

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

DISSERTAÇÃO

**Cultivo de *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales:
Spirochaetaceae) em células embrionárias de
Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae)**

Rafaella Câmara Teixeira

2010



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

**CULTIVO de *Borrelia burgdorferi* (SPIROCHAETALES:
SPIROCHAETACEAE) EM CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE
Rhipicephalus sanguineus (ACARI: IXODIDAE)**

RAFAELLA CÂMARA TEIXEIRA

Sob a Orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

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.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2010

636.089696

T266c

T

Teixeira, Rafaella Câmara, 1984-.
Cultivo de *Borrelia burgdorferi*
(Spirochaetales: Spirochaetaceae) em células
embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus*
(Acari: Ixodidae) / Rafaella Câmara Teixeira
- 2010.
28 f.: il.

Orientador: Adivaldo Henrique da
Fonseca.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Bibliografia: f. 21-28.


1. Parasitologia veterinária - Teses. 2.
Carrapato - Teses. 3. Células -
Proliferação - Teses. 4. *Borrelia*
burgdorferi - Teses. I. Fonseca, Adivaldo
Henrique da, 1953-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa
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

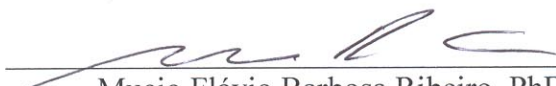
RAFAELLA CÂMARA TEIXEIRA

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.

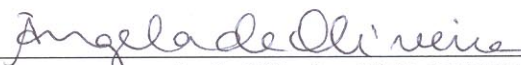
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25 de Fevereiro de 2010.



Aivaldo Henrique da Fonseca. PhD. UFRRJ
(Orientador)



Mucio Flávio Barbosa Ribeiro. PhD. UFMG



Angela de Oliveira. PhD. UFRRJ



Carlos Luiz Massard. PhD. UFRRJ

“Nossa maior fraqueza está em desistir.

O caminho mais certo para vencer é tentar outra vez.”

Autor desconhecido

**Dedico este trabalho a minha família:
meus pais Luiz e Glória, meus irmãos
Rodrigo e Renata, minha vizinha Gedalva
(*in memoriam*) e meus animais Billy e Mel,
obrigada por tudo!**

AGRADECIMENTOS

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.

Aos amigos do Laboratório que contribuíram para o trabalho experimental, cada um ajudando da sua maneira, Fábio Jorge Moreira da Silva, Charles Passos Rangel, Bruna de Azevedo Baêta, Renata Kazuko Sakai e Jania de Rezende, sem eles nada disso seria possível.

Aos demais companheiros do Laboratório, Raquel da Silva Lisbôa, Nathalie Costa da Cunha, Fabíola do Nascimento Corrêa, Daniel da Silva Guedes Júnior, Karina Martins Cardoso, 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, por sua amizade e ajuda em todos os momentos.

Um agradecimento especial a minha amiga do peito, irmã (gêmea!) e companheira de todas as horas, Janaína da Soledad Rodrigues, obrigada por tudo mesmo.

Ao amigo Francisco de Assis Ribeiro, pelos anos de amizade e por ceder os carrapatos necessários para esta pesquisa.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Coccídios e Coccidioses, em especial a Gisele Santos de Meireles, Walter Flausino e Landreani Ramirez Gonçalves, pela amizade, pelos momentos de diversão e pela utilização do Laboratório.

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.

Aos amigos Marco Aurélio Pohlmann, Thiago de Almeida Corrêa e Elisângela Faria Alexandrino, por estarem sempre presentes nos bons e maus momentos, confortando, incentivando e acreditando em mim.

À Professora Marília Massard da Fonseca, pela gentileza com que sempre nos recebe em sua casa.

Às Professoras Elizabeth Ballesteiro e Patrícia Gonçalves, pela forma com que se prontificaram a ajudar.

Aos animais pelo carinho e amor incondicional.

À turma de Medicina Veterinária 2003 – I da UFRRJ, pelos anos inesquecíveis.

Ao CNPQ pela ajuda financeira com a concessão de bolsa durante o período de Mestrado.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Rafaella Câmara Teixeira, filha de Luiz Augusto Teixeira e Glória Luiza Câmara, nasceu em 22 de Junho de 1984, na cidade e estado do Rio de Janeiro.

Cursou até a 4^a série do Ensino Fundamental no Colégio Washington Luís, na cidade de Saquarema-RJ, e, da 5^a a 8^a série, na Escola Municipal 04.10.018 Berlim, na cidade do Rio de Janeiro-RJ.

Do ano de 1999 ao ano de 2002, cursou Ensino Médio e Educação Profissional de Nível Técnico em Saúde, na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro-RJ, obtendo o título de Técnica em Patologia Clínica. Durante o último ano, fez estágio nos Laboratórios de Patologia Clínica da Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ; do Hospital Geral de Bonsucesso - Ministério da Saúde; e do Instituto de Pesquisa do Hospital Evandro Chagas - FIOCRUZ.

No ano de 2003, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), colando grau e obtendo o título de Médica Veterinária em 06 de Março de 2008.

Durante o período acadêmico, participou de projetos de pesquisa no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública - UFRRJ, onde realizou 29 publicações científicas, entre artigos em revistas científicas indexadas e em congressos e eventos científicos nacionais e internacionais.

Foi bolsista de Iniciação Científica do CNPq de Março de 2005 a Fevereiro de 2008, junto a projetos de pesquisa na área de alimentação artificial e mecanismos de transmissão de bioagentes por carrapatos e na área de cultivo de células embrionárias de carrapato, no Laboratório de Doenças Parasitárias, localizado no prédio do Projeto Sanidade Animal, convênio UFRRJ/EMBRAPA.

Em março de 2008, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária, ao nível de Mestrado, da UFRRJ, onde foi Bolsista do CNPq. Nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

RESUMO

TEIXEIRA, Rafaella Câmara. **Cultivo de *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) em células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae)**. 2010. 28p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

As culturas celulares oferecem um simplificado sistema de observação que pode ser particularmente útil para estudos de microrganismos intracelulares e epicelulares. O objetivo deste estudo foi estabelecer cultura primária *in vitro* de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* para cultivo da espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, cepa americana G39/40. A cultura foi estabelecida a partir de ovos embrionados de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* com 12 dias após o início da postura, utilizando o meio de cultivo Leibovitz's L-15B, suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado, 10% de caldo triptose fosfato, 0,1% fração V de albumina bovina, 1% de glutamina e 0,1% de antibiótico gentamicina, pH 6,8. Com a formação de uma monocamada celular, o meio de cultura inicial L-15B foi retirado dos tubos e trocado por meio Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) ou BSK com L-15B sem antibiótico. As espiroquetas previamente cultivadas em BSK foram contadas e inoculadas nos tubos, apresentando concentração final de aproximadamente $6,2 \times 10^5$ espiroquetas/mL. A contagem de *B. burgdorferi* dos tubos inoculados foi realizada quando o meio apresentou coloração amarela, indicativa de elevada acidez devido à multiplicação das espiroquetas. No terceiro dia após o início da cultura primária de células embrionárias de *R. sanguineus*, foi possível observar a fixação de agregados celulares na superfície dos frascos. A partir destes agregados, surgiram diversos tipos celulares, como grandes células fibroblastóides e estruturas semelhantes a vesículas e tubos. Na segunda semana, foi observado o aparecimento das células epitelióides ou redondas e, com 21 dias de cultivo, visualizou-se a formação de uma monocamada celular devido ao aspecto confluyente das células. O meio de cultivo L-15B demonstrou ser eficiente para o desenvolvimento da cultura primária de células embrionárias de *R. sanguineus*. Houve grande multiplicação das espiroquetas cultivadas com células embrionárias quando comparada à concentração inicial, assim como das espiroquetas cultivadas na ausência das células de carrapato, observando-se um aumento em 100 vezes do número de *B. burgdorferi*. Sete dias após a inoculação, foram recuperadas maiores concentrações de *B. burgdorferi* nos tubos onde se utilizou somente o meio BSK, do que nos tubos onde foi utilizado BSK juntamente com Leibovitz's L-15B. Independente dos meios de cultivo testados, a concentração final de *B. burgdorferi* dos tubos com células embrionárias de carrapato foi menor do que a dos tubos sem células embrionárias. Na observação dos tubos de cultivo à microscopia de contraste de fase, as espiroquetas apresentaram-se aderidas às células de carrapato epitelióides e fibroblastóides de maneira epicelular e com grande motilidade. As células embrionárias de *R. sanguineus* cultivadas em meio BSK, com ou sem inóculo de *B. burgdorferi*, pararam sua multiplicação, apresentaram degeneração na membrana e muitas desprenderam-se da superfície do frasco. As células cultivadas em meio BSK e L-15B continuaram a se multiplicar, muitas ainda estavam íntegras e aderidas ao frasco, com presença de tecidos em desenvolvimento, com menos células degeneradas e flutuantes que as cultivadas somente em BSK. A espiroqueta *B. burgdorferi*, cepa G39/40, aderiu, cresceu, multiplicou e apresentou grande motilidade nos cultivos com células embrionárias do carrapato *R. sanguineus*, utilizando meios BSK e Leibovitz's L-15B.

Palavras-chave: Carrapato, cultivo celular, *Borrelia burgdorferi*

ABSTRACT

TEIXEIRA, Rafaella Câmara. **Culture of *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) in embryonic cells of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae).** 2010. 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, 2010.

