minerais, vitaminas, aminoácidos, ácido α -cetoglutárico e glicose, formando o meio Leibovitz's L-15B (MUNDERLOH; KURTTI, 1985), que supriu as deficiências nutricionais presentes no Leibovitz's L-15 (MUNDERLOH; KURTTI, 1989).

A primeira linhagem de célula de carrapato foi estabelecida a partir de tecidos de adultos em desenvolvimento de *Rhipicephalus appendiculatus* (VARMA et al., 1975), no

entanto, a maioria das atuais linhagens de células de carrapatos disponíveis foi estabelecida de células embrionárias, utilizando metodologias simples (KURTTI, et al. 1988a). Crescem em meios de cultura suplementados com soro mamífero, à temperatura de incubação entre 28°C e 34°C, embora existam células que cresçam a 37°C. Algumas linhagens de células prosperam em condições ácidas (pH 6,5-6,8), semelhante ao ambiente de proliferação celular dentro de larvas, ninfas e adultos em desenvolvimento (MUNDERLOH; KURTTI, 1995), outras são propagadas em pH neutro a alcalino, capacitando o crescimento de patógenos ácido-sensíveis (MUNDERLOH et al., 1996a). Culturas de linhagens de células de carrapato podem ser extremamente duradouras, sobrevivendo durante vários anos com mudanças de meio regulares e subculturas ocasionais, refletindo a habilidade de carrapatos ixodídeos em resistir por períodos extremamente longos de tempo entre repastos sanguíneos na natureza (BELL-SAKYI et al., 2007).

Algumas espécies de carrapato, tais como *R. appendiculatus* e *R. microplus*, têm produzido diversas linhagens de células em diferentes laboratórios, enquanto que células de outras espécies têm demonstrado dificuldades para o cultivo ininterrupto, apesar da existência de protocolos relativamente padronizados para o estabelecimento de culturas primárias. Durante 30 anos, tentativas sucessivas foram realizadas até o estabelecimento de linhagem de *Dermacentor andersoni*, uma das primeiras espécies de carrapato utilizada em experimentos de cultura de células (YUNKER, 1987).

No Brasil, já foram desenvolvidos com êxito cultivos primários embrionários das espécies *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma cajennense* (REZENDE, 2008) e *Rhipicephalus sanguineus* (TEIXEIRA, 2010) com a utilização de meios L-15 e L-15B respectivamente, porém não há registro do estabelecimento de linhagens de células de carrapatos no país.

As culturas de células de carrapatos *in vitro* fornecem sistemas de interações vetor e patógeno, substrato para produção de diagnósticos com baixo custo, produção de vacinas e ainda substitui experimentos com animais. A cultura de tecidos também dispõe da oportunidade para estudo da embriologia, fisiologia e morfologia de tecidos de carrapatos em suas diferentes fases de crescimento (MARTIN; VIDLER, 1962).

A mais significativa evolução em propagação de patógenos em linhagens celulares diz respeito aos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*. Para a anaplasmose, após muitos estudos, linhagens de células derivadas de embriões de *Ixodes scapularis* (IDE8) apoiaram o crescimento de diversos isolados de *Anaplasma marginale*, proporcionando assim novas oportunidades de investigação para estudos da interação entre *A. marginale* e células de carrapato (MUNDERLOH et al., 1996a; BLOUIN et al., 2002). Além disso, IDE8 suportou uma variedade de outras riquetsias incluindo *Anaplasma phagocytophilum* (MUNDERLOH et al., 1996b) e *Ehrlichia ruminantium* (BELL-SAKYI et al., 2000). Em estudo de inoculação do protozoário *Babesia bigemina* em IDE8, foi possível observar o contato entre esporocineto e superfície celular, além da fagocitose pela célula, sugerindo a presença de receptores de membrana (RIBEIRO et al., 2009).

Alguns estudos com cultivo de células demonstraram a capacidade ou incapacidade vetorial de algumas espécies de carrapatos no cultivo de *Borrelia burgdorferi*, contudo, as linhagens de células de carrapato poderiam ser úteis no isolamento de novas cepas de *B. burgdorferi*. (KURTTI et al., 1988b). Segundo Kurtti et al. (1988a), 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 de espiroqueta com células do hospedeiro. A espiroqueta não parece ser altamente específica, embora tenham sido observadas diferenças em suas afinidades por células embrionárias de diferentes espécies de

carrapatos (KURTTI et al., 1993). Yunker (1987), somente quando utilizou culturas de células de carrapatos como substrato, isolou diversas cepas de espiroplasmas de carrapatos. Kurtti et al. (1988b) observaram o crescimento e aderência celular de *B. burgdorferi* em diversas linhagens de células de carrapatos, entre elas, *R. appendiculatus* (RAE25 e RA243), *Dermacentor nitens* (ANE58), *R. microplus* (BME26) e *Rhipicephalus sanguineus* (RSE8).

Portanto, para diversos patógenos, as linhagens celulares de carrapatos mostraram-se ferramentas úteis para ajudar a definir a natureza complexa da relação hospedeiro-vetor-patógeno (BELL-SAKYI et al., 2007).

2.2 Carrapato *Dermacentor nitens*

Dermacentor nitens (Acari: Ixodidae), conhecido como carrapato da orelha dos equídeos, foi observado pela primeira vez no Brasil por Aragão (1936). Não possui uma especificidade de hospedeiro, mas é encontrado parasitando, principalmente, equídeos (SERRA-FREIRE, 1982; LABRUNA et al., 2001) e com uma ampla distribuição geográfica no Brasil (SERRA-FREIRE, 1982).

Esta espécie possui um ciclo monóxeno, ou seja, tem sua fase parasitária em um único hospedeiro. No entanto, Miziara (1989) descreveu que este carrapato pode apresentar comportamento monóxeno e heteróxeno, facilitando a transmissão de diversos patógenos, embora o grande percentual das gerações desenvolva o ciclo monóximo,. Os adultos iniciam a cópula dois dias após a muda e o ingurgitamento pode durar de 9 a 23 dias, iniciando postura de 3 a 15 dias após a queda. A incubação dos ovos varia de 19 a 39 dias de acordo com a temperatura ambiente e após a eclosão das larvas, essas podem sobreviver durante meses em jejum na ausência de hospedeiros, variando intensamente a duração do ciclo deste carrapato (FLECHTMANN, 1973).

Com predileção pelas regiões da orelha, divertículo nasal, períneo e crina de seus hospedeiros (BORGES et al., 2000; BARROS-BATTESTI et al., 2006), durante o ingurgitamento, a fêmea expele grande quantidade de excremento em que o macho fica embebido e frequentemente morre. Isto dá origem à supuração e pode causar lesões graves nas orelhas, predispondo a miíases e infecções bacterianas, além de acarretar inúmeros prejuízos na queda da produtividade devido ao estresse do animal (FLECHTMANN, 1973). Está associada ainda com a transmissão de agentes patogênicos tais como protozoários (ROBY; ANTHONY, 1963; ROBY et al., 1964), riquetsias (LE MOS et al., 1997) e, possivelmente, vírus (LINTHICUM et al., 1991) e microsporídios (RIBEIRO; GUIMARÃES, 1998). Roby e Anthony (1963) descreveram o importante papel de *D. nitens* como vetor natural na transmissão transovariana de *Babesia caballi*. No entanto, ainda não há registro do envolvimento de *D. nitens* na transmissão de *Borrelia burgdorferi*.

2.3 O Gênero *Borrelia*

Como membro da ordem Spirochaetales, família Spirochaetaceae, o gênero *Borrelia* Swellengrebel, 1907, foi assim denominado em homenagem a Amédée Borrel. De formato helicoidal com 3 a 10 espiras, medindo de 0,2 a 0,5 µm por 3 a 33 µm, estas bactérias se diferem dos demais gêneros desta família por serem maiores, possuírem maior número de flagelos periplasmáticos e menor número de espiras (PFISTER et al., 1994, QUINN et al., 1994), entretanto, pode ocorrer pleomorfismo (BENNET, 1995). Sua reprodução ocorre por

fissão binária transversal, são microaerófilas, gram-negativas, crescem em temperatura de 33°C em meios artificiais específicos e podem ser visualizadas com a utilização de microscópio de campo escuro, de contraste de fase ou ainda em tecidos, quando corados à base de prata (BARBOUR; HAYES, 1986; QUINN et al., 1994; KONEMAN, 2008).

