

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

TESE

Isolamento e caracterização molecular de duas novas cepas de *Anaplasma marginale* e estabelecimento de linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Bruna de Azevedo Baêta

2015



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

Isolamento e caracterização molecular de duas novas cepas de *Anaplasma marginale* e estabelecimento de linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

BRUNA DE AZEVEDO BAÊTA

Sob a Orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

Sob co-orientação do Doutor
Erich Zweygarth

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2015

636.089696

B142i

T

Baêta, Bruna de Azevedo, 1984-

Isolamento e caracterização molecular de duas novas cepas de *Anaplasma marginale* e estabelecimento de linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* / Bruna de Azevedo Baêta. - 2015.
97 f.: il.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Parasitologia veterinária - Teses. 2. *Anaplasma marginale* - Teses. 3. *Boophilus microplus* - Teses. 4. Bovino - Parasito - Teses. I. Fonseca, Adivaldo Henrique da, 1953- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

BRUNA DE AZEVEDO BAÊTA

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

TESE APROVADA EM 20/02/2015.



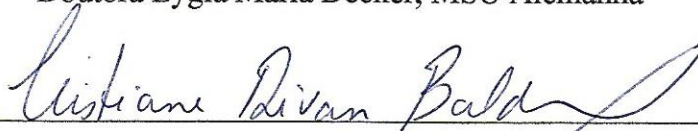
Doutor Adivaldo Henrique da Fonseca, UFRRJ
(Orientador)



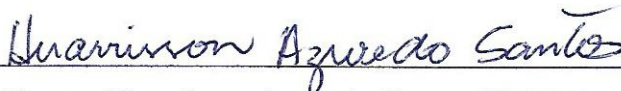
Doutora Eliane Mattos Piranda, UFMS



Doutora Lygia Maria Decker, MSU Alemanha



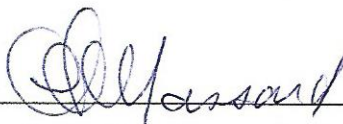
Doutora Cristiane Divan Baldani, UFRRJ



Doutor Huarrisson Azevedo Santos, UFRRJ



Doutor Daniel da Silva Guedes, FIOCRUZ



Doutor Carlos Luiz Massard, UFRRJ

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

“A maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmos sempre depois de cada queda.”

Confúcio

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Aos amigos e bolsistas do laboratório de Doenças Parasitárias do Prédio da Sanidade Animal do Convênio EMBRAPA/UFRRJ, pelo auxílio e instruções durante a realização do trabalho, Carla Carolina Dias Uzede Ribeiro, Rafaella Câmara Teixeira, Matheus Dias Cordeiro e Jaqueline de Almeida Valim, sem eles nada disso seria possível. Aos demais amigos Patrícia Barizon Cepeda, Bruna Sampaio Martins Land Manier, Carolina Marotta Ribeiro, Jessica Fernandes de Souza, Priscilla Nunes dos Santos, Márcio Barizon Cepeda, Gustavo Nunes de Santana Castro e Lucinéia Costa Oliveira, pelo convívio, amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos pesquisadores da Universidade Ludwig-Maximilians de Munique, Alemanha, Lygia Maria Friche Passos, Erich Zwegarth, Katarzyna Lis, Rachel Kenneil e Marzena Broniszewska pelos ensinamentos indispensáveis para a realização do projeto de doutorado sanduíche e pela receptividade e momentos de descontração que fizeram meu Doutorado Sanduíche ser muito mais fácil.

Ao pesquisador Alejandro Cabezas-Cruz pela grande ajuda no desenvolvimento das análises filogenéticas realizadas durante o estudo e parceria em publicações.

À pesquisadora Lesley Bell-Sakyi pelos ensinamentos indispensáveis para a realização do projeto e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos pesquisadores do Laboratório da FIOCRUZ, Flávio Alves Lara, Mariana e Jessica Ferreira, pela ótima receptividade e pelos ensinamentos indispensáveis para a realização deste trabalho.

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

Aos grandes amigos da UFRRJ, principalmente a Ísis Daniele Alves Costa Santolin, Mayara Almeida Martins e Kelly Cristina da Silva pelos momentos de descontração e pela amizade incontestável que construímos e que levaremos para toda a vida.

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

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

Ao CNPq pela concessão de bolsa durante o período de Doutorado e à CAPES pela concessão de bolsa durante o período de Doutorado Sanduíche na Alemanha.

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

BIOGRAFIA

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

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

No ano de 2003, ingressou no curso de Medicina Veterinária da UFRRJ, colando grau e obtendo o título de Médica Veterinária em agosto de 2008. Durante o período acadêmico realizou estágios em diversas áreas, participando de projetos de pesquisa no Departamento de Parasitologia Animal e no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública-UFRRJ.

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

Em março de 2009, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Parasitologia Veterinária, em nível de Mestrado, da UFRRJ, onde foi bolsista da CAPES até fevereiro de 2011.

Em março de 2011, ingressou no mesmo curso, em nível de Doutorado, passando em primeiro lugar na seleção, onde foi bolsista CNPq. De março à agosto de 2013, permaneceu na Universidade de Ludwig-Maximilians em Munique, Alemanha, onde realizou seu doutorado Sanduíche com bolsa CAPES. Durante a pós-graduação produziu 8 publicações científicas em revistas indexadas.

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.

LISTA DE TABELA

- Tabela 1. Primers e sonda utilizados no qPCR para *Anaplasma marginale* (CARELLI et al., 2007). 17
- Tabela 2. Condições das reações para realização do qPCR para *Anaplasma marginale* (CARELLI et al., 2007). 17
- Tabela 3. Condições de termociclagem no qPCR para *Anaplasma marginale* (CARELLI et al., 2007). 18
- Tabela 4. As análises microssatélites do gene *mplα* de *A. marginale* a partir de cepas do Rio de Janeiro. 21
- Tabela 5. Nova sequência de repetições em tandem de *mplα* encontrada em isolado de *A. marginale* do Rio de Janeiro (cepa AmRio1). 21

