UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE

Estudo da interação de *Borrelia burgdorferi* e *Borrelia anserina* (SPIROCHAETALES: SPIROCHAETACEAE) com diferentes linhagens de células de carrapatos (ACARI: IXODIDAE)

Rafaella Câmara Teixeira

2014

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

ESTUDO DA INTERAÇÃO DE *Borrelia burgdorferi* E *Borrelia anserina* (SPIROCHAETALES: SPIROCHAETACEAE) COM DIFERENTES LINHAGENS DE CÉLULAS DE CARRAPATOS (ACARI: IXODIDAE)

RAFAELLA CÂMARA TEIXEIRA

Sob a Orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Março de 2014.

UFRRJ / Biblioteca Central / Divisão de Processamentos Técnicos

636.089696
T266e
T

Teixeira, Rafaella Câmara, 1984-
Estudo da interação de Borrelia burgdorferi e Borrelia anserina (Spirochaetales: Spirochaetaceae) com diferentes linhagens de células de carrapatos (Acari:Ixodidae) / Rafaella Câmara Teixeira. - 2014.
49f. : il.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Bibliografia: f. 41-49.

1. Parasitologia veterinária – Teses. 2. Carrapato como transmissor de doenças - Teses. 3. Borrelia - Teses. 4. Borrelia burgdorferi – Teses. 5. Células - Proliferação – 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

RAFAELLA CÂMARA TEIXEIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM 21 / 03 / 2014

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

Profa. Dra. Angela de Oliveira - UFRRJ

Dr. Flavio Alves Lara - FIOCRUZ

Profa. Dra. Nathalie Costa da Cunha - UFF

Prof. Dr. João Luiz Horácio Faccini - UFRRJ

“Os homens mais brilhantes da história
da humanidade morreram cheio de dúvidas
e os mais ignorantes vivem cheios de certezas...”

Autor desconhecido

Dedico este trabalho a minha família: meus pais Luiz e Glória, meus irmãos Rodrigo e Renata, minha vozinha Gedalva (*in memorian*), meu noivo Marco e meus bichinhos, obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca, pelo apoio durante todos esses dez anos no Laboratório de Doenças Parasitárias.

Aos amigos do laboratório Bruna de Azevedo Baêta, Bruna Sampaio Martins Land Manier, Matheus Dias Cordeiro, Jessica Fernandes de Souza, Carla Carolina Dias Uzêdo Ribeiro, Patricia Barizon Cepeda, Neide Gomes da Silva, Jaqueline Rodrigues de Almeida Valim, Marcio Barizon Cepeda, por sua amizade e ajuda em vários momentos.

Aos ex-companheiros de laboratório e amigos queridos Charles Passos Rangel, Fábio Jorge Moreira da Silva, Jenevaldo Barbosa da Silva, Daniel da Silva Guedes Júnior, Nathalie Costa da Cunha, Vanessa de Almeida Raia, Raquel da Silva Lisbôa e Fabíola do Nascimento Corrêa, pelos anos de convivência, amizade e ajuda incondicional.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Celular (Fiocruz) Jessica Ferreira, Flavio Lara e Rychelle Medeiros, pela gigante ajuda com a parte experimental e pelos momentos felizes de convivência.

Aos colegas da UFRJ Erik Ferreira Mafer e Emilia Balsemão Pires, pela realização das fotos no microscópio confocal e pelas horas divertidas que passamos juntos.

À Dra. Lesley Bell-Sakyi por ceder as linhagens de células de carrapatos indispensáveis a esta pesquisa.

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

Aos amigos do coração Pedro Ivan Fazio Jr., Claudia Navarro dos Santos, Cassio Nascimento Florêncio, Gideão da Silva Galvão, Ulisses Jorge Pereira Stelmann, Gabriel Alves Landulfo, sem amigos não sou nada.

A minha família sempre presente em todos os momentos.

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

Aos animais pelo carinho e amor incondicional.

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

À CAPES pela ajuda financeira com a concessão de bolsa durante o período de Doutorado.

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 o 5º ano do Ensino Fundamental no Colégio Washington Luís, na cidade de Saquarema-RJ, e, do 6º ao 9º 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 diversas 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, do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, do Instituto de Veterinária da UFRRJ, localizado no Prédio da Sanidade Animal.

De março de 2008 a fevereiro de 2010, foi aluna do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária da UFRRJ, ao nível de Mestrado, onde foi Bolsista do CNPq.

De março de 2010 a fevereiro de 2014, foi aluna do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária da UFRRJ, ao nível de Doutorado, onde foi Bolsista da Capes. Nesta data, apresenta e defende esta tese como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

RESUMO

TEIXEIRA, Rafaella Câmara. **Estudo da interação de *Borrelia burgdorferi* e *Borrelia anserina* (SPIROCHAETALES: SPIROCHAETACEAE) com diferentes linhagens de células de carrapatos (ACARI: IXODIDAE).** 2014. 49p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

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. O presente estudo teve como objetivo verificar a associação de *Borrelia burgdorferi* e *Borrelia anserina* com diferentes linhagens de células de carrapato por citometria de fluxo, microscopia confocal e de fluorescência. Um total de oito linhagens de células embrionárias de carrapatos foi utilizado: *Amblyomma variegatum* AVL/CTVM17, *Hyalloma anatollicum* HAE8/CTVM8, *Ixodes ricinus* IRE/CTVM19, *Ixodes scapularis* IDE8 e ISE6, *Rhipicephalus appendiculatus* RA243 e RAE/CTVM1 e *Rhipicephalus microplus* BME/CTVM2. As espiroquetas foram marcadas com um marcador fluorescente de membrana (PKH67) para visualização e quantificação em citometria de fluxo, microscopia confocal e de fluorescência. As linhagens de células de carrapatos foram cultivadas a uma média de 2,7 x 10^5 células/poço em placas de 24 poços: para cada linhagem de células, três poços foram adicionados 10% de meio BSK-H e 90% de meio de células de carrapato, em outros três poços foram adicionados 90% de meio BSK-H e 10% de meio de células de carrapato. Nos ensaios, *B. burgdorferi* e *B. anserina* coradas foram adicionadas às células de carrapatos (razão de 10:1 *Borrelia* por célula de carrapato) e incubados a 30°C por 24h. A linhagem de células de carrapato com maior percentual médio de células fluorescentes na citometria de fluxo foi tratada com citocalasina D para elucidar o mecanismo de internalização da espiroqueta. O fluoróforo PKH67 se mostrou eficiente na marcação de *B. burgdorferi* e *B. anserina*, sem afetar a motilidade e a viabilidade bacteriana. Nas análises da citometria de fluxo, a linhagem RA243 do carrapato *R. appendiculatus* apresentou a maior taxa de infecção e a linhagem ISE6 do carrapato *I. scapularis*, juntamente com IRE19 do carrapato *I. ricinus*, apresentaram menores taxas de infecção para ambas as espiroquetas e em ambos os meios de cultivo. As células de carrapatos apresentaram maior percentual de fluorescência em concentrações mais baixas de BSK-H, que favoreceu a internalização de ambas espiroquetas nas células. Não houve diferença entre o percentual médio de células infectadas por *B. anserina* e o percentual médio das mesmas células infectadas por *B. burgdorferi*, em ambos os meios de cultivo. O tratamento da linhagem RA243 com citocalasina D inibiu drasticamente a percentagem média de células infectadas. Na análise morfológica das amostras, houve uma estreita relação entre as espiroquetas e todas as linhagens de células de carrapatos, após 24 horas de incubação. O material fluorescente no interior das células se apresentou de maneira pontual e espiroquetas intactas não puderam ser detectadas, sugerindo sua localização intracelular em fagossomo. Estes resultados indicam que diferenças na capacidade de resposta dos tecidos envolvidos na resposta imune celular podem ser determinantes na competência vetorial dos carrapatos. A marcação de *Borrelia* spp. com PKH67 pode ser utilizada para análise da associação com células de carrapatos utilizando citometria de fluxo, microscopia confocal e de imunofluorescência.

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

ABSTRACT

TEIXEIRA, Rafaella Câmara. **Study of interaction of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia anserina* (SPIROCHAETALES: SPIROCHAETACEAE) with different ticks cell lines (ACARI: IXODIDAE).** 2014. 49p. Tesis (Doctor Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The cultivation of tick tissues may contribute to clarify the mechanisms of transmission, cell adhesion, migration of the agent within the vector and interaction with cells and tissues of the vector. The present study aimed to verify the association of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia anserina* with different tick cell lines by flow cytometry, confocal and fluorescence microscopy. A total of eight embryo-derived tick cell lines was used: *Amblyomma variegatum* cell line AVL/CTVM17, *Hyalloma anatollicum* cell line HAE8/CTVM8, *Ixodes ricinus* cell line IRE/CTVM19, *Ixodes scapularis* cell lines IDE8 e ISE6, *Rhipicephalus appendiculatus* cell lines RA243 and RAE/CTVM1 and *Rhipicephalus microplus* cell line BME/CTVM2. Spirochetes were stained with a fluorescent membrane marker (PKH67) for visualization and quantify in flow cytometry, confocal and fluorescence microscopy. Eight tick cell lines were cultured at a mean of 2,75 x 10^5 cells/well on 24-well plates: to each cell line, 3 wells were added of 10% BSK-H medium and 90% tick cell medium, in other 3 wells were added of 90% BSK-H medium and 10% tick cell medium. In the assays, *B. burgdorferi* and *B. anserina* stained was added to tick cells (in *Borrelia* to tick cell ratio 10:1) and incubated at 30°C per 24 h. The tick cell line with higher mean percentage of fluorescent cells on flow cytometry was treated with cytochalasin D to elucidate the mechanism of internalization of the spirochete. In the morphological analysis of the samples, there was a close relationship between spirochetes and tick cells lines after 24 hours of incubation. The fluorescent material within the cells appeared intact and timely manner spirochetes could not be detected, suggesting intracellular location in phagosome. PKH stain was shown to efficiently stain *B. burgdorferi* e *B. anserina* without affecting bacterial viability or motility. In flow cytometry analyses, the tick cell line RA243 from *R. appendiculatus* showed the highest rate of infection and the line ISE6 from *I. scapularis*, along with the line IRE19 from *I. ricinus*, had lower rates of infection for both spirochetes and in both culture media. Tick cells showed a higher percentage of fluorescence in lower concentrations of BSK-H, it favored the internalization of both spirochetes in cells. The treatment of RA243 line with cytochalasin D dramatically inhibited the average percentage of infected cells. There was no difference between the average percentage of cells infected with *B. anserina* and the average percentage of those infected with *B. burgdorferi* cells in both culture media In the morphological analysis of the samples, there was a close relationship between both spirochetes and all tick cell lines, after 24 hours of incubation. The fluorescent material inside the cells was presented like points and intact spirochetes could not be detected, suggesting its intracellular localization in phagosome. These results indicate that differences in responsiveness of the tissues involved in the cellular immune response may determine the vector competence of ticks. PKH labelling of borreliae can be used for analysis of borrelial association with tick cells using flow cytometry, confocal and fluorescence microscopy.

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

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1. Relação das linhagens de células de carrapatos utilizadas. Espécies de carrapatos, nomeação das linhagens, origem, instar, passagem atual, meio de cultivo específico, temperatura de incubação das células e referência bibliográfica..... **13**

Tabela 2. Resultado das amostras na citometria de fluxo, indicando o percentual médio de células com as espiroquetas aderidas ou internalizadas, para as oito linhagens de células de carrapatos inoculadas com *Borrelia anserina* e *Borrelia burgdorferi* marcadas com o fluoróforo PKH67, de acordo com as concentrações dos meios de cultivo: 10% BSK + 90% meio das células e 90% BSK + 10% meio das células..... **24**

Tabela 3. Resultado das amostras na citometria de fluxo, indicando o percentual médio de células com as espiroquetas aderidas ou internalizadas, para as oito linhagens de células de carrapatos inoculadas com *Borrelia anserina* **(A)** e *Borrelia burgdorferi* **(B)** marcadas com o fluoróforo PKH67, de acordo com as concentrações dos meios de cultivo: 10% BSK + 90% meio das células e 90% BSK + 10% meio das células..... **27**

Tabela 4. Resultado das amostras na citometria de fluxo, indicando o percentual médio de células com as espiroquetas aderidas ou internalizadas, para as oito linhagens de células de carrapatos inoculadas com *Borrelia anserina* e *Borrelia burgdorferi* marcadas com o fluoróforo PKH67, de acordo com as concentrações dos meios de cultivo: 10% BSK + 90% meio das células **(A)** e 90% BSK + 10% meio das células **(B)**..... **29**

LISTA DE FIGURAS

Páginas

Figura 1. Espiroquetas coradas com o fluoróforo PKH67: *Borrelia anserina* (**A**) e *Borrelia burgdorferi* (**B**). Microscopia de fluorescência, aumento de 400x..... **16**

Figura 2. Delineamento experimental das placas de cultivo para citometria de fluxo..... **17**

Figura 3. Aparelho de citometria de fluxo BD Accuri C6 (Beckton & Dickinson®) do Laboratório de Microbiologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - RJ..... **18**

Figura 4. Overlays da citometria de fluxo mostrando a associação de *Borrelia anserina* marcada com PKH67 com oito linhagens de células de carrapatos (linhas verdes), no meio composto por 10% de BSK-H + 90% de meio das células. Linhas negras nos gráficos representam os controles de células de carrapatos não infectadas. Valores dentro do gráfico representam o percentual médio de infecção e o desvio padrão..... **23**

Figura 5. Overlays da citometria de fluxo mostrando a associação de *Borrelia burgdorferi* marcada com PKH67 com oito linhagens de células de carrapatos (linhas verdes), no meio composto por 10% de BSK-H + 90% de meio das células. Linhas negras nos gráficos representam os controles de células de carrapatos não infectadas. Valores dentro do gráfico representam o percentual médio de infecção e o desvio padrão..... **23**

Figura 6. Resultado das amostras na citometria de fluxo, indicando o percentual de células com as espiroquetas aderidas ou internalizadas (média e desvio padrão), para as oito linhagens de células de carrapatos inoculadas com *Borrelia anserina* **(A)** e *Borrelia burgdorferi* **(B)** marcadas com o fluoróforo PKH67, de acordo com as concentrações dos meios de cultivo: 10% BSK + 90% meio das células e 90% BSK + 10% meio das células..... **25**

Figura 7. Resultado das amostras na citometria de fluxo, indicando o percentual de células com as espiroquetas aderidas ou internalizadas (média e desvio padrão), para as oito linhagens de células de carrapatos inoculadas com *Borrelia anserina* e *Borrelia burgdorferi* marcadas com o fluoróforo PKH67, de acordo com as concentrações dos meios de cultivo: 10% BSK + 90% meio das células **(A)** e 90% BSK + 10% meio das células **(B)**..... **28**

Figura 8. Percentual médio de infecção de *Borrelia anserina* (**A**) e *Borrelia burgdorferi* (**B**) marcada com PKH67 em linhagem de células RA243 pré-tratadas com DMSO (controle) e com citocalasina D..... **32**

Figura 9. Linhagens de células de carrapatos controles e inoculadas com a bactéria *Borrelia anserina* marcada com o fluoróforo PKH67, após 24h. DNA nuclear corado com DAPI. Microscópio de fluorescência, aumento de 400x. A barra de escala representa 50µm..... **34**

Figura 10. Linhagens de células de carrapatos controles e inoculadas com a bactéria *Borrelia burgdorferi* marcada com o fluoróforo PKH67, após 24h. DNA nuclear corado com DAPI. Microscópio de fluorescência, aumento de 400x. A barra de escala representa 50µm..... **35**

Fig. 11. Time lapse de *Borrelia anserina* marcada com o fluoróforo PKH26 em linhagem AVL17 de células de carrapato. Setas brancas indicam espiroquetas localizadas externamente ou fixadas às células; setas verdes indicam espiroquetas internalizadas. Os números representam o tempo pós-infecção, em hora e minuto. Microscópio de fluorescência, aumento de 400x. A barra de escala representa 25µm..... **36**

Figura 12. Linhagens de células de carrapatos inoculadas com a bactéria *Borrelia anserina* marcada com o fluoróforo PKH67, após 24h, no meio composto por 10% de BSK-H + 90% de meio das células. Microscópio confocal, aumento 630x..... **38**

Figura 13. Linhagens de células de carrapatos inoculadas com a bactéria *Borrelia burgdorferi* marcada com o fluoróforo PKH67, após 24h, no meio composto por 10% de BSK-H + 90% de meio das células. Microscópio confocal, aumento 630x..... **39**

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO	**1**
2 REVISÃO DE LITERATURA	**3**
2.1 Gênero *Borrelia*	**3**
2.2 Biologia de *Borrelia* spp. no carrapato	**3**
2.3 Borreliose de Lyme	**5**
2.4 Borreliose Aviária	**6**
2.5 Cultivo de células de carrapatos	**7**
2.6 Cultivo de *Borrelia burgdorferi* em linhagens de células de carrapatos	**9**
3 MATERIAL E MÉTODOS	**12**
3.1 Local de execução	**12**
3.2 Procedência das linhagens de células de carrapatos e das cepas de *Borrelia* spp.	**12**
3.3 Manutenção das linhagens de células de carrapatos	**12**
3.4 Manutenção das cepas de *Borrelia* spp.	**14**
3.5 Confirmação de identidade de *Borrelia* spp.	**14**
3.6 Citometria de fluxo	**15**
3.7 Internalização de *Borrelia* spp. em células de carrapatos	**18**
3.8 Microscopia de fluorescência	**19**
3.9 Microscopia Confocal	**19**
3.10 Análises Estatísticas	**19**
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	**21**
4.1 Citometria de fluxo	**21**
4.2 Internalização de *Borrelia* spp. em células de carrapatos	**31**
4.3 Microscopia de fluorescência	**33**
4.4 Microscopia Confocal	**37**
5 CONCLUSÕES	**40**
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	**41**

1 INTRODUÇÃO

Culturas *in vitro* de células de carrapato são importantes ferramentas por fornecerem sistemas de interações vetor e patógeno, substratos para produção de antígenos para diagnósticos e imunógenos, além de substituírem experimentação com animais, que na prática requerem alto custo, assim como implicações éticas.