Em 1681, Leeuwenhoek reportou a primeira observação de espiroquetas a partir de material oriundo da mucosa bucal e intestinal de humanos. Porém, sua importância se deu apenas em 1868, com a descoberta de Obermeier, que verificou a presença de espiroquetas no sangue de indivíduos com febre recorrente na Rússia (PESSOA, 1963; PAVLOVSKY, 1965). Durante anos, o gênero *Borrelia* foi reclassificado entre os grupos das algas, bactérias e protozoários e a partir de 1948, foi incluído como um grupo especial entre as bactérias (PESSOA, 1963).

As borrelíias, na sua maioria, são parasitas sanguíneos de animais e do homem (BARBOUR; HAYES, 1986), embora exerçam uma relação simbiótica com os carrapatos, sendo esses importantes na sua transmissão. Existem registros em que sucessivas infecções por *Borrelia* sem o envolvimento de carrapatos diminuem sua patogenicidade, podendo torná-las apatogênicas (RESTREPO et al., 1994; SCHWAN, 1996). As espiroquetas do gênero *Borrelia* são transmitidas principalmente por carrapatos, embora experimentalmente sejam transmitidas por tabanídeos, culicídeos e sifonápteros (MAGNARELLI et al., 1986).

As espécies desse gênero foram nomeadas segundo seu vetor, no entanto, atualmente a identificação das espécies se dá pela associação dos estudos biológicos, bioquímicos e moleculares (HOOGSTRAAL, 1985; BARBOUR; HAYES, 1986). Diversos pesquisadores verificaram a existência de uma dependência bioquímica entre a espiroqueta e o vetor, que se dá principalmente ao nível do trato intestinal do carrapato, quando do desenvolvimento e multiplicação da borrelíia (HOOGSTRAAL, 1985; SCHWAN, 1996; RANDOLPH et al., 1996).

As espiroquetas podem ser transmitidas tanto transovariana como transestadialmente. Em espécies transmitidas por argasídeos, a transmissão ocorre principalmente pela forma transovariana, embora haja também a transmissão transestadial (HOOGSTRAAL, 1985; BARBOUR; HAYES, 1986). Para carrapatos ixodídeos pode ocorrer ambos os modos de transmissão (RANDOLPH et al., 1996), porém apenas o estágio de ninfa tem maior importância epidemiológica na transmissão, manutenção e dispersão de espiroquetas, diferentemente dos argasídeos, que são capazes de transmitir borrelíias em todos seus ínstares (BENACH et al., 1987; BOUSEMAN et al., 1990).

Diversos fatores estão relacionados à transmissão de borrelíias, entre eles a temperatura em que vive o carrapato, que pode ser deletéria para muitas espécies de espiroquetas, dada a influência no metabolismo, balanço hídrico e no processo digestivo do vetor (HOOGSTRAAL, 1985). Além disso, muitas espiroquetas podem morrer logo após a mudança de estágio do vetor, como também o carrapato pode não suportar um número excessivo de espiroquetas lesando seus órgãos (HOOGSTRAAL, 1985; SCHWAN, 1996). Outro fator relevante na eficiência da transmissão é o tempo de fixação do carrapato no hospedeiro, onde para ixodídeos são necessárias pelo menos 48 horas para a transmissão via saliva (PIESMAN et al., 1987), e para argasídeos o tempo não influencia, visto que ocorre transmissão via saliva e via líquido coxal (SONENSHINE, 1991).

Durante a passagem pelo carrapato, os microrganismos do gênero *Borrelia* encontram-se na cavidade intestinal e ficam na superfície e nos espaços intercelulares das células intestinais. Com o início do repasto sanguíneo, parte dos patógenos migra à cavidade do corpo e depois penetra nas glândulas salivares, no gânglio nervoso e em outros órgãos internos (BALASHOV, 2005). Burgdorfer et al. (1988) afirmaram que a espiroqueta *B. burgdorferi* se

multiplica no intestino de *Ixodes scapularis*, de onde ocasionalmente penetra na parede intestinal e inicia a infecção sistêmica de todos os tecidos, especialmente gânglio central, tubos de Malpighi e ovário. Durante a alimentação, as espiroquetas, disseminadas para outros órgãos via hemolinfa, são detectadas nas superfícies basal, lateral e apical das células da glândula salivar (ZUNG et al., 1989).

Algumas proteínas de superfície externa sintetizadas por *B. burgdorferi* têm sido identificadas, como OspA e OspB (PAL; FIRKRIG, 2003), sendo responsáveis pela colonização, aderência e migração da espiroqueta no organismo do carrapato (SCHWAN; PIESMAN, 2000). Obonyo et al. (1999) relataram que a manipulação de sistemas de células de carrapatos poderá ser uma ferramenta para estudos da regulação de proteínas externas (Osp) e até permitir a eficácia de vacinas para doença de Lyme baseada em Osps recombinantes.

Após diversas tentativas de cultivo de borrelias fora do organismo de pacientes e animais, meios artificiais foram desenvolvidos. Assim, essas espiroquetas puderam ser repassadas diversas vezes nos meios e ainda mantiveram a infectividade ao animal, no entanto, cepas cultivadas, eventualmente, perderam essa habilidade (BARBOUR; HAYES, 1986).

2.4 Borreliose de Lyme

Borreliose de Lyme ou Doença de Lyme é definida como enfermidade infecciosa transmitida por carrapatos infectados com diferentes microrganismos do complexo *Borrelia burgdorferi lato sensu*, que inclui um grupo com grande número de agentes infecciosos causadores de doenças capazes de comprometer vários órgãos (YOSHINARI et al., 1995). O espectro de apresentação clínica dessa enfermidade difere conforme as regiões geográficas, associando-se às características antigênicas de *Borrelia* spp encontradas no local, assim como a sua interação com o ecossistema e vetor da região (ABELE; ANDER, 1990).

Em 1883, o médico Buchwald descreveu na Alemanha uma atrofia difusa de pele com caráter idiopático, que em 1902 foi denominada acrodermatite atrófica crônica com causa desconhecida (HERXHEIMER; HARTMANN, 1902). Posteriormente, Afzelius demonstrou que a lesão estava relacionada à picada de carrapato *Ixodes ricinus*, referindo-a como eritema migratório que passou a ser chamada de eritema migratório crônico em 1913 (BURGDORFER, 1993). Nos Estados Unidos, o primeiro caso de eritema migratório crônico foi reportado em 1969 em um clínico com histórico de picada por carrapatos. Um episódio de artrite associada ao eritema migratório na cidade de Old Lyme denominou a doença como enfermidade de artrite de Lyme ou doença de Lyme, uma desordem multisistêmica de agente desconhecido (STEERE et al., 1977b). Burgdorfer et al. (1982) encontraram espiroquetas em carrapatos *Ixodes scapularis* e associaram à artrite de Lyme, confirmada pela realização da imunofluorescência indireta em soros de pacientes doentes. Após estudos, a espiroqueta foi caracterizada e denominada *B. burgdorferi* (JOHNSON et al., 1984) e, no início da década de 90, estabeleceram-se as diferenças de espectros clínicos da enfermidade, criando o “complexo borreliose de Lyme”, onde encontram-se quatro espécies: *B. burgdorferi stricto sensu*, *Borrelia afzelli*, *Borrelia garinii* e *Borrelia japonica*.

As borrelioses do “complexo de Lyme” apresentam um caráter epidemiológico cosmopolita, estando distribuídas na América do Norte, América Central, América do Sul, Ásia, África, Europa e Austrália. Apesar de manifestações clínicas distintas, todos os agentes

são transmitidos por carrapatos da família Ixodidae e pertencem ao gênero *Borrelia* (BENNETT, 1995; BARBOUR et al., 1996).

No Brasil, o primeiro relato de sinais clínicos foi realizado por Filgueira et al. (1989) em pacientes com quadro dermatológico. Após casos sugestivos em São Paulo no ano de 1992 e posterior confirmação do diagnóstico, a borreliose de Lyme foi então caracterizada como zoonose emergente no país e de interesse multidisciplinar, devido à variedade de manifestações clínicas (YOSHINARI et al., 1995).

As manifestações clínicas da doença estão divididas em duas fases: na primária, observa-se a lesão cutânea característica no sítio de inoculação dos microrganismos, denominada eritema migratório (STEERE et al., 1977a). Na fase secundária, que surge após semanas ou meses, observa-se, na população americana, complicações articulares (STEERE et al., 1977b), neurológicas (PACHNER; STEERE, 1985) e cardíacas (STEERE, 1989). No Brasil, nos primeiros casos clínicos identificados em 1992, foram observadas lesões cutâneas, febre, dores musculares, artralgias e cefaléia (YOSHINARI et al., 1992; YOSHINARI et al., 1993), no entanto, é possível a existência de borreliose em pacientes sem quadro cutâneo.