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo de desenvolvimento de *A. marginale* em bovinos e carrapatos. Adaptado de Kocan et al. (2003). 10
- Figura 2. Mapa molecular de MSP1 α de *A. marginale* no mundo. O número de cepas (S), repetições em tandem (TR), estrutura 2D das repetições em tandem (TR-2D), repetições em tandem funcional (FTR) tipo de epítomos de célula B (BCE) e microssatélites estão apresentados em cada país. Compilado de Cabezas-Cruz et al. (2013). 13
- Figura 3. Visualização de lâminas de citocentrífuga coradas com Giemsa de células IDE8 infectadas com *A. marginale* do Rio de Janeiro, Brasil. (A) Formação de pequena colônia no interior da célula – 60 dias de cultivo; (B) várias colônias na mesma célula com deslocamento do núcleo – 81 dias de cultivo; (C) Ruptura de uma colônia liberando corpúsculos no meio de cultivo – 88 dias de cultivo. Setas indicam colônias de *A. marginale*. 20
- Figura 4. Estrutura da região de repetição de MSP1 α de *A. marginale*, seguindo a numeração de Cabezas-Cruz et al. (2013). 22
- Figura 5. Análise filogenética utilizando o método Neighbor Joining. As sequências de cepas AmRio1 e AmRio2 de *A. marginale* isoladas nesse estudo estão em destaque (asterisco vermelho). Sequência de aminoácido de MSP1 α das diferentes cepas de *A. marginale* registradas no Brasil (Br) e Argentina (Ar). Os dois clusters foram nomeados como Cluster τ e Cluster α . A posição e composição de repetições em tandem das sequências de MSP1 α ancestrais estão apresentadas para os dois clusters (Círculos azul e vermelho). O número acima e abaixo dos braços representam valores de suporte estatísticos como indicado na figura. Apenas os valores maiores que 50 estão apresentados. O número de acesso ao GenBank e a composição das repetições em tandem utilizados na árvore filogenética estão apresentados. 23
- Figura 6. Curva de crescimento e manutenção. Concentração celular versus tempo a partir do subcultivo, indicando as fases *Lag*, *Log* e de platô, e o tempo ideal para a realização do subcultivo e alimentação. Adaptado de Freshney (2005). 43
- Figura 7. Ciclo biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Fêmeas grávidas põem ovos no meio ambiente (1). Os ovos eclodem em larvas de três pares de patas (2). Larvas procuraram e fixam-se ao hospedeiro e depois de duas mudas (larva-ninfa e ninfa-adulto), desenvolvem-se em adultos (3a-3c). As fêmeas caem do hospedeiro para realização da postura (4). O adulto de um carrapato ixodídeo (duro) é considerado o estágio de diagnóstico, onde a identificação em nível de espécie é melhor alcançada com adultos. Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention – CDC (CDC, 2014). 45
- Figura 8. Cultura primária *in vitro* de células embrionárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cultivadas em meio Leibovitz'sL-15 com dois (A), 30 (B), 60 (C) dias de cultivo e após o primeiro subcultivo (D). Microscópio de contraste de fase invertido. Barra de escala representa 250 μ m. 53

Figura 9. Curva de crescimento das linhagens de células de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* BMEBR1, BMEBR2 e BME/CTVM2 em meio de cultivo Leibovitz's-L15. 54

Figura 10. Linhas de tendência e equação da reta da fase exponencial das linhagens de células de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BMEBR1, BMEBR2 e BME/CTVM2), após transformação dos dados por log neperiano (ln). 55

Figura 11. Alinhamento da linhagem de célula de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BMEBR1) com 100% de similaridade. 56

Figura 12. Alinhamento da linhagem de célula de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BMEBR2) com 100% de similaridade. 56

Figura 13. Culturas de células de *Rhipicephalus microplus* com três dias de idade após repique. Setas indicam células fibroblastóides com presença de vacúolos e asteriscos indicam células arredondadas. Microscopia de DIC. Barra de escala representa 50 µm. 57

Figura 14. Linhagens de células de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inoculadas com a bactéria *Borrelia burgdorferi* marcada com o fluoróforo PKH67, após 6 horas. DNA nuclear corado com DAPI. Barra de escala representa 100µm. 58

Figura 15. Overlays da citometria de fluxo mostrando a associação de *Borrelia burgdorferi* marcada com PKH26 em três linhagens de origem embrionária de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Linhas cinza preenchidas nos gráficos representam os controles de células de carrapatos não infectadas. Linhas vermelhas representam células infectadas. Valores dentro do gráfico representam o percentual médio de fluorescência nas células negativas (autofluorescência) e nas infectadas. 59

Figura 16. Linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* controles e inoculadas com a bactéria *Borrelia burgdorferi* após 6 horas, marcadas com o fluoróforo Bodipy. A intensidade da fluorescência foi medida com o filtro verde (Zeiss 61). Imagens com DIC foram utilizadas apenas para ilustração das células que fluoresceram. Barra de escala representa 100µm. 60

Figura 17. Média de fluorescência do marcador Bodipy por número de células em três linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A fluorescência foi mensurada no programa ImageJ 1.48v, através das imagens geradas em microscópio de epifluorescência Axio Observer.Z1 (Zeiss®). 61

Figura 18. Overlays da citometria de fluxo mostrando a marcação de Bodipy em três linhagens de origem embrionária de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Linhas pretas nos gráficos representam os controles de células de carrapatos não infectadas. Linhas verdes representam células infectadas com *Borrelia burgdorferi*. Valores dentro do gráfico representam o percentual médio de fluorescência nas células. 61

Figura 19. Linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* controles e inoculadas com a bactéria *Borrelia burgdorferi* após 6 horas, marcadas com o fluoróforo Laranja de Acridina, destacando os diferentes graus de acidificação no

interior das vesículas do citoplasma. As intensidades da fluorescência foram medidas com o filtro vermelho (Zeiss 28) e verde (Zeiss 61). Imagens com DIC foram utilizadas apenas para ilustração das células que fluoresceram. Barra de escala representa 100µm. 63

Figura 20. Média de fluorescência do marcador Laranja de Acridina por número de células em três linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A fluorescência foi medida no programa ImageJ 1.48v, através das imagens geradas em microscópio de epifluorescência Axio Observer.Z1 (Zeiss®). 64

Figura 21. Linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* controles e inoculadas com a bactéria *Borrelia burgdorferi* após 6 horas, marcadas com o fluoróforo DHE. A intensidade da fluorescência foi medida com o filtro vermelho (Zeiss 28). Imagens com DIC foram utilizadas apenas para ilustração das células que fluoresceram. Barra de escala representa 100µm. 65

Figura 22. Média de fluorescência do marcador DHE por número de células em três linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A fluorescência foi medida no programa ImageJ 1.48v, através das imagens geradas em microscópio de epifluorescência Axio Observer.Z1 (Zeiss®). 66

Figura 23. Overlays da citometria de fluxo mostrando a marcação de DHE em três linhagens de origem embrionária de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Linhas pretas nos gráficos representam os controles de células de carrapatos não infectadas. Linhas vermelhas representam células infectadas com *Borrelia burgdorferi*. Valores dentro do gráfico representam o percentual médio de fluorescência nas células. 67

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
CAPÍTULO 1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DUAS NOVAS CEPAS DE <i>Anaplasma marginale</i> EM LINHAGEM DE CÉLULAS DE CARRAPATO <i>Ixodes scapularis</i> (IDE8)	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 Taxonomia e Morfologia de <i>Anaplasma marginale</i>	8
2.2 Ciclo Biológico de <i>Anaplasma marginale</i>	8
2.3 Epidemiologia da Anaplasmose	10
2.4 Diversidade Genética	11
2.5 Isolamento de <i>A. marginale</i>	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Local de Execução	16
3.2 Linhagem Celular	16
3.3 Isolamento de cepas de <i>Anaplasma marginale</i> Oriundas do Município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.	16
3.4 Congelamento das Cepas	17
3.5 Caracterização dos Isolados	17
3.6 Análise Filogenética	19
3.7 Reconstrução de Ancestral	19
4 RESULTADOS	20
4.1 Isolamento e propagação de <i>A. marginale</i>	20
4.2 Caracterização das cepas de <i>A. marginale</i>	21
4.3 Análises filogenéticas	22
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÕES	27
7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	28
CAPÍTULO 2. ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DO CARRAPATO <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	37
RESUMO	38
ABSTRACT	39
1 INTRODUÇÃO	40
2 REVISÃO DE LITERATURA	41
2.1 Cultivo Celular	41
2.2 Carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	44
2.3 Cultivo de Células Embrionárias de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	46
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 Origem dos Carrapatos	48
3.2 Cultivo Primário de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	48
3.3 Congelamento e Manutenção da Linhagem	48
3.4 Taxa de Crescimento	49