Cell cultures provide a simplified system of observation that can be particularly useful for studies of intracellular and epicellular microorganisms. The aim of this study was to establish *in vitro* embryonic cells primary culture of the tick *Rhipicephalus sanguineus* to cultivate the spirochete *Borrelia burgdorferi* american strain G39/40. The culture was established from embryonated eggs of engorged females of *R. sanguineus* to 12 days after the beginning of the oviposition, using the culture medium Leibovitz's L-15B supplemented with 20% of inactivated fetal calf serum, 10% of tryptose phosphate broth, 0.1% fraction V bovine albumin, 1% of glutamine and 0.1% of gentamicin antibiotic, pH 6.8. After the formation of a monolayer, the initial culture medium L-15B was removed from the tubes and replaced by Barbour-Stoenner-Kelly medium (BSK) or BSK with L-15B without antibiotics. Spirochetes previously grown in BSK were counted and inoculated into tubes, with final concentration of approximately 6.2×10^5 spirochetes/mL. *B. burgdorferi* from the inoculated tubes were countered when the means showed yellow color, indicative of high acidity due to the multiplication of spirochetes. On the third day after the start of primary culture of *R. sanguineus* embryonic cells, we observed the fixation of cell aggregates on the surface of the bottles. From these clusters, there were several cell types, such as large fibroblast-type cells and structures like vesicles and tubes. In the second week, we observed the appearance of round or flattened epithelial-type cells, and after 21 days of culture, we realized the formation of a monolayer due to the appearance of confluent cells. The L-15B medium proved to be efficient for the development of primary culture of *R. sanguineus* embryonic cells. There was a great multiplication of spirochetes cultivated with cultured embryonic cells when compared to the initial concentration, as well as the spirochetes grown in the absence of the tick cells, observing an increase of 100 times the number of *B. burgdorferi*. Seven days after inoculation, the tubes in which we used only the BSK medium, higher concentrations of *B. burgdorferi* were recovered when compared to the tubes where the medium BSK and Leibovitz's L-15B were used. Regardless of the culture media tested, the final concentration of *B. burgdorferi* of the tubes with embryonic tick cells was lower than that of seamless embryonic cells. In observation of the culture tubes on microscopy phase contrast, spirochetes were presented adhered to epithelial-type and fibroblast-type tick cells in an epicellular way and with great motility. *R. sanguineus* embryonic cells grown in BSK medium, with or without *B. burgdorferi* inoculation, stopped its propagation, showed membrane degeneration and many of them broke away from the surface of the bottle. The cells grown in BSK and L-15B continued to multiply, many were still intact and attached to the bottle, with the presence of tissues in development, with fewer degenerated and floating cells than those cultivated in BSK. The spirochete *B. burgdorferi* strain G39/40, adhered, grew, multiplied and showed great motility in cultures of embryonic cells of *R. sanguineus* tick, using BSK and Leibovitz's L-15B media.

Key words: Tick, cell culture, *Borrelia burgdorferi*

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Sistemas de cultura utilizados para cultivo de <i>Borrelia burgdorferi</i> e de células embrionárias de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , em meios Barbour-Stoenner-Kelly (grupo I) ou Leibovitz's L-15B com Barbour-Stoenner-Kelly (grupo II).....	13

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Cultura primária <i>in vitro</i> de células embrionárias de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> cultivadas em meio Leibovitz's L-15B, em diferentes estágios de desenvolvimento: 7 dias (A), 12 dias (B) e 21 dias (C e D). Microscópio de contraste de fase invertido, aumento de 200x (A , B e C) e 400x (D).....	15
Figura 2. Representação gráfica da contagem em câmara de Neubauer de <i>Borrelia burgdorferi</i> nos diferentes sistemas de cultivo, demonstrando a concentração de espiroqueta nos momentos da inoculação e da recuperação após sete dias.....	17
Figura 3. Espiroquetas <i>Borrelia burgdorferi</i> aderidas em células embrionárias epitelíóides (A) e fibroblastóides (B e C) de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em cultura primária. Coloração de GIEMSA, microscópio de luz, aumento de 1000x.....	18

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Cultivo de células de carrapatos	3
2.2 Carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	5
2.3 Gênero <i>Borrelia</i>	6
2.3.1 Biologia de <i>Borrelia</i> spp. no carrapato	6
2.3.2 Doença de Lyme	8
2.3.3 Borreliose em cães	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Local de execução	11
3.2 Procedência da colônia de carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e da cepa de <i>Borrelia burgdorferi</i>	11
3.3 Cultura primária <i>in vitro</i> de células embrionárias de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	11
3.4 Manutenção da cultura primária de células embrionárias de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	12
3.5 Inoculação de <i>Borrelia burgdorferi</i> na cultura primária de células embrionárias de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	12
3.6 Subcultivo das células embrionárias de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1 Cultura primária <i>in vitro</i> de células embrionárias de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	14
4.2 Cultivo de <i>Borrelia burgdorferi</i> em células embrionárias de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	16
5 CONCLUSÕES	20
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de células e tecidos é uma técnica amplamente aplicada em diferentes áreas, desde as ciências básicas e biologia molecular até a biotecnologia. Culturas *in vitro* de células de carrapato são importantes ferramentas por fornecerem sistemas de interações vetor e patógeno, substrato para produção de diagnósticos com baixo custo e produção de vacinas, além de substituírem experimentos com animais, que na prática requerem alto custo, assim como implicações éticas.

O clima tropical predominante no Brasil favorece o desenvolvimento e a multiplicação de carrapatos, o que possibilita diversos estudos envolvendo estes espécimes. Desta forma, os cultivos primários de seus órgãos ou tecidos podem ser utilizados por pesquisadores em substituição às linhagens celulares comercializadas, que não são produzidas em nosso país e que apresentam elevado custo de compra ou burocracia para sua aquisição.

Estudos envolvendo cultivo primário de células embrionárias de carrapato foram desenvolvidos com êxito para as espécies *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma cajennense* por Rezende (2008). Entretanto, não há registro do estabelecimento de cultura primária de *Rhipicephalus sanguineus* no Brasil. Este ixodídeo apresenta a mais ampla distribuição geográfica no mundo, sendo encontrado naturalmente parasitando os cães (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Outras espécies podem atuar como hospedeiros alternativos, entre elas felinos, coelhos, roedores e pequenos ruminantes. A importância econômico-sanitária de *R. sanguineus* está associada a sua capacidade de atuar como vetor de diferentes patógenos, principalmente *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*. No Brasil, *R. sanguineus* é um dos principais transmissores de *Hepatozoon canis* e possui provável participação na transmissão de *Rickettsia rickettsii* para humanos (CUNHA et al. 2009), além de ser indicado como possível vetor de *Borrelia* spp. (YOSHINARI et al., 1997; YOSHINARI, 2009).

O cultivo de tecidos de carrapatos pode contribuir para esclarecimento dos mecanismos de transmissão, aderência celular, migração no interior do vetor e interação do agente com células e tecidos do vetor. As culturas celulares oferecem um simplificado sistema de observação que pode ser particularmente útil para estudos de microrganismos intracelulares e epiteliais. Interações celulares e moleculares entre patógenos e células *in vitro* de carrapatos têm sido pouco estudadas. Desta forma, o cultivo de células dos diferentes órgãos e tecidos de carrapatos pode servir como importante ferramenta para o estudo de *Borrelia* spp.

O agente etiológico da Borreliose de Lyme nos Estados Unidos da América (EUA) é *Borrelia burgdorferi*, transmitido por carrapatos do gênero *Ixodes* ao homem e aos animais durante o repasto sanguíneo. Os resultados das pesquisas realizadas no Brasil mostraram a existência de um agente etiológico relacionado com carrapatos que é capaz de estimular o sistema imune do hospedeiro a produzir anticorpos contra a cepa americana G39/40 *B. burgdorferi* stricto sensu. A Doença de Lyme brasileira tem sido chamada, desde 2005, de Síndrome de Baggio-Yoshinari devido às diferenças entre o agente etiológico, os aspectos clínicos e laboratoriais observados na Borreliose de Lyme nos EUA (YOSHINARI, 2009).

Tentativas de cultivo de espiroquetas isoladas de humanos e animais no Brasil têm sido realizadas sem sucesso em meios líquidos artificiais, como o Barbour-Stoenner-Kelly (BSK). Dessa forma, as linhas de pesquisa buscam atualmente outras formas de cultivo, isolamento e identificação de *Borrelia* spp. O cultivo *in vitro* de *B. burgdorferi* com células embrionárias oriundas de cepas de carrapatos encontradas no Brasil pode ser útil no esclarecimento de aspectos relativos à sua biologia dentro do vetor, que poderia servir de auxílio para uma melhor compreensão da espiroqueta encontrada em nosso país.

Assim sendo, o presente estudo objetivou estabelecer cultura primária *in vitro* de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* para cultivo da espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, cepa americana G39/40.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultivo de células de carrapatos

A primeira tentativa registrada de cultivo de tecidos de carrapatos ocorreu em 1952, quando Weyer tentou manter rickettsias 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 (YUNKER, 1987).

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). O primeiro estabelecimento de cultura de células embrionárias foi do carrapato *Hyalomma asiaticum*, realizado por Medvedeva et al. (1972), enquanto Pudney et al. (1973) estabeleceram o segundo cultivo, com ovos de *Rhipicephalus microplus*. Estes autores observaram as formas celulares fibroblastóides e epitelíoides após algumas semanas de cultivo.

As células de carrapatos em cultivo não apresentam inibição por contato e a maioria cresce rapidamente em três dimensões, geralmente não se aderem fortemente, dividem-se relativamente devagar, podem sobreviver por longos anos com mudanças regulares de meio de cultivo e com realização ocasional de subculturas (BELL-SAKYI et al., 2007).

O sucesso do cultivo com células embrionárias depende de diversos fatores, como a manutenção das culturas sem contaminantes, a escolha do dia adequado para a utilização dos ovos (aproximadamente na metade do seu desenvolvimento) (PUDNEY et al., 1973), bem como a escolha do meio de acordo com a espécie de carrapato e com o tipo de tecido a ser cultivado.

Řeháček; 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 que era previsto, levando assim à utilização de meios de cultivo para células de vertebrados. O mais comumente usado é o 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, permite o isolamento e a manutenção de células de diversas espécies de ixodídeos (KURTTI et al., 1982). Em 1985, o meio L-15 foi modificado pela adição de traços minerais, vitaminas, aminoácidos, ácido α -cetoglutárico e glicose, formando o meio Leibovitz's L-15B (MUNDERLOH; KURTTI, 1985), que supre as deficiências nutricionais presentes no Leibovitz's L-15 (MUNDERLOH; KURTTI, 1989).

Com o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo de células de carrapato, foi estabelecida a primeira linhagem contínua através de tecidos de carrapatos marrons africanos, *Rhipicephalus appendiculatus* (VARMA et al., 1975). Segundo Bell-Sakyi et al. (2007), hoje existem 44 linhagens celulares estabelecidas de 14 gêneros de carrapatos de importância médica e veterinária.

A maioria das linhagens celulares de carrapato existentes foi estabelecida de células embrionárias, usando metodologia simples e sem selecionar tipos de tecidos específicos (KURTTI et al., 1988b; BELL-SAKYI, 1991; MUNDERLOH et al., 1994). Desse modo, as linhagens geralmente são compostas de dois ou mais tipos celulares presentes em proporções variadas, sendo essencial para a sobrevivência do cultivo (YUNKER, 1987).