À medida que novos pacientes foram descobertos, verificaram-se grandes diferenças entre a Doença de Lyme descrita no hemisfério Norte e no Brasil (YOSHINARI et al., 1997). Não foram identificados no Brasil carrapatos do complexo *Ixodes ricinus*, além disso, clinicamente a enfermidade brasileira cursava com recorrências. Laboratorialmente, em nenhum momento foi isolado bactérias do complexo *B. burgdorferi* lato sensu nos fluidos biológicos e em tecidos. A pesquisa de anticorpos contra *B. burgdorferi* de origem americana ou europeia, embora relevante para o diagnóstico, revelava títulos baixos e oscilantes, desaparecendo rapidamente no sangue ou líquido cefalorraquidiano. Assim, a enfermidade identificada no país passou a receber inúmeras denominações como Doença de Lyme-símile, Síndrome Infecto-Reacional Lyme-símile (MANTOVANI et al., 2007) ou Doença de Lyme-símile Brasileira.

Espiroquetas sofrem transformações estruturais, assumindo formas de cistos ou corpos densos, quando submetidas a condições desfavoráveis de cultivo, como nas mudanças de nutriente, pH e presença de antibióticos. Estas estruturas latentes retornam à morfologia espiralada quando as condições de cultivo melhoram (BUTLER; BLAKEY, 1975). No Brasil, ainda não foi possível o isolamento de espiroquetas na forma espiralada em materiais biológicos, mesmo utilizando meios de cultivo próprios para este microrganismo, como o meio Barbour-Stoenner-Kelly (BSK). Sendo assim, no intuito de desvincular esta zoonose brasileira da Doença de Lyme, mudou-se a nomenclatura para Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY) (GAUDITANO et al., 2005).

A SBY é considerada uma nova doença provavelmente causada pela forma L da espiroqueta *B. burgdorferi* lato sensu (mutante), que é a forma em que se apresentam as bactérias deficientes em parede celular que alteram sua morfologia quando as condições de sobrevivência não são favoráveis. A biodiversidade brasileira de animais reservatórios e carrapatos, assim como diferenças climáticas, seriam os fatores implicados no surgimento de espiroquetas latentes, possivelmente borrelíias, na forma cística (YOSHINARI et al., 2010).

Os vetores responsáveis pela transmissão da doença no Brasil ainda não estão bem estabelecidos, mas provavelmente são carrapatos que não pertencem ao complexo *I. ricinus*, como *Amblyomma cajennense*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus microplus* (YOSHINARI, 2009).

Pesquisas em localidades com casos de SBY mostraram ocorrência de carrapatos pertencentes às espécies *Amblyomma cajennense* e *Ixodes loricatus* (BARROS-BATTESTI et al., 2000). Acredita-se que o carrapato transmissor das espiroquetas ao homem seja *A.*

cajennense, visto que, foi verificado o desenvolvimento da SBY no homem após picada acidental por esta espécie de carrapato. No entanto, os carrapatos da espécie *R. microplus* não podem ser descartados. Outros artrópodes como moscas, mosquitos e piolhos também podem estar envolvidos no ciclo epidemiológico da SBY (YOSHINARI et al., 2010).

2.5 Borreliose em Animais

A borreliose de Lyme é considerada uma antropozoonose, sendo capaz de infectar animais silvestres e domésticos. No noroeste dos Estados Unidos, o agente encontra-se amplamente disseminado em seus reservatórios naturais, os roedores e cervídeos (MAGNARELLI et al., 1986).

Os animais domésticos, como cães, equinos e bovinos, comportam-se como agentes transportadores de vetores aos ambientes domiciliares (MAGNARELLI; ANDERSON, 1989) além de apresentarem doença clínica quando infectados (PARKER; WHITE, 1992). Esses animais apresentam sinais clínicos primários caracterizados pelo comprometimento de diversas articulações, com ou sem febre (LEVY; MAGNARELLI, 1992; PARKER; WHITE, 1992).

Nos cães a borreliose de Lyme envolve uma síndrome musculoesquelética e pode evoluir à cardiopatia com bloqueio átrio-ventricular e alteração do ritmo cardíaco, e ainda ao comprometimento neurológico com quadro de meningite (MCKENNA et al., 1995). Esta enfermidade em cães está descrita na América do Norte, Europa e Ásia (SOARES et al., 2000).

A apresentação clínica em bovinos assemelha-se aos cães com aumento do volume articular, mialgia, febre, laminite, queda de produção e aborto (PARKER; WHITE, 1992), no entanto, estudos soropidemiológicos da doença de Lyme em ruminantes descrita na América do Norte e na Europa demonstram que animais positivos, em sua maioria, são assintomáticos (ISHIKAWA, 1996). A soroprevalência de bovinos nos Estados Unidos da América pode atingir 66% (BENXIU et al., 1994) e no Brasil acima de 50% (FONSECA et al., 1996).

Em equinos, a doença encontra-se bem definida nos Estados Unidos da América, demonstrando positividade de 12 a 75% entre animais assintomáticos. (MARCUS et al., 1985; PARKER; WHITE, 1992). Nos equinos, a doença apresenta sinais clínicos como perda de peso, claudicação esporádica, laminite, febre, aumento articular, enrijecimento muscular, uveíte anterior e sinais neurológicos como depressão, mudança de comportamento, disfagia, balanço de cabeça e encefalite (PARKER; WHITE, 1992).

A doença de Lyme é particularmente de difícil diagnóstico em equinos, devido ao porte atlético e anatômico desta espécie predispor a uma ampla variedade de distúrbios músculo-esqueléticos, com consequente claudicação (MADIGAN, 1993). O diagnóstico presuntivo da doença de Lyme, portanto, exige a eliminação de outras causas de claudicação, bem como suporte de testes sorológicos que indicam a exposição a *B. burgdorferi*. Sendo assim, o diagnóstico mais eficiente é feito através do ensaio de imunoadsorção enzimático (ELISA) indireto pela pesquisa de anticorpos da classe IgG (MAGNARELLI; ANDERSON, 1989; COHEN et al., 1992).

Estudos sorológicos para *B. burgdorferi* em equinos conduzidos no estado do Rio de Janeiro revelaram positividade em 42,9% e 28,1% dos equinos de diferentes regiões, segundo Salles et al. (2002) e Madureira (2004), respectivamente. No estado do Pará, Galo (2006) encontrou 26,8% de equinos positivos para *B. burgdorferi* na mesorregião metropolitana de Belém. Salles et al. (2002) em seu estudo com equinos compararam animais mantidos sob

diferentes tipos de sistemas de controle de carrapatos e encontraram uma clara relação entre a produção de anticorpos anti-*B. burgdorferi* e o histórico de contato com carrapatos. Entre os animais com alta infestação por carrapatos, 42,9% apresentaram-se reagentes ao ELISA indireto, em contraste com 0,9% de soropositivos entre animais que viviam sob controle rigoroso de ectoparasitos.

Animais domésticos, além de contraírem a infecção, podem servir de hospedeiros de carrapatos que possam estar envolvidos na transmissão de *Borrelia burgdorferi* (SOARES et al., 2000). Portanto, esses animais podem contribuir indiretamente na demonstração do agente infeccioso, numa determinada área de risco, através de estudos sorológicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Execução do Trabalho

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado no prédio do Projeto Sanidade Animal convênio Embrapa/UFRRJ.

3.2 Origem das Fêmeas de *Dermacentor nitens*

Os carrapatos *Dermacentor nitens* foram originados de infestação natural de equinos pertencentes ao setor de matrizes da Fazenda do Instituto de Zootecnia da UFRRJ. As fêmeas foram coletadas da superfície do solo após período de total ingurgitamento e posterior queda.

3.3 Cultivo Primário *in vitro* de Células Embrionárias de Carrapatos *Dermacentor nitens*

O método de cultivo celular foi baseado no trabalho de Yunker (1987), com modificações descritas a seguir. O meio de cultivo utilizado para as células embrionárias de *Dermacentor nitens* foi o Leibovitz's L-15B (Sigma®), suplementado com 10% de caldo triptose fosfato (Sigma®), 20% de soro fetal bovino inativado (Invitrogen®), 0,1% fração V de albumina bovina (Sigma®), 1% de glutamina (Sigma®) e 0,1% de antibiótico gentamicina (50mg/mL) (Sigma®). O pH foi ajustado para 6,8 e o meio esterilizado em filtro de nitrocelulose com porosidade 0,22µm.