3.5 Extração de DNA, Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e Sequenciamento	49
3.6 Microscopia	50
3.6.1 Morfologia	50
3.6.2 Microscopia de epifluorescência	50
3.6.2.1 Ensaio de percentual de infecção	51
3.6.2.2 Ensaio de corpúsculo lipídico	51
3.6.2.3 Ensaio de acidificação	51
3.6.2.4 Ensaio de estresse oxidativo	52
3.7 Citometria de Fluxo	52
4. RESULTADOS	53
4.1 Cultura Primária e Estabelecimento das Linhagens Celulares	53
4.2 Confirmação da Identidade das Linhagens de Células de <i>R. (B.) microplus</i>	55
4.3 Características Citológicas das Linhagens Celulares de <i>R. (B.) microplus</i> e Citometria de Fluxo	57
5. DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÕES	71
7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
ANEXOS	80
A - Artigo Completo Publicado em Revista Indexada	80

RESUMO

BAÊTA, Bruna de Azevedo. **Isolamento e caracterização molecular de duas novas cepas de *Anaplasma marginale* e estabelecimento de linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*** 2015. 97p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

No primeiro capítulo foram isoladas e caracterizadas duas novas cepas de *Anaplasma marginale* oriundas do município de Seropédica, RJ, em linhagem de células de carrapato *Ixodes scapularis* (IDE8), possibilitando novos estudos no diagnóstico com a utilização de cepas locais. No segundo capítulo foram desenvolvidas e caracterizadas as primeiras linhagens de células embrionárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas de cepa brasileira. As cepas de *A. marginale* foram obtidas a partir de sangue de dois bezerros naturalmente infectados pertencentes à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica. Após isolamento, as cepas foram caracterizadas morfológicamente, através da microscopia de luz e molecularmente através do semi-nested PCR do gene *mSPA*. Duas cepas de *A. marginale* foram isoladas e nomeadas como AmRio1 e AmRio2. Pequenas colônias foram observadas em lâminas de citocentrífuga coradas com Giemsa 1:10, de cada isolado, 60 dias após o início da cultura. Análises de uma repetição em tandem de MSP1a da cepa AmRio1 resultou em uma nova sequência (nomeada de 162) com um aminoácido diferente. O resultado da análise filogenética demonstrou que as cepas de *A. marginale* a partir do Brasil e Argentina formam dois grandes clusters. Para o estabelecimento das linhagens de *R. (B.) microplus*, os carrapatos foram provenientes de cepa mantida em bezerros no Laboratório de Doenças Parasitárias, UFRRJ, Seropédica. No 13º dia de postura, a massa de ovos foi esterilizada, macerada, filtrada e centrifugada a 200 xg por 10 minutos. O “pellet” foi suspenso em meio Leibovitz’s L15 e dividido em 6 frascos de 25 cm², dos quais 3 contaminaram, um foi depositado no banco de células do Instituto Pirbright e outros 2 foram caracterizados no presente estudo (linhagens BMEBR1 e BMEBR2) através da análise molecular do gene 16S DNAr (PCR), curva de crescimento e microscopia de luz e epifluorescência. Com 60 dias de cultivo, as células passaram a apresentar um aspecto confluyente, caracterizando a formação da monocamada. Existiu uma completa similaridade (100%) das novas linhagens BMEBR1 e BMEBR2 com *R. (B.) microplus* do Brasil (EU918178.1), da Costa Rica (EU918179.1), do Paraguai (EU918180.1), entre outros. Ambas as cepas apresentaram crescimento menor que a linhagem de *R. (B.) microplus* BME/CTVM2 oriunda da Costa Rica. A linhagem BMEBR1 possui maior capacidade fagocítica que as linhagens BMEBR2 e BME/CTVM2. Além disso, essas linhagens possuem características de acidificação, produção de corpúsculo lipídico e estresse oxidativo diferentes entre si. As novas linhagens foram congeladas e descongeladas com sucesso e apresentaram-se estáveis com relação às características morfológicas e de taxa crescimento. Desta forma, estas linhagens podem ser utilizadas em futuros estudos na propagação das novas cepas de *A. marginale* isoladas.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*, *Anaplasma marginale*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

ABSTRACT

BAÊTA, Bruna de Azevedo. **Isolation and molecular characterization of two new strains of *A. marginale* and establishment of embryonic cell lines from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2015. 97p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

In the first chapter two new strains of *Anaplasma marginale* derived from the Seropédica, RJ were isolated and characterized in tick cells line of *Ixodes scapularis* (IDE8), enabling new studies in the diagnosis with the use of local strains. In the second chapter the first lines of embryonic cells of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Brazilian strains were developed and characterized. The strains of *A. marginale* were from blood of two naturally infected calves belonging to the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica. After isolation, the strains were characterized morphologically by light microscopy and molecularly by nested PCR of *msslα* gene. Two strains of *A. marginale* were isolated and named as AmRio1 and AmRio2. Small colonies were observed in cytospin smears stained with Giemsa's 1:10, of each of the isolates, 60 days after culture initiation. Analysis of *msslα* microsatellite in both strains resulted in a single genotype, genotype E. The amino acid sequence of one MSP1α tandem repeat from the strain AmRio1 resulted in a new sequence (named 162) with one amino acid change. The results of our phylogenetic analysis demonstrated that *A. marginale* strains from Brazil and Argentina formed two large clusters. In establishing of the strains of *R. (B.) microplus*, the ticks were from strain kept calves in Parasitic Diseases Laboratory, UFRRJ, Seropédica. After 13 days of laying, the pool of eggs was sterilized, macerated, filtered and centrifuged at 200 xg for 10 minutes. The pellet was suspended in Leibotiz's L15 medium and divided into 6 flasks of 25 cm², of which 3 were contaminated, one was deposited in the cell bank of the Pirbright Institute and others two were characterized in the present study (BMEBR1 and BMEBR2 lines) through molecular analysis of the 16S rDNA gene (PCR), growth curve and epifluorescence and light microscopy. Sixty days in culture, the cells began to show confluent aspect, reaching the formation of the monolayer. There was a complete similarity (100%) of new lines BMEBR1 and BMEBR2 with *R. (B.) microplus* in Brazil (EU918178.1), Costa Rica (EU918179.1), Paraguay (EU918180.1), among others. Both strains showed lower growth than the *R. (B.) microplus* line from Costa Rica, BME/CTVM2. The BMEBR1 line has increased phagocytic ability that the BMEBR2 and BME/CTVM2 lines. In addition, these strains have acidification characteristics, lipid corpuscle production and oxidative stress different from each other. The new strains were frozen and defrosted successfully, and were stable with respect to morphology and growth rate. Thus, these lines can be used in future studies to propagation of new strains of *A. marginale* isolated.

Key-words: *in vitro* culture, *Anaplasma marginale*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

INTRODUÇÃO GERAL

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

A cultura de tecidos de carrapatos além de possibilitar estudos sobre a embriologia, fisiologia e morfologia em suas diferentes fases de crescimento, permite estudos e propagação de diversos patógenos, facilitando o entendimento das interações entre patógeno e hospedeiro. Além disso, essas culturas atuam como substrato para produção de antígenos para diagnósticos e vacinas.