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 epicelulares. Interações celulares e moleculares entre patógenos e células *in vitro* de carrapatos têm sido pouco estudadas; desta forma, o cultivo de células 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 borreliose 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 isolamento de espiroquetas 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* e *Borrelia anserina* com linhagens celulares de carrapatos 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.

A habilidade de *B. burgdorferi* de interagir com uma variedade de tipos celulares pode ser um fator importante para explicar sua infectividade em diferentes hospedeiros. Estudos anteriores indicam a interação e fagocitose desta espiroqueta por diferentes células de mamíferos e células de carrapatos (KURTTI et al., 1988a; MA et al., 1991; KURTTI et al., 1993; TUOMINEN-GUSTAFSSON et al., 2006; MATILLA et al., 2007). A espiroqueta não parece ser altamente específica, embora têm sido observadas diferenças em suas afinidades por células de diferentes espécies de carrapatos (KURTTI et al., 1993). Já a espécie *B. anserina* nunca havia sido cultivada anteriormente com células de carrapatos.

A adesão e a invasão da espiroqueta nas células do vetor são importantes para as transmissões horizontal e vertical, tal como para a transmissão para os hospedeiros mamíferos, porem é difícil observar estes processos ocorrendo dentro do carrapato. Para examinar os processos envolvidos com adesão e invasão de células de carrapatos por *Borrelia* spp., sob condições que podem ser mais facilmente manipuladas, buscou-se desenvolver um método de visualização e quantificação da associação destas espiroquetas com as células de carrapatos.

O marcador fluorescente de membrana PKH foi utilizado por não apresentar efeito deletério na viabilidade e na motilidade das bactérias, além de apresentar alta fluorescência e habilidade por manter sua fluorescência por diversos dias. Reportou-se aqui o uso do PKH corando duas espécies do gênero *Borrelia* e a subsequente visualização e quantificação destas

espiroquetas marcadas associadas a células de diferentes carrapatos, usando citometria de fluxo, microscopia confocal e de fluorescência.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 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^{o}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 recurrente (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 simbiontes 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).

As diferentes espécies do gênero *Borrelia* de importância médica e veterinária são parasitas obrigatórios de uma variedade de hospedeiros vertebrados. Embora possam causar doença em animais e humanos, infecções sub-clínicas são comuns. Atualmente são reconhecidos cinco grupos de enfermidades causadas pelos microrganismos do gênero *Borrelia* (SWELLENGREBEL, 1907). A febre recurrente foi a primeira borreliose descrita, causando enfermidade no ser humano, tendo como agente *Borrelia recurrentis* lato sensu com mais de 20 espécies, cujos vetores são carrapatos do gênero *Ornithodoros* (PAVLOVSKY, 1965). A espiroquetose aviária descrita em seguida tem como agente *Borrelia anserina*, cujos vetores são os carrapatos do gênero *Argas*, acometendo aves de diversas ordens (QUINN et al., 1994). A borreliose bovina, cujo agente é *Borrelia theileri* pode também acometer ovinos e equinos e tem como vetores carrapatos ixodídeos, principalmente *Rhipicephalus microplus* (NEITZ, 1956; CALLOW, 1967). A mais recente é o aborto epizoótico bovino, que tem como agente etiológico *B. coriaceae* e *O. coriaceus* como vetor (JOHNSON et al.,1987; ZINGG, LEFEBVRE, 1994).

2.2 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 subseqüente 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; SPIELMAN, 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 cinco a nove gerações de carrapatos têm sido documentadas em laboratório (BALASHOV, 1968).

Algumas proteínas de superficíe externa sintetizadas por *B. burgdorferi* têm sido identificadas, como OspA e OspB (PAL; FIRKRIG, 2003). A OspA aparece primeiramente na superficie 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; JING WU, 2011). 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; JING WU, 2011).

2.3 Borreliose de Lyme

Borreliose 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 da *Borrelia* spp. encontradas no local, assim como a sua interação com o ecossistema e vetor da região.

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).

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 da doença 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). A pesquisa de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* de origem americana ou europeia, embora relevante para o diagnóstico, revelava títulos baixos e oscilantes, desaparecendo rapidamente no sangue ou líquido cefalorraquidiano.

Yoshinari et al. (1989) publicaram o primeiro artigo de revisão sobre borreliose em língua portuguesa, quando alertaram a classe médica sobre a possibilidade da existência desta enfermidade no Brasil. O perfil da Borreliose de Lyme foi caracterizado no Brasil por Yoshinari et al. (1997), onde foi relatado a ocorrência de aproximadamente 30 casos em humanos, quando foi discutido a clínica, o diagnóstico sorológico, o tratamento e a epidemiologia com o envolvimento de cães, bovinos, animais silvestres e carrapatos. 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.

Ainda não foi possível o isolamento de espiroquetas na apresentação espiralada em materiais biológicos no país, mesmo utilizando meios de cultivo próprios para este microrganismo (BSK). Sendo assim, no intuito de desvincular esta zoonose brasileira da Doença de Lyme, mudou-se a nomenclatura para Síndrome Baggio-Yoshinari (GAUDITANO et al., 2005).

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

2.4 Borreliose Aviária

O agente etiológico da espiroquetose aviária ou borreliose aviária é *Borrelia anserina*, uma bactéria gram-negativa, de corpo helicoidal, com fibrilas axiais ou flagelos periplasmáticos (HOLT et al., 1994) esta se encontra no plasma sanguíneo das aves infectadas durante os estágios iniciais da doença (DICKIE, BARRERA, 1964; BURGDORFER, SCHWAN, 1991). A borreliose aviária é uma doença septicêmica aguda que acomete diversas espécies aviárias e transmitida pelo carrapato *Argas miniatus* (BOERO, 1967; BIER, 1985; LISBÔA et al., 2009).

A preservação de *B. anserina* em meios de cultura não é conseguida facilmente, devido às necessidades nutricionais exigentes desta espiroqueta (HOLT et al., 1994). Isolados de *B. anserina* são comumente mantidos em laboratórios por meio de passagens sanguíneas

sucessivas em aves jovens, ou via vetor carrapato ou por meio de amostras de soro e sangue mantidas criopreservadas em nitrogênio líquido (LABRUNA et al., 1999). Ataliba et al. (2007) realizaram o primeiro isolamento de *B. anserina* em meio BSK, possibilitando novos estudos desta espiroqueta.

A espiroquetose aviária diagnosticada no Rio de Janeiro por Marchoux e Salimbeni, em 1903, é uma doença septicêmica aguda que acomete diferentes espécies, sendo relatada em todo o mundo. Clinicamente, a enfermidade se manifesta por hipertermia e polidipsia inicial, profunda adinamia, sonolência, inapetência, diarréia verde escura, cianose com hipotermia e transtornos paralíticos. Nas aves enfermas ocorre ainda hepatomegalia com presença de manchas esbranquiçadas e/ou fígado com aspecto de noz moscada e esplenomegalia (BOERO, 1967; BIER, 1985).

O diagnóstico de borreliose aviária durante a fase aguda pode ser realizado através de esfregaços sanguíneos periféricos, preferencialmente corados pelo Giemsa, e através de exames histopatológicos dos órgãos afetados, corados pela hematoxilina-eosina (SOARES et al., 2000). Pode-se utilizar também como auxílio diagnóstico a aposição de tecidos dos carrapatos como intestino e glândula salivar, e ainda, exame de hemolinfa e de líquido coxal em microscopia de campo escuro (BIER, 1985).

Surtos são comumente reportados, mas o diagnóstico laboratorial é dificultado, visto que geralmente é realizada antibioticoterapia nas aves imediatamente após o aparecimento de mortalidade (GARG; GAUTAM, 1971).

2.5 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).

Em 1969, Řeháček e Brzostowski formularam um meio para cultivo de células de carrapatos baseado na composição bioquímica da hemolinfa do carrapato na tentativa de propiciar condições fisiológicas para o cultivo *in vitro* das células desses artrópodes. O meio Leibovitz´s L-15, originalmente formulado para células de mamíferos, quando suplementado com soro fetal bovino e caldo de triptose fosfatada, permitiu o isolamento e a manutenção de células de diversas espécies de ixodídeos (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).

Novas tentativas de cultivo de células de carrapatos 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 Medvedeeva 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 epitelióides após algumas semanas de cultivo.

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), 44 linhagens celulares foram estabelecidas de 14 gêneros de carrapatos de importância médica e veterinária.

A maioria das linhagens celulares de carrapato existentes foi estabelecida a partir 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).

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).

As culturas de células de carrapatos podem se originar de ovos embrionários e de órgãos como intestino, ovário e tubos de Malpighi. Segundo Kurtti e Büscher (1979), os dois estágios mais comumente utilizados para o cultivo de células de carrapatos são as ninfas 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.

As células de carrapato 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), enquanto outras são propagadas em pH neutro a alcalino, capacitando o crescimento de patógenos ácido-sensíveis (MUNDERLOH et al., 1996).

Culturas de linhagens celulares 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 várias 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. *Dermacentor andersoni*, uma das primeiras espécies de carrapato usadas em experimentos de cultura de células (YUNKER, 1987), não produziu uma linhagem de células durante 30 anos. Similarmente, os argasídeos têm recebido menor atenção que os ixodídeos, retardando o estabelecimento da primeira linha de células de argasídeos, que só ocorreu no ano de 2009 (BELL-SAKYI et al., 2009).

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 significante evolução em propagação de patógenos em linhagens celulares diz respeito a *Ehrlichia* e *Anaplasma* (MUNDERLOH et al., 1996; BLOUIN et al., 2002). 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).

Linhagens celulares de carrapatos já provaram ser ferramentas úteis para estudar a interação de diversos patógenos economicamente importantes transmitidos por carrapatos, assim como para ajudar a definir a natureza complexa da relação hospedeiro-vetor-patógeno (BELL-SAKYI et al., 2007). A cultura de tecidos também dispõe da oportunidade para estudo da embriologia, da fisiologia e da morfologia de tecidos de carrapatos em suas diferentes fases de crescimento (MARTIN; VIDLER, 1962).

2.6 Cultivo de *Borrelia burgdorferi* em linhagens de células de carrapatos

As 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).

Em 1987, Yunker et al. isolaram diversas cepas de espiroplasma de carrapatos usando culturas de células de carrapatos como superfícies alimentadoras e nenhuma na ausência de células de carrapatos. A taxa de crescimento dos espiroplasmas, uma vez estabelecido, não foi afetada pela presença ou ausência de células de carrapatos no sistema de cultivo.

Kurtti et al. (1988a) observaram a aderência celular de *Borrelia burgdorferi* cultivada com diversas linhagens de células de carrapatos: *R. appendiculatus* (RAE25 e RA243),

Dermacentor nitens (ANE58), *Dermacentor variabilis* (RML15), *R. microplus* (BME26) e *Rhipicephalus sanguineus* (RSE8). As espiroquetas se fixaram a estas células por suas extremidades a partir de 30 minutos após serem adicionadas às culturas de células de carrapatos. Estes autores observaram melhor afinidade da espiroqueta *B. burgdorferi* pela linhagem de células embrionárias RAE25 de *R. appendiculatus* e menos afinidade pelas células de *Dermacentor variabilis* (RML15), enquanto que, quando foi cultivada com a linhagem RSE8 de *R. sanguineus*, os autores relataram o desaparecimento desta espiroqueta dentro de três a 10 dias, onde não puderam ser detectadas por microscopia de luz. A espiroqueta permaneceu fixada às células de carrapatos durante todo o período de co-cultivo (sete a 10 dias). O crescimento de *B. burgdorferi* não foi alterado quando cultivada com as linhagens de células de carrapatos testadas, comparado ao crescimento desta espiroqueta na ausência de células de carrapatos.

Kurtti et al. (1993) cultivaram cepas recém-isoladas de *B. burgdorferi* em linhagem de células 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. A capacidade das cepas de *B. burgdorferi* para induzir edema de articulação (artritogenicidade) foi perdida na 30ª passagem do co-cultivo, e a infectividade após a 51ª passagem. Em contraste, espiroquetas cultivadas somente em meio BSK perderam a artritogenicidade e a infectividade para hamsters após a 11ª passagem.

Neste mesmo trabalho, observou-se uma maior afinidade de *B. burgdorferi* pela linhagem RAE25 do que pelas linhagens celulares RML15 (do carrapato *D. variabilis*) e BME26 (*R. microplus*), durante seis horas de co-cultivo. Quando se comparou a linhagem RAE25 com seis novas linhagens do carrapato *Ixodes scapularis*, não houve diferença estatística significativa entre os percentuais de células com a espiroqueta de cada linhagem. A espiroqueta se fixou às células de carrapatos de forma epicelular pelas suas extremidades e poços endocitóticos revestidos e vesículas foram observados no local de fixação das espiroquetas às membranas das células, indicando a participação ativa da célula hospedeira. Algumas espiroquetas foram envolvidas parcialmente por invaginação na membrana plasmática das células de carrapatos. Com 18h de co-cultivação, houve o aparecimento de *B. burgdorferi* em formato espiralada dentro dos vacúolos intracelulares, que compreendeu 2/3 das espiroquetas associadas às células de carrapatos, e estavam envoltas pela membrana da célula hospedeira.

Estes 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 1994, Kurtti et al. se aprofundaram na análise ultraestrutural de *B. burgdorferi* em cultura de células de carrapatos (linhagem RAE25) e observaram que a espiroqueta se comportou nas células de carrapato de maneira semelhante ao seu comportamento descrito nos tecidos de carrapato.

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 a linhagem de células de carrapatos 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). Estes autores observaram que a expressão diferencial de proteínas OspA e OspB de *B. burgdorferi*, cultivada 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 37ºC, 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.

Bugrysheva et al. (2002) cultivaram *B. burgdorferi* em linhagens IDE8 e ISE6 de células de carrapatos por três dias e observaram a multiplicação e a totalidade da localização extracelular da espiroqueta nestas células.

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.

Matilla et al., no ano de 2007, estudaram a fagocitose de *B. burgdorferi* por células dos carrapatos *I. scapularis* (linhagens ISE6 e IDE12) e *D. andersoni* (linhagem DAE15), infectadas com o endossimbionte *R. peacockii*.

Teixeira (2010) cultivou *B. burgdorferi* em células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, enquanto Baêta (2011) cultivou a mesma espiroqueta em células embrionárias de *Dermacentor nitens*. Já Rezende et al. (2012) cultivaram células embrionárias de *R. microplus* e *A. cajennense* para co-cultivo de *B. burgdorferi*.

Em síntese, o cultivo de células dos diferentes órgãos e tecidos dos carrapatos constitui-se num substrato para cultivo de agentes por eles transmitidos (REZENDE et al., 2012). O cultivo de células de carrapatos é um modelo útil para estudar a interação entre as células desses artrópodes e os patógenos economicamente importantes transmitidos por eles, pois ajuda a definir a natureza complexa da relação hospedeiro-vetor-patógeno (BELL-SAKYI et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de execução

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, do Instituto de Veterinária da UFRRJ, localizado no anexo 01 do Instituto de Veterinária (antigo Prédio da Sanidade Animal). As etapas referentes à citometria de fluxo e às fotomicrografias foram desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz – RJ e no Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.2 Procedência das linhagens de células de carrapatos e das cepas de *Borrelia* spp.

As linhagens de células de carrapatos foram gentilmente cedidas pela Dra. Lesley Bell-Sakyi, da Universidade de Edinburgh, pertencentes ao "Tick Cell Biobank - The Roslin Wellcome Trust" (http://tickcells.roslin.ac.uk/). Estas linhagens foram oficialmente introduzidas no Brasil por doação ao prof. Adivaldo Fonseca pela Dra. Bell-Sakyi em setembro de 2010.