Foram coletadas 80 teleóginas provenientes de equinos que, em seguida, no Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ, foram lavadas com água corrente e depois água destilada, para uma limpeza prévia.

Em capela de fluxo laminar, para a esterilização das superfícies, os carrapatos foram lavados com álcool 70%, hipoclorito de sódio 1% e álcool 70%, por 5 minutos cada, e por fim água ultrapura estéril com adição de antibiótico gentamicina e antifúngico anfotericina B. Em seguida, as teleóginas foram secas com gaze esterilizada, colocadas em placas de Petri estéreis, e incubadas em estufa tipo Demanda Biológica de Oxigênio (B.O.D.) a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar superior de 80%, para realização da postura.

Testaram-se ovos embrionados com 12, 13, 14 e 15 dias de idade, pois estudos realizados com linhagem de *D. nitens* (ANE 58) não descrevem a idade ideal do ovo embrionado para o estabelecimento do cultivo primário. Em capela de fluxo laminar, os ovos embrionados foram removidos da placa de Petri para um béquer com o auxílio de uma pinça e submetidos à remoção da cera do ovo através de duas lavagens com acetona P.A. e oito lavagens com água ultrapura estéril, adicionada de antibiótico gentamicina e antifúngico anfotericina B na última lavagem.

Os ovos, acrescidos de 2 mL de meio de cultura L-15B suplementado, foram macerados, por pressão, com o auxílio de um êmbolo de seringa hipodérmica de vidro de 20mL. Após a ruptura da maioria dos ovos, o material em suspensão foi filtrado com um filtro de vidro número um para a remoção dos ovos intactos e das cascas. Em seguida, o material foi centrifugado a 168xg por oito minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi

descartado e o precipitado ressuspensão cuidadosamente em 12 mL de meio L-15B suplementado. Volumes iguais desta nova suspensão foram distribuídos em 12 frascos de 10cm², com adição do meio L-15B suplementado para obtenção de volume final igual a 5mL/frasco e incubados a 28°C em estufa tipo B.O.D.

As culturas foram monitoradas diariamente com o auxílio de microscópio contraste de fase invertido (Olympus®), sendo realizada a primeira troca de meio no terceiro dia de cultivo. As demais trocas foram realizadas em intervalos de sete dias, com a remoção de apenas 3mL de cada frasco, substituindo este volume por meio novo.

3.4 Origem e Manutenção de *Borrelia burgdorferi*

A cepa G39/40 de *Borrelia burgdorferi* de origem americana utilizada foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari, do Laboratório de Integração Artrite e Microorganismo, Departamento de Reumatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Centro de Referência para Borreliose de Lyme no Brasil. As amostras de *B. burgdorferi* foram mantidas por mais de 100 passagens em meio Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) (Sigma®) suplementado com 6% de soro de coelho e criopreservadas em nitrogênio líquido a -196°C no Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ.

3.5 Co-cultivo de *Borrelia burgdorferi* em Células Embrionárias de *Dermacentor nitens*

Após a formação da monocamada de células embrionárias de carrapatos nos frascos de 10cm², o meio de cultura L-15B foi retirado dos tubos. Foram formados três grupos com meios distintos, um grupo com meio constituído de 100% BSK (grupo I), um grupo com meio L-15B com 40% de BSK (grupo II) e um terceiro grupo com meio L-15B com 10% de BSK (grupo III). Para cada grupo foram realizadas três repetições, as quais receberam os inóculos de espiroquetas de *Borrelia burgdorferi*. Foi preparado mais um tubo sem células de carrapato com 5mL de BSK, com a finalidade de avaliar o desenvolvimento das espiroquetas na ausência de células embrionárias (tubo controle). O co-cultivo foi mantido sem a utilização de antibióticos.

Antes da inoculação, a cepa G39/40 de *B. burgdorferi* foi descongelada e cultivada no meio de cultura BSK suplementado com 6% de soro de coelho, e incubada a 34°C em estufa tipo B.O.D. por nove dias. As espiroquetas foram observadas com auxílio de microscopia de campo escuro e contraste de fase (Olympus®) e avaliadas quanto à motilidade, tamanho e quantidade.

No nono dia após a reativação em meio BSK, as espiroquetas foram contadas com auxílio da câmara de Neubauer, apresentando resultado de aproximadamente 1,1x10⁷ espiroquetas/mL. Em seguida, 500µL da amostra do cultivo de *B. burgdorferi* foram inoculados nos nove tubos de cultivo, com concentração final de aproximadamente 1,1 x 10⁶ espiroquetas/mL. O co-cultivo de *B. burgdorferi* com as células embrionárias foi incubado a 32°C em estufa do tipo B.O.D.

O acompanhamento do cultivo de células de *Dermacentor nitens* com as espiroquetas foi realizado diariamente à vista desarmada e em microscopia de contraste de fase invertido e microscopia de campo escuro. Uma nova contagem de *B. burgdorferi* foi realizada três dias após a inoculação das espiroquetas (KURTTI et al., 1988b), quando os tubos de cultivo foram

agitados mecanicamente para retirada das amostras e posterior contagem das espiroquetas com auxílio da câmara de Neubauer, em microscópio de contraste de fase em objetiva de 40x.

Foram calculadas as médias de crescimento de *B. burgdorferi* em cultura embrionária de células de carrapato *D. nitens* nas diferentes proporções dos meios BSK e L-15B, utilizando a fórmula a seguir.

$$\text{Média de Crescimento de } B. \text{ burgdorferi} = [\text{Final}] - [\text{Inicial}]$$

[Final] - Concentração final de *B. burgdorferi* (após três dias de co-cultivo)

[Inicial] - Concentração inicial de *B. burgdorferi* (dia da inoculação nas células de carrapato)

Após a contagem, lamínulas foram introduzidas em um dos tubos de cultivo de cada grupo e após 24 horas, quando se observou a fixação das células com espiroquetas, as lamínulas foram retiradas com auxílio de uma espátula de metal e sobrepostas em lâminas de vidro para secagem. Em seguida, foram fixadas com metanol por três minutos e coradas com GIEMSA na proporção de 1:9 por 60 minutos para observação em microscópio óptico, em objetiva de imersão (100x).

3.6 Análise Estatística

Para análise estatística utilizou-se os testes paramétricos análise de variância e teste de Tukey com nível de significância 5%, para comparações das médias. A análise foi realizada com o auxílio do Pacote estatístico R (R Development Core Team, 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivo Primário *in vitro* de Células Embrionárias de Carrapatos *Dermacentor nitens*

O cultivo primário de *Dermacentor nitens* foi estabelecido com ovos embrionados de 13 dias de idade. As demais idades de ovos não originaram cultivos primários, contendo poucas células fixadas e baixa multiplicação celular. Durante a fase de ovo existe uma considerável atividade mitótica dos tecidos embrionários, no entanto o melhor momento para a utilização desse tecido varia com a espécie de carrapato e é influenciado pela temperatura de incubação. Os embriões com aproximadamente metade do período de incubação representam um desenvolvimento satisfatório, estando em período de organogênese ativo e antes da formação da cutícula ((KURTTI; BÜSCHER, 1979). Diversos cultivos primários estabelecidos a partir de ovos embrionados de carrapatos utilizaram ovos com idades próximas ao estabelecido neste estudo, como *Rhipicephalus microplus* (PUDNEY et al., 1973) e *Hyalomma asiaticum* (MEDVEDEVA et al., 1972) com ovos de 12-13 e 10-14 dias de incubação, respectivamente. Teixeira (2010) ao trabalhar com *Rhipicephalus sanguineus*, estabeleceu cultivo primário a partir de ovos embrionados de 12 dias de idade.

A partir do segundo dia de início de cultivo foi observada a fixação da maioria das células na superfície do frasco, com inúmeros agregados celulares. Yunker (1987) relatou que células de carrapatos iniciam a aderência na superfície do frasco após algumas horas de cultivo, ainda que por alguns dias essa aderência pode não ser completa.