A mais significativa evolução em propagação de patógenos em linhagens celulares diz respeito aos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*. Em relação a anaplasmose, após muitos estudos, linhagens de células derivadas de embriões de *Ixodes scapularis* (IDE8) apoiaram o crescimento de diversos isolados de *Anaplasma marginale*, proporcionando assim novas oportunidades de investigação para estudos da interação entre *A. marginale* e células de carrapato.

Durante o projeto foi realizado um período de doutorado sanduíche, gerando a oportunidade de realizar o trabalho na Universidade de Ludwig-Maximilians de Munique na Alemanha, com *A. marginale* e cultivo de células de carrapato. Além disso, manteve-se o projeto original com estabelecimento de linhagens brasileiras de células de carrapato e sua interação com *Borrelia burgdorferi*. Desta forma, no primeiro capítulo foram isoladas e caracterizadas duas novas cepas de *A. marginale* oriundas do município de Seropédica, RJ, em linhagem de células de carrapato IDE8, possibilitando novos estudos no diagnóstico com a utilização de cepas locais. No segundo capítulo foram desenvolvidas e caracterizadas as primeiras linhagens de células embrionárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriunda de cepa brasileira.

CAPÍTULO 1.
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DUAS NOVAS
CEPAS DE *Anaplasma marginale* EM LINHAGEM DE
CÉLULAS DE CARRAPATO *Ixodes scapularis* (IDE8)

RESUMO

BAÊTA, Bruna de Azevedo. **Isolamento e caracterização de duas novas cepas de *Anaplasma marginale* em linhagem de células de carrapato *Ixodes scapularis* (IDE8)**. 2015. 97p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Estudos provaram que cultura *in vitro* de células de carrapato é uma ferramenta útil por permitir a verificação da interação vetor-patógeno, a produção de vacinas, a redução da experimentação animal e obter substrato para diagnóstico. O primeiro sistema de cultivo *in vitro* contínuo de *Anaplasma marginale* foi estabelecido em linhagens de células de *Ixodes scapularis* (IDE8), a partir daí, esse sistema tem sido usado para isolamento e propagação de diversas cepas de *A. marginale*. No presente estudo foi realizado o isolamento e propagação de duas novas cepas de *A. marginale*, oriunda do estado do Rio de Janeiro, em células de IDE8 e a caracterização dessas cepas. Foram coletadas amostras de sangue de dois bezerros naturalmente infectados pertencentes à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Essas amostras foram processadas e as hemácias foram inoculadas em cultivo de células de IDE8 em meio Leibovitz's L15B modificado, pH 7,4. Após isolamento, as cepas foram caracterizadas morfológicamente, através da microscopia de luz e molecularmente através do semi-nested PCR do gene *msp1a* e posterior sequenciamento para identificação das cepas pela sequência das repetições em tandem de *msp1a*, do microssatélite e análise filogenética. Pequenas colônias foram observadas em lâminas de citocentrífuga coradas com Giemsa 1:10, de cada isolado, 60 dias após o início da cultura. Duas cepas foram isoladas com sucesso e mesmo após diversas passagens, criopreservação e descongelamento, as sequências do gene *msp1a* e morfologias dos isolados mantiveram-se as mesmas. Baseado na variação da sequência do gene *msp1a*, os dois isolados formaram cepas diferentes e foram nomeadas como AmRio1 e AmRio2. Análises de uma repetição em tandem de MSP1a a partir da cepa AmRio1 resultou em uma nova sequência (nomeada de 162) com um aminoácido diferente. O resultado da análise filogenética demonstrou que as cepas de *A. marginale* a partir do Brasil e Argentina formaram dois grandes clusters, com a cepa AmRio2 mais próxima de Minas Gerais do que da cepa AmRio1.

Palavras-chave: células de carrapato, cultivo *in vitro*, IDE8.

ABSTRACT

BAÊTA, Bruna de Azevedo. **Isolation and Characterization of two new strains of *A. marginale* in tick cell line of *Ixodes scapularis* (IDE8)**. 2015. 97p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Studies have shown that *in vitro* culture of tick cells is a useful tool for allowing verification of the vector-pathogen interaction, vaccine production, the reduction in animal experimentation and to obtain a substrate for diagnostics. The first *in vitro* continuous culture system of *Anaplasma marginale* was established in *Ixodes scapularis* cell lines (IDE8), thereafter this system has been used for the isolation and propagation of different strains of *A. marginale*. In the present study the isolation and propagation of two new strains of *A. marginale*, from the state of Rio de Janeiro in IDE8 line and the characterization of these strains were done. Blood samples were collected from two naturally infected calves belonging to the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. These samples were processed and the erythrocytes were inoculated in IDE8 cell, with Leibovitz's L15B medium modified, pH 7.4. After isolation, the strains were characterized morphologically by light microscopy and molecularly by nested PCR of *msp1 α* gene and subsequent sequencing for identification of strains from sequence of tandem repeats, microsatellite and phylogenetic analysis. Small colonies were observed in cytopsin smears stained with Giemsa's 1:10, of each of the isolates, 60 days after culture initiation. Two strains were isolated with success and even after several passages, cryopreserved and defrosting, *msp1 α* gene sequences and morphology of the isolates remained the same. Based on *msp1 α* sequence variation, the two isolates were found to be separate strains and were named AmRio1 and AmRio2. The amino acid sequence of one MSP1 α tandem repeat from the strain AmRio1 resulted in a new sequence (named 162) with one amino acid change. The results of our phylogenetic analysis demonstrated that *A. marginale* strains from Brazil and Argentina formed two large clusters, with the AmRio2 strain nearest of Minas Gerais that the AmRio1 strain.

Key-words: tick cells, *in vitro* culture, IDE8.

1 INTRODUÇÃO

Anaplasma marginale Theiler 1910, é um agente riquetsial intraeritrocítico que causa anaplasmosse, uma doença que afeta bovinos ao redor do mundo. Essa bactéria afeta principalmente vacas leiteiras de alta produção e raça pura. No Brasil, anaplasmosse é uma doença endêmica caracterizada por anemia, perda de peso, febre, aborto e morte nos casos agudos. Este patógeno é transmitido biologicamente por carrapatos, mecanicamente por transferência de sangue infectado sobre fômites ou aparelho bucal de insetos sugadores e por transmissão transplacentária para os bezerros.

A heterogeneidade de cepas de *A. marginale* é alta em bezerros de regiões endêmicas em todo o mundo. Três das seis proteínas de superfície (MSPs), MSP5, MSP4 e MSP1 α têm sido extensivamente utilizadas para a caracterização molecular de *A. marginale*. Análises das sequências do gene *msp1 α* (proteína de superfície 1 alfa) permitiram a identificação de diversas cepas ao redor do mundo. Apesar da diversidade genética de *msp1 α* , esse gene é considerado como um marcador genético estável conservado durante a riquetsemia aguda e persistente no bezerro e também durante a multiplicação em carrapatos.