A cepa de *B. anserina* foi isolada a partir de *Gallus gallus* naturalmente infectados e cedida pelo Prof. Dr. Romário Cerqueira Leite, da Universidade Federal de Minas Gerais, em agosto de 2002.

A cepa G39/40 de *B. burgdorferi* de origem americana utilizada foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari, do Laboratório de Integração Artrite e Microrganismo, Departamento de Reumatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Centro de Referência para Borreliose de Lyme no Brasil, em dezembro de 2001.

3.3 Manutenção das linhagens de células de carrapatos

As amostras de células foram mantidas em nitrogênio líquido a -196ºC no LDP, com DMSO a 10% como criopreservante, e, para realização do trabalho experimental, as culturas foram descongeladas a 32^{o}C e mantidas em estufas bacteriológicas em frascos de cultivo de 25cm^{2}, com rotina de substituição de aproximadamente 2/3 do meio semanalmente.

As linhagens celulares BME2, IRE19, RAE1 e RA243 **(Tab. 1)** foram cultivadas com o meio Leibovitz´s L-15 (Sigma®), suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (Life Technologies®), 10% de caldo de triptose fosfatada (Sigma®), 1% de L-glutamina (200mM) (Sigma®) e 1% da solução de antibióticos penicilina (10.000 UI) e estreptomicina (10mg/mL) (Sigma®).

O meio de cultura utilizado para as linhagens IDE8 e ISE6 **(Tab. 1)** foi o Leibovitz´s L-15B (Sigma®), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Life Technologies®), 10% de caldo de triptose fosfatada (Sigma®), 0,1% de lipoproteína bovina concentrada (MP Biomedicals®), 1% de L-glutamina (200mM) (Sigma®) e 1% da solução de antibióticos penicilina (10.000 UI) e estreptomicina (10mg/mL) (Sigma®).

Foi utilizado também o meio de cultura H-Lac, que consiste de 75% de solução salina balanceada de Hanks' (Cultilab®), 20% de soro fetal bovino inativado (Life Technologies®),

Tab. 1. Relação das linhagens de células de carrapatos utilizadas: espécies de carrapatos, nomeação das linhagens, origem, instar, passagem atual, meio de cultivo específico, temperatura de incubação das células e referência bibliográfica.

Linhagem	**Espécie de carrapato**	**Origem**	**Instar**	**Número de Passagens**	**Meio de cultivo**	**Temperatura de incubação**	**Referência**
AVL/CTVM17	*Amblyomma variegatum*	África austral	Larva	~136	L15+H-Lac+L15B	32ºC	BELL-SAKYI, 2004
BME/CTVM2	*Rhipicephalus microplus*	Costa Rica	Embrião	~138	L15	28ºC	BELL-SAKYI, 2004
HAE/CTVM8	*Hyalomma anatolicum*	Índia	Embrião	~142	L15+H-Lac	32ºC	BELL-SAKYI, 1991
IDE8	*Ixodes scapularis*	Estados Unidos	Embrião	~96	L15B	30ºC	MUNDERLOH et al., 1994
IRE/CTVM19	*Ixodes ricinus*	Reino Unido	Embrião	~197	L15	28ºC	BELL-SAKYI et al., 2007
ISE6	*Ixodes scapularis*	Estados Unidos	Embrião	~142	L15B	30ºC	KURTTI et al., 1996
RA243	*Rhipicephalus appendiculatus*	África oriental	Ninfa	desconhecido	L15	28ºC	VARMA et al., 1975
RAE/CTVM1	*Rhipicephalus appendiculatus*	África oriental	Ninfa	~139	L15	32ºC	BELL-SAKYI, 2004

0,5% de lactalbumina hidrolizada (SAFC Biosciences®), 1% de L-glutamina (200mM) (Sigma®) e 1% da solução de antibióticos penicilina (10.000 UI) e estreptomicina (10mg/mL) (Sigma®). A linhagem celular HAE8 **(Tab. 1)** foi cultivada em uma mistura de volumes equivalentes dos meios L-15 e H-Lac, enquanto que a linhagem AVL17 **(Tab. 1)** foi cultivada em uma mistura de volumes equivalentes dos meios L-15, L-15B e H-Lac.

O pH dos meios foi ajustado para 6,6-6,8 e posteriormente esterilizados em filtro de nitrocelulose com porosidade de 0,22µm.

O crescimento celular foi monitorado com auxílio de um microscópio de contraste de fase invertido até as células atingirem um estado de confluência. Neste momento, foram removidas do frasco por rinsagem e transferidas para placas de cultivo de 24 poços.

3.4 Manutenção das cepas de *Borrelia* spp.

As amostras de soro de *G. gallus* infectado com *B. anserina* foram mantidas no LDP em nitrogênio líquido a -196ºC, com DMSO a 10% como criopreservante.

As amostras de *B. burgdorferi* utilizadas no presente estudo foram mantidas por mais de 100 passagens em meio Barbour-Stoenner-Kelly (BSK-H) (Sigma®) e alíquotas criopreservadas em nitrogênio líquido a -196ºC, com DMSO a 10% como criopreservante.

Para realização do trabalho experimental, as amostras foram descongeladas a 32ºC e mantidas no meio de cultura BSK-H, em estufa bacteriológica a 34°C, em garrafas de cultivo de células de 25cm^2, com rotina de substituição de aproximadamente 95% do meio semanalmente.

3.5 Confirmação de identidade de *Borrelia* spp.

Para confirmação pela PCR das espécies de *B. burgdorferi* e *B. anserina* estudadas, foi feita a extração de DNA com o kit Qiagen DNeasy (Qiagen®) a partir de amostras dos cultivos em BSK mantidas no LDP. A concentração e a pureza do DNA foram obtidas através de espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific/Sinapse Biotecnologia®).

Para *B. burgdorferi*, as amostras foram submetidas a *nested*-PCR padronizada por Mantovani (2010). Os dois pares de *primers* foram desenhados (MANTOVANI, 2010) para amplificação do gene *flgE* (SAL et al., 2008). As reações foram feitas utilizando o *primer forward flgE*513bp F (5'-TTGGTGTTCTTGAGCTTAGAGTTG-3') e o *primer reverse flgE* 513bp R (5'-CGCCTATTCTAACTTGACCTGAAT-3') na primeira PCR, e o *primer forward flgE* 262 bp F (5'-CAA GTC CTC CGG GAT TCA TA-3') e o *primer reverse flgE* 262 bp R (5'-TTG GGT GCA AAT GTA GGT GA-3') na segunda PCR.

O produto da PCR foi purificado com o kit Wizard SV Gel and a PCR Clean-up System (Promega®) conforme recomendações do fabricante. Após a purificação, o DNA foi sequenciado em plataforma capilar tipo Sanger no equipamento ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies®), e as sequências analisadas com o programa Analysis 5.3.1. Os resultados foram avaliados com o programa Chromas Lites e as similaridades de sequência foram determinados por BLASTn analysis no GenBank.

Para *B. anserina*, as amostras foram submetidas a PCR padronizada por Ataliba et al. (2007). A amplificação dos fragmentos de DNA pela PCR do gene 16sRNA (rrs) foi realizada utilizando os *primers* Rec4 (50-ATGCTAGAAACTGCATGA-30) e Rec9 (50-

TCGTCTGAGTCCCCATCT-30), que amplifica o fragmento 519-bp de *Borrelia* spp. (MARTIRAS et al., 1996). Para as reações do gene flagelina (flaB), foram utilizados *primers* FlaLL (50-ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT-30) e FlaRL (50-GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT-30), que amplifica o fragmento 658-bp de *Borrelia* spp. (BARBOUR et al., 1996), e *primers* A (50-TCTGATGATGCTGCTGGTATGG-30) e D (50-AGGTTTTCAATAGCATACTC-30), que amplifica fragmento sobreposto 739-bp (GUNER et al., 2003).

3.6 Citometria de fluxo

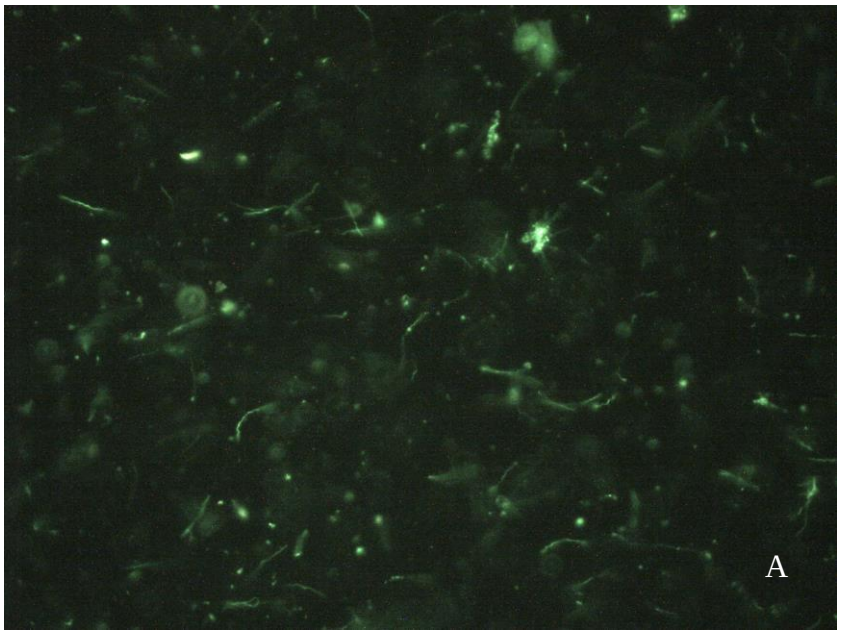
Para esta etapa, frascos de cultivo de 25cm^2 com cada uma das oito linhagens celulares de carrapatos em estado de confluência foram submetidos à rinsagem para descolamento do frasco e separação das células. As amostras foram contadas em câmara de Neubauer para determinação da concentração das células e posterior transferência para placas de cultura.

As oito linhagens celulares foram semeadas em quatro placas de cultura de 24 poços a uma concentração de aproximadamente 5 x 10^5 células/mL de meio com antibiótico e incubadas a 30ºC em estufa bacteriológica, com 500µL da solução de células por poço. Foi preparada uma placa de 24 poços extra com todas as linhagens à mesma concentração para servir de controle não infectado.

- Marcação de *Borrelia* spp.

As espiroquetas foram marcadas com um marcador fluorescente de membrana (PKH67 - Sigma®), um corante de cor verde que se liga às regiões lipídicas da membrana celular. O protocolo utilizado consta no "Technical Bulletin" que acompanha o produto, com modificações (**Fig. 1**).

Primeiramente, *B. anserina* e *B. burgdorferi* mantidas em cultivo no meio BSK-H foram contadas em câmara de Neubauer para determinação de suas concentrações. Em uma capela de fluxo laminar, transferiu-se 1mL de cada espécie de bactéria à concentração de aproximadamente 4 x 10^7 espiroquetas/mL para tubos estéreis de 1,5mL do tipo Eppendorf®, que foram centrifugados por 14.462 x g por 5 minutos em microcentrífuga. Após a centrifugação, retiraram-se os sobrenadantes e os pellets foram resssuspensos em 1mL de solução salina balanceada de Hanks' (HBSS - Life Technologies®). Os tubos foram centrifugados à mesma rotação e pelo mesmo tempo e os sobrenadantes retirados. Em outro tubo, preparou-se a solução de 400µL de diluente C + 4µL do corante PKH (componentes do minikit PKH67). Cada um dos pellets foi ressuspenso em 200µL de diluente C e posteriormente adicionou-se 200µL da solução de diluente + corante, com incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, agitando periodicamente a cada minuto. Após a incubação, interrompeu-se a coloração avolumando 1mL de soro fetal bovino inativado (Life Technologies®) a cada tubo, incubando à temperatura ambiente por 1 minuto. Novamente o material foi centrifugado a 14.462 x g por 5 minutos, o sobrenadante removido e os pellets ressuspensos cada um em 200µL do meio BSK (**Fig. 1**).



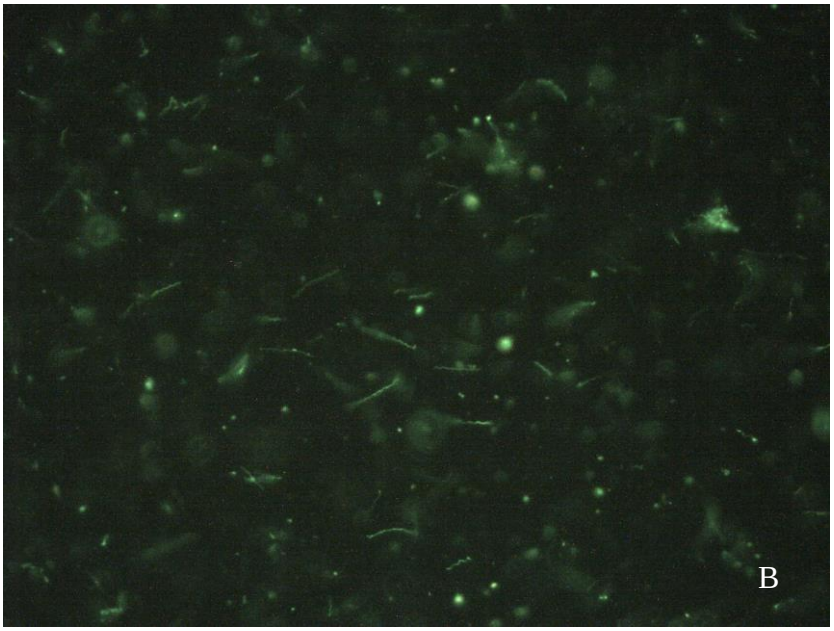


Fig. 1. Espiroquetas coradas com o fluoróforo PKH67: *Borrelia anserina* (**A**) e *Borrelia burgdorferi* (**B**). Microscopia de fluorescência, aumento de 400x.

- Inoculação de *Borrelia* spp. nas linhagens de células de carrapatos

Para inoculação das espiroquetas, os meios de cultivo das células com antibióticos foram retirados dos poços e as células de um poço controle de cada linhagem foram ressuspensas em 1mL de meio de cultivo próprio para contagem em câmara de Neubauer.

No momento em que as linhagens estavam à concentração de aproximadamente 1,8-3,7 x 10^5 células/mL, em metade dos poços foram colocados 10% de meio BSK + 90% de meio próprio para cada linhagem e, na outra metade, 90% de meio BSK + 10% de meio próprio para cada linhagem (**Fig. 2**).

Foram inoculados 10µL de solução de *Borrelia* sp. marcada com PKH67 em cada um dos poços, totalizando aproximadamente 1 x 10^6 espiroquetas/poço. O volume final de cada poço foi 300µL e as placas foram incubadas a 30ºC em estufa do tipo B.O.D., ao abrigo da luz.

- Fixação do co-cultivo com paraformoldeído

Após 24h de inoculação das bactérias nas células de carrapatos, os meios de cultivo foram retirados dos poços por aspiração suave e os poços lavados gentilmente com HBSS para retirada das espiroquetas livres. Depois desse procedimento, as células foram ressuspensas gentilmente por rinsagem com 1mL de HBSS/poço e colocadas em tubos de 1,5mL para centrifugação por 14.462 x g por 5 minutos.

Em seguida o sobrenadante foi retirado, os pellets foram ressuspensos em solução de 1% de paraformoldeído e os tubos acondicionados em geladeira a 4ºC, ao abrigo da luz, por até uma semana.

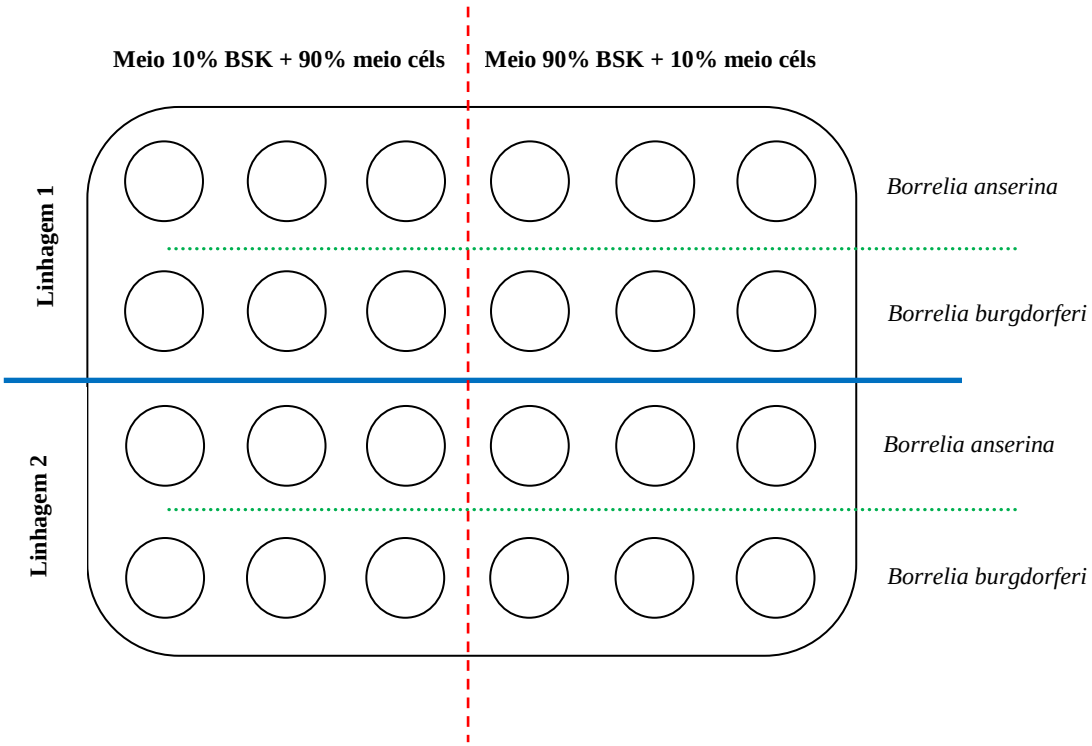


Fig. 2. Delineamento experimental das placas de cultivo para citometria de fluxo.