Após fixação, foi observada uma grande variedade de tipos celulares que começaram a se diferenciar e formaram ilhas de tecidos organizados, como músculos que se contraíam. Estas ilhas gradativamente foram cobertas de células de morfologia não especializada, onde durante os primeiros sete dias, foi observada a presença de células fibroblastóides (figura 1a) e posteriormente, células epitelióides e arredondadas (figura 1b e 1c). Kurtti; Munderloh (1983), ao trabalharem com linhagens de células de *Dermacentor nitens* (ANE 58), observaram células arredondadas, fusiformes e estreladas, porém não descreveram o tempo de aparecimento de cada tipo celular. Os diferentes tipos celulares foram encontrados em tempos semelhantes por Teixeira (2010) e Pudney et al. (1973) ao cultivarem células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus microplus*, respectivamente.

Com 35 dias de cultivo, as células passaram a apresentar um aspecto confluyente, caracterizando a formação da monocamada (figura 1d). Pudney et al. (1973) observaram o aparecimento dos diferentes tipos celulares em tempos semelhantes na cultura primária de células embrionárias de *Rhipicephalus microplus*, com formação da monocamada aos 28 dias de cultivo. Rezende (2008) ao cultivar células embrionárias de *Amblyomma cajennense* e Teixeira (2010) com células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus* observaram a formação da monocamada com 30 e 21 dias, respectivamente. A formação da camada de células confluentes e subcultiváveis é o objetivo de qualquer tentativa de desenvolvimento de uma linhagem celular. A velocidade pela qual é atingida depende de vários fatores, mas principalmente do tamanho do inóculo e meio utilizado. Em geral, este estágio é atingido dentro de quatro semanas (KURTTI; BÜSCHER, 1979).

Neste estudo, foi realizado um repique das células aos 40 dias de cultivo, porém não foi possível a formação de uma nova monocamada, mesmo após dois meses de incubação.

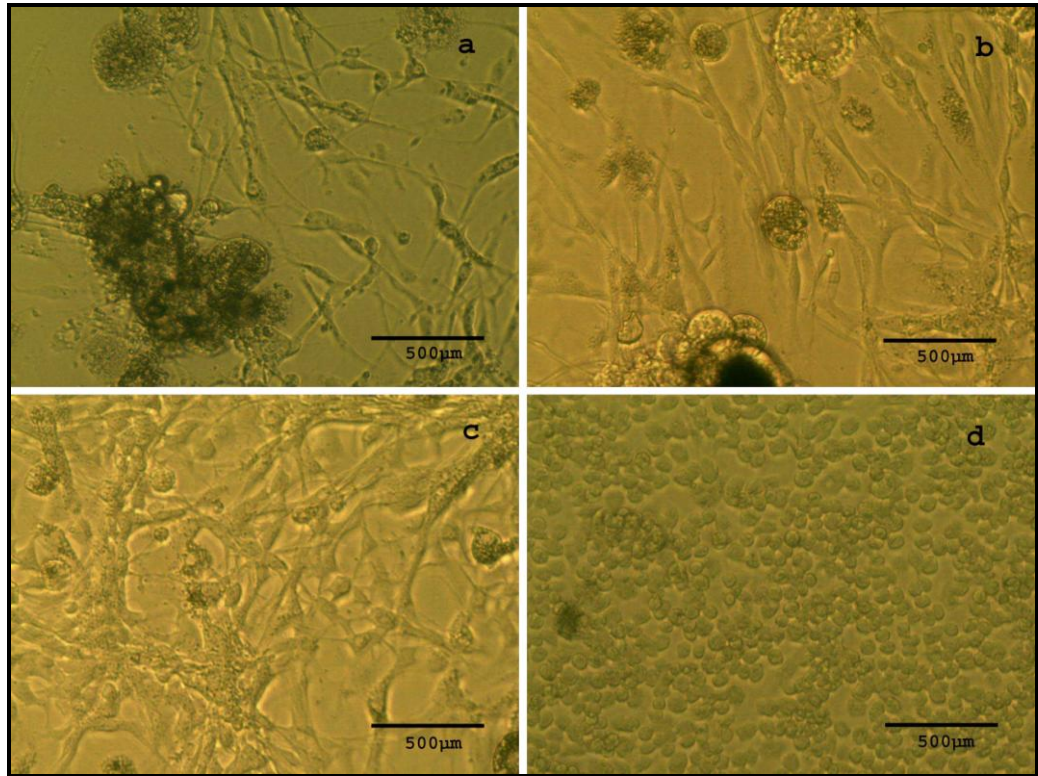


Figura 1. Cultura primária *in vitro* de células embrionárias de *Dermacentor nitens* cultivadas em meio Leibovitz's L-15B com sete (a), 14 (b), 21 (c) e 35 (d) dias de cultivo. Microscópio de contraste de fase invertido.

O meio de cultivo Leibovitz's L-15B demonstrou ser eficiente para o desenvolvimento da cultura primária de células embrionárias de *D. nitens*. Munderloh; Kurtti (1989) observaram que diversas linhagens de carrapato, entre elas, ANE58, desenvolveram-se bem no meio L-15B. Kurtti et al. (1993) cultivaram linhagem celular de origem embrionária de *D. nitens* (ANE58) com meio L-15B para posterior infecção com *Borrelia burgdorferi*, assim como Bugrysheva et al. (2002) usando duas linhagens de células de *Ixodes scapularis* (IDE8 e ISE6), também de origem embrionária.

4.2 Co-cultivo de *Borrelia burgdorferi* em Cultivo de Células Embrionárias de *Dermacentor nitens*

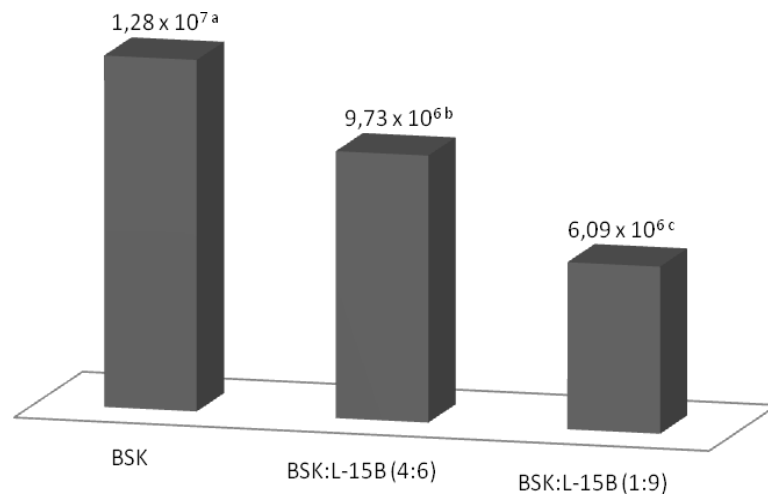
Após 72 horas de co-cultivo de *B. burgdorferi*, houve intensa multiplicação das espiroquetas, resultados apresentados na tabela 1. A concentração inicial do inóculo de *B. burgdorferi* de $1,1 \times 10^6$ espiroquetas/mL foi semelhante à utilizada por Kurtti et al. (1988b) quando inocularam essa bactéria em células de diversas linhagens de carrapato, entre elas a de *Dermacentor nitens* (ANE58), a uma concentração de 1 a 2×10^6 espiroquetas/mL. No entanto, foi inferior à concentração utilizada por Bugrysheva et al. (2002) e Kurtti et al. (1993) ao infectarem linhagens de células de *Ixodes scapularis* (IDE8 e ISE6) com 2 a 4×10^7 espiroquetas/mL e de *Rhipicephalus appendiculatus* (RAE25) com 1 a 2×10^7 espiroquetas/mL, respectivamente.

Tabela 1. Média da contagem de espiroquetas de *Borrelia burgdorferi* em câmara de Neubauer dos grupos testes e contagem do tubo controle, antes e após 72 horas de inoculação.

Grupos*	Concentração inicial do inóculo**	Concentração final do inóculo**
I	1,1 x 10 ⁶	1,39 x 10 ⁷ ^a
II	1,1 x 10 ⁶	1,08 x 10 ⁷ ^b
III	1,1 x 10 ⁶	7,18 x 10 ⁶ ^c
Tubo Controle	1,1 x 10 ⁶	1,09x10 ⁷

* I - Meio BSK com células de carrapato, II - Meio BSK:L-15B (4:6) com células de carrapato, III - Meio BSK:L-15B (1:9) com células de carrapato, Tubo controle - Meio BSK sem células de carrapatos; **espiroquetas/mL; letras minúsculas indicam diferença significativa (p<0,0001).