Estudos provaram que a cultura *in vitro* de células de carrapato é uma ferramenta útil por permitir a verificação da interação vetor-patógeno, a produção de vacinas, a redução da experimentação animal e a obtenção de substratos para diagnósticos. Uma das mais difundidas aplicações das linhagens de células de carrapatos é sua utilização para isolamento e propagação de patógenos transmitidos por carrapatos economicamente importantes. O primeiro sistema de cultivo *in vitro* contínuo de *A. marginale* foi estabelecido em linhagens de células de *Ixodes scapularis* (IDE8) e a partir daí, esse sistema tem sido utilizado para isolamento e propagação de diversas cepas de *A. marginale*.

Estudo com isolamento de cepas locais de *A. marginale* permite avanços no diagnóstico sorológico e molecular da anaplasmosse, considerando a alta variabilidade genética entre as cepas e as diferentes formas de transmissão. Além disso, poderá ser utilizado como substrato para produção de vacinas. Desta forma, o presente estudo visa demonstrar o isolamento e propagação de duas novas cepas de *A. marginale*, oriunda do estado do Rio de Janeiro, em células de IDE8 e a caracterização dessas cepas através de microscopia óptica e análise da sequência do gene *msp1 α* .

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia e Morfologia de *Anaplasma marginale*

Nos últimos anos, estudos moleculares indicaram modificações nas posições taxonômicas da maioria das espécies de bactérias existentes nas famílias Rickettiaceae, Bartonellaceae e Anaplasmataceae, pertencentes à ordem Rickettsiales. Dumler et al. (2001) através da análise do gene 16S RNAr, do operon groESL e das proteínas de superfície (MSPs) reorganizaram os membros dessa ordem em apenas duas famílias Rickettiaceae e Anaplasmataceae. Desta forma, na família Anaplasmataceae foram incluídas espécies dos gêneros *Wolbachia*, *Ehrlichia* e *Neorickettsia*, mantendo as espécies dos gêneros *Anaplasma* e *Aegyptianella*.

Todos os membros da família Anaplasmataceae, são bactérias intracelulares obrigatórias que se replicam dentro de vacúolos citoplasmáticos da célula hospedeira que inclui eritrócitos, células retículo-endoteliais, células fagocíticas derivadas da medula óssea no hospedeiro vertebrado e tecidos reprodutivos de artrópodes e helmintos. No gênero *Anaplasma*, estão incluídos organismos gram-negativos, pequenos, pleomórficos de cocóides a elipsoidais que residem nos vacúolos individualmente e em inclusões compactas, conhecidas como mórulas. As espécies desse gênero são cultivadas apenas na presença de células, incluindo, neutrófilos, linhagens celulares mielomonocíticas e polimielocíticas, eritrócitos e linhagem de células de carrapatos (DUMLER et al., 2001).

O gênero *Anaplasma* inclui quatro espécies infectantes para ruminantes: *Anaplasma marginale* (espécie tipo), *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis* e *Anaplasma phagocitophilum* (conhecido anteriormente como *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocitophila* e agente causador da erliquiose granulocítica de humanos), além disso o gênero inclui as espécies *Anaplasma bovis* (*Ehrlichia bovis*) e *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) (DUMLER et al., 2001).

Anaplasma marginale foi descrito pela primeira vez por Theiler em 1910, na África do Sul, sendo identificado como "pontos marginais" em eritrócitos de bovinos doentes. No entanto, alguns anos antes, Smith e Kilborne (1983), afirmaram erroneamente que os "pontos marginais" observados nos eritrócitos dos bovinos com febre do gado no Texas, eram fases evolutivas do ciclo de *Babesia bigemina*. Theiler (1910) então determinou que babesiose e anaplasmoses pudessem co-existir num mesmo animal, porém eram doenças distintas (KOCAN et al., 2010).

Desta forma temos a seguinte classificação sistemática para a espécie *Anaplasma marginale*:

Reino: Bacteria (Cohn, 1870) Cavalier-Smith, 1983 Ex Cavalier-Smith, 2002

Filo: Proteobacteria - Garrity et al., 2005.

Classe: Alphaproteobacteria- Garrity et al., 2006

Ordem: Rickettsiales - Gieszczykiewicz, 1939.

Família: Anaplasmataceae - Philip, 1957.

Gênero: *Anaplasma* Theiler 1910

Espécie - *Anaplasma marginale* Theiler 1910.

2.2 Ciclo Biológico de *Anaplasma marginale*

Anaplasma marginale pode ser transmitido biologicamente por carrapatos, mecanicamente por transfusão de sangue infectado em fômites ou aparelho bucal de insetos sugadores, e ainda pela transmissão transplacentária aos bezerros (AUBRY; GEALE, 2011; PASSOS; LIMA, 1984).

Transmissão mecânica de *A. marginale* ocorre quando sangue infectado é transferido à bovino susceptível via fômites ou aparelho bucal de insetos sugadores contaminados com sangue (EWING, 1981). Já a transmissão biológica é efetivada por carrapatos, existindo cerca de 20 espécies de carrapatos incriminados como vetores ao redor do mundo, incluindo espécies de *Rhipicephalus* spp., *Dermacentor* spp. e *Ixodes ricinus* (KOCAN et al., 2004). Além disso, *A. marginale* pode ser transmitido a partir das vacas para os bezerros por via transplacentária durante a gestação (ZAUGG; KUTTLER, 1984), podendo contribuir para a epidemiologia da doença em algumas regiões (KOCAN et al., 2003).

A transmissão biológica por carrapatos pode ser por via transestadial ou intraestadial (STICH et al., 1989), com o carrapato macho desempenhando um papel muito importante na transmissão intraestadial por se tornarem permanentemente infectados, transmitindo *A. marginale* repetidamente quando se alimenta em um novo hospedeiro (KOCAN et al., 1992). A transmissão transovariana de *A. marginale* parece não ocorrer (STICH et al., 1989).

A participação de vetores de um único hospedeiro como *R. (B.) microplus* no ciclo de *A. marginale* ainda é desconhecida. No entanto, em estudo realizado por Alamzán et al. (2008), foi detectada a presença do DNA de *A. marginale* em glândulas salivares de duas fêmeas de *R. (B.) microplus* (40%), sugerindo o envolvimento deste carrapato na transmissão de *A. marginale*. Além disso, Ribeiro e Lima (1996) verificaram a presença de colônias de *A. marginale* em células epiteliais do intestino de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* através da microscopia óptica e eletrônica.

O ciclo de desenvolvimento de *A. marginale* é coordenado pelo ciclo de alimentação do carrapato (KOCAN, 1986; KOCAN et al., 1992). Durante o repasto sanguíneo sobre os bovinos, os eritrócitos infectados são ingeridos, promovendo a infecção de células intestinais do carrapato. Após o desenvolvimento do *A. marginale* nas células do intestino médio do carrapato, muitos outros tecidos são infectados, incluindo a glândula salivar, da qual as riquetsias podem ser transmitidas para os vertebrados durante a alimentação (KOCAN, 1986; KOCAN et al., 1992; GE et al., 1996). Em cada sítio de infecção no carrapato, *A. marginale* se desenvolve dentro de vacúolos ou colônias delimitadas por membrana. Dentro das colônias, a primeira forma observada é a forma reticulada, ou vegetativa, a qual multiplica-se por fissão binária, formando grandes colônias que podem conter centenas de organismos. A partir daí, modifica-se para a forma infectante conhecida como corpúsculo denso, podendo sobreviver fora do hospedeiro e permitir a ocorrência da transmissão mecânica (KOCAN et al., 2010). Os bovinos se tornam infectados quando a forma densa é transmitida durante a alimentação do carrapato, via glândula salivar (KOCAN et al., 2003) (Fig. 1).