Mesmo procedimento de fixação e armazenamento foi realizado para as amostras de células de carrapatos que serviram de controle não infectado.

- Leitura em aparelho de citometria de fluxo

O aparelho utilizado foi o BD Accuri C6 - Beckton & Dickinson® (**Fig. 3**), no canal FL1-A, com leitura de 10.000 eventos, do Laboratório de Microbiologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - RJ.

3.7 Internalização de *Borrelia* spp. em células de carrapatos

Para entender como ocorre a internalização de *Borrelia* spp. nas células de carrapatos, foram semeadas em uma placa de 24 poços aproximadamente $2{,}75 \times 10^5$ células/poço da linhagem com maior percentual médio de infecção (RA243) observado previamente na citometria de fluxo. Quatro poços receberam meio de cultivo Leibovitz´s L-15 suplementado com DMSO (1:500 v/v) e outros quatro poços receberam solução de citocalasina D (1mg/mL de DMSO) (1:500 v/v). Após uma hora de incubação, a espiroqueta marcada com PKH67 foi adicionada em três poços de cada tratamento (proporção de 10:1 *Borrelia* por célula de carrapato), enquanto o restante serviu de controle não infectado. A placa foi mantida por 24 horas a 30ºC em estufa ao abrigo da luz.

Após 24h de incubação, os meios de cultivo foram retirados dos poços por aspiração suave e os poços lavados gentilmente com HBSS para retirada das espiroquetas livres. Depois desse procedimento, as células foram ressuspensas gentilmente por rinsagem com 500µL de uma solução de PBS + 10% de soro fetal bovino inativado e colocadas em tubos de 1,5mL para leitura em aparelho de citometria, no canal FL1-A com leitura de 10.000 eventos. O índice de associação bacteriana foi expressa como a percentagem de células fluorescentes.



Fig. 3. Aparelho de citometria de fluxo BD Accuri C6 (Beckton & Dickinson®) do Laboratório de Microbiologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - RJ.

Uma das maiores preocupações nos ensaios de fagocitose é distinguir bactérias realmente internalizadas daquelas apenas ligadas às células. Para isto, utilizou-se o efeito de extinção do azul de tripan da fluorescência extracelular para diferenciar a fixação da internalização.

Desta forma, as mesmas amostras após a primeira leitura no citômetro foram coradas com azul de tripan (1:100 v/v) e foram reanalisadas pela citometria de fluxo.

3.8 Microscopia de fluorescência

Para visualização por microscopia de fluorescência, as linhagens de células de carrapatos foram semeadas em placas de cultivo de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis e as espiroquetas foram marcadas com o fluoróforo PKH67 (Sigma®). Utilizou-se o mesmo protocolo da citometria para marcação das bactérias e para a inoculação destas nas linhagens de células.

Após 24h de incubação a 30ºC do co-cultivo, ao abrigo da luz, os meios de cultivo foram retirados por aspiração suave e os poços lavados gentilmente com HBSS para retirada das espiroquetas livres. Depois desse procedimento, adicionou-se um volume de 500µL de uma solução de 4% de paraformoldeído em cada poço para fixação do material durante 20 minutos. Decorrido este tempo, a solução de paraformoldeído foi retirada e os poços foram lavados gentilmente com HBSS. Utilizou-se o corante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para marcação do DNA nuclear das células numa concentração de 1:1000, onde foram adicionados 500µL dessa solução em cada poço e mantidos por cinco minutos. Então esta solução foi retirada e os poços lavados gentilmente com HBSS. As lamínulas foram mantidas dentro dos poços em 500µL de HBSS e as placas foram acondicionadas em geladeira a 4ºC ao abrigo da luz.

No momento da leitura, as lamínulas foram retiradas dos poços e sobrepostas a lâminas de vidro para visualização no microscópio de fluorescência Axio Observer.Z1 (Zeiss®), no Laboratório de Microbiologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - RJ.

3.9 Microscopia Confocal

Para visualização por microscopia confocal, as linhagens de células de carrapatos foram semeadas em placas de cultivo de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis e as espiroquetas foram marcadas com o fluoróforo PKH67 (Sigma®). Utilizou-se o mesmo protocolo da citometria para marcação das bactérias e para a inoculação destas nas linhagens de células. Após 24h de incubação a 30ºC do co-cultivo, ao abrigo da luz, as lamínulas foram retiradas dos poços e sobrepostas a lâminas de vidro para visualização no microscópio confocal Leica TCS SPE (Leica®), no Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.10 Análises Estatísticas

Para comparação das médias dos percentuais de células de carrapatos infectadas com as espiroquetas, em um mesmo grupo experimental, foram utilizados os testes ANOVA e

Tukey, a nível de 5% de significância. As médias foram consideradas significativamente distintas quando $p<0,05$.

Para análise dos resultados, utilizou-se o programa InStat® e a escolha dos testes estatísticos foi realizada conforme Sampaio (2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Citometria de fluxo

Neste estudo, foram usadas linhagens de células de espécies de carrapatos conhecidamente vetoras de *B. burgdorferi* e não vetoras, e de nenhuma espécie vetora de *B. anserina*, combinado com meios de cultivo que suportam ou não o crescimento desta espiroqueta, para facilitar a análise da adesão e penetração nas células de carrapatos.

A utilização de fluoróforos permite melhor visualização de uma bactéria nos estudos microscópicos e também é uma maneira para estudar quantitativamente sua associação com diferentes células. Uma vantagem no uso da marcação bacteriana com fluoróforo está na simplicidade dos ensaios. A citometria de fluxo é rápida, sensível e requer pequenos volumes das amostras. Uma quantidade muito maior de células pode ser quantificada, comparada à microscopia, e a citometria de fluxo não é tão propensa a erros devido à interpretação individual pelo operador como a microscopia. Por outro lado, as técnicas microscópicas possuem a vantagem de permitir a avaliação visual direta da interação das espiroquetas com as células de carrapatos (TUOMINEN-GUSTAFSSON et al., 2006).

Outros estudos com diferentes corantes, tais como diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) e isômero isotiocianato I (ITCF), foram previamente utilizados para marcar diferentes genoespécies de *B. burgdorferi* para verificar a associação entre esta espiroqueta e células (TUOMINEN-GUSTAFSSON et al., 2006; MATILLA et al., 2007). A modificação genética de *B. burgdorferi* para expressar proteínas fluorescentes (BABB et al., 2004) é outro método para marcação de espiroquetas para visualização da sua interação com células (MONIUSZKO et al., 2014). No entanto, esta técnica é muito mais complexa do que a marcação com fluoróforos, e o último método tem a vantagem de ser rápida e facilmente aplicado a qualquer cepa de *Borrelia* sp.

A marcação de *B. burgdorferi* com PKH67 permitiu a subsequente quantificação da espiroqueta associada às células de carrapatos através da citometria de fluxo e sua visualização nas microscopias de fluorescência e confocal.

Após 24 horas de co-cultivo das espiroquetas, coradas com PKH, com as células de carrapatos, a fluorescência pôde ser detectada pela técnica da citometria utilizando os parâmetros de ajuste das células para detectar apenas a fluorescência proveniente das bactérias marcadas associadas a células de carrapatos. As células de carrapatos foram divididas em duas populações distintas, uma sem fluorescência (apenas autofluorescência) e outra com fluorescência detectável (**Fig. 4** e **Fig. 5**).

A citometria de fluxo revelou diferentes percentuais de associação de *Borrelia anserina* com as diversas linhagens de células de carrapatos. Quando foi utilizado meio de cultivo composto por 10% de BSK + 90% de meio da célula, o percentual médio de células infectadas variou entre 13,92 e 77,83%, onde a linhagem RA243 obteve os melhores resultados, seguida das linhagens BME2 (51,34%) e AVL17 (47,69%), ficando ISE6 com os mais baixos resultados (**Tab. 2** e **Fig. 6A**).

Quando foi utilizado meio de cultivo composto por 90% de BSK + 10% de meio da célula, o percentual médio de células infectadas variou entre 4,14 e 54,56%, onde a linhagem RA243 obteve melhores resultados, seguida das linhagens BME2 (27,55%) e AVL17 (28,14%), ficando IRE19 com os mais baixos resultados (**Tab. 2** e **Fig. 6A**).

A citometria de fluxo revelou diferentes percentuais de associação de *Borrelia burgdorferi* com as diversas linhagens de células de carrapatos. Quando foi utilizado meio de

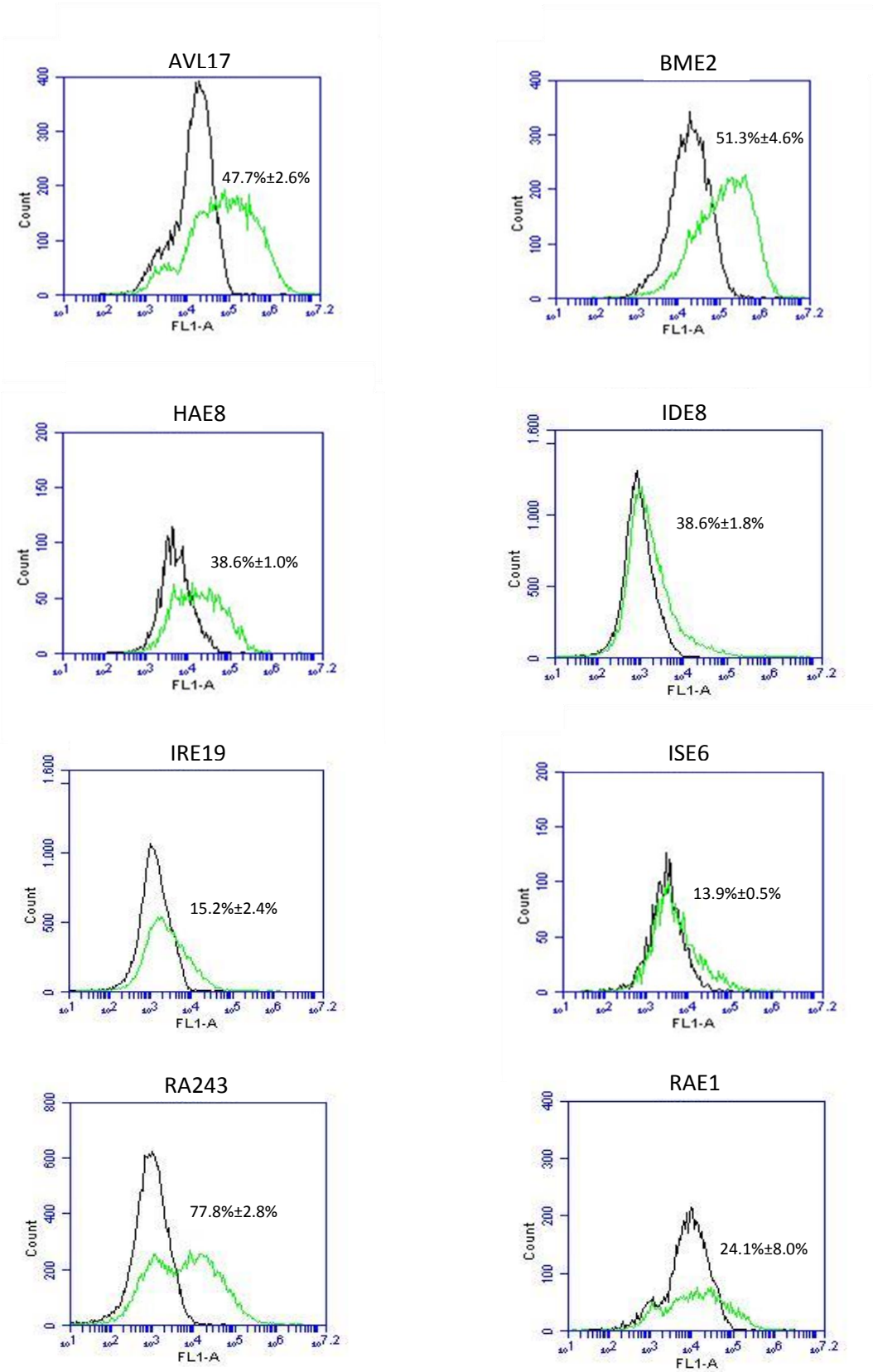


Figura 4. Overlays da citometria de fluxo mostrando a associação de *Borrelia anserina* marcada com PKH67 com oito linhagens de células de carrapatos (linhas verdes), no meio de cultura composto por 10% de BSK-H + 90% de meio das células. Linhas negras nos gráficos representam os controles de células de carrapatos não infectadas. Valores dentro do gráfico representam o percentual médio de infecção e o desvio padrão.

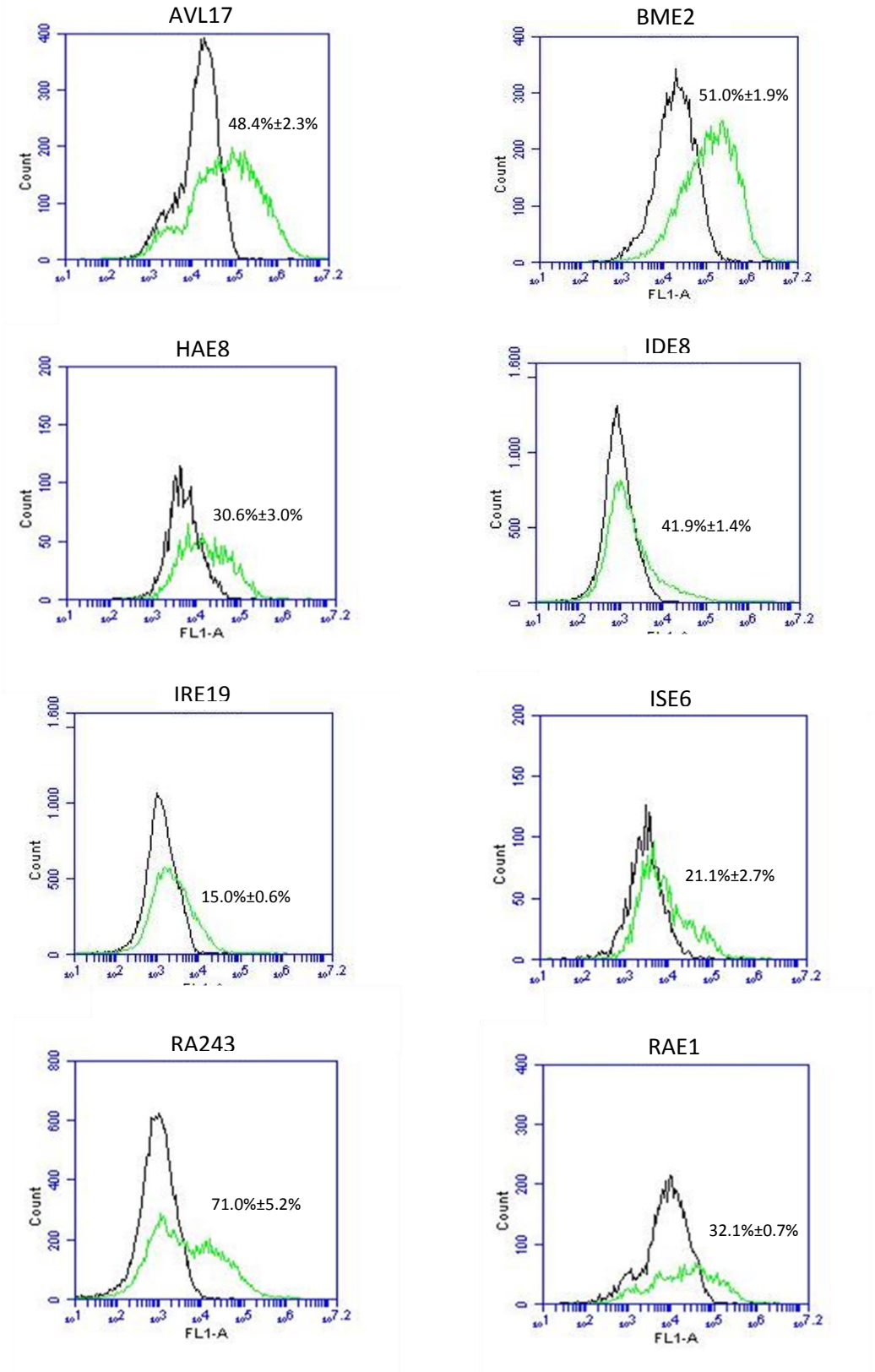
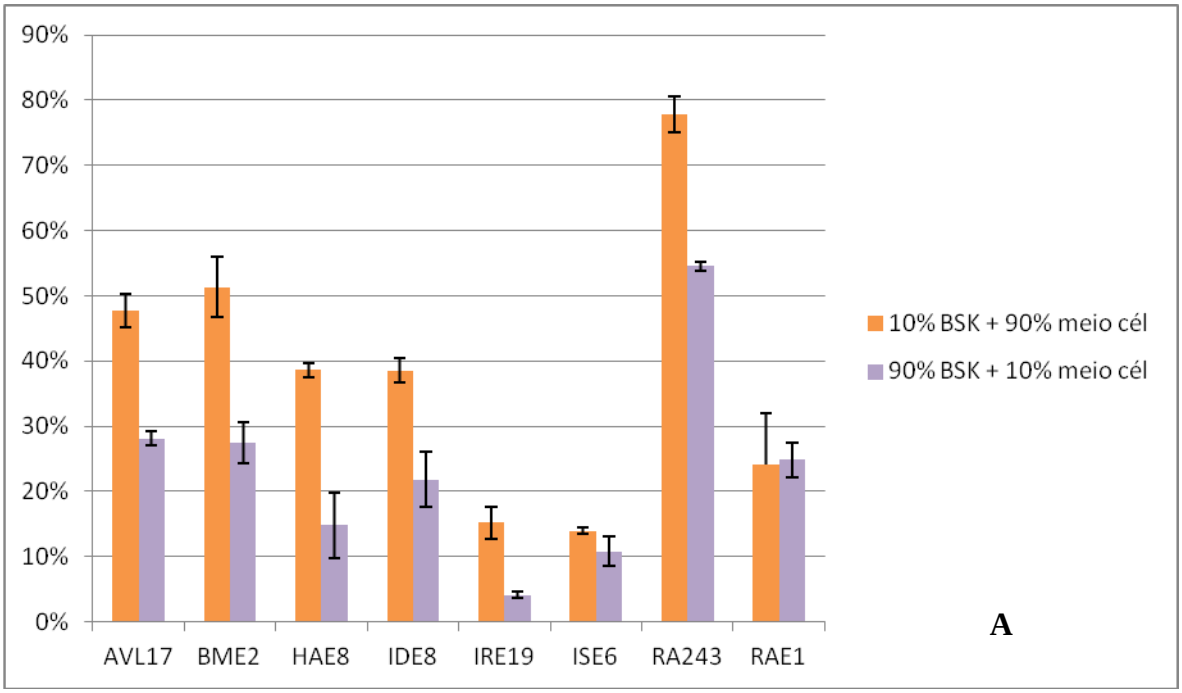