Foi observada intensa multiplicação das espiroquetas em todos os grupos, assim como das espiroquetas cultivadas na ausência das células de carrapato. Porém na avaliação da influência das células de carrapatos sobre as espiroquetas, a partir das diferentes composições de meios utilizados, a multiplicação de *B. burgdorferi* apresentou diferença significativa entre todos os grupos estudados. A concentração de *B. burgdorferi* após a inoculação no grupo I, onde foi utilizado apenas o meio BSK, foi maior e diferiu significativamente dos demais grupos, que receberam o meio BSK juntamente com o meio Leibovitz's L-15B em diferentes diluições. O crescimento da bactéria foi proporcional a concentração de meio BSK (figura 2). Este resultado era esperado, pois BSK é o meio utilizado para cultivo da espiroqueta, enquanto L-15B é o meio de cultivo das células e que não promove o crescimento de *B. burgdorferi* (KURTTI et al., 1988b; BUGRYSHEVA et al., 2002). No entanto, os grupos I e II obtiveram concentrações finais de *B. burgdorferi* bem próximas do tubo controle (1,09x10⁷ espiroquetas/mL), que possuía apenas o meio BSK sem células de carrapatos. Esse resultado diferiu do encontrado por Teixeira (2010), que ao cultivar espiroquetas em células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus* observou concentração final de *B. burgdorferi* dos tubos com células embrionárias de carrapato menor do que a dos tubos sem células, independentemente dos meios de cultivos testados. Essa diferença pode ser explicada pela menor afinidade das espiroquetas pelas células de *D. nitens* como demonstrado por Kurtti et al. (1993), o que facilitaria a contagem final, após agitação dos tubos de co-cultivo, das bactérias.



BSK = meio Barbour-Stoenner-Kelly; L-15B = meio Leibovitz's L-15B; Letras minúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,0001$)

Figura 2. Média de crescimento de *Borrelia burgdorferi* em cultura embrionária de células de carrapato *Dermacentor nitens* nas diferentes proporções dos meios BSK e L-15B, após três dias de inoculação.

Durante a observação em microscopia de contraste de fase invertida, a maioria das espiroquetas foram vistas anexadas às células de carrapatos logo que entraram em contato e permaneceram aderidas às células durante todo o período de co-cultivo. No entanto, espiroquetas livres também estavam presentes. O exame por microscopia óptica das células coradas com GIEMSA comprovou que a maioria das espiroquetas se apresentava epicelular e estava aderida às células longitudinalmente ou pelas suas extremidades, com poucas espiroquetas livres (figura 3). O mesmo foi observado por Kurtti et al. (1993) ao cultivar *B. burgdorferi* em linhagens de células de *Rhipicephalus appendiculatus* (RAE25). Essa aderência *in vitro* reflete seu comportamento no lúmen do intestino do vetor, onde as espiroquetas se fixam às microvilosidades e penetram nos espaços intercelulares (KURTTI et al., 1988b; MUNDERLOH; KURTTI, 1995).

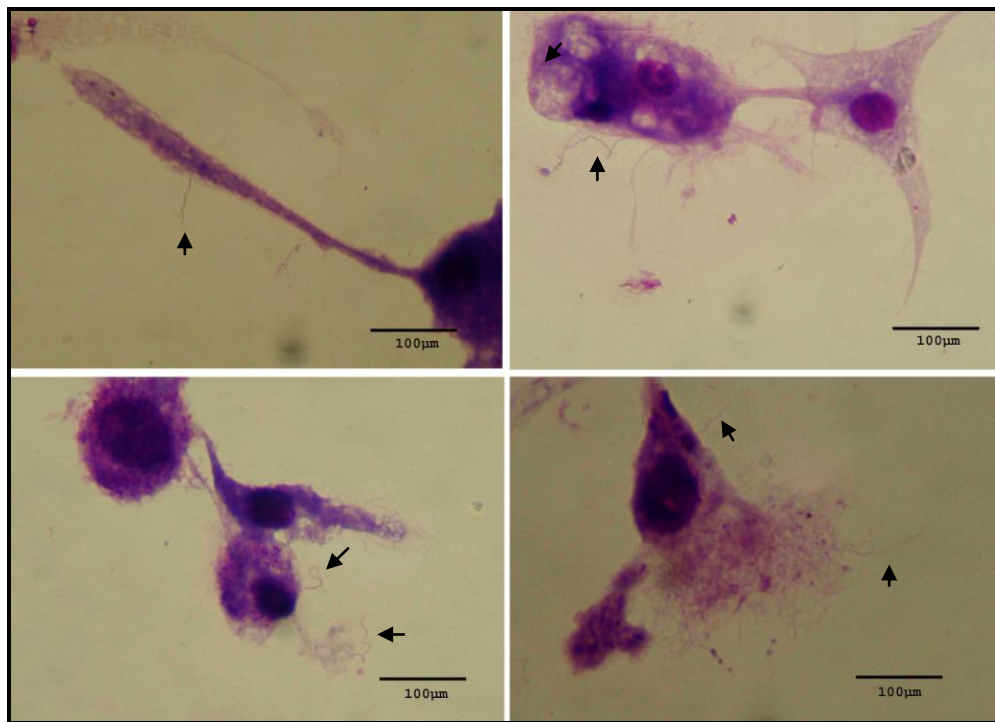


Figura 3. Espiroquetas *Borrelia burgdorferi*, indicadas pelas setas, aderidas às células embrionárias de *Dermacentor nitens* em cultura primária. Coloração de GIEMSA, microscópio óptico.

Apesar da intensa multiplicação de *B. burgdorferi* no grupo I, após 72 horas de co-cultivo, as células de carrapatos sofreram intensa degeneração com o desprendimento de inúmeras delas da superfície do frasco. Kurtti et al. (1988b) relataram que células de RAE25 são capazes de apresentar aparência normal na presença de BSK, enquanto que as demais linhagens celulares não se desenvolvem neste meio e em 2 a 3 dias tornam-se arredondadas e desprendem-se da superfície de cultivo.

As células de carrapato dos demais grupos desenvolveram-se bem com a associação dos meios L-15B e BSK, mantendo multiplicação celular e aderência no frasco de cultivo por até 14 dias de co-cultivo. Durante a observação em microscopia invertida, células do grupo III encontravam-se menos degeneradas do que do grupo II, devido a sua maior concentração de meio L-15B. A sobrevivência das células de carrapato foi inversamente proporcional a concentração de BSK. O efeito citotóxico sobre as células de *D. nitens* pode ser explicado pela presença do meio BSK, pelo esgotamento do meio L-15B, pela presença de *B. burgdorferi*, ou ao conjunto desses fatores. Beck et al. (1985) relataram a presença do componente lipopolissacarídeo de *B. burgdorferi* como possível causa de dano à membrana das células de carrapato.

Portanto, o grupo II, com meio constituído de 60% de L-15B e 40% de BSK, demonstrou melhores resultados, visto que, esta concentração causou menor dano às células de carrapato quando comparado ao grupo I e com boa multiplicação de espiroquetas quando comparado aos grupos III e controle.

Embora *D. nitens* não seja espécie vetora específica de *B. burgdorferi*, o cultivo da espiroqueta no estudo foi bem sucedido, demonstrando ser uma ferramenta útil na tentativa de isolamento de cepas ou espécies de *Borrelia* spp. Kurtti et al. (1993) demonstraram que *B.*

burgdorferi não parece ser altamente específica, embora tenham sido observadas diferenças em suas afinidades por células embrionárias de diferentes espécies de carrapato. Essa habilidade pode ser um importante fator contribuinte para sua infectividade em diferentes hospedeiros.

5 CONCLUSÕES

Culturas primárias de células embrionárias de *Dermacentor nitens* foram obtidas com a utilização de meio Leibovitz's L-15B, no entanto, não originaram subcultivos.