Os virologistas têm utilizado linhagens celulares de *R. appendiculatus* para propagação e estudo de arboviroses por mais de 30 anos (VARMA et al., 1975; PUDNEY, 1987; VARMA, 1989); recentemente linhagens de diversas outras espécies de carrapato têm sido utilizadas com sucesso para este propósito (LAWRIE et al., 2004; SENIGL et al., 2004; GARCIA et al., 2005).

Embora as linhagens celulares ainda não tenham sido amplamente utilizadas em estudos sobre a fisiologia de carrapatos, a geração de cepas resistentes a organofosforados da linhagem celular de *R. microplus* VII-SCC constituiu em uma oportunidade para estudar *in vitro* a evolução da resistência acaricida nesta espécie (COSSIO-BAYUGAR et al., 2002). Recentemente, lisozimas imune-responsivas tipo-c foram identificadas e caracterizadas a nível molecular na linhagem celular DAE100 de *Dermacentor andersoni* (SIMSER et al., 2004).

A mais significativa evolução em propagação de patógenos em linhagens celulares diz respeito a *Ehrlichia* e *Anaplasma*. Diversos membros desse gênero de bactérias intracelulares obrigatórias têm sido cultivados em linhagens de células de carrapato desde 1995, sendo *Anaplasma marginale* mais extensivamente explorado (MUNDERLOH et al., 1996; BLOUIN et al., 2002). Cultivos contínuos desses patógenos têm sido realizados em linhagens celulares de várias espécies de carrapatos, predominantemente *Ixodes scapularis* (BELL-SAKYI et al., 2007). Na pesquisa para vacina contra *A. marginale*, as linhagens de célula de *I. scapularis* têm tido um papel importante em muitos estudos de transcrição de gene diferencial e de expressão de proteína de membrana externa.

Além da utilização na propagação de patógenos, alguns dos quais não podem ser cultivados *in vitro* em nenhum outro sistema de cultivo, as linhagens de células têm aplicação no isolamento de microrganismos não caracterizados associados a carrapatos (BELL-SAKYI et al., 2007). Essa função atual e potencial é facilitada pela série de espécies de carrapatos das quais as linhagens de célula são agora disponíveis, e a habilidade bem documentada de algumas destas linhagens em suportar o crescimento de microrganismos que não são transmitidos por carrapato (PUDNEY, 1987; LAWRIE et al., 2004; BELL-SAKYI, 2004). O cultivo de órgãos de carrapatos já foi usado com sucesso também para cultura de estágios de protozoários parasitas que mostraram somente desenvolvimento limitado *in vitro* (KURTTI et al., 1983; BELL, 1984).

As células de carrapato forneceram uma evolução importante para os estudos da transcrição de genes e da expressão de proteínas de *Borrelia burgdorferi*; a co-cultivação das espiroquetas com as células IDE8 e ISE6 influenciou na expressão das proteínas de superfície externa OspA e OspC associada com o aumento da infectividade das espiroquetas para o hospedeiro mamífero (OBONYO et al., 1999).

Obonyo et al. (1999) observaram que a expressão diferencial de proteínas OspA e OspB de *B. burgdorferi*, cultivado com células do carrapato *I. scapularis*, foi similar ao que observaram em *B. burgdorferi* parasitando o mesmo carrapato no momento da sua alimentação. Também observaram o declínio na produção de OspA e o aumento na produção de OspC, mais pronunciados em espiroquetas cultivadas com células de carrapato a 37°C, do que as cultivadas em meio BSK na mesma temperatura. Dessa forma, a manipulação de sistemas com células de carrapato pode ser uma ferramenta útil 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 (OBONYO et al., 1999).

Borrelia burgdorferi modula também sua expressão de gene na presença das células do hospedeiro. A expressão relativa de genes de OspA e OspC é alterada com a passagem de *B. burgdorferi* do carrapato para o hospedeiro mamífero (SCHWAN et al., 1995). Schwan et al. (1988) reportaram que o cultivo de *B. burgdorferi* em meio BSK diminui a infectividade das espiroquetas, além de reduzir o número de plasmídios.

Kurtti et al. (1988a) trabalharam com diversas linhagens de células de carrapato e observaram o melhor desenvolvimento da espiroqueta *B. burgdorferi* nas células embrionárias de *R. appendiculatus* (RAE25). Culturas de células de mamíferos têm provido compreensões na patogênese da doença de Lyme no hospedeiro vertebrado e têm ajudado na identificação dos receptores celulares em que aderem as espiroquetas. Estudos similares com células de carrapatos podem elucidar o fenômeno de tropismo da espiroqueta pelos tecidos e células de carrapatos, assim como os mecanismos de transmissão (KURTTI et al., 1988a).

Kurtti et al. (1993) cultivaram cepas recém-isoladas de *B. burgdorferi* em linhagem de célula de *R. appendiculatus* (RAE25) e observaram que as espiroquetas co-cultivadas com estas células de carrapato por mais de um ano e por 51 passagens mantiveram sua infectividade para hamsters (*Mesocricetus auratus*). A capacidade das cepas de *B. burgdorferi* para induzir edema de articulação (artritogenicidade) foi perdida na 30^a passagem do co-cultivo, e a infectividade após a 51^a passagem. Em contraste, espiroquetas cultivadas somente em meio BSK perderam a artritogenicidade e a infectividade para hamsters após a 11^a passagem.

Neste mesmo trabalho, os autores reportaram que a espiroqueta *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 desta espiroqueta de interagir com uma variedade de tipos de células pode ser um fator importante para explicar sua infectividade em diferentes hospedeiros.

Em 2004, Varela et al. isolaram pela primeira vez *Borrelia lonestari* em cultivo de células embrionárias de *I. scapularis*, linhagem ISE6, utilizando carrapatos *Amblyomma americanum* naturalmente infectados com a espiroqueta.

Dessa forma, o cultivo celular de carrapatos é um modelo útil para estudar a interação entre as células desses artrópodes e os patógenos economicamente importantes transmitidos por eles, pois poderá ajudar a definir a natureza complexa da relação hospedeiro-vetor-patógeno (BELL-SAKYI et al., 2007).

2.2 Carrapato *Rhipicephalus sanguineus*

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* pertence à família Ixodidae e é conhecido popularmente como “carrapato-vermelho-do-cão” ou “carrapato-dos-canis”. A espécie apresenta a mais ampla distribuição geográfica no mundo, ocorrendo em toda região neotropical, com predomínio nas áreas urbanas. Pode ocasionar infestações maciças com intensa espoliação do hospedeiro, além de transmitir patógenos muitas vezes letais ao cão (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

As infestações ocorrem quase que exclusivamente em cães domésticos, que não parecem desenvolver resistência aos carrapatos, sendo comuns as reinfestações; felinos, coelhos, pequenos ruminantes, eqüinos podem servir de hospedeiros alternativos. Por outro lado, roedores e especialmente cobaias apresentam forte resistência ao carrapato após a primeira infestação. Carnívoros silvestres, em cativeiro ou vivendo em áreas frequentadas por cães, podem servir de hospedeiros. São poucos os relatos de parasitismo em humanos na região neotropical, sendo todos registros acidentais. Segundo Labruna (2004), infestações em hospedeiros secundários são conseqüências de um crescimento exagerado do carrapato no ambiente em áreas habitadas por cães.

Rhipicephalus sanguineus é uma espécie com ciclo de vida trioxeno, ou seja, tem sua fase parasitária em três hospedeiros, realizando suas mudas no meio ambiente. Por estarem bem adaptados aos ambientes urbanos, estes carrapatos possuem hábitos nidícolas, entocados nas frestas dos abrigos de seus hospedeiros. Outro hábito importante é a tendência em subir

por anteparos, facilmente escalando muros divisórios e infestando as casas e quintais vizinhos (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Ehrlichia canis e *Babesia canis* são os mais importantes agentes patogênicos transmitidos por *R. sanguineus*. No Brasil, um dos principais transmissores de *Hepatozoon canis* é *R. sanguineus* (O'DWYER; MASSARD, 2001). Labruna; Pereira (2001); Cunha et al. (2009) relataram considerável chance da participação deste carrapato na transmissão de *Rickettsia rickettsii* para humanos no Brasil. A Doença de Lyme, causada por *Borrelia* sp., tem o carrapato *R. sanguineus* como possível vetor no continente americano (YOSHINARI et al., 1997; YOSHINARI, 2009).

2.3 Gênero *Borrelia*

Os microrganismos do gênero *Borrelia* possuem o formato helicoidal, com 3 a 10 espiras e medem de 0,2 a 0,5µm por 3 a 30µm. Este organismo possui protoplasma cilíndrico envolto pela membrana celular, da qual partem de 15 a 20 flagelos periplasmáticos e possui externamente outra membrana contendo diversas proteínas de superfície (BARBOUR; HAYES, 1986; PFISTER et al., 1994). Reproduzem-se por fissão binária transversal e são microaerófilos (AUSTIN, 1993). São bactérias gram negativas, crescem à temperatura de 33°C em meios artificiais e podem ser visualizadas através de microscopia de campo escuro, contraste de fase ou ainda em tecidos, quando por colorações à base de prata (BARBOUR; HAYES, 1986; QUINN et al., 1994).

A primeira observação de espiroqueta foi reportada por Leeuwenhoek em 1681, em material oriundo da mucosa oral e intestinal de humanos. No entanto, a importância deste grupo se deu a partir da descoberta de Obermeier em 1873, quando verificou na Rússia a presença de espiroquetas no sangue de indivíduos com febre recorrente (PESSOA, 1963). Atualmente, a identificação das espécies é feita pela associação dos estudos biológico, bioquímico e molecular (BARBOUR; HAYES, 1986; BARBOUR et al., 1996; SILVA; FIKRIG, 1997).

As espiroquetas do gênero *Borrelia* se desenvolvem como simbioses nos artrópodes e atuam como parasitas sanguíneos nos animais e no homem (HOOGSTRAAL, 1985). São transmitidas principalmente por carrapatos, embora, em raros casos, por tabanídeos, culicídeos e sifonápteros (MAGNARELLI et al., 1986; 1987). Entretanto, não há estudos que confirmem sua competência como vetores para transmissão dessas espiroquetas para o homem (DERDÁKOVÁ; LENCÁKOVÁ, 2005)

2.3.1 Biologia de *Borrelia* spp. no carrapato

O modo de transmissão de *Borrelia* spp. nos carrapatos ixodídeos pode ser transovariana (vertical) e/ou transestadial (horizontal) (SMITH et al., 1978; RANDOLPH et al., 1996). O estágio de ninfa parece ter maior importância epidemiológica na transmissão, manutenção e dispersão da espiroqueta (SOARES et al., 2000).