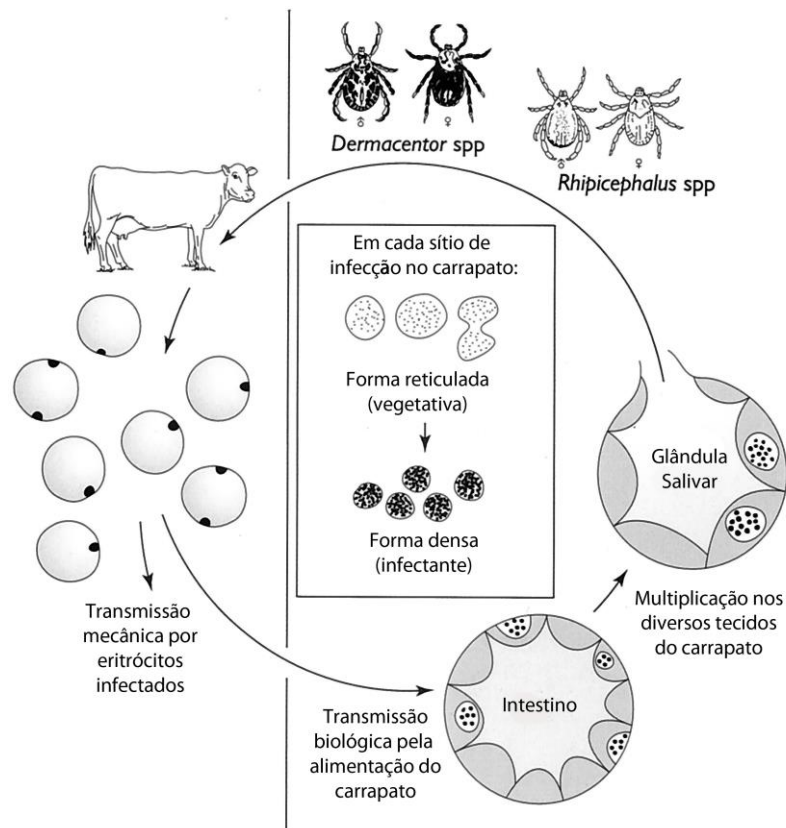


Figura 1. Ciclo de desenvolvimento de *A. marginale* em bovinos e carrapatos. Adaptado de Kocan et al. (2003).

2.3 Epidemiologia da Anaplasmoze

Anaplasma marginale é o agente riquetsial intraeritrocítico transmitido por carrapatos mais prevalente em todo o mundo, sendo responsável por morbidade e mortalidade de ruminantes em regiões temperadas, subtropicais e tropicais, incluindo América do Sul, Central e Norte, Austrália, Ásia e Europa (KOCAN et al., 2010; AUBRY; GEALE, 2011). Espera-se que a distribuição da anaplasmoze se modifique ao longo dos anos devido ao aquecimento global, o qual pode influenciar no movimento do carrapato vetor (JONSSON; REID, 2000).

Na Europa, ruminantes silvestres, em particular veados e alces, podem influenciar na epidemiologia da anaplasmoze de algumas regiões (ZAUGG et al., 1996; SEVILLA et al., 2002). A preocupação com a transmissão de agentes infecciosos entre animais selvagens e animais domésticos está aumentando, especialmente em áreas onde estes compartilham a mesma pastagem (CHOMEL et al., 1994). Em países como Itália (CECI; CARELLI, 1999; CRINGOLI et al., 2002), Áustria (BAUMGARTNER et al., 1992) e Espanha (SEVILLA et al., 2002), bovinos infectados com *A. marginale* têm sido identificados (DE LA FUENTE et al., 2004a).

Nos EUA, anaplasmoze tem sido relatada em quase todos os estados podendo ser resultado do transporte de gado e posterior transmissão mecânica ou biológica ao gado suscetível (KOCAN et al., 2010). Em todos os países da América Latina, bem como nas ilhas do Caribe, anaplasmoze é enzoótica, com exceção de áreas desérticas e algumas cadeias de montanhas nos Andes, tendo como principal vetor o carrapato *R. (B.) microplus* (GUGLIELMONE, 1995), no entanto a participação desse vetor no ciclo de *A. marginale* ainda é desconhecida.

Em algumas áreas do Brasil (MADRUGA et al., 1983) e Costa Rica (PÉREZ et al., 1980), anaplasmosose aparece como um problema maior do que a babesiose. Na Colômbia, esta doença foi descrita por causar uma mortalidade de 0,4 a 1,3% em bezerros da região de Córdoba (OTTE; PÉREZ, 1987). Anaplasmosose parece ser também um problema na Venezuela (TORO BENÍTEZ et al., 1991), no entanto, no Uruguai e Argentina, essa doença não se destaca como a babesiose, apesar da existência de surtos por transmissão mecânica em regiões da Argentina consideradas livre de *R. (B.) microplus* (GUGLIELMONE, 1995).

No Brasil, *A. marginale* é um dos três agentes do complexo conhecido como “Tristeza Parasitária Bovina” (TPB), caracterizado por anemia, perda de peso, febre, aborto e morte em casos agudos (KUTTLER, 1984). A anaplasmosose possui grande importância tanto em áreas de instabilidade endêmica, ocorrendo altas taxas de mortalidade, quanto nas áreas de estabilidade endêmica, que apesar de não ocorrer surtos nessas áreas, pode apresentar riscos de anaplasmosose aos animais introduzidos provenientes de áreas livres de carrapato ou sob controle intensivo de carrapato (ARAUJO et al., 2003).

Alguns fatores influenciam a susceptibilidade dos animais às hemoparasitoses, destacando-se: os animais *Bos taurus* são mais sensíveis aos carrapatos e hemoparasitoses; bovinos jovens são mais resistentes do que os adultos devido à presença de anticorpos colostrais, rápida resposta da imunidade celular, maior eritropoiese da medula óssea e presença de hemoglobina fetal nos eritrócitos (RISTIC, 1960). O percentual de animais doentes e a taxa de mortalidade são dependentes do número de vetores no ambiente, estado nutricional e doenças concomitantes. Após recuperação, o bovino torna-se portador assintomático (GONÇALVES, 2000), apresentando importância na manutenção do ciclo em vetores.

2.4 Diversidade Genética

Diversos estudos verificaram uma heterogeneidade genética de *A. marginale* em regiões endêmicas ao redor do mundo (DE LA FUENTE et al., 2004a; DE LA FUENTE et al., 2005a; DE LA FUENTE et al., 2005b; DE LA FUENTE et al., 2007; CABEZAS-CRUZ et al., 2013; POHL et al., 2013), o qual difere na morfologia, sequência de proteína, características antigênicas e habilidade de ser transmitido por carrapatos. A diversidade genética das cepas de *A. marginale* derivado de eritrócitos bovinos é caracterizada baseada na sequência de genes de MSPs, os quais estão envolvidos na interação patógenos e células hospedeiras dos vertebrados e invertebrados (DE LA FUENTE et al., 2001a; KOCAN et al., 2003).