Figura 5. Overlays da citometria de fluxo mostrando a associação de *Borrelia burgdorferi* marcada com PKH67 com oito linhagens de células de carrapatos (linhas verdes), no meio de cultura composto por 10% de BSK-H + 90% de meio das células. Linhas negras nos gráficos representam os controles de células de carrapatos não infectadas. Valores dentro do gráfico representam o percentual médio de infecção e o desvio padrão.

Tab. 2. Resultado das amostras na citometria de fluxo, indicando o percentual médio de células com as espiroquetas aderidas ou internalizadas, para as oito linhagens de células de carrapatos inoculadas com *Borrelia anserina* e *Borrelia burgdorferi* marcadas com o fluoróforo PKH67, de acordo com as concentrações dos meios de cultivo: 10% BSK + 90% meio das células e 90% BSK + 10% meio das células.

		AVL17	BME2	HAE8	IDE8	IRE19	ISE6	RA243	RAE1
Borrelia	10% BSK +90% meio cél	47.69% ^{ab}	51.34% ^{b}	38.59% ^{a}	38.57% ^{a}	15.2% ^{cd}	13.92% ^{c}	77.83% ^{e}	24.05% ^{d}
anserina	90% BSK + 10% meio cél	28.14% ^{a}	27.55% ^{a}	14.82% ^{bc}	21.83% ^{ab}	4.14% ^{d}	10.81% ^{cd}	54.56% ^{e}	24.84% ^{ab}
Borrelia	10% BSK + 90% meio cél	48.41% ^{a}	50.98% ^{a}	30.58% ^{be}	41.94% ^{ac}	15.02% ^{d}	21.1% ^{de}	70.91% ^{f}	32.1% ^{bc}
burgdorferi	90% BSK +10% meio cél	28.68% ^{a}	24.13% ^{ab}	15.78% ^{bc}	20.48% ^{ab}	7.3% ^{c}	20.06% ^{ab}	49.46% ^{d}	27.84% ^{a}

Médias seguidas por letra minúscula igual nas linhas não diferiram entre si, pelos testes ANOVA e Tukey, ambos a nível de 5% de significância.



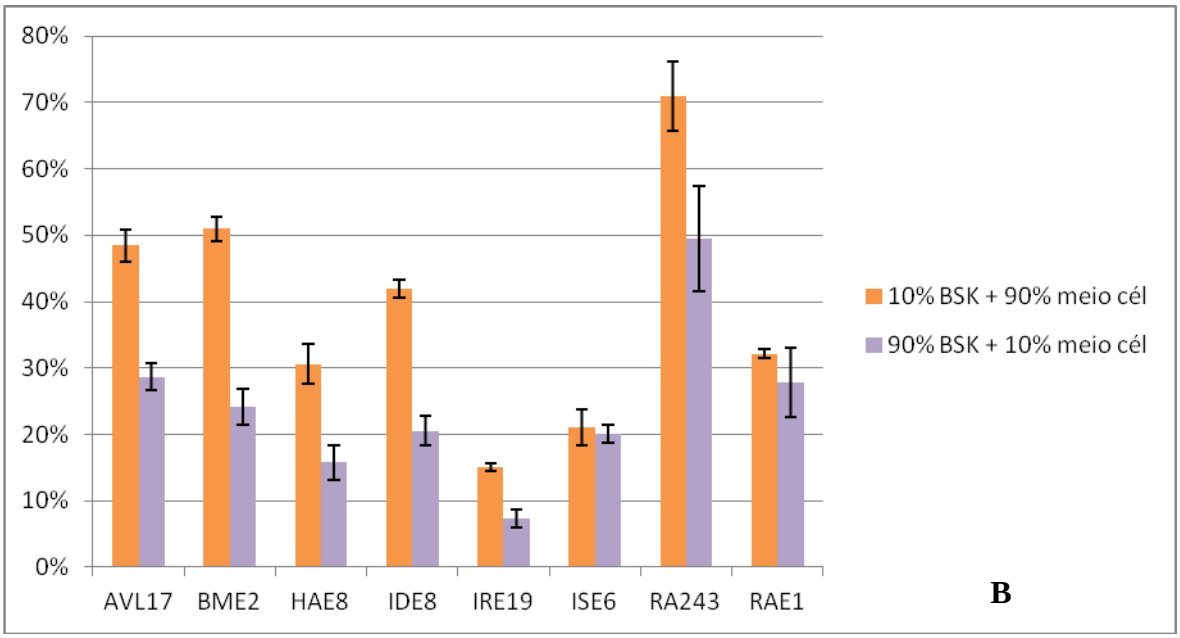


Fig. 6. Resultado das amostras na citometria de fluxo, indicando o percentual de células com as espiroquetas aderidas ou internalizadas (média e desvio padrão), para as oito linhagens de células de carrapatos inoculadas com *Borrelia anserina* **(A)** e *Borrelia burgdorferi* **(B)** marcadas com o fluoróforo PKH67, de acordo com as concentrações dos meios de cultivo: 10% BSK + 90% meio das células e 90% BSK + 10% meio das células.

cultivo composto de 10% de BSK + 90% de meio da célula, o percentual médio de células infectadas variou entre 15,02 e 70,91%, onde a linhagem RA243 obteve melhores resultados, seguida das linhagens BME2 (50,98%) e AVL17 (48,41%), ficando IRE19 com os mais baixos resultados (**Tab. 2** e **Fig. 6B**).

Quando foi utilizado meio de cultivo composto por 90% de BSK + 10% de meio da célula, o percentual médio de células infectadas variou entre 7,3 e 49,46%, onde a linhagem RA243 obteve melhores resultados, seguida das linhagens AVL17 (28,68%) e RAE1 (27,84%), ficando IRE19 com os mais baixos resultados (**Tab. 2** e **Fig. 6B**).

A linhagem RA243 obteve as maiores médias de percentuais de infecção para ambas as espécies de espiroqueta e em ambos os meios de cultivo, resultado este observado também na estatística, onde houve diferenças significativas ($p<0,05$) entre esta linhagem comparada a todas as outras sete (**Tab. 2**).

As linhagens de *I. scapularis* e *I. ricinus* (ISE6 e IRE19, respectivamente, espécies conhecidamente vetoras de *B. burgdorferi*) obtiveram as menores médias de percentuais de infecção para ambas as espécies de espiroqueta e em ambos os meios de cultivo, resultado este observado também na estatística, onde houve diferenças significativas ($p<0,05$) entre estas linhagens comparada às outras (**Tab. 2**).

Na comparação das médias dos percentuais de infecção dentro de cada linhagem celular de carrapatos infectada com *B. anserina*, no meio de cultivo composto por 10% de BSK + 90% de meio da célula, houve um maior percentual médio de células infectadas que no meio composto por 90% de BSK + 10% de meio da célula, exceto nas linhagem RAE1 e ISE6 (**Fig. 6A** e **Tab. 3A**). A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os percentuais médios de infecção das linhagens RAE1 e ISE6 por *B. anserina* nas duas composições de meio de cultivo.

Na comparação das médias dos percentuais de infecção dentro de cada linhagem celular de carrapatos infectada com *B. burgdorferi*, no meio de cultivo composto por 10% de BSK + 90% de meio da célula houve um maior percentual médio de células infectadas que no meio composto por 90% de BSK + 10% de meio da célula, exceto nas linhagens IRE19, ISE6 e RAE1 (**Fig. 6B** e **Tab. 3B**). De modo geral, as culturas utilizando menores concentrações de BSK-H favoreceram a aderência e/ou a internalização das espiroquetas nas células, visto que em todas as linhagens, as células de carrapato apresentaram maior percentual de fluorescência em meios contendo 10% de BSK-H e 90% de meio específico para célula. A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os percentuais médios de infecção das linhagens IRE19, ISE6 e RAE1 por *B. burgdorferi* nas duas composições de meio de cultivo (**Tab. 3**).

Diferentes concentrações do meio BSK-H influenciaram significativamente nas proporções de associação espiroquetas-células detectadas por citometria de fluxo. O meio de cultivo pode influenciar a capacidade fagocítica e o meio BSK é ideal para *Borrelia* sp. mas não para células de carrapatos (KURTTI et al., 1988b; BUGRYSHEVA et al., 2002), e altas concentrações deste meio podem afetar a capacidade fagocítica das células de carrapatos ou a habilidade das espiroquetas em penetrar nas células ou ambos, resultando na diminuição do percentual de células fluorescentes.

Quando são comparadas as médias dos percentuais de infecção dentro de cada linhagem celular de carrapatos no meio de cultivo composto por 10% de BSK + 90% de meio da célula, a análise estatística demonstra que não houve diferenças estatísticas significativas ($p>0,05$) entre o percentual médio de células infectadas por *B. anserina* e o percentual médio das mesmas células infectadas por *B. burgdorferi* (**Fig. 7A** e **Tab. 4A**).

Tab. 3. Resultado das amostras na citometria de fluxo, indicando o percentual médio de células com as espiroquetas aderidas ou internalizadas, para as oito linhagens de células de carrapatos inoculadas com *Borrelia anserina* **(A)** e *Borrelia burgdorferi* **(B)** marcadas com o fluoróforo PKH67, de acordo com as concentrações dos meios de cultivo: 10% BSK + 90% meio das células e 90% BSK + 10% meio das células.

	Borrelia anserina	
Linhagem	10% BSK + 90% meio cél	90% BSK + 10% meio cél
AVL17	47.69%	28.14%
BME2	51.34%	27.55%
HAE8	38.59%	14.82%
IDE8	38.57%	21.83%
IRE19	15.20%	4.14%
ISE6	13.92% [a]	10.81% [a]
RA243	77.83%	54.56%
RAE1	24.05% [a]	24.84% [a]

A

	Borrelia burgdorferi	
Linhagem	10% BSK + 90% meio cél	90% BSK + 10% meio cél
AVL17	48.41%	28.68%
BME2	50.98%	24.13%
HAE8	30.58%	15.78%
IDE8	41.94%	20.48%
IRE19	15.02% [a]	7.30% [a]
ISE6	21.10% [a]	20.06% [a]
RA243	70.91%	49.46%
RAE1	32.10% [a]	27.84% [a]

B

Médias seguidas por letra minúscula igual nas linhas não diferiram entre si, pelos testes ANOVA e Tukey, ambos a nível de 5% de significância.

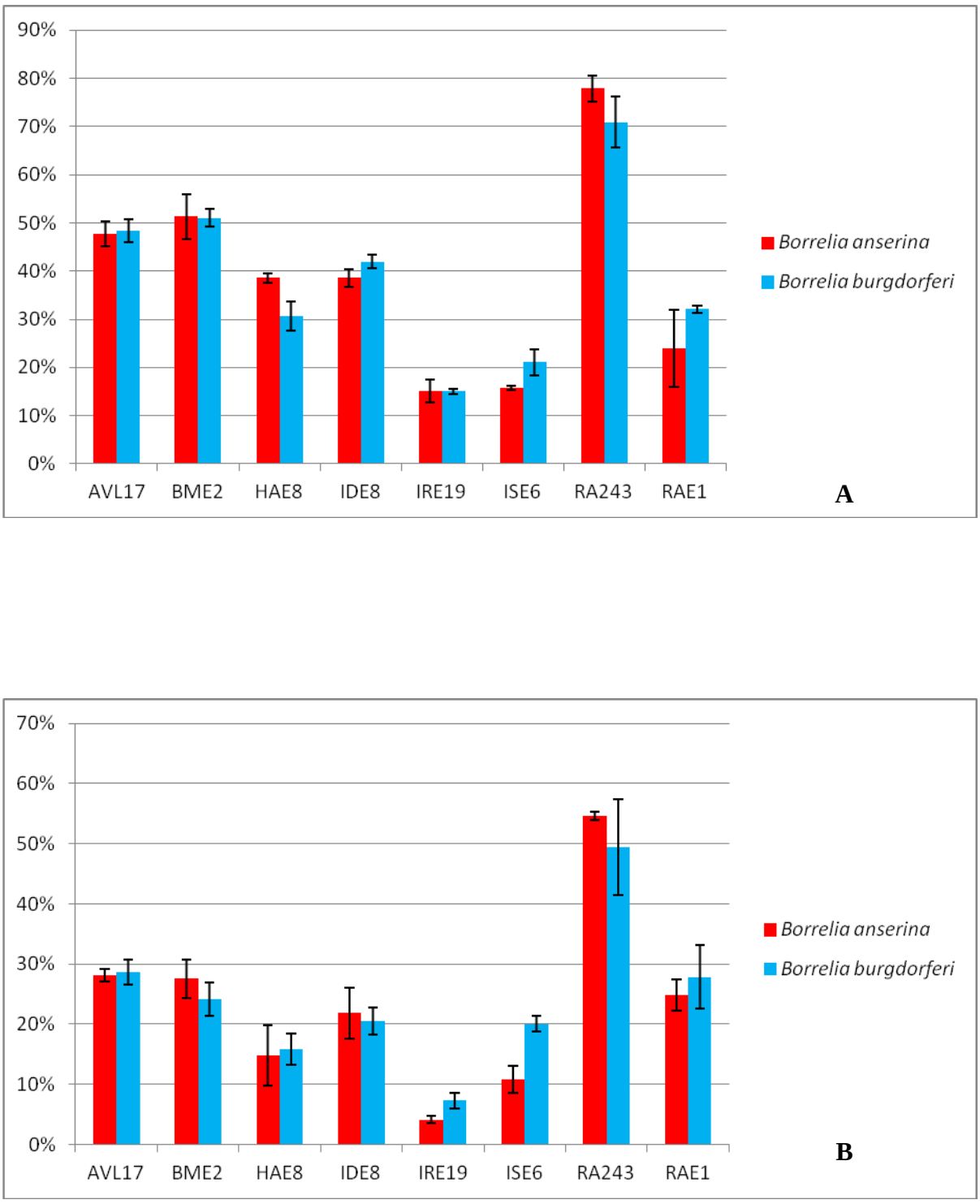


Fig. 7. Resultado das amostras na citometria de fluxo, indicando o percentual de células com as espiroquetas aderidas ou internalizadas (média e desvio padrão), para as oito linhagens de células de carrapatos inoculadas com *Borrelia anserina* e *Borrelia burgdorferi* marcadas com o fluoróforo PKH67, de acordo com as concentrações dos meios de cultivo: 10% BSK + 90% meio das células **(A)** e 90% BSK + 10% meio das células **(B)**.