O tempo de fixação no hospedeiro é importante por definir a eficiência na transmissão. Segundo Piesman et al. (1987); Falco et al. (1995), este tempo é superior a 48 horas para a transmissão de *Borrelia* spp. pelos ixodídeos. No momento da transmissão, a saliva do carrapato exerce ainda ações farmacológicas, como o bloqueio de células fagocitárias e inflamatórias, facilitando a penetração e a disseminação do patógeno (RIBEIRO et al., 1987).

Hoogstraal (1985); Schwan (1996); Randolph et al. (1996) verificaram que existe uma dependência bioquímica entre a espiroqueta e o vetor, que se dá principalmente ao nível de trato intestinal do carrapato, quando do desenvolvimento e multiplicação de *Borrelia* spp. Este fenômeno, bem como a quimiotaxia da espiroqueta por determinados sítios do trato

digestivo do carrapato, estão relacionados à ativação de genes, presentes em *Borrelia* spp. para determinadas fases do ciclo biológico (BARBOUR, 1990; SILVA; FIKRIG, 1997).

Na maioria dos carrapatos em jejum, as espiroquetas estão presentes no intestino e migram durante a alimentação sanguínea para as glândulas salivares, de onde são transmitidas ao hospedeiro através da saliva (CRIPPA et al., 2002). Tanto no vetor quanto no hospedeiro vertebrado, *Borrelia burgdorferi* é principalmente um parasita de superfície celular, embora possam ocorrer fases intracelulares.

Segundo Balashov (2005), os microrganismos do gênero *Borrelia* encontram-se na cavidade intestinal e ficam na superfície e nos espaços intercelulares das células intestinais. Com o começo da alimentação, parte dos patógenos migra à cavidade do corpo e depois penetra nas glândulas salivares, no gânglio nervoso, e em outros órgãos internos. 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).

O(s) fator(es) envolvido(s) na atração das espiroquetas pelas células dos carrapatos ainda não foi elucidado. A dinâmica deste tropismo e a invasão subsequente de tecidos do carrapato variam entre as espécies do gênero *Borrelia*. As espiroquetas causadoras de febre, tal como *Borrelia duttoni* e o agente da borreliose bovina, *Borrelia theileri*, penetram no intestino logo após a ingestão, e a invasão dos órgãos internos é extensiva. Em contraste, as espiroquetas da doença de Lyme permanecem principalmente dentro do lúmen intestinal ao longo das superfícies microvilares das células do intestino e entre elas (ZUNG et al., 1989). A penetração do intestino e das glândulas salivares é ligada às mudanças na organização e nas funções estruturais destes órgãos durante a alimentação e a salivação. Não obstante, a maioria das espiroquetas permanece no intestino, dentro do espaço endoperitrófico e ectoperitrófico, e poucas parecem ser invasivas. A penetração do intestino ocorre durante o transporte ativo de nutrientes e a reorganização extensiva das membranas da célula epitelial (BALASHOV, 2005).

Na hemocele, *B. burgdorferi* adere às superfícies basais do epitélio do intestino, às superfícies basais e laterais dos ácinos da glândula salivar, e aos oócitos (ZUNG et al., 1989). As espiroquetas avidamente aderem à matriz extracelular (membrana basal) do intestino e das glândulas salivares e podem penetrar através das matrizes altamente viscoelásticas, tais como a lâmina basal da membrana peritrófica (KIMSEY; SPELMAN, 1990). A cinética de *B. burgdorferi* na superfície basal do intestino e nas superfícies apicais dos ácinos da glândula salivar suportam a conclusão de que a migração da espiroqueta no carrapato segue o fluxo de líquidos corporais do intestino às glândulas salivares (BENACH et al., 1987). Leuba-Garcia et al. (1994) observaram que, como as taxas de infecção das glândulas salivares de *Ixodes ricinus* em jejum coletados na Suíça foram elevadas, sugeriram que os carrapatos infectados sistemicamente podem transmitir *Borrelia* spp. bem cedo para o hospedeiro. Crippa et al. (2002) observaram também que as espiroquetas se tornam infectantes no carrapato antes de alcançarem as glândulas salivares.

Os patógenos transmitidos por carrapatos possuem uma relação muito íntima com seus vetores. A ingestão durante a alimentação sanguínea coloca o microrganismo dentro do lúmen intestinal, que deve migrar até as glândulas salivares no momento certo para a transmissão durante uma alimentação subsequente. Os hormônios do invertebrado ou os fatores associados com os tecidos do carrapato transmitem um sinal que induzem etapas necessárias para o patógeno, tal como a colonização dos ovários durante o desenvolvimento do ovo na preparação para a transmissão transovariana ou na dispersão às glândulas salivares até o momento da alimentação sanguínea (MUNDERLOH; KURTTI, 1995). Estas hipóteses não

podem facilmente ser investigadas dentro do ambiente complexo dos carrapatos, mas a cultura de células desses artrópodes oferece um sistema simplificado e muito útil para examinar muitas destas inter-relações.

Os microrganismos do gênero *Borrelia* são transmitidos transovarianamente em muitas espécies de carrapato. As espiroquetas nos ovários invadem a gema do oócito a partir da hemolinfa, antes da formação da casca dos ovos. Durante o desenvolvimento embrionário, migram da região da gema para o gânglio (BARBOUR; HAYES, 1986). Em alguns casos, as larvas da próxima geração podem não ser capazes de transmitir *Borrelia* spp., porém a ninfa após sua alimentação frequentemente 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 documentadas em laboratório (BALASHOV, 1968).

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 (GILMORE; PIESMAN, 2000; SCHWAN; PIESMAN, 2000; 2002).

2.3.2 Doença de Lyme

A Doença de Lyme ou Borreliose de Lyme é a mais prevalente zoonose transmitida por artrópodes no hemisfério norte (STEERE, 2001; ROSTOFF et al., 2009). Com aproximadamente 20.000 novos casos reportados a cada ano, a Doença de Lyme tem se tornado a doença transmitida por vetor mais comum nos EUA (HILDENBRAND et al., 2009).

A patologia foi descoberta em 1975 pelo Dr. Allen C. Steere, mais tarde Burgdorfer et al. (1982) encontraram espiroquetas em carrapatos da espécie *Ixodes scapularis*. A Borreliose de Lyme possui caráter epidemiológico cosmopolita, sendo descrita na América do Norte, América Central, América do Sul, Ásia, África, Europa e Austrália. Apresentando manifestações clínicas muitas vezes distintas, porém todas transmitidas por carrapatos da família Ixodidae e determinadas por *Borrelia* spp. (BENNETT, 1995; BARBOUR et al., 1996).

Esta doença infecciosa multissistêmica com amplo espectro de sintomas clínicos é causada por um grupo de espiroquetas distinto filogeneticamente, conhecido como *Borrelia burgdorferi* lato sensu (*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* e *B. burgdorferi* stricto sensu) (STEERE et al., 1980; STEERE, 2001). São transmitidas ao homem e aos animais por carrapatos ixodídeos e todas as três genoespécies são endêmicas na Europa, onde só *B. burgdorferi* stricto sensu ocorre na América do Norte. Os principais vetores dessas espiroquetas são os carrapatos *Ixodes ricinus* na Europa, *Ixodes persulcatus* na Ásia, *I. scapularis* e *Ixodes pacificus* na América do Norte (STEERE et al., 1980; LELOVAS et al., 2008). Contudo, outras espécies podem transmitir o agente, dependendo da região fisiográfica (SOARES et al., 2000). Estas espiroquetas já foram isoladas de outros gêneros de carrapatos, como *Amblyomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus* (YOSHINARI et al., 1995).

A Doença de Lyme é uma antropozoonose e animais silvestres, especialmente pequenos roedores, são considerados reservatórios naturais das espiroquetas (FONSECA et al., 2005). As aves migratórias, além de se contaminarem com *Borrelia* spp., são capazes de disseminar larvas e ninfas de carrapatos contaminadas a longas distâncias (YOSHINARI et al., 1997). Animais domésticos como cão, gato, equino, bovino, além de contraírem a

infecção, são potenciais agentes transportadores de carrapatos para o ambiente peridomiciliar, favorecendo assim ao carrapato veicular o patógeno para o homem (MATHER et al., 1994; YOSHINARI et al., 1997).

O primeiro relato da Doença de Lyme no Brasil foi realizado por Filgueira et al. (1989) em pacientes com manifestações cutâneas. Os estudos prosseguem para caracterizar a espiroqueta responsável pela enfermidade no Brasil, mas sabe-se que a espécie aqui existente possui características antigênicas homólogas a *B. burgdorferi* stricto sensu, *B. garinii* e *B. afzelii* (SOARES, 1998) e já foi diagnosticada em animais (FONSECA et al., 1996) e em humanos (YOSHINARI et al., 1997).

Devido a diversas particularidades, a Doença de Lyme brasileira tem sido chamada, desde 2005, de Síndrome de Baggio-Yoshinari (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. 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*: *Amblyomma cajennense*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus microplus* (YOSHINARI, 2009).

No estágio agudo da doença em humanos, surge uma lesão cutânea de crescimento expansivo, no local da picada do carrapato contaminado, denominada eritema migratório, concomitante com sintomas inespecíficos sugestivos de infecções viróticas, tais como febre baixa, mialgia, fadiga, tosse seca ou produtiva (YOSHINARI et al., 1997).

No estágio latente, observam-se manifestações sistêmicas, tais como febre, fadiga, dor de garganta, mialgia, calafrios, tosse. Queixas articulares também são relatadas, como artralgia e artrite, envolvendo principalmente articulações dos joelhos, das mãos e dos pés. As manifestações neurológicas estão presentes entre 15 a 20% dos pacientes dos EUA, como meningite, mielite e encefalopatia; no Brasil, estão presentes em 25% dos pacientes e podem cursar também com disfunções do cognitivo, como perda de memória e atenção, mudanças no comportamento e no padrão do sono. Manifestações cardíacas, tais como bloqueio atrioventricular, cardiomegalia e arritmias, são raras no Brasil e nos EUA (YOSHINARI et al., 1995; YOSHINARI et al., 1997; STANEK; STRLE, 2003; YOSHINARI; MANTOVANI, 2006).