As MSPs estão mais susceptíveis a evoluir mais rapidamente do que outros genes nucleares, pois estes estão sujeitos à pressão seletiva exercida pelo sistema imune do hospedeiro (DE LA FUENTE et al., 2005a). Seis MSPs de *A. marginale* derivado de eritrócitos bovinos foram identificadas. MSP1a, MSP4 e MSP5 são codificadas a partir de genes simples e não variam antigenicamente durante a sua multiplicação (ALLRED et al., 1990; BOWIE et al., 2002), enquanto MSP1b, MSP2 e MSP3 são codificadas a partir de famílias de multigenes e podem variar antigenicamente, principalmente em bovinos persistentemente infectados (BOWIE et al., 2002; KOCAN et al., 2003).

O complexo MSP1 é formado por MSP1a e MSP1b, onde a MSP1a é variável em peso molecular dentro de isolados geográficos devido ao diferente número de repetições em tandem (23-31 aminoácidos) localizados na porção amino-terminal da proteína e conservados durante a multiplicação (ALLRED et al., 1990; DE LA FUENTE et al., 2005a; DE LA FUENTE et al., 2007; CABEZAS-CRUZ et al., 2013). MSP1a é codificada pelo gene *mSP1a*, o qual é conservado durante a multiplicação em bovinos e carrapatos (KOCAN et al., 2003). Ela está envolvida na adesão aos eritrócitos bovinos e células de carrapato, na transmissão do

parasito pelos carrapatos (DE LA FUENTE et al., 2001a) e no desenvolvimento da imunidade bovina contra *A. marginale* (AUBRY; GEALE, 2011). Devido ao número e sequência de repetições em tandem permanecerem os mesmos em determinada espécie, o gene *msp1a* foi reconhecido como marcador genético estável para identidade de cepas geográficas (BARBET et al., 1987; DE LA FUENTE et al., 2001a; DE LA FUENTE et al., 2002). O gene *msp1a* é um marcador genético estável para identificação de cepas em animais durante a fase aguda e crônica da infecção e antes, durante e depois da transmissão por carrapato (BOWIE et al., 2002). Estudos provaram que MSP1a pode não ser adequada para informações filogeográficas numa escala global, no entanto, pode ser útil para comparação de cepas de determinadas regiões e pode prover informações sobre a evolução da relação hospedeiro-patógeno e vetor-patógeno (KOCAN et al., 2010).

Estudos com gene *msp1a* apresentam sequências repetidas para uma região geográfica única (DE LA FUENTE et al., 2007; CABEZAS-CRUZ et al., 2013). Na figura 2 observa-se a distribuição de cepas registradas ao redor do mundo, no entanto, a maioria das cepas foram registradas apenas em uma região determinada, embora outras foram isoladas em múltiplas regiões (CABEZAS-CRUZ et al., 2013). Essa heterogeneidade genética entre as cepas de *A. marginale* em uma região endêmica provavelmente reflete a história de movimento de bovinos e manutenção de diferentes genótipos por eventos de transmissão independentes (ALAMZÁN et al., 2008; PALMER et al., 2004). No Brasil, *A. marginale* apresenta alta diversidade genética entre os isolados (POHL et al., 2013). O agrupamento filogeográfico de alguns genótipos do MSP1a foram relatados, com determinados genótipos sendo encontrados exclusivamente no sul do Brasil (ESTRADA-PEÑA et al., 2009).

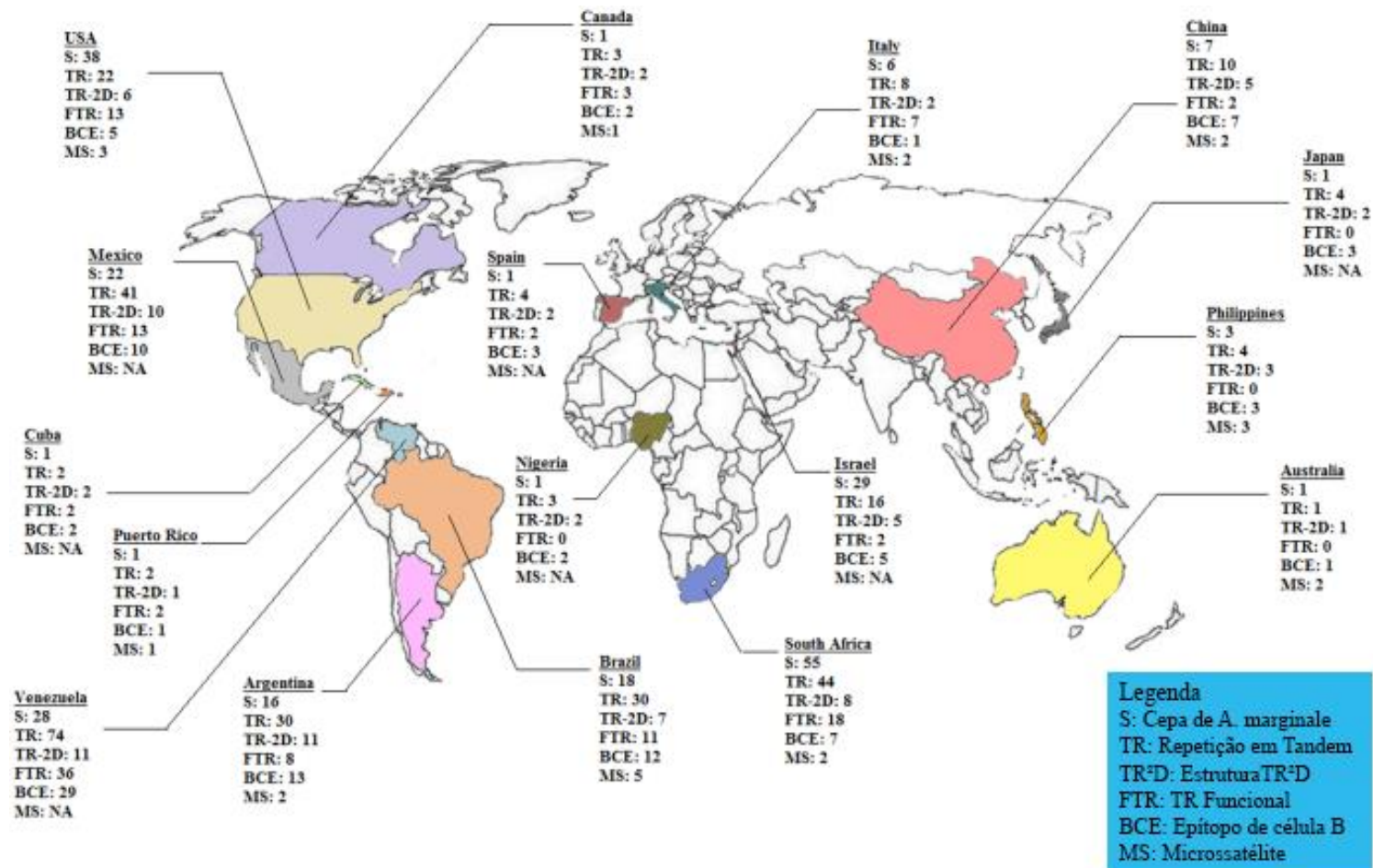


Figura 2. Mapa molecular de MSP1a de *A. marginale* no mundo. O número de cepas (S), repetições em tandem (TR), estrutura 2D das repetições em tandem (TR-2D), repetições em tandem funcional (FTR) tipo de epítomos de célula B (BCE) e microsatélites estão apresentados em cada país. Adaptado de Cabezas-Cruz et al. (2013).