Tab. 4. Resultado das amostras na citometria de fluxo, indicando o percentual médio de células com as espiroquetas aderidas ou internalizadas, para as oito linhagens de células de carrapatos inoculadas com *Borrelia anserina* e *Borrelia burgdorferi* marcadas com o fluoróforo PKH67, de acordo com as concentrações dos meios de cultivo: 10% BSK + 90% meio das células **(A)** e 90% BSK + 10% meio das células **(B)**.

Linhagem	*Borrelia anserina* 10% BSK + 90% meio cél	*Borrelia burgdorferi* 10% BSK + 90% meio cél
AVL17	47.69% [a]	48.41% [a]
BME2	51.34% [a]	50.98% [a]
HAE8	38.59% [a]	30.58% [a]
IDE8	38.57% [a]	41.94% [a]
IRE19	15.20% [a]	15.02% [a]
ISE6	13.92% [a]	21.10% [a]
RA243	77.83% [a]	70.91% [a]
RAE1	24.05% [a]	32.10% [a]

A

Linhagem	*Borrelia anserina* 90% BSK + 10% meio cél	*Borrelia burgdorferi* 90% BSK + 10% meio cél
AVL17	28.14% [a]	28.68% [a]
BME2	27.55% [a]	24.13% [a]
HAE8	14.82% [a]	15.78% [a]
IDE8	21.83% [a]	20.48% [a]
IRE19	4.14% [a]	7.30% [a]
ISE6	10.81% [a]	20.06% [a]
RA243	54.56% [a]	49.46% [a]
RAE1	24.84% [a]	27.84% [a]

B

Médias seguidas por letra minúscula igual nas linhas não diferiram entre si, pelos testes ANOVA e Tukey, ambos a nível de 5% de significância.

O mesmo ocorre quando são comparadas as médias dos percentuais de infecção dentro de cada linhagem celular de carrapatos no meio de cultivo composto por 90% de BSK + 10% de meio da célula, não há diferenças estatísticas significativas ($p>0,05$) entre o percentual médio de células infectadas por *B. anserina* e o percentual médio das mesmas células infectadas por *B. burgdorferi* (**Fig. 7B** e **Tab. 4B**).

As interações de *B. burgdorferi* com as superfícies das células de vertebrados, como aderência e penetração, representam etapas importantes na patogênese que também podem representar um papel importante na transmissão desta espiroqueta por carrapatos (KURTTI et al., 1993). A adesão e a invasão da espiroqueta nas células do vetor são importantes para a transmissão horizontal e vertical, tal como para a transmissão para os hospedeiros mamíferos (KURTTI et al., 1993). A bactéria *B. burgdorferi* pode invadir e se multiplicar a baixo níveis dentro de células de mamíferos como fibroblastos, células endoteliais e neuronais (KLEMPNER et al., 1993; LIVENGOOD, GILMOREJR, 2006; MA et al., 1991).

A aderência e invasão das espiroquetas em células de carrapatos em cultivo se assemelham àqueles reportados ocorrendo nos órgãos e tecidos de fêmeas ingurgitadas (BURGDORFER, HAYES, 1989; BURGDORFER et al., 1989; ZUNG et al., 1989; KURTTI et al., 1993; KURTTI et al., 1994). A invasão das células do intestino do carrapato é associada com as mudanças nas células do intestino médio durante a alimentação e digestão sanguínea (KURTTI et al., 1993). As espiroquetas penetram no intestino durante o período no qual as células estão envolvidas ativamente na endocitose para ingestão de componentes da alimentação sanguínea (BENACH et al., 1987; BURGDORFER, HAYES, 1989; KOH et al., 1991; SONENSHINE, 1991) e não aparecem induzindo elas mesmas a formação de poços endocitóticos no intestino de carrapatos em jejum (ZUNG et al., 1989).

O fato da invasão de células eucarióticas por bactérias patogênicas ser mediada por endocitose, e a visualização de poços revestidos na membrana das células de carrapatos, pode-se especular que as espiroquetas utilizam mecanismos similares para entrar nas células de carrapatos (KURTTI et al., 1993). As espiroquetas entram nas células dentro de um vacúolo criado pela invaginação da membrana das células de carrapato, ampliado pela fusão de vesículas revestidas, e este processo pode necessitar do alinhamento da porção final apical da espiroqueta com o poço endocitótico da membrana da célula (KURTTI et al., 1993).

A adaptação flexível por patógenos bacterianos para mudar rapidamente em ambientes do hospedeiro requer a interação de reguladores gerados em resposta a sinais desencadeados por estímulos ambientais. Uma tal resposta adaptativa é a resposta rigorosa, uma resposta global provocada pelo stress nutricional, quando a síntese de proteínas é bloqueada pela inanição de aminoácidos (BYRAN et al., 2004; BARBOUR et al., 2006; ANTONARA et al., 2007). A resposta rigorosa provoca aumento da regulação da degradação de proteínas e síntese de aminoácidos, a infra-regulação de ácidos nucleicos e de síntese de proteínas, e alteração de muitas funções celulares, incluindo a transcrição, tradução, replicação, transporte e metabolismo, e é acompanhada por um lento crescimento.

Apesar de *B. burgdorferi* crescer mais rapidamente em meio BSK-H do que quando co-cultivada com células de carrapatos, há evidência para o desencadeamento da resposta rigorosa desta espiroqueta crescendo em meio BSK-H e melhora desta resposta quando crescendo na presença de células de carrapatos. A aparente deficiência nutricional do meio BSK-H, sugerida pela estimulação da resposta rigorosa mesmo em uma cepa de laboratório que é adaptada para isso, tal como a B31, pode explicar a falha de diversos isolados clínicos de *B. burgdorferi* de crescer neste meio (BUGRYSHEVA et al., 2002).

Mesmo esta espiroqueta crescendo mais lentamente em co-cultivo com células de carrapato do que em cultivo somente com BSK-H, as células de carrapatos ou seus produtos metabólicos podem complementar essa aparente deficiência nutricional do meio BSK, o que

poderia auxiliar no isolamento de novas cepas desta bactéria, inclusive o agente causador da síndrome brasileira.

Johns et al. (2001) encontraram *D. variabilis* rapidamente eliminando e matando *B. burgdorferi* que foi inoculada na hemocele, enquanto que a espiroqueta inoculada em *I. scapularis* foi eliminada muito mais lentamente e pôde ser vista em sua morfologia normal aderida a glândula salivar e ovário após 24h de infecção.

A linhagem celular do carrapato *R. appendiculatus* (RA243) parece usar o mesmo mecanismo fagocítico que os hemócitos utilizam para fagocitar as espiroquetas, denominado de fagocitose por enrolamento ("coiling phagocytosis") (KURTTI et al., 1993; KURTTI et al., 1994; RITTIG et al., 1996). No estudo de Matilla et al. (2007), assim como no presente estudo, a linhagem celular ISE6 foi permissiva a *B. burgdorferi*, pois menos que 1% dessas células fagocitaram a espiroqueta, que permaneceu aderente a estas células de carrapatos por sete dias após a inoculação. Esta linhagem mostrou uma limitada resposta celular à infecção por *B. burgdorferi* (MATILLA et al., 2007). Já as células da linhagem IDE12, também do carrapato *I. scapularis*, fagocitaram menos e mais lentamente a espiroqueta que as células da linhagem DAE15 do carrapato *D. andersoni*, espécie não vetora desta bactéria.

As linhagens de células de carrapatos utilizadas são derivadas de tecidos embrionários e o tipo de tecido representado em cada cultura é desconhecido. A fagocitose é realizada por células dedicadas à fagocitose (RITTIG et al., 1996), sugerindo que o tecido embrionário que a linhagem ISE6 foi derivada não é fagociticamente competente ou sua habilidade foi perdida em cultura (MATILLA et al, 2007). A linhagem ISE6 já foi utilizada para isolar (VARELA et al., 2004) e cultivar *Borrelia* sp. (OBONYO et al., 1999; BUGRYSHEVA et al., 2002), reforçando a hipótese que estas células não montam resposta imune celular contra as espiroquetas (MATILLA et al., 2007).

As diferenças observadas na maior invasão da linhagem celular *R. appendiculatus* podem ser interpretadas mais como diferenças refletidas nos tipos de células que deram origem à cultura, do que pela espécie de carrapato (KURTTI et al., 1993; KURTTI et al., 1994).

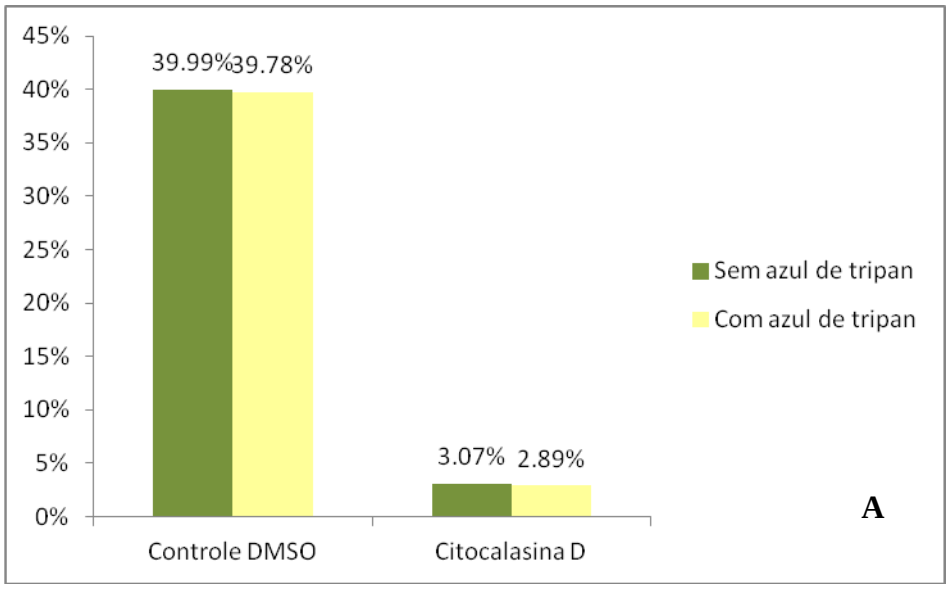
4.2 Internalização de *Borrelia* spp. em células de carrapatos

Com o tratamento das células de carrapatos da linhagem RA243 com citocalasina, inibindo a fagocitose, uma dramática inibição do percentual médio de infecção das células por *B. anserina* e *B. burgdorferi* pôde ser detectada (**Fig. 8**, colunas verdes). A estatística reforça que esses valores, além de numericamente diferentes (39.99% e 3.07%; 62.15% e 15.66%, respectivamente), são estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

A citocalasina despolimeriza a actina, causando diversas mudanças morfológicas, incluindo a perda de pseudópodes. Em outro estudo, a citocalasina inibiu efetivamente a fagocitose de *B. burgdorferi* pelas células de *I. scapularis* (linhagem IDE12) e *Dermacentor andersoni* (DAE15) (MATILLA et al., 2007).

Neste estudo, os dados microscópicos mostraram que algumas bactérias fluorescentes estavam ligadas à membrana celular e a fixação não pôde ser distinguida da fagocitose. Assim, os resultados devem ser interpretados como a associação das bactérias às células, incluindo tanto fixação quanto internalização. Para isto, utilizou-se o efeito de extinção do azul de tripan da fluorescência extracelular para diferenciar a fixação da internalização.

O percentual médio de infecção por *B. anserina* e *B. burgdorferi* das células coradas com azul de tripan (**Fig. 8**, colunas amarelas) não apresentou diferença estatística significativa ($p>0,05$) comparado ao percentual médio de infecção das células que não receberam azul de tripan (**Fig. 8**). Esse resultado sugere a quase totalidade da localização intracelular de ambas



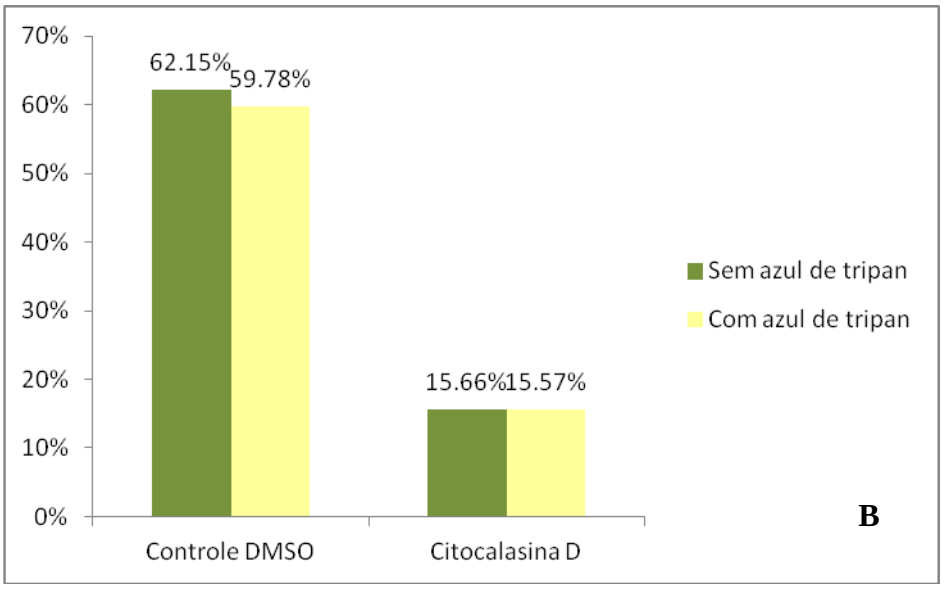


Figura 8. Percentual médio de infecção de *Borrelia anserina* (**A**) e *Borrelia burgdorferi* (**B**) marcadas com PKH67 em linhagem de células RA243 pré-tratadas com DMSO (controle) e com citocalasina D.

bactérias cultivadas com células de carrapatos, após 24h, fato este observado também nas microscopias confocal e de imunofluorescência.

No estudo de Ma et al. (1991), a inibição da polimerização de actina com citocalasina D inibiu a internalização de *B. burgdorferi* em células endoteliais humanas. Um pré-tratamento de 12h da linhagem de célula HUVEC com 1µg/mL de citocalasina D completamente bloqueou a internalização das espiroquetas. Isto significa que microfilamentos de actina foram necessários para a localização intracelular, o que indica que a célula hospedeira participa ativamente no processo de internalização e que a espiroqueta pode fazer uso dos polímeros de actina do hospedeiro na sua internalização (MA et al., 1991).

Já no trabalho de Matilla e colaboradores (2007), a citocalasina B bloqueou a fagocitose de espiroquetas viáveis e mortas pelas células da linhagem IDE12 e preveniu a fagocitose de espiroquetas mortas pelas células da linhagem DAE15, enquanto viáveis espiroquetas invadiram estas células mesmo com o pré-tratamento com citocalasina.

Kurtti et al. (1993) reportaram que as espiroquetas usam mecanismos similares para invasão de células de vertebrados e de células de carrapatos. No estudo de 1994, Kurtti et al. observaram que a espiroqueta se fixou às células do carrapato *R. appendiculatus* de forma epicelular pelas suas extremidades e poços endocitóticos revestidos e vesículas foram observados no local de fixação das espiroquetas às membranas das células, indicando a participação ativa da célula hospedeira. Estes autores também sugeriram que a espiroqueta utiliza processos dependentes de actina, tal como endocitose mediada por receptor, para invadir as células de carrapatos.

4.3 Microscopia de fluorescência

Após 24 horas de co-cultivo das espiroquetas, coradas com PKH, com as células de carrapatos, as lamínulas de vidro foram retiradas dos poços e sobrepostas a lâminas de vidro para visualização no microscópio de fluorescência.

Na análise morfológica das amostras, observou-se a relação íntima entre as células de carrapato e ambas as espiroqueta em todas as linhagens (**Fig. 9** e **10**). As bactérias *B. anserina* e *B. burgdorferi* raramente foram vistas em formato de espiroquetas fixadas às células de carrapatos ou livre.

Diversos estudos reportam a habilidade de *B. burgdorferi* em internalizar em diferentes tipos de células mamíferas, como células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (MA et al., 1991; KLEMPNER et al., 1993; DORWARD et al., 1997; LIVENGOOD, GILMOREJR, 2006; TUOMINEN-GUSTAFSSON et al., 2006; CRUZ et al., 2008; JING WU et al., 2011). O destino das espiroquetas internalizadas e os mecanismos empregados por elas para engatilhar a internalização, bem como as vias de sinalização celular envolvidas neste processo, são ainda desconhecidos (JING WU, 2011).