2.3.3 Borreliose em cães

Na Doença de Lyme, o cão pode atuar como importante sentinela epidemiológica, albergando a espiroqueta, comportando-se como reservatório no ambiente domiciliar, favorecendo, assim, ao carrapato veicular o patógeno para o homem e outros animais (APPEL, 1990; MATHER et al., 1994). Atualmente, os cães são considerados animais sentinelas para a Borreliose de Lyme, cuja prevalência correlaciona-se positivamente com aquela verificada para seres humanos, na mesma área (MERINO et al., 2000; OLSON et al., 2000).

A infecção é usualmente assintomática em cães. Entretanto, podem ser observados sinais envolvendo o sistema músculo-esquelético, com quadro de artrite progressiva (LEVY; DRESEN, 1992; STRAUBINGER, 2000). Com a utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase, foi possível detectar DNA de *Borrelia burgdorferi* em urina de cães (BAUERFEIND et al., 1998), em amostras de membranas sinoviais, pele, fluido cérebro-espinhal, bexiga, coração e medula óssea de cães com infecção sintomática (HOVIUS et al., 1999; STRAUBINGER, 2000).

Várias espécies de carrapatos podem ser encontradas parasitando cães no Brasil de acordo com a região estudada (O'DWYER et al., 2004). Cães de áreas rurais são parasitados

principalmente por carrapatos do gênero *Amblyomma* (*Amblyomma ovale*, *Amblyomma tigrinum*, *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma cajennense*) (MASSARD et al., 1981; O'Dwyer et al., 2001), que podem desempenhar papel importante na transmissão do agente para cães e também para seres humanos, enquanto em cães criados em áreas urbanas, *Rhipicephalus sanguineus* é o carrapato mais prevalente (MASSARD et al., 1981; RIBEIRO et al., 1997).

Os carrapatos do gênero *Amblyomma* têm potencial de transmitir diversos patógenos para cães e seres humanos. Sua possível participação na transmissão de *B. burgdorferi* no Brasil necessita de estudos. Além disso, *B. burgdorferi* e espécies correlatadas já foram isoladas de carrapatos do gênero *Amblyomma* (BARBOUR et al., 1996; SOARES et al., 2000).

O'Dwyer et al. (2004) pesquisaram a prevalência de anticorpos contra *B. burgdorferi* lato sensu em cães de áreas rurais de sete municípios do estado do Rio de Janeiro, pelo ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), e encontraram 15,58% dos cães examinados positivos. Soares et al. (1999) observaram prevalência de 20% de cães positivos para *B. burgdorferi*, procedentes da Baixa Fluminense, estado do Rio de Janeiro. Alves et al. (2004) diagnosticaram 48,25% de cães soropositivos para *B. burgdorferi* lato sensu no estado do Rio de Janeiro através de ELISA, o que deve servir como alerta para ocorrência de *Borrelia* sp. nas regiões estudadas, considerando a importância da borreliose de Lyme como zoonose emergente.

A presença de anticorpos contra *B. burgdorferi* em cães do Rio de Janeiro é indicativo da presença de um agente nessa área que possui reação cruzada com esta espiroqueta e do risco de ocorrerem casos humanos da doença na região (O'DWYER et al., 2004). Devido à ampla distribuição e baixa especificidade de carrapatos do gênero *Amblyomma*, principalmente nas áreas rurais, não se pode descartar a possibilidade desses carrapatos serem responsáveis pela transmissão borreliose de Lyme no Brasil (O'DWYER et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de execução

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, do Instituto de Veterinária da UFRRJ, localizado no prédio do Projeto Sanidade Animal (convênio Embrapa/UFRRJ).

3.2 Procedência da colônia de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e da cepa de *Borrelia burgdorferi*

Os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* foram originados de colônia mantida por 10 gerações em coelhos (*Oryctolagus cuniculi*) no Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ.

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®) e criopreservadas em nitrogênio líquido a -196°C no Laboratório de Doenças Parasitárias.

3.3 Cultura primária *in vitro* de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus*

A metodologia utilizada para o cultivo de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* foi desenvolvida a partir da técnica descrita por Yunker (1987), com modificações.

Cinquenta fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* foram obtidas de queda natural por infestação artificial em coelhos. Em seguida, foram levadas ao Laboratório de Doenças Parasitárias, lavadas inicialmente em água corrente e depois em água destilada, a fim de retirar o excesso de sujidades.

No interior de uma capela de fluxo laminar, os carrapatos foram submetidos a uma esterilização de suas superfícies; primeiro, foram imersos por segundos em álcool a 70%, seguido de hipoclorito de sódio a 1%, álcool a 70% e, por fim, água destilada estéril contendo os antibióticos penicilina e estreptomicina, e o antifúngico anfotericina B. Após etapa de esterilização superficial, as teleóginas foram secas com gaze estéril, colocadas em placas de Petri estéreis e incubadas para realização da postura em estufa para Demanda Biológica de Oxigênio (B.O.D.), à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar superior a 80%.

Observações diárias foram realizadas para estabelecer o dia de início da postura dos ovos, o que tornou possível determinar o período exato para retirada dos ovos utilizados no cultivo celular. No 12º dia após o início da postura (KURTTI et al., 1982), num ambiente estéril, ovos embrionados foram removidos da placa de Petri para um béquer e submetidos a duas lavagens rápidas em acetona P.A. e oito em água destilada estéril, para retirada da cera dos ovos.

Ovos embrionados, acrescidos de 2mL de meio de cultura, foram quebrados por leve aplicação de pressão com auxílio de um êmbolo de seringa vidro. Após a compressão dos ovos, o material em suspensão foi filtrado em um filtro de vidro com porosidade número um para remoção das cascas e de possíveis ovos intactos.

O meio de cultivo utilizado para as células embrionárias de *R. sanguineus* foi o Leibovitz's L-15B (Sigma®), suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (Cripion®), 10% de caldo triptose fosfato, 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 de 0,22µm.

O material filtrado foi centrifugado a 73 x g por oito minutos em uma centrífuga de mesa a fim de concentrar as células e desprezar o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensão cuidadosamente em 35mL de meio de cultura L-15B suplementado e distribuído em volumes de 5mL para frascos de cultivo de 10cm², totalizando sete frascos que foram incubados a 28°C em estufa do tipo B.O.D.

3.4 Manutenção da cultura primária de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus*

As culturas de *Rhipicephalus sanguineus* foram monitoradas diariamente com auxílio de um microscópio de contraste de fase invertido e também à vista desarmada, sendo realizada a primeira troca do meio L-15B três dias após o início do cultivo. Retirou-se 3mL de cada frasco, substituindo este volume por meio novo. O procedimento foi realizado novamente num intervalo de dois dias.

No 7º dia de cultivo, foi realizada troca total do meio L-15B dos frascos. Após esse período, a cada dois ou três dias o meio de cultura era trocado totalmente. O meio L-15B era preparado a cada semana para garantir a qualidade dos nutrientes e a eficácia do antibiótico.

Foram realizadas observações diárias para verificação do desenvolvimento celular até a formação da monocamada de células.

3.5 Inoculação de *Borrelia burgdorferi* na cultura primária de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus*

Para avaliar o desenvolvimento de *Borrelia burgdorferi*, o meio de cultura inicial L-15B foi retirado dos seis tubos de cultivo após a formação da monocamada de células. Em três deles, foram colocados 5mL de BSK (grupo I) e, em outros três, colocados 3mL de BSK e 2mL de L-15B sem antibiótico (grupo II). Em cada grupo, apenas dois tubos foram inoculados com espiroquetas, sendo um utilizado para observação dos efeitos dos meios nas células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus*. Foram preparados dois novos tubos sem células, um contendo 5mL de BSK e outro contendo 3mL de BSK e 2mL de L-15B sem antibiótico, com a finalidade de observar o desenvolvimento das espiroquetas na ausência de células embrionárias (**Tabela 1**).

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 bacteriológica. As espiroquetas foram observadas com auxílio de microscopia de campo escuro e contraste de fase e avaliadas quanto a motilidade, tamanho e quantidade.

As espiroquetas em cultivo no meio BSK foram contadas com auxílio da câmara de Neubauer, apresentando resultado de aproximadamente $6,8 \times 10^6$ espiroquetas/mL. Em seguida, 500µL da amostra do cultivo de *B. burgdorferi* foram inoculados em seis tubos de cultivo, com concentração final de aproximadamente $6,2 \times 10^5$ espiroquetas/mL (**Tabela 1**). Durante o co-cultivo de *B. burgdorferi* com as células embrionárias, os tubos foram incubados a 32°C em estufa do tipo B.O.D.

Tabela 1. Sistemas de cultura utilizados para cultivo de *Borrelia burgdorferi* e de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus*, em meios Barbour-Stoenner-Kelly (grupo I) ou Leibovitz's L-15B com Barbour-Stoenner-Kelly (grupo II).

Grupos	Tubos	Sistemas de cultivo
I	1	Monocamada celular + 5 mL BSK + inóculo de <i>Borrelia</i> sp.
	2	Monocamada celular + 5 mL BSK + inóculo de <i>Borrelia</i> sp.
	3	Monocamada celular + 5 mL BSK
	4	5 mL BSK + inóculo de <i>Borrelia</i> sp.
II	1	Monocamada celular + 3 mL BSK + 2 mL L-15B + inóculo de <i>Borrelia</i> sp.
	2	Monocamada celular + 3 mL BSK + 2 mL L-15B + inóculo de <i>Borrelia</i> sp.
	3	Monocamada celular + 3 mL BSK + 2 mL L-15B
	4	3 mL BSK + 2 mL L-15B + inóculo de <i>Borrelia</i> sp.

BSK = meio Barbour-Stoenner-Kelly; L-15B = meio Leibovitz's L-15B

Foram realizadas observações diárias à vista desarmada para avaliar o desenvolvimento do cultivo através da coloração do meio (presença de acidez ou alcalinidade). A contagem de *B. burgdorferi* foi realizada quando o meio apresentou coloração amarela, indicativa de elevada acidez devido à multiplicação das espiroquetas. 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.

Após a contagem, foram feitos repiques das células embrionárias inoculadas com *B. burgdorferi* para tubos de cultivo com lamínulas. Quando se observou a fixação das células, 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 (1:9) por 60 minutos para observação em microscópio de luz, em objetiva de imersão.