A cepa 39/40 de *Borrelia burgdorferi* apresentou boa aderência, multiplicação e motilidade, ao ser co-cultivada em células embrionárias de *D. nitens*, utilizando meios BSK e L-15B em diferentes concentrações, no entanto, demonstrou melhores resultados do co-cultivo no grupo com meio constituído de 60% L-15B e 40% de BSK.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABELE, D. C.; ANDER, K. H. The many faces and phases of borreliosis I. Lyme Disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 23, n. 2, p. 167-186, 1990.
- ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitadores. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, n.4, p. 759-844, 1936.
- BALASHOV, Y. S. Bloodsucking Insects and Ticks and Mites, Vectors of transmissible Infections of Humans and Domestic Animals. **Entomological Review**, v. 85, n. 8, p. 990-1007, 2005.
- BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F. Biology of *Borrelia* species. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 381-400, 1986.
- BARBOUR, A. G.; MAUPIN, G. O.; TELTOW, G. J.; CARTER, C. J.; PIESMAN, J. Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease-like illness. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 2, p. 403-409, 1996.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**, Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006, 223 p.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; YOSHINARI, N. H.; BONOLDI, V. L. N.; GOMES, A. C. Parasitism by *Ixodes didelphidis* and *I. loricatus* (Acari: Ixodidae) on Small Wild Mammals from an Atlantic Forest in the State of Sao Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**., v. 37, n. 6, p. 820-827, 2000.
- BECK, G.; HABICHT, G. S; BENACH, J. L.; COLEMAN, J. L. Chemical and biologic characterization of a lipopolysaccharide extracted from the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) **Journal of infectious diseases**, v. 152, n. 1, p.108-117, 1985
- BELL- SAKYI, L.; PAXTON, E. A.; MUNDERLOH, U. G.; SUMPTION, K. J. Growth of ruminantium, the causative agent of heartwater, in a tick line. **Journal of Clinical Microbiology** v. 38, n. 3, p. 1238-1240, 2000.
- BELL-SAKYI, L.; ZWEYGARTH, E.; BLOUIN, E. F.; GOULD, E. A.; JONGEJAN, F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 9, p. 450-457, 2007.
- BENACH, J. L.; COLEMAN, J. H.; 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.
- BENNETT, C. E. Ticks and Lyme disease. **Advances in Parasitology**, v. 36, n. 1, p. 343-405, 1995.

- BENXIU, J.; THOMAS, C. B.; COLLINS, M. T. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay that uses the 41-kd flagellin as the antigen for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 9, p. 1213-1219, 1994.
- BLOUIN, E. F.; DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; SAUER, J. R.; SALIKI, J. T.; KOCAN, K. M. Applications of a cell culture system for studying the interaction of *Anaplasma marginale* with tick cells. **Animal Health Research Reviews**, v. 3, n. 2, p. 57-68, 2002.
- BORGES, L. M. F.; OLIVEIRA, P. R.; RIBEIRO, M. F. B. Seasonal dynamics of *Anocentor nitens* on horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 89, n. 3, p. 165–171, 2000.
- BOUSEMAN J. K.; KITRON, U.; KIRKPATRICK, C. E.; SIEGEL, J.; TODD, K. S. Status of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) in illinois. **Journal of medical entomology**, v. 27, n. 4, p. 556-560, 1990.
- BUGRYSHEVA, J.; DOBRIKOVA, E. 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. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 3061-3067, 2002.
- BURGDORFER, W. Discovery of *Borrelia burgdorferi*. In: COYLE, P. K. (ed.) **Lyme Disease**. Boston: Mosby Year Book, 1993, p. 3-7.
- BURGDORFER, W.; BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F. Lyme Disease: a tick-borne spirochetosis? **Science**, v. 216, n. 1, 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, n. 1, p. 172-179, 1988.
- BUTLER, H. M.; BLAKEY, J. L. A review of bacteria in L-phase and their possible clinical significance. **Medical Journal of Australia**, v. 20, n. 2, p. 463-467, 1975.
- CARREL, A. On the permanent life of tissues outside the organism. **Journal of experimental medicine**, v.15, n. 5, p. 516-528, 1912.
- COHEN, N. D.; HECK, F. C.; HEIM, B.; FLAD, D. M.; BOSLER, E. M.; COHEN D. Seroprevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in a population of horses in central Texas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 7, p. 1030-1034, 1992.
- EIDE, P. E.; CALDWELL, J. M. A method for obtaining primary cultures of dispersed embryonic tissue from the lone star tick, *Amblyomma americanum*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.66, n. 1, p. 891-893, 1973.

FILGUEIRA, A. L.; TROPPE, B. M.; GONTIJO FILHO, P. P. Doença de Lyme. **Rio Dermatológico**, Ano 2 – n. 1, 1989.

FLECHTMANN, C. H. W. **Ácaros de Importância Médico-Veterinária**. São Paulo: Livraria Nobel, 1973, 192p.

FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; YOSHINARI, N. H. Lyme borreliosis serology in cattle in Brazil. **Revista da Universidade Rural, Série Ciência da Vida**, v. 18, n. 1-2, p. 85-89, 1996.

GALO, K. R. **Frequência de anticorpos anti- *Borrelia burgdorferi* em equinos na mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará**. 2006. Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará. 48p, 2006.

GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L. N.; COSTA, I. P.; BATTISTI, D. M. B. BARROS, P. J. L.; FONSECA, A. H., HIGUCHI, M. L.; YOSHINARI, N. H. Síndrome de Lyme-símile ou complexo infecto-reacional do carrapato - Síndrome de Baggio-Yoshinari. **Jornada Paulista de Reumatologia**, v. 4, p. 16-7, 2005.

HARRISON, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. *Journal of Experimental Zoology* **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.4, n. 1, p. 140-143, 1907.

HERXHEIMER, K.; HARTMANN, K. U. Acrodermatitis chronica atrophicans. **Archiv fur Dermatologie und Syphilis**. v. 61, n. 57, p. 255-300, 1902.

HOOGSTRAAL, H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Advances in Parasitology**, v. 24, n. 1, p. 135-238, 1985.

ISHIKAWA, M. M. **Epidemiologia da borreliose de Lyme em bovinos na região sudeste do Brasil e padronização do diagnóstico sorológico**. 1996. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

JOHNSON, R. C.; SCHIMID, G. P.; HYDE, F. W.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. **International journal of systematics bacteriology**. v. 34, n. 4, p.496, 1984.

KONEMAN, E. W. Koneman diagnostico microbiológico: texto y atlas en color. In: KONEMAN, E. W. Infecciones producidas por espiroquetas. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2008, p. 1085-1097.

KURTTI, T. J.; BÜSCHER, G. Trends in tick cell culture. In: MARAMOROSCH, K.; HIRUMI, H. **Practical Tissue Culture Applications**, New York: Academic Press, 1979, p. 351-371.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G. Tick cell culture: Characteristics, growth requirements, and applications to parasitology. In: MARAMOROSCH, K.; MITSUHASHI, J. **Invertebrate cell culture Applications**, New York: Academic Press, 1982, p. 195-232.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G. The Effects of 20-Hydroxyecdysone and Juvenile Hormone III on Tick Cells. **The Journal of Parasitology**, v. 69, n. 6, p. 1072-1078, 1983.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; AHLSTRAND, G. G. Tick tissue and cell culture in vector research. In: HARRIS, K. F. **Advances in disease vector research**, v. 5, New York: Springer-Verlag, 1988a. p. 87-109.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; AHLSTRAND, G. G.; JOHNSON, R. C. *Borrelia burgdorferi* in Tick Cell Culture: Growth and Cellular Adherence. **Journal of Medical Entomology**, v. 25, n. 4, p. 256-261, 1988b.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; KRUEGER, D. E.; JOHNSON, R. C.; SCHWAN, T. G. Adhesion to and Invasion of Cultured Tick (Acarina: Ixodidae) Cells by *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) and Maintenance of Infectivity. **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 586-596, 1993.

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

LABRUNA, M. B.; KERBER, C. E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; DE WAAL, D. T.; GENNARI, S. M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 1-14, 2001.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; PIRES, F. D. A.; MACHADO, S. L.; COSTA, L. M. C.; COURA, J. R. Rickettsiae-infected ticks in an endemic area of spotted fever in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 477-481, 1997.

LEVY, S. A.; MAGNARELLI, L. A. Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 3, p. 344-347, 1992.

LINTHICUM, K. J.; LOGAN, T. M.; BAILEY, C. L.; GORDON, S. W.; PETERS, C. J.; MONATH, T. P.; OSORIO, J.; FRANCY, D. B.; McLEAN, R. G.; LEUC, J. W.; GRAHAM, R. R.; JAHRLING, P. B.; MOULTON, J. R.; DOHM, D. J. Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus infection and transmission by the tick *Amblyomma cajennense* (Arachnida: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 28, n. 3, p. 405-409, 1991.

MACKENNA, P.; CLEMENT, J.; VAN DIJCK, D.; LAUWERYS, M.; CAREY, D.; VAN DEN, B.; BIGAIGNON, G. Canine Lyme disease in Belgium. **Veterinary Record**, v. 136, n. 1, p. 224-247, 1995.