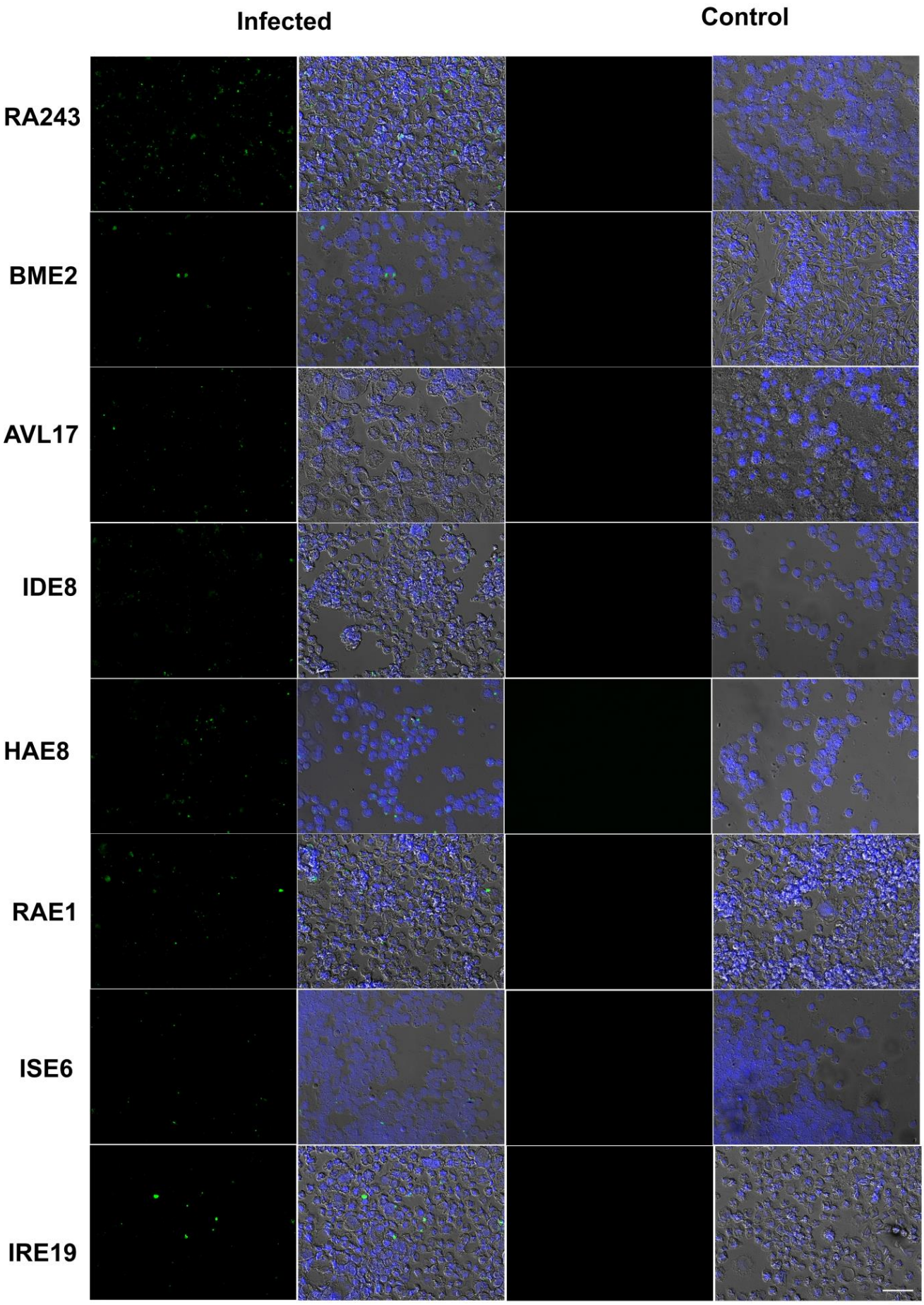


Fig. 9. Linhagens de células de carrapatos controles e inoculadas com a bactéria *Borrelia anserina* marcada com o fluoróforo PKH67, após 24h. DNA nuclear corado com DAPI. Microscópio de fluorescência, aumento de 400x. A barra de escala representa 50µm.

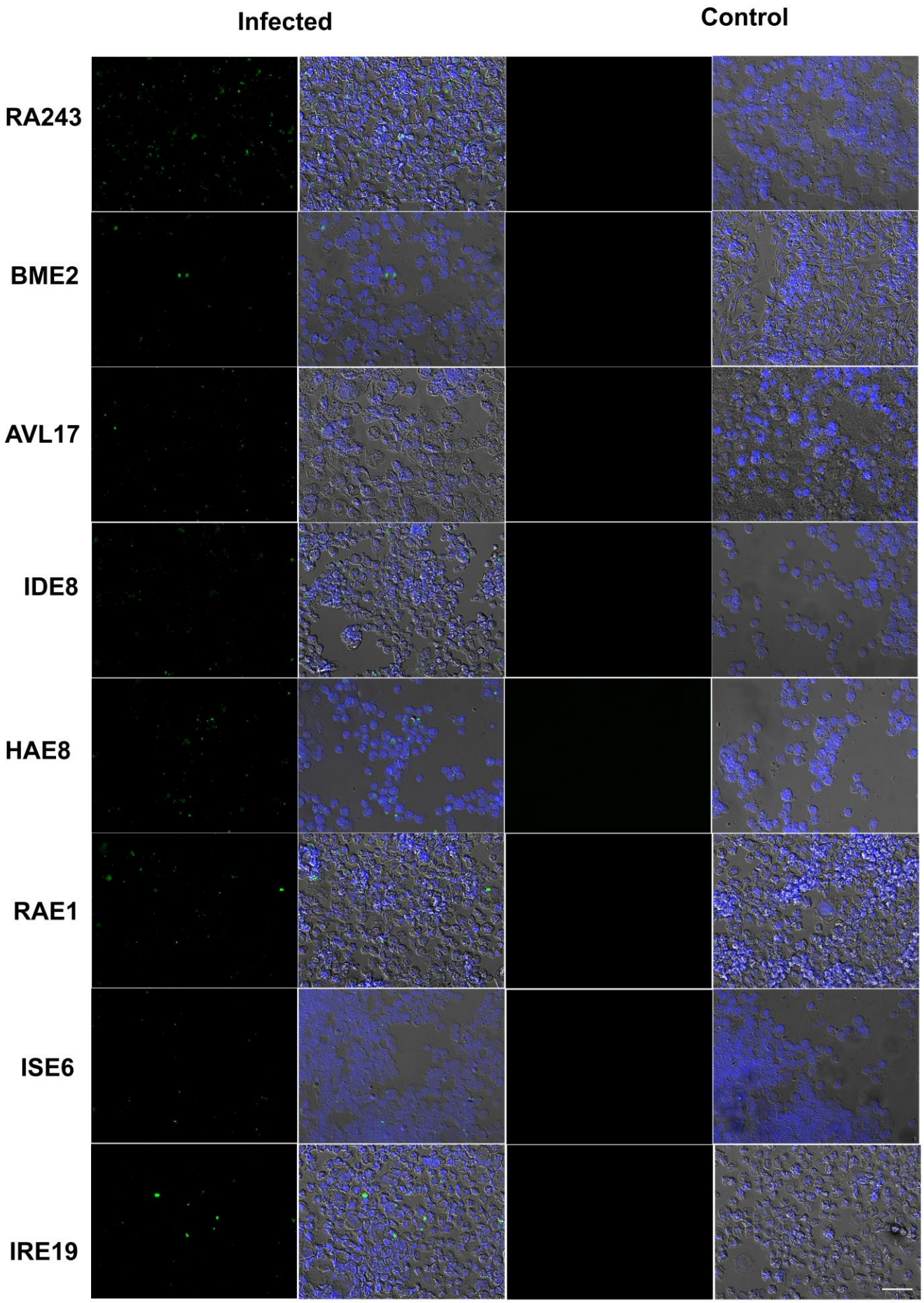


Fig. 10. Linhagens de células de carrapatos controles e inoculadas com a bactéria *Borrelia burgdorferi* marcada com o fluoróforo PKH67, após 24h. DNA nuclear corado com DAPI. Microscópio de fluorescência, aumento de 400x. A barra de escala representa 50µm.

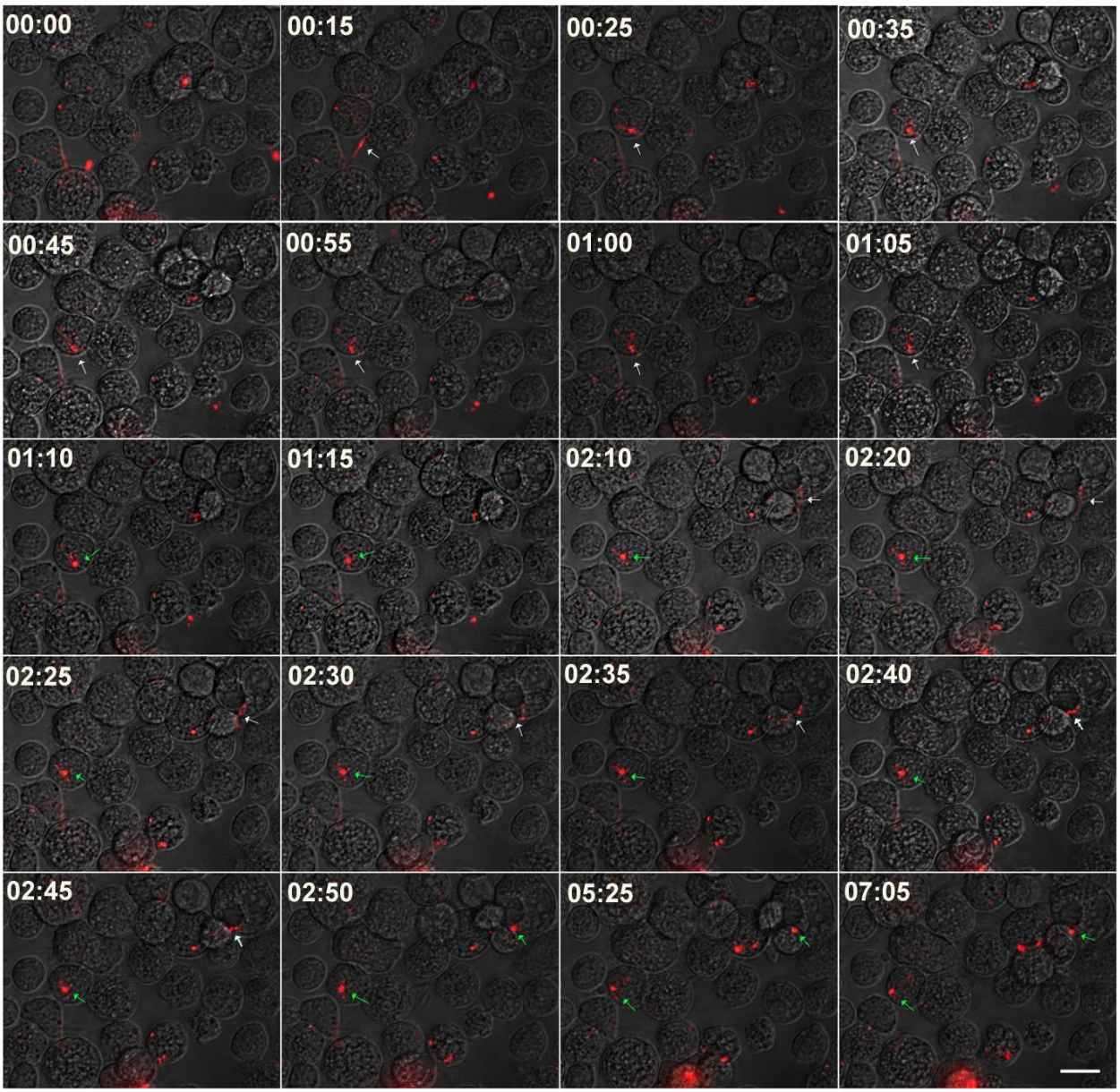


Fig. 11. Time lapse de *Borrelia anserina* marcada com o fluoróforo PKH26 em linhagem AVL17 de células de carrapato. Setas brancas indicam espiroquetas localizadas externamente ou fixadas às células; setas verdes indicam espiroquetas internalizadas. Os números representam o tempo pós-infecção, em hora e minuto. Microscópio de fluorescência, aumento de 400x. A barra de escala representa 25µm.

4.4 Microscopia Confocal

Após as 24 horas de incubação, quando visualizado o material fluorescente nas diferentes seções transversais das células de carrapatos, praticamente todo material fluorescente apareceu no interior das células. Este material fluorescente no interior das células se apresentou de maneira pontual e as espiroquetas intactas não puderam ser detectadas, sugerindo sua localização intracelular em fagossomo (**Figura 12** e **13**). As fotomicrografias são "stack images" feitas de uma seção transversal definida das células de carrapatos, tão perto quanto possível do centro das células.

No estudo de Matilla et al. (2007), as linhagens DAE15 e IDE12 de células de carrapatos degradaram *B. burgdorferi* dentro de fagolisossomas. Resultados similares foram reportados por Tuominen-Gustafsson et al. (2006) com *Borrelia* spp., marcadas com fluoróforo, infectando neutrófilos humanos.

Esta conformação das espiroquetas pode ser devido a restrições de volume da célula hospedeira ou podem ser reminiscência da forma quiescente nutricionalmente restrita da espiroqueta, que tem forma de cisto, sugerindo que os diferentes tipos celulares podem fornecer domínios mais ou menos hospitaleiros para *B. burgdorferi* devido a processamento ou tráfico alternativo de internalização nos diferentes tipos de células (JING WU, 2011).

Embora não comprovada, pode-se especular que algumas das formas intracelulares observadas podem representar a morfologia cística e que podem ser recuperadas quando estiverem em um ambiente nutricionalmente completo (JING WU, 2011). Não é claro se as espiroquetas internalizadas são capazes de multiplicação, porém presume-se que não atingem números elevados mas parecem estar em um estado de repouso, porém viável (LIVENGOOD, GILMOREJR, 2006; JING WU, 2011).

Apesar das espiroquetas terem sido encontradas dentro das células de carrapatos, a frequência deste fenômeno e sua relevância biológica não são claras (BUGRYSHEVA et al., 2002).

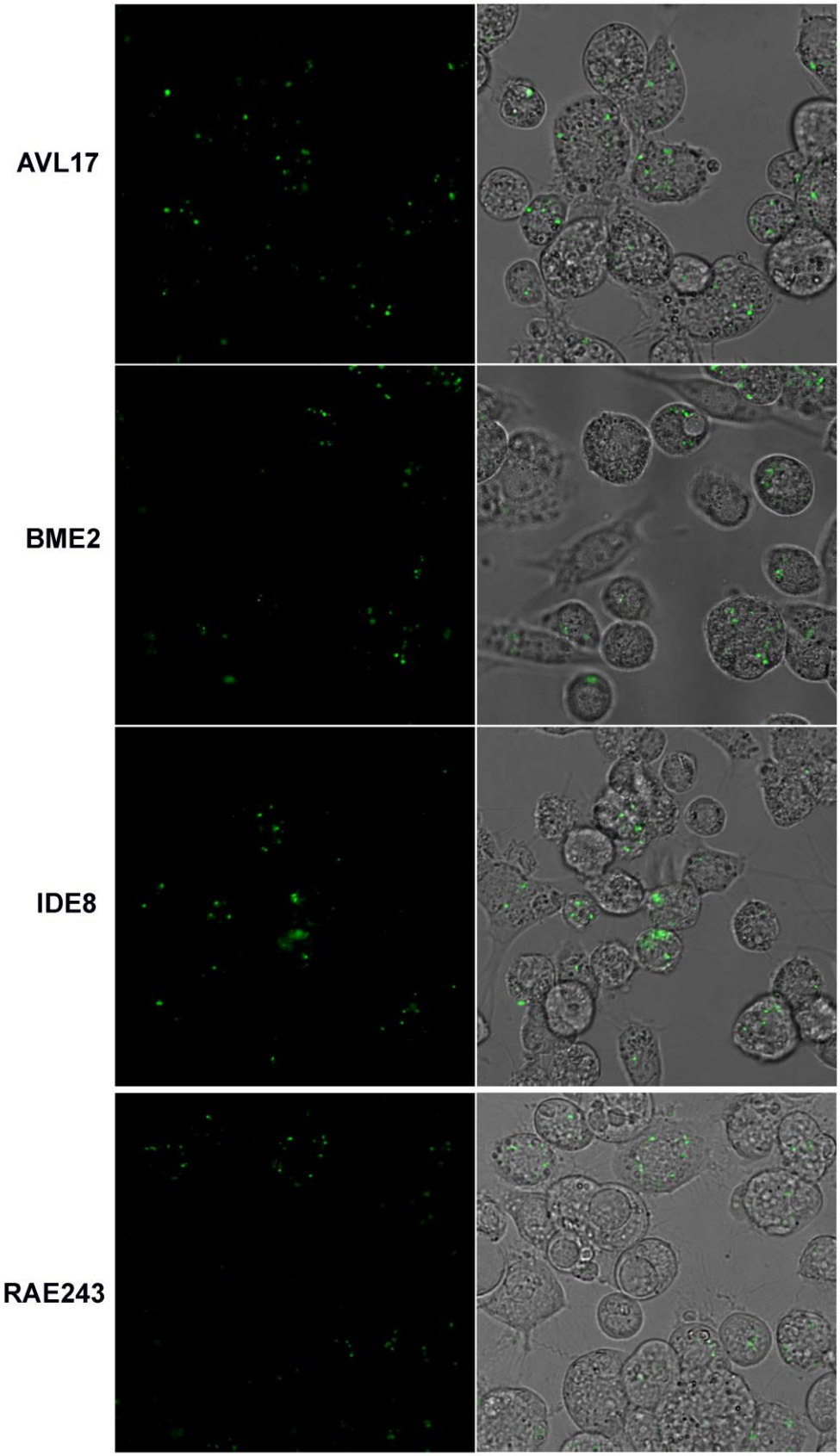


Figura 12. Linhagens de células de carrapatos inoculadas com a bactéria *Borrelia anserina* marcada com o fluoróforo PKH67, após 24h, no meio composto por 10% de BSK-H + 90% de meio das células. Microscópio confocal, aumento de 630x.