3.6 Subcultivo das células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus*

Dos sete tubos iniciais de cultivo de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus*, um foi reservado para realização de subcultivo celular. Quando as células se apresentaram em monocamada, o meio de cultura L-15B foi trocado por meio novo e, em seguida, as células foram descoladas por agitação mecânica do fundo do tubo de 10cm² e passadas para um frasco de cultivo de 25cm².

Após nova formação da monocamada celular, foram feitos novos subcultivos para dois frascos de 25cm², seguindo a mesma metodologia.

A cada três semanas eram feitos novos subcultivos de células embrionárias de *R. sanguineus*. Os frascos foram sempre incubados à temperatura de 28°C em estufa do tipo B.O.D. e o meio de cultura trocado semanalmente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultura primária *in vitro* de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus*

No terceiro dia após o início da cultura primária de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus*, foi possível observar a fixação de agregados celulares na superfície dos frascos. A partir destes agregados, surgiram diversos tipos celulares, como grandes células fibroblastóides e estruturas semelhantes a vesículas e tubos (**Figura 1A**). Na segunda semana, foi observado o aparecimento das células epitelióides ou redondas (**Figura 1B**) e, com 21 dias de cultivo, visualizou-se a formação de uma monocamada celular devido ao aspecto confluyente das células (**Figura 1C e 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 com 28 dias de cultivo. Rezende (2008) cultivou células embrionárias de *R. microplus* e *Amblyomma cajennense* e observou a formação da monocamada com quatro meses e com 21 dias, respectivamente.

As culturas celulares possuem necessidades nutricionais que variam de acordo com a espécie de carrapato e com o tipo de tecido cultivado. O meio de cultivo Leibovitz's L-15B demonstrou ser eficiente para o desenvolvimento da cultura primária de células embrionárias de *R. sanguineus*. Kurtti et al. (1993) cultivaram linhagem celular de origem embrionária de *Rhipicephalus appendiculatus* (RAE25), com meio baseado em 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. Kurtti et al. (1988a) cultivaram diversas linhagens celulares, inclusive de *R. sanguineus* (RSE8), com meio L-15B adicionado de gelatina e N-acetilglicosamina para permitir o co-cultivo com *B. burgdorferi*.

As células embrionárias de *R. sanguineus* originaram diversos subcultivos, que vêm sendo mantidos por seis meses. O primeiro foi realizado com 21 dias e a cada três semanas são feitos novos, assim como realizado por Pudney et al. (1973). Estas culturas encontram-se na sexta passagem e vêm sendo mantidas com o objetivo de criar uma linhagem celular com a cepa brasileira deste carrapato. Munderloh et al. (1996) realizaram o primeiro subcultivo das células embrionárias de *I. scapularis* com seis meses após o início da cultura primária.

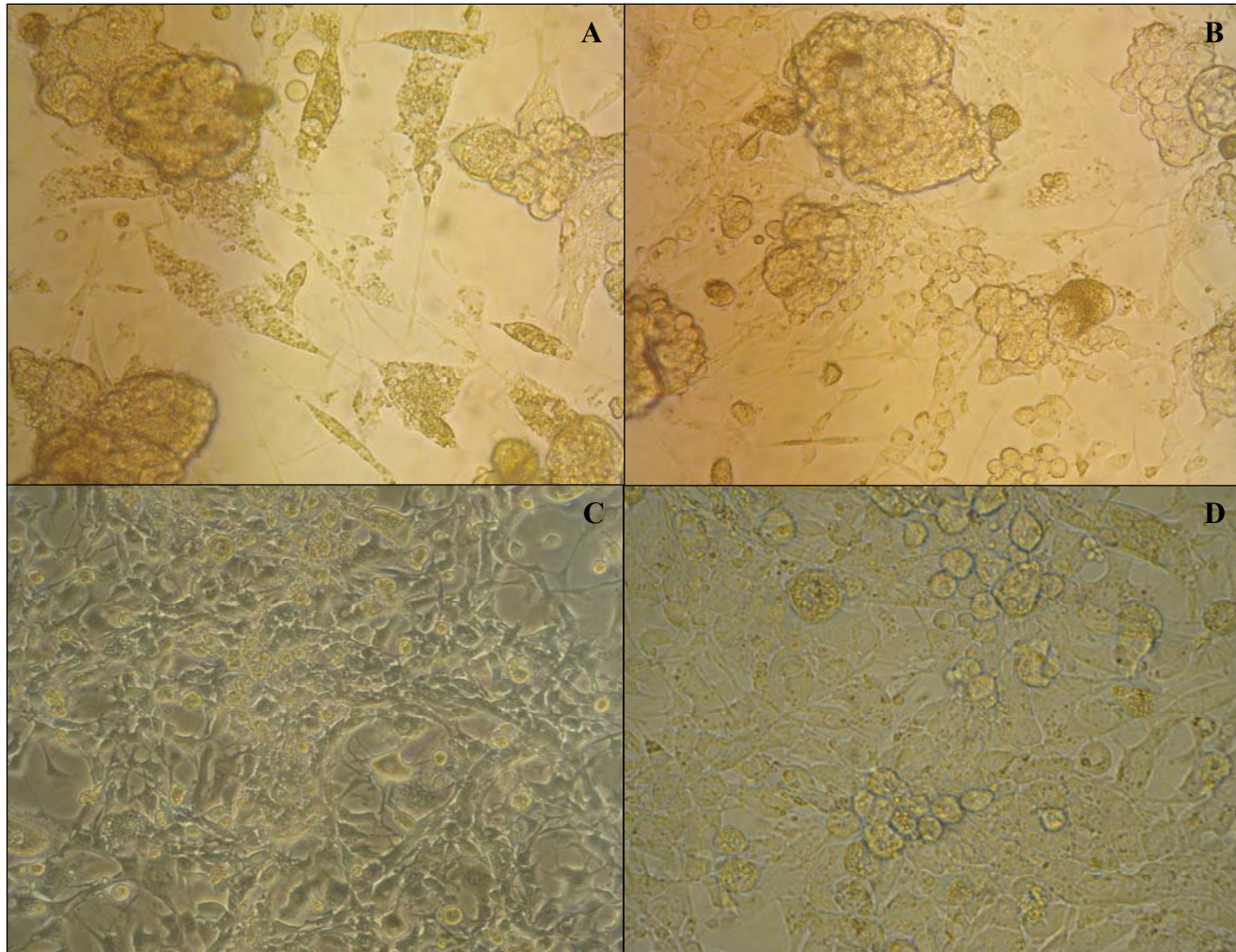


Figura 1. Cultura primária *in vitro* de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus* cultivadas em meio Leibovitz's L-15B, em diferentes estágios de desenvolvimento: 7 dias (**A**), 12 dias (**B**) e 21 dias (**C** e **D**). Microscópio de contraste de fase invertido, aumento de 200x (**A**, **B** e **C**) e 400x (**D**).

4.2 Cultivo de *Borrelia burgdorferi* em células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus*

Sete dias após a inoculação de *Borrelia burgdorferi* nas culturas primárias de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus*, os meios dos tubos apresentaram-se com coloração amarela, indicando elevada acidez devido à multiplicação das espiroquetas. Desta forma, procedeu-se a contagem das espiroquetas dos tubos inoculados, com resultados apresentados na **Figura 2**.

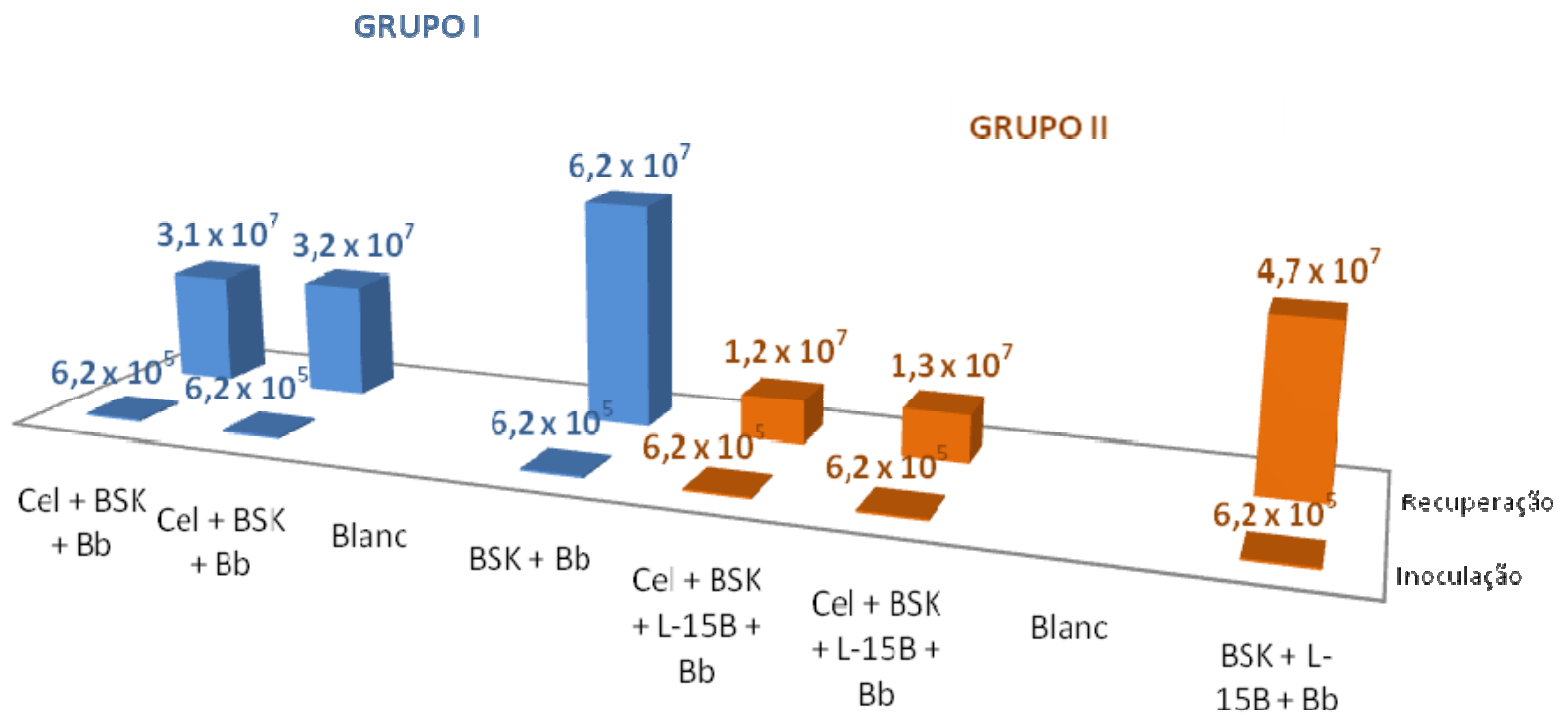
A concentração de $6,8 \times 10^6$ espiroquetas/mL de *B. burgdorferi* inoculada nas células embrionárias de *R. sanguineus* foi semelhante à utilizada por Kurtti et al. (1988a) quando infectaram células de diversas linhagens de carrapato, inclusive de RSE8 de *R. sanguineus*, com a mesma bactéria a uma concentração de $1-2 \times 10^6$ espiroquetas/mL. Já Bugrysheva et al. (2002) infectaram células IDE8 e ISE6 de *Ixodes scapularis* com *B. burgdorferi* a uma concentração de $2-4 \times 10^7$ espiroquetas/mL, enquanto Kurtti et al. (1993) utilizaram uma concentração de $1-2 \times 10^7$ espiroquetas/mL para infectar células da linhagem RAE25 de *R. appendiculatus*.