MADIGAN, J. E. **Lyme disease in horses**. The Backstretch, February, 1993, p. 12-16.

MADUREIRA, R. C. **Frequência de anticorpos homólogos anti-Borrelia burgdorferi em equinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, estado do Rio de Janeiro**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 40p, 2004.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F. Class-specific and polyvalent enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in equids. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 10, p. 1365-1368, 1989.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; APPERSON, C. S.; FISH, D.; JOHNSON, R. C.; CHAPPELL, W. A. Spirochetes in ticks and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in white tailed deer from Connecticut, New York state, and north Carolina. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 22, n. 2, p. 178-188, 1986.

MANTOVANI, E.; COSTA, I. P.; GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L.; 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.

MARCUS, L. C.; PATTERSON, M. M.; GILFILLAN, R. E. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in New England horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 12, p. 2570, 1985.

MARTIGNONI, M. E. Problems of insect tissue culture. **Experientia**, v.16, n. 1, p. 125-128, 1960.

MARTIN, H. M.; VIDLER, B. O. *In vitro* growth of tick tissues *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann, 1901). **Experimental Parasitology**, v. 12, n. 1, p. 192-203, 1962.

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.

MIZIARA, S. R. **Biologia da fase parasitária de *Anocentor nitens* (Neumann, 1987) (Acarina: Ixodidae)**. 1989. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

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

MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Malarial parasites complete sporogony in axenic mosquitoes. **Experientia**, v. 41, n. 9, p. 1205-1207, 1985.

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.; KURTTI, T. J. Cellular and molecular interrelationships between tick-borne pathogens. **Annual Reviews Entomology**, v. 40, n. 1, p. 221-243, 1995.

MUNDERLOH, U. G.; MADIGAN, J. E.; DUMLER, J. S.; GOODMAN, J. L.; HAYES, S. F.; BARLOUGH, J. E.; NELSON, C. N.; KURTTI, T. J. Isolation of the equine granulocytic

erhlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 664-670, 1996b.

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.

PACHNER, A. R.; STEERE, A. C. The triad of neurologic manifestations of Lyme disease: meningitis, cranial neuritis and radiculoneuritis. **Neurology**. v. 35, n. 1, p. 47-53, 1985.

PAL, U.; FIRKRIG, E. Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the vector and vertebrate host. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 7, p. 659-666, 2003.

PARKER, J. L.; WHITE, K. W. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. **Cornell Veterinary**, v. 82, n. 3, p. 253-274, 1992.

PAVLOVSKY, E. N. **Natural nidality of transmissible diseases**. Moscow: Peace Publishers, 1965. 250p.

PESSOA, S. B. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1963. 849p.

PFISTER, H. W.; WILSKE, B.; WEBER, K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. **Lancet**, v. 343, n. 8904, p. 1013-1016, 1994.

PIESMAN, J.; MATHER, T. N.; SINSKY, R. J.; SPIELMAN, A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 557-558, 1987.

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**. First edition. London: Wolf Publishing, 1994. p. 292-303.

RANDOLPH, S. E.; GERN, L.; NUTTALL, P. A. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. **Parasitology Today**, v. 12, n. 12, p. 472-479, 1996.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>, 2009.

ŘEHÁČEK, J; BRZOSTOWSKI, H. W. A tick tissue culture medium based on analyses of tick haemolymph. **Journal of Insect Physiology**, v. 15, n. 8, p. 1431-1436, 1969.

RESTREPO, B. I.; CARTER, C. J.; BARBOUR, A. G. Activations of a *vmp* pseudogene in *Borrelia hermsii*: an alternate mechanism of antigenic variation during relapsing fever. **Molecular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 287-299, 1994.

REZENDE, J. **Cultura primária *in vitro* de células embrionárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Amblyomma cajennense* como substrato para cultivo de *Borrelia burgdorferi***. 2008. 22f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

RIBEIRO, M. F. B.; BASTOS, C. V.; VASCONCELOS, M. M. C.; PASSOS, L. M. F. *Babesia bigemina*: *In vitro* multiplication of sporokinetes in *Ixodes scapularis* (IDE8) cells. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 3, p. 192-195, 2009.

RIBEIRO, M. F. B.; GUIMARÃES, A. M. Encephalitozoon like microsporidia in the ticks *Amblyomma cajennense* and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 6, p. 1029-1033, 1998.

ROBY, T. O.; ANTHONY, D. W. Transmission of equine piroplasmiasis by *Dermacentor nitens* Neumann. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 142, n. 7, p. 768-769, 1963.

ROBY, T. O.; ANTHONY, D. W.; THORTON Jr., C. W.; HOLBROOK, A. A. The hereditary transmission of *Babesia caballi* in the Tropical Horse Tick *Dermacentor nitens* Neumann. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, n. 105, p. 494-499, 1964.

SALLES, R. S.; FONSECA, A. H.; SCOFIELD, A.; MADUREIRA, R. C.; YOSHINARI, N. H. Sorologia para *Borrelia burgdorferi* *latu sensu* em eqüinos no estado do Rio de Janeiro. **A Hora Veterinária**, v. 22, n. 127, p. 46-49, 2002.

SCHWAN, T.G. Ticks and *Borrelia*: model systems for investigating pathogen-arthropod interactions. **Infectious agents and disease**, v. 5, n. 3, p. 167-181, 1996.

SCHWAN, T. G.; 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 of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 382-388, 2000.

SERRA-FREIRE, N. M. S. Epidemiologia de *Amblyomma cajennense*: ocorrência sazonal e comportamento dos estágios não parasitários em pastagens do Estado do Rio de Janeiro. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 5, n. 2, p. 187-193, 1982.

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.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. v. 2, New York: Oxford University Press, 1991, 464p.

STEERE, A.C. Lyme disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 31, n. 1, p. 586-597, 1989.

STEERE, A. C.; MALAWISTA, S. E.; HARDIN, J. A.; RUDDY, S.; ASKENASE, P. W.; ANDINAN, W. A. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: the enlarging clinical spectrum. **Annals of Internal Medicine**, v. 86, n. 6, p. 685-698. 1977a.

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 Rheum.** v. 20, n. 1, p. 7-17, 1977b.

TEIXEIRA, R. C. **Cultivo de *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) em células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae).** 2010. 28f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

TRAGER, W. Cultivation of the vírus of grasserie in silkworm tissue cultures. **Journal of Experimental Medicine.** v. 61, n.4, p. 501-514, 1935.

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

WEYER, F. Explantationsversuche bei Läusen in Verbindung mit der Kultur von Rickettsien. **Cblatt Bakt. Parasitenk. Infektionskr.**, v. 159, n. 1-2, p. 13-22, 1952.

YOSHINARI, N. H. Uma longa jornada para entender a *Borrelia burgdorferi* no Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 5, p. 483-486, 2009.

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. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. **Revista Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 111-117, 1997.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; FONSECA, A. H.; BONOLDI, V. L. N.; BARROS-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.; YASSUDA, P.; BAGGIO, D.; STEERE, A. C.; PAGLIARINE, R. C.; COSSERMELLI, W. Estudo epidemiológico da doença de Lyme no Brasil. **Revista Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 47, n. 2, p. 71-75, 1992.

YOSHINARI, N. H.; MANTOVANI, E.; BONOLDI, V. L. N.; MARANGONI, R. G.; GAUDITANO, G. Doença de lyme-símile brasileira ou síndrome Baggio-Yoshinari: zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. **Revista da Associação Médica Brasileira.** v. 56, n.3, p. 363-369, 2010.

YOSHINARI, N. H.; OYAFUSO, L. K.; MONTEIRO, F. G. V.; BARROS, P. J. L.; CRUZ, F. C. M.; FERREIRA, L. G. E.; BONASSER, F.; BAGGIO, D.; COSSERMELLI, W. Doença de Lyme: Relato de um caso observado no Brasil. **Revista Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 48, n. 4, p.170-174, 1993.

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, 1987. p. 35-51.

YUNKER, C. E.; CORY, J. Effectiveness of refrigerated nymphs in tick tissue culture experiments. **Journal of Parasitology**, v. 51, n. 4, p. 686, 1965.

ZUNG, J. L.; LEWENGRUB, S.; RUDZINSKA, M. A.; SPIELMAN, A.; TELFORD, A. R.; PIESMAN, J. Fine structural evidence for the penetration of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdoferi* through the gut and salivary tissues of *Ixodes dammini*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, n. 1, p. 1737-1748, 1989.