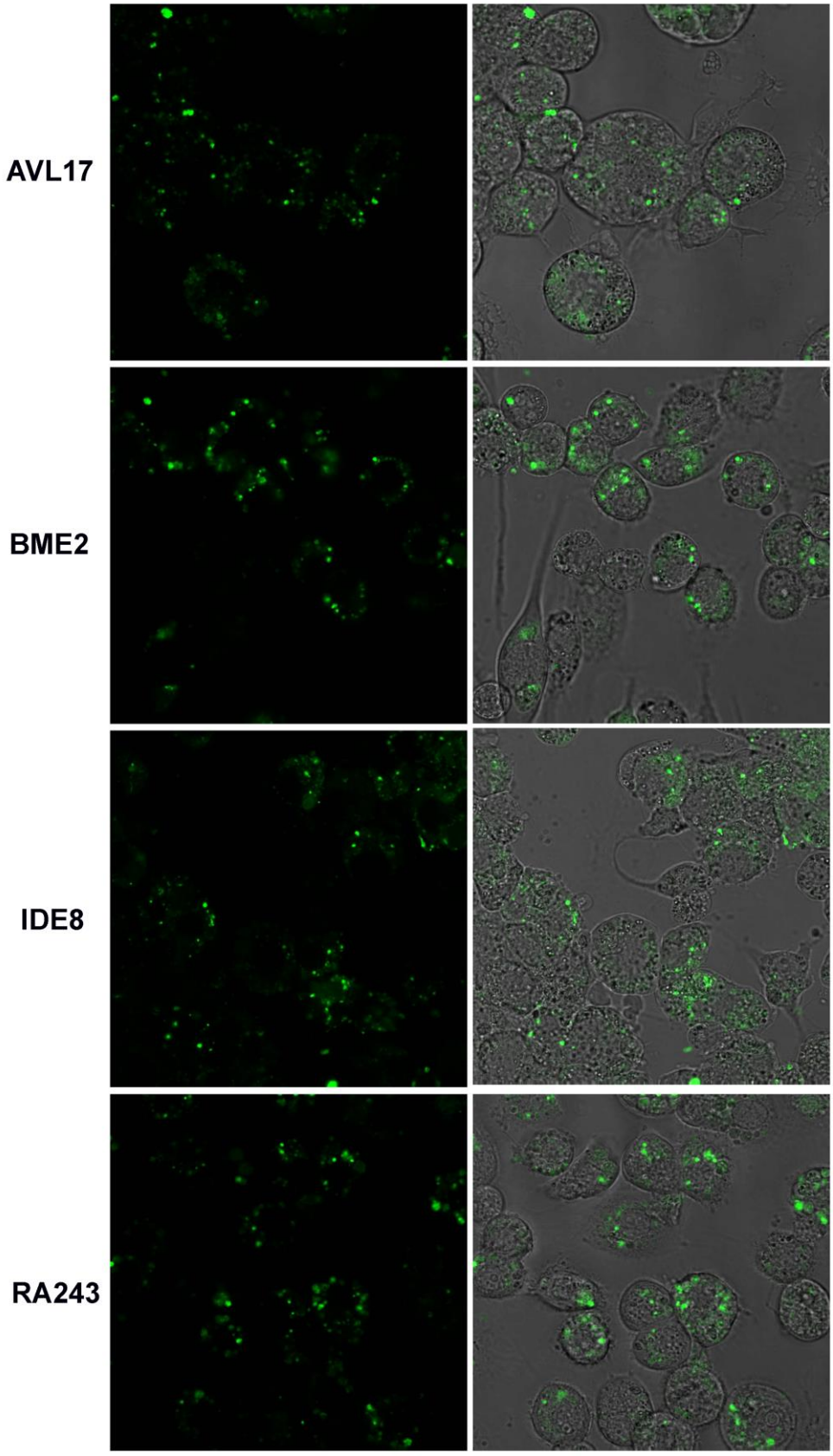


Figura 13. Linhagens de células de carrapatos inoculadas com a bactéria *Borrelia burgdorferi* marcada com o fluoróforo PKH67, após 24h, no meio composto por 10% de BSK-H + 90% de meio das células. Microscópio confocal, aumento de 630x.

5 CONCLUSÕES

Este estudo suporta a validade do uso dos sistemas de cultivos de células de carrapato como ferramentas úteis para elucidar as interações entre as espiroquetas e estas células e os receptores de superfície envolvidos na sua fixação às células de carrapatos, que seriam impossíveis de serem visualizados *in vivo*.

Os resultados demonstram que a marcação de *Borrelia* sp. com o fluoróforo PKH67 é uma técnica valiosa na análise da interação entre as espiroquetas e as células de carrapatos e pode ser utilizada para analisar quantitativamente essa associação, utilizando citometria de fluxo e microscopias confocal e de imunofluorescência.

Respostas diferentes à infecção por *Borrelia* spp. foram observadas entre as linhagens de células de carrapatos. No presente estudo, a linhagem RA243 do carrapato *R. appendiculatus* apresentou a maior taxa de infecção e a linhagem ISE6 do carrapato *I. scapularis*, juntamente com IRE19 do carrapato *I. ricinus*, apresentaram menores taxas de infecção para ambas as espiroquetas. Estes resultados indicam que diferenças na capacidade de resposta dos tecidos envolvidos na resposta imune celular podem ser determinantes na competência vetorial dos carrapatos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONARA, S.; CHAFEL, R. M.; LAFRANCE, M.; COBURN, J. *Borrelia burgdorferi* adhesins identified using in vivo phage display. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 262-276, 2007.

ATALIBA, A. C.; RESENDE, J. S.; YOSHINARI, N. H.; LABRUNA, M. B. Isolation and molecular characterization of a Brazilian strain of *Borrelia anserina*, the agent of fowl spirochaetosis. **Research in Veterinary Science**, v. 83, n. 1, p. 145–149, 2007.

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.

BABB, K.; MCALISTER, J. D.; MILLER, J. C.; STEVENSON, B. Molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* per promoter/operator elements. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 1745-2756, 2004.

BAÊTA, B. A. **Co-cultivo de *Borrelia burgdorferi* (SPIROCHAETALES: SPIROCHAETACEAE) em cultura primária de células embrionárias de *Dermacentor nitens* (ACARI: IXODIDAE).** 2011. 22f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

BALASHOV, Y. S. Transovarial transmission of the spirochete *Borrelia sogdiana* in *Ornithodoros papillipes* ticks and its effect on biological properties of the agent. **Parazitilogiya**, 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.

BARBOUR, A. G.; DAI, Q.; RESTREPO, B. I.; STOENNER, H. G.; FRANK, S. A. Pathogen escape from host immunity by a genome program for antigenic variation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 48, p. 18290-18295, 2006.

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.

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

BENACH, J. L.; COLEMAN, J. H.; SKINNER, R. A.; BOSLER, E. M. Adult *lxodes 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.

BIER, O. Microbiologia e Imunologia. 24.ed. Editora Melhoramentos. São Paulo. 1985, 1234p.

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.

BOERO, J. J. **Parasitosis Animales**. Editora Universidade de Buenos Aires. 1967, 498p.

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.; 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.

BURGDORFER, W.; HAYES, S. F.; CORWIN, D. Pathophysiology of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in ixodid ticks. **Reviews of Infectious Disease**, v. 11, suppl. 6, p. S1442–S1450, 1989.

BURGDORFER, W.; SCHWAN, T. G. *Borrelia*. In: BALOWS, W. J.; HAUSLER, Jr.; HERRMANN, K. L.; ISENBERG, H. D; SHAWDOMY, H. J. **Manual of clinical microbiology**, 5.ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1991, p. 560-566.

BYRAM, R.; STEWART, P. E.; ROSA P. The essential nature of the ubiquitous 26-kilobase circular replicon of *Borrelia burgdorferi*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 11, p. 3561-3569, 2004.

CALLOW, L. L. Observations on tick-transmitted spirochaetes of cattle in Australia and South Africa. **British Veterinary Journal,** v. 123, n. 11, p. 492-497, 1967.

COSSIO-BAYUGAR, R.; WAGNER, G. G.; HOLMAN, P. J. *In vitro* generation of organophosphate resistan *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.

CRUZ, A. R.; MEAGAN, W. M.; CARSON, J. L. V.; CHRISTIAN, H. E.; SALAZAR, J. C.; RADOLF, J. D. Phagocytosis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme Disease Spirochete, Potentiates Innate Immune Activation and Induces Apoptosis in Human Monocytes. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 1, p. 56–70, 2008.

DERDÁKOVÁ, M.; LENCÁKOVÁ, 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.

DICKIE, C. W.; BARRERA, J. A Study of the carrier state of avian spirochetosis in the chicken. **Avian Diseases**, v. 8, n. 2, p.191-195, 1964.

DORWARD, D. W.; FISCHER, E. R.; BROOKS, D. M. Invasion and cytopathic killing of human lymphocytes by spirochetes causing Lyme disease. **Clinical Infectious Disease**, v. 25, suppl. 1, p. S2-S8, 1997.

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.

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.

GARG, R. R.; GAUTAM, O. P. Serological diagnosis of fowl Spirochetosis. **Avian Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 1971.

GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L. N.; COSTA, I. P.; BATTESTI, D. M. B.; BARROS, P. J. L.; FONSECA, A. H.; HIGUCHI, L. M.; YOSHINARI, N. H. Síndrome de Lyme-símile ou Complexo Infecto-Reacional do Carrapato – Síndrome de Baggio Yoshinari. **XVIII Jornada Paulista de Reumatologia e XI Encontro de Reumatologia Avançada.** 21-27 Maio, 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.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, A. T. The Spirochetes. In: Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T.; Williams, A. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 9. ed. Baltimore, 1994, p. 27-37.

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

JING WU, B. M. **The invasion and attachment of *Borrelia burgdorferi* to eukaryotic cells**. 2011. 148f. Dissertation (Doctor of Philosophy), Texas A&M Health Science Center, Texas, Houston.

JOHNS, R.; OHNISHI, J.; BROADWATER, A.; SONENSHINE, D. E.; DE SILVA, A. M.; HYNES, W. L. Contrasts in tick innate immune responses to *Borrelia burgdorferi* challenge: immunotolerance in *Ixodes scapularis* versus immunocompetence in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomolology**, v. 38, n. 1, p. 99-107, 2001.

JOHNSON, R. C.; BURGDORFER, W.; LANE, R. S.; BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F.; HYDE, F. W. *Borrelia coriaceae* sp. nov. putative agent of epizootic bovine abortion. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 1, p. 72-74, 1987.

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.

KLEMPNER, M. S.; NORING, R.; ROGERS, R. A. Invasion of human skin fibroblasts by the Lyme-disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 5, p. 1074-1081, 1993.

KOH, K.; MORI, T.; SHIRAISHI, S.; UCHIDA, T. A. Ultrastructural changes of the midgut epithelial cells in feeding and moulting nymphs of the tick *Haemaphysalis longicornis*. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 21, n. 1, p. 23-36, 1991.

KURTTI, T. J.; BUSCHER, G. Trends in tick cell culture. In: **Practical Tissue Culture Applications** (Maramorosch and Hirumi, eds), p. 351-371, Academic Press, New York. 1979.

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.; 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., ANDREADIS, T.G., MAGNARELLI, L.A., MATHER, T.N. Tick cell culture isolation of an intracellular prokaryote from the tick *Ixodes scapularis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, n. 3, p. 318-321, 1996.

LABRUNA, M. B.; RESENDE, J. S.; MARTINS, N. R. S.; JORGE, M. A. Cryopreservation of an avian spirochete strain in liquid nitrogen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 6, p. 551–553, 1999.

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.

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 fur Backteriologie**, v. 280, n. 4, p. 468-475, 1994.

LISBÔA, R. S.; TEIXEIRA, R. C.; RANGEL, C. P.; SANTOS, H. A.; FONSECA, A. H. Avian Spirochetosis in Chickens Following Experimental Transmission of *Borrelia anserina* by *Argas* (*Persicargas*) *miniatus.* **Avian Diseases**, v. 53, n. 2, p. 166-168, 2009.

LIVENGOOD, J., GILMOREJR, R. Invasion of human neuronal and glial cells by an infectious strain of *Borrelia burgdorferi*. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 14-15, p. 2832-2840, 2006.

MA, Y.; STURROCK; A.; WEI, J. J. Intracellular localization of *Borrelia burgdorferi* within human endothelial cells. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 2, p. 671-678, 1991.

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.

MANTOVANI, E.; COSTA, I. P.; GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L. N.; HIGUCHI, M. L.; YOSHINARI, N. H. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. Is it a new tick borne disease or Lyme disease variation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 4, p. 443-456, 2007.

MARCHOUX, E.; SALIMBENI, A. La spirillose des poules. **Annales de l'Institut Pasteur Lille**, v. 17, n. 1, p. 569-580, 1903.

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.

MATTILA, J. T.; MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Phagocytosis of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, by cells from the ticks, *Ixodes scapularis* and *Dermacentor andersoni*, infected with an endosymbiont, *Rickettsia peacockii*. **Journal of Insect Science**, v. 7, n. 58, 2007.

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.

MONIUSZKO, A.; RÜCKERT, C.; ALBERDI, M. P.; BARRY, G.; STEVENSON, B.; FAZAKERLEY, J. K.; KOHL, A.; BELL-SAKYI, L. Co-infection of tick cell lines has variable effects on replication of intracellular bacterial and viral pathogens. **Ticks and Tick-borne Diseases** (in press), 2014.

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.

NEITZ, W. O. A consolidation of our knowledge of the transmission of tick-borne diseases. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 27, n. 2, p. 115-163, 1956.

OBERMEIER, O. Zur contagion des Wiederkehrenden und Fleckfiebers. **Zentralbl Med Wissenschr**, v. 11, n. 1, p. 561, 1873.

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

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

PAVLOVSKY, E. N. Natural Nidality of Transmissible Diseases. **Peace Publishers**, Moscow. 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. 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., RANGEL, C. P., CUNHA, N. C., FONSECA, A. H. Primary embryonic cells of *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma cajennense* ticks as a substrate for the development of *Borrelia burgdorferi* (strain G39/40). **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 577-582, 2012.

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.

RITTIG, M. G.; KUHN, K. H.; DECHANT, C. A.; GAUCKLER, A.; MODOLELL, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; KRAUSE, A.; BURMESTER, G. R. Phagocytes from both vertebrate and invertebrate species use "coiling" phagocytosis. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 20, n. 6, p. 393-406, 1996.

SAMPAIO, I. B. M. Testes estatísticos para comparação de médias. In: SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 256p.

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.; 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. 1991. **Biology of ticks**. Oxford University Press.

SWELLENGREBEL, N. H. Sur la cytologic comparée des spirochètes et des spirilles. **Annales de l'Institut Pasteur (Paris)**, v. 21, n. 1, p. 562-586, 1907.

TEIXERA, R. C. **Cultivo de *Borrelia burgdorferi* (SPIROCHAETALES: SPIROCHAETACEAE) em células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE)**. 2010. 38f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

TUOMINEN-GUSTAFSSON, H.; PENTTINEN, M.; HYTONEN, J.; VILJANEN, M. K. Use of CFSE staining of borreliae in studies on the interaction between borreliae and human neutrophils. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 92, 2006.

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 arbovirusis. **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.; STEERE, A. C.; COSSERMELLI, W. Revisão da borreliose de Lyme. **Revista da Associação Médica Brasileira** , v. 35, n. 1, p.34-37, 1989.

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.

ZINGG, B. C.; LEFEBVRE, R. B. PoLymerase chain reaction for detection of *Borrelia coriaceae*, putative agent of epizootic bovine abortion. **American Journal of Veterinary Research** , v. 55, n. 11, p.1509-1515, 1994.

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 *lxodes dammini*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, n. 1, p. 1737-1748, 1989.