Houve grande multiplicação das espiroquetas cultivadas com células embrionárias de *R. sanguineus* quando comparada à concentração inicial, assim como das espiroquetas cultivadas na ausência das células de carrapato (**Figura 2**). Observou-se um aumento em 100 vezes do número de *B. burgdorferi*, assim como Kurtti et al. (1988a) quando inocularam em células embrionárias de diversos carrapatos $1-2 \times 10^6$ espiroquetas/mL e recuperaram concentrações maiores que 10^8 espiroquetas/mL.

No grupo I, onde se utilizou somente o meio BSK, foram recuperadas maiores concentrações de *B. burgdorferi*, sete dias após a inoculação, do que no grupo II, onde foi utilizado o meio BSK juntamente com o meio Leibovitz's L-15B. 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., 1988a; BUGRYSHEVA et al., 2002).

Independente dos meios de cultivo testados (grupos I e II), a concentração final de *B. burgdorferi* dos tubos com células embrionárias de carrapato foi menor do que a dos tubos sem células embrionárias. Este resultado pode ser explicado porque grande parte das espiroquetas permaneceu aderida às células de carrapato em quantidade incalculável, mesmo após agitação mecânica dos tubos de cultivo para contagem, enquanto que nos tubos controles não há células embrionárias, somente espiroquetas livres. Kurtti et al. (1993); Bugrysheva et al. (2002) relataram que a aderência da espiroqueta nas células de carrapatos é forte e duradoura.

Na observação dos tubos de cultivo à microscopia de contraste de fase, as espiroquetas apresentaram-se aderidas às células de carrapato de maneira epitelial e com grande motilidade. Comportamento semelhante das espiroquetas foi observado por Kurtti et al. (1993) quando inocularam-nas em linhagem embrionária RAE25 de *Rhipicephalus appendiculatus*. Os estudos de Bugrysheva et al. (2002) provaram definitivamente a localização extracelular de *B. burgdorferi* em culturas de células de carrapato. Inúmeras espiroquetas foram observadas aderidas às células epitelióides e fibroblastóides nas lamínulas coradas com GIEMSA, à microscopia de luz (**Figura 3**). A aderência de *B. burgdorferi* às células de carrapato cultivadas *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., 1988a; MUNDERLOH; KURTTI, 1995). Estes achados diferem dos relatados por Kurtti et al. (1988a), onde as espiroquetas *B. burgdorferi* inoculadas nas células de *R. sanguineus* desapareceram da cultura em três a dez dias, e não puderam mais ser detectadas à microscopia.



Cel = monocamada celular; BSK = meio Barbour-Stoenner-Kelly; L-15B = meio Leibovitz's L-15B; Bb = inóculo de *Borrelia* sp.; Blanc = tubo sem inoculação.

Figura 2. Representação gráfica da contagem em câmara de Neubauer de *Borrelia burgdorferi* nos diferentes sistemas de cultivo, demonstrando a concentração de espiroqueta nos momentos da inoculação e da recuperação após sete dias.

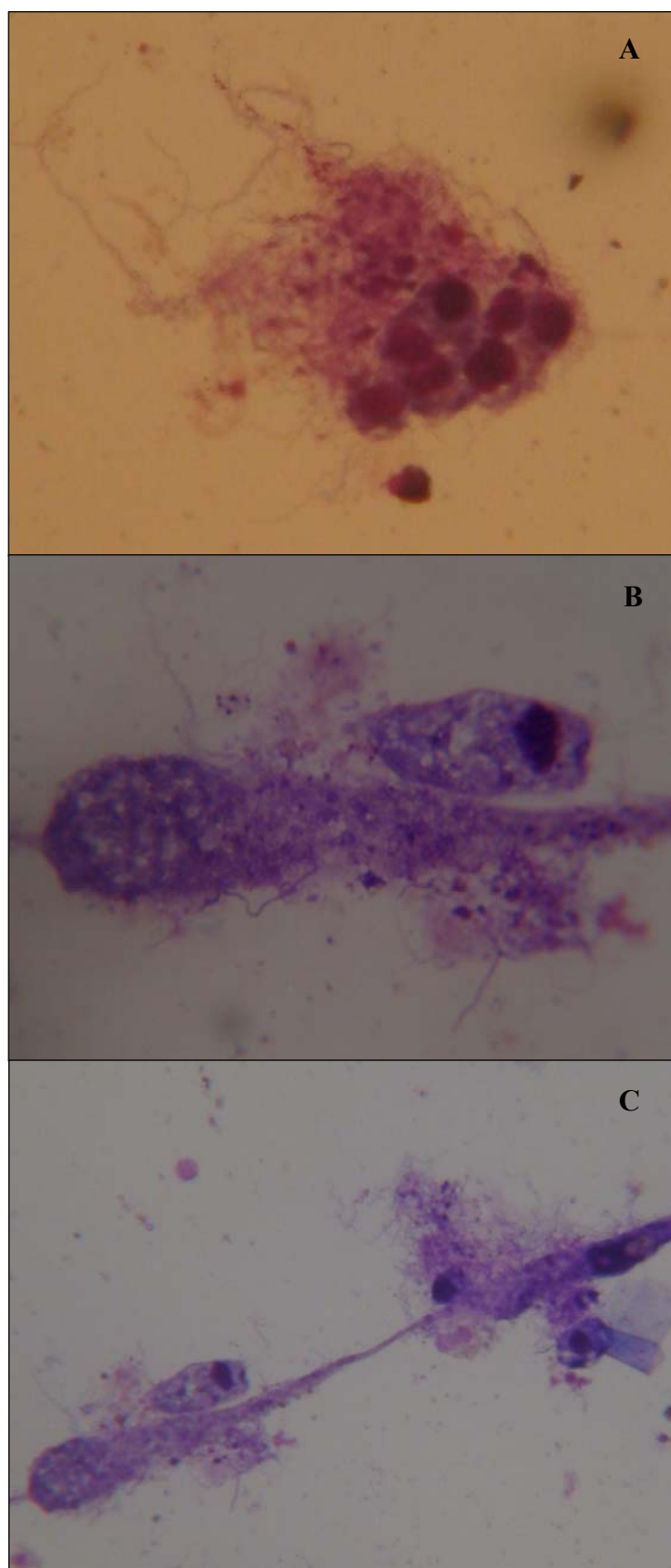


Figura 3. Espiroquetas *Borrelia burgdorferi* aderidas em células embrionárias epitelióides (A) e fibroblastóides (B e C) de *Rhipicephalus sanguineus* em cultura primária. Coloração de GIEMSA, microscópio de luz, aumento de 1000x.

As células embrionárias de *R. sanguineus* cultivadas em meio BSK, com ou sem inóculo de *B. burgdorferi* (tubos 1, 2 e 3 do grupo I), pararam sua multiplicação, apresentaram degeneração na membrana e muitas desprenderam-se da superfície do frasco. Kurtti et al. (1988a) afirmaram que células de carrapato não crescem em meio BSK e observaram o arredondamento e o desprendimento das células da superfície dos frascos com um a dois dias quando cultivadas neste meio. Estes autores relataram também a presença de componentes no BSK que podem ser tóxicos para as células. Além disso, o co-cultivo com *B. burgdorferi* contribuiu para o efeito citopático observado nas células dos tubos 1 e 2. Bugrysheva et al. (2002) infectaram as linhagens IDE8 e ISE6 de *I. scapularis* com esta espiroqueta e observaram o destacamento das células e a lise da monocamada em sete a oito dias e concluíram que a morte celular foi principalmente devido à necrose.

As células cultivadas em meio BSK e L-15B (grupo II) continuaram a se multiplicar, muitas ainda estavam íntegras e aderidas ao frasco, com presença de tecidos em desenvolvimento, com menos células degeneradas e flutuantes que as cultivadas somente em BSK (grupo I). Os efeitos citopáticos devem ter sido causados pelo esgotamento do meio L-15B, pelo uso do meio BSK e, no caso dos tubos inoculados, pelo co-cultivo com *B. burgdorferi*.

O cultivo de *B. burgdorferi* com células embrionárias de *R. sanguineus* foi bem sucedido, tal como Rezende (2008) quando cultivou esta espiroqueta em culturas primárias de células embrionárias de *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma cajennense*. Embora estas três espécies de carrapato não sejam vetoras específicas de *B. burgdorferi*, estudos apontam-nas como possíveis vetoras de *Borrelia* sp. no Brasil (YOSHINARI et al., 1997; YOSHINARI, 2009). Sendo assim, culturas de células de carrapato podem ser ferramentas úteis na tentativa de isolamento de novas cepas ou espécies de *Borrelia* spp.

5 CONCLUSÕES

As culturas primárias de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* desenvolveram-se em cultivo com meio Leibovitz's L-15B e originaram subcultivos.

A espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, cepa G39/40, aderiu, cresceu, multiplicou e apresentou grande motilidade em cultivo com células embrionárias do carrapato *R. sanguineus*, utilizando meios Barbour-Stoener-Kelly e Leibovitz's L-15B.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, A. L.; MADUREIRA, R. C.; SILVA, R. A.; CORRÊA, F. N.; BOTTEON, R. C. C. M. Frequência de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 203-206, 2004.
- APPEL, J. G. Lyme disease in dogs and cats. **Compendium**, v. 12, n. 5, p. 617, 1990.
- 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, n. 12, 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, n. 1, p. 198-201, 1968.
- 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. Antigenic variation of a relapsing fever *Borrelia* species. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 155-171, 1990.
- 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**. São Paulo: Vox/ICTTD-3 Butantan, 2006. 223p.
- BAUERFEIND, R.; KREIS, U.; WEISS, R.; WIELER, L.; BALJER, G. Detection of *Borrelia burgdorferi* in urine specimens from dogs by a nested polymerase chain reaction. **Zentralbl Bakteriologie**, v. 287, n. 4, p. 347-361, 1998.
- BELL, L. J. Tick tissue culture techniques in the study of arthropod-borne protozoa: the development of *Theileria annulata* in organ cultures of *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Acarology**, v. 6, n. 2, p. 1089-1095, 1984.
- BELL-SAKYI, L. Continuous cell lines from the tick *Hyalomma anatolicum*. **Journal of Parasitology**, v. 77, n. 6, p. 1006-1008, 1991.
- BELL-SAKYI, L. Ehrlichia ruminantium grows in cell lines from four ixodid tick genera. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 4, p. 285-293, 2004.

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.

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.

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.; 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.

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

CRIPPA, M.; RAIS, O.; GERN, L. Investigation on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v. 2, n. 1, p. 3-9, 2002.

CUNHA, N. C.; FONSECA, A. H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A. R. M.; BARREIRA, J. D.; MASSARD, C. L.; LEMOS, E. R. S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 105-108, 2009.

DERDÁKOVÁ, M.; LENČÁKOVÁ, D. Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 12, n. 2, p. 165-172, 2005.

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.

- FALCO, C. R.; DANIELS, T. J.; FISH, D. Increase in abundance of immature *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in an emergent Lyme disease endemic area. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 522-526, 1995.
- FILGUEIRA, A. L.; TROPPE, B. M.; GONTIJO FILHO, P. P. Doença de Lyme. **Rio Dermatológico**, Ano 2 – n. 1, 1989.
- FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; YOSHINARI, N. H. Lyme borreliosis serology in cattle in Brazil. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 18, n. 1/2, p. 85-89, 1996.
- FONSECA, A. H.; SALLES, R. S.; SALLES, S. A. N.; MADUREIRA, R. C.; YOSHINARI, N. H. Borreliose de Lyme simile: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 2, p. 171-178, 2005.
- GARCIA, S.; BILLECOCQ, A.; CRANCE, J. M.; MUNDERLOH, U.; GARIN, D.; BOULOY, M. Nairovirus RNA sequences expressed by a Semliki Forest virus replicon induce RNA interference in tick cells. **Journal of Virology**, v. 79, n. 14, p. 8942-8947, 2005.
- GILMORE, R. D.; 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, n. 1, p. 411-414, 2000.
- HILDENBRAND, P.; CRAVEN, D. E.; JONES, R.; NEMESKAL, P. Lyme neuroborreliosis: manifestations of a rapidly emerging zoonosis. **American Journal of Neuroradiology**, v. 30, n. 6, p. 1079-1087, 2009.
- HOOGSTRAAL, H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Advances in Parasitology**, v. 24, n. 1, p. 135-238, 1985.
- HOVIUS, K. E.; STARK, L. A.; BLEUMINK-PLUYM, N. M.; VAN DE POL, I.; VERBEEK-DE KRUIF, N.; RIJPKEMA, S. G.; SCHOULS, L. M.; HOUWERS, D. J. Presence and distribution of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species in internal organs and skin of naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs, as detected by polymerase chain reaction. **Veterinary Quarterly**, v. 21, n. 2, p. 54-58, 1999.
- KIMSEY, R. B.; SPIELMAN, A. Motility of Lyme disease spirochetes in fluids. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 162, n. 5, p. 1025-1028, 1990.
- KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; SAMISH, M. Effect of medium supplements on tick cells in culture. **Journal of Parasitology**, v. 68, n. 5, p. 930-935, 1982.
- KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; STILLER, D. The interaction of *Babesia caballi* kinetes with tick cells. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 42, n.3, p. 334-343, 1983.
- KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; 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, 1988a.

- 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, 1988b. p. 87-109.
- 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.
- LABRUNA, M. B. Biologia e ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 123-124, 2004.
- LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 30, n. 1, p. 24-32, 2001.
- LAWRIE, C. H.; UZCÁTEGUI, N. Y.; ARMESTO, M.; BELL-SAKYI, L.; GOULD, E. A. Susceptibility of mosquito and tick cell lines to infection with various flaviviruses. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 3, p. 268-274, 2004.
- LELOVAS, P.; DONTAS, I.; BASSIAKOU, E.; XANTHOS, T. Cardiac implications of Lyme disease, diagnosis and therapeutic approach. **International Journal of Cardiology**, v. 129, n. 1, p. 15-21, 2008.
- LEUBA-GARCIA, S.; KRAMER, M. D.; WALLICH, R.; GERN, L. Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from different organs of *Ixodes ricinus* ticks collected in nature. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 280, n. 4, p. 468-475, 1994.
- LEVY, S. A.; DREESEN, D. W. Lyme borreliosis in dogs. **Canine Practice**, v. 17, n. 2, p. 5-14, 1992.
- 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 Caroline. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 22, n. 2, p. 178-188, 1986.
- MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; SCHREIER, A. B.; FICKE, C. M. Clinical and serologic studies of canine borreliosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 191, n. 1, p. 1089-1094, 1987.
- 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.
- MASSARD, C. A.; MASSARD, C. L.; RESENDE, H. E. B. Carrapatos de cães de áreas urbanas e rurais de alguns estados brasileiros. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 1981, Belo Horizonte-MG. **Anais do VI CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 1981. p. 201.

MATHER, T. N.; FISH, D.; COUGHLIN, R. T. Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 205, n. 2, p. 186-188, 1994.

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

MERINO, F. J.; SERRANO, L.; SAZ, J. V.; NEBREDA, T.; GEGUNDEZ, M.; BELTRAN, M. Epidemiological characteristics of dogs with Lyme borreliosis in the province of Soria. **European Journal of Epidemiology**, v. 16, n. 2, p. 97-100, 2000.

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

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, 1996.

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.

O'DWYER, L. H.; MASSARD, C. L. Aspectos gerais da hepatozoonose canina. **Clínica Veterinária**, ano 6, n. 31, p. 34-39, 2001.

O'DWYER, L. H.; MASSARD, C. L.; SOUZA, J. C. P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 1, p. 143-150, 2001.

O'DWYER, L. H.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; SOUZA, J. C. P.; FLAUSINO, W.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de *Borrelia burgdorferi* *latu sensu* associada à presença de carrapatos em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 201-205, 2004.

OLSON, P. E.; KALLEN, A. J.; BJORNEBY, J. M.; CREEK, J. G. Canine as sentinels for Lyme disease in San Diego County, California. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 2, p. 126-129, 2000.

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.

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

PFISTER, H. W.; WILSKÉ, 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. Tick cell lines for the isolation and assay of arboviruses. In: YUNKER, C. E. **Arboviruses in Arthropod Cells in Vitro**, v. 1, CRC Press, 1987. p. 87-101.

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.

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.

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, J. M. C.; MATHER, T. N.; PIESMAN, J.; SPIELMAN, A. Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 24, n. 2, p. 201-205, 1987.

RIBEIRO, V. L. S.; WEBER, M. A.; FETZER, L. O.; VARGAS, C. R. B. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 285-289, 1997.

ROSTOFF, P.; GAJOS, G.; KONDURACKA, E.; GACKOWSKI, A.; NESSLER, J., PIWOWARSKA, W. Lyme carditis: Epidemiology, pathophysiology, and clinical features in endemic áreas. **International Journal of Cardiology**, 2009.

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.

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. **Infection and Immunity**. v. 56, n. 8, p. 1831-1836, 1988.

SCHWAN, T. G., PIESMAN, J., GOLDE, W. T., DOLAN, M. C.; ROSA, P. A. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 92, v. 7, p. 2909–2913, 1995.

SENIGL, F.; KOPECKÝ, J.; GRUBHOFFER, L. Distribution of E and NS1 proteins of TBE virus in mammalian and tick cells. **Folia Microbiologica (Praha)**, v. 49, n. 2, p. 213-216, 2004.

SILVA, A. M.; FIKRIG, E. *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in ticks and mammals. **Parasitology Today**, v. 13, n. 7, p. 267-270, 1997.

SIMSER, J. A.; MACALUSO, K. R.; MULENGA, A.; AZAD, A. F. Immune-responsive lysozymes from hemocytes of the American Dog tick, *Dermacentor variabilis* and an embryonic cell line of the Rocky Mountain wood tick, *D. andersoni*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 12, p. 1235-1246, 2004.

SMITH, R. D.; BRENER, J.; OSORNO, M.; RISTIC, M. Pathobiology of *Borrelia theileri* in the tropical cattle tick, *Boophilus microplus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 32, n. 2, p. 182-190, 1978.

SOARES, C. O. **Estudo da Borreliose Canina: imunodiagnóstico, soropidemiologia e análise interativa com a Babesiose Canina**. 1998. 80f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

SOARES, C. O.; FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; MANDERA, G. B.; SCOFIELD, A.; YOSHINARI, N. H. Sorologia para borreliose em cães procedentes da Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 111-114, 1999.

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.

STANEK, G.; STRLE, F. Lyme borreliosis. **The Lancet**, v. 362, n. 9396, p. 1639-1647, 2003.

STEERE, A. C. Lyme disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 2, p. 115-125, 2001.

STEERE, A. C.; BATSFORD, W. P.; WEINBERG, M. Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 93, n. 1, p. 8-16, 1980.

STRAUBINGER, R. K. PCR-Based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-Day postinfection period. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2191-2199, 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, 2004.

VARMA, M. G. R. Progress in the study of human and animal pathogens in primary and established tick cell lines. In: MITSUHASHI, M. **Invertebrate Cell System Applications**, v. 2, CRC Press, 1989. p. 119-128.

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 Lusen 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.; MANTOVANI, E. Síndrome Infec-to-Reacional Lyme-Smile. **Atualidades – Sociedade Brasileira de Parasitologia**, 2006.

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.; 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.

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 burgdorferi* through the gut and salivary tissues of *Ixodes dammini*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, n. 1, p. 1737-1748, 1989.