Já a proteína MSP1b é polimórfica entre os isolados de *A. marginale* e codificada por pelo menos dois genes, *mSP1β1* e *mSP1β2* (BOWIE et al., 2002; KOCAN et al., 2003), no entanto, apenas uma pequena variação na sequência de proteína foi observada durante o ciclo de vida em bovinos e carrapatos (BOWIE et al., 2002). Esta proteína é considerada uma adesina para eritrócitos bovinos, mas não para células de carrapato (DE LA FUENTE et al., 2001a).

As proteínas MSP2 e MSP3 são codificadas por uma grande variedade de genes (PALMER et al., 1999) e estão envolvidas na indução da resposta imune bovina (PALMER et al., 2000). A composição antigênica e sequência de MSP2 variam durante o ciclo riquetsêmico no bovino (FRENCH et al., 1998; FRENCH et al., 1999) e em carrapatos persistentemente infectados (DE LA FUENTE et al., 2001a), enquanto que em MSP3, essa composição e sequência variam entre os isolados geográficos (ALLEMAN et al., 1997).

MSP4 é codificada por único gene, sendo altamente conservada (DE LA FUENTE et al., 2005a), no entanto, sua função ainda é desconhecida. Alguns estudos com a proteína MSP4 geraram informações filogeográficas e filogenéticas para cepas de *A. marginale* do Novo Mundo (DE LA FUENTE et al., 2001b; DE LA FUENTE et al., 2002; DE LA FUENTE et al., 2004a), no entanto, em outras cepas essas informações não foram evidenciadas (DE LA FUENTE et al., 2005a).

MSP5 é uma proteína imunodominante codificada por um único gene e identificada em diversas espécies de *Anaplasma* (DE LA FUENTE et al., 2005a). Essa proteína também possui sua função desconhecida, apesar de ser efetiva em diagnósticos e utilizada em testes de imunoensaio (ELISA) (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998).

2.5 Isolamento de *A. marginale*

As primeiras tentativas para propagar *A. marginale* foram limitadas à fase eritrocítica, permitindo o estudo do patógeno fora do hospedeiro vertebrado e invertebrado (KESSLER; RISTIC, 1979; KESSLER et al., 1979). Kessler et al. (1979) realizaram o cultivo de *A. marginale* em eritrócitos utilizando um sistema de cultura de sangue total com base em um método utilizado para o *Plasmodium*, no entanto, apesar dos organismos permanecerem viáveis durante vários dias, esse sistema não resultou em propagação contínua.

Outras tentativas para o desenvolvimento de *A. marginale* sem a necessidade do hospedeiro foram realizadas utilizando diversas culturas, entre elas, culturas de medula óssea bovina, medula óssea de coelho e linfonodos de bovinos, porém obtiveram apenas um sucesso moderado, pois sua replicação não foi confirmada (MARBLE; HANKS, 1972; HILDAGO, 1975).

As primeiras linhagens de células de artrópodes testadas para a infecção foram derivadas do mosquito *Aedes albopictus*, obtendo uma viabilidade à curto prazo de *A. marginale*, sem sucesso na propagação (MAZZOLA et al., 1976). Posteriormente, com o detalhamento do ciclo de desenvolvimento de *A. marginale* nos carrapatos e o estabelecimento de diversas linhagens de células de carrapato, tentativas com inoculação nessas linhagens foram realizadas. Samish et al. (1988) realizaram a primeira tentativa de infecção de linhagem celular de carrapato utilizando a linhagem RML-15 de *Dermacentor variabilis*. Nessa tentativa, os autores observaram diversas estruturas parecidas com *A. marginale* no citoplasma das células, no entanto não conseguiram estabelecer uma infecção contínua.

O principal avanço na propagação de *A. marginale* foi conseguido em linhagem de células de carrapato *Ixodes scapularis* (IDE8) (MUNDERLOH et al., 1994), a partir

daí diversos isolados ao redor do mundo têm sido mantidos (MUNDERLOH et al., 1996; BLOUIN et al., 2000; ZWEYGARTH et al., 2006). IDE8 é capaz de suportar uma variedade de outras riquetsias incluindo *Anaplasma* sp. (ZWEYGARTH et al., 2006), *A. phagocytophilum* (SILAGHI et al., 2011) e *Ehrlichia ruminantium* (BELL-SAKYI et al., 2000).

Seguindo o protocolo descrito por Munderloh et al. (1996) e Blouin et al. (2000), culturas de *A. marginale* podem ser iniciadas a partir do sangue obtido de bezerros infectados durante o pico de riquetsemia (BLOUIN et al, 2000; BASTOS et al, 2009). Nesse método, o sangue é coletado com anticoagulante, lavado diversas vezes com PBS e então criopreservado com DMSO. Após descongelamento a 37°C, o sangue é centrifugado e os eritrócitos são ressuspensos em meio de cultura adequado para a propagação de *A. marginale* (MUNDERLOH et al., 1996). As células IDE8 são então inoculadas e mantidas a 34°C, sendo essa considerada a temperatura ideal de crescimento de *A. marginale*. As culturas devem ser monitoradas por exame direto em microscópio invertido e / ou por exame microscópico de lâminas de citocentrífuga corados pelo Giemsa. Células infectadas por *A. marginale* podem ser propagadas de forma contínua, e as taxas de infecção podem chegar a 80% (PASSOS, 2012).

O sistema de linhagens celulares de carrapato fornece um modelo útil para estudos tais como a análise molecular, a transcrição do gene, as relações celulares e moleculares entre agentes patogênicos e vetores, e estudos comparativos *in vitro/in vivo* (PASSOS, 2012). Além disso, as preparações de antígenos são úteis como ferramentas diagnósticas, pois são aplicadas em testes sorológicos como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA), teste de fixação do complemento, entre outros. *A. marginale* nesse sistema pode ser quantificado e utilizado como material antigênico, testes de diagnóstico ou para ensaios de imunização.

No Brasil, dois isolados a partir de bezerro naturalmente infectado foram estabelecidos em IDE8 e nomeados como UFMG1, o qual produz altos picos de riquetsemia em animais esplenectomizados, porém não ocasiona a morte do animal, e UFMG2, que induz à alta mortalidade em bovinos esplenectomizados e intactos susceptíveis (BASTOS et al., 2009). Existem poucos registros na literatura sobre isolados de *A. marginale* no Brasil, não havendo uma clareza de informações sobre as formas de transmissão e patogenicidade das cepas, revelando a necessidade de maiores estudos nas diferentes regiões do país.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Execução

O experimento foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e no Instituto de Medicina Tropical Comparativa e Parasitologia (Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie), da Universidade Ludwig-Maximilians-University (Ludwig Maximilians Universität) – LMU, situada em Munique, Alemanha.

3.2 Linhagem Celular

Linhagem de células do carrapato *I. scapularis* (IDE8) foi mantida em frascos de cultivo de células de 25 cm² com troca de meio semanal e repique a cada 15 dias quando as células atingiam a confluência com formação de monocamada de células.

O meio de cultura utilizado para a linhagem IDE8 antes da inoculação de *A. marginale* foi o Leibovitz's L15B (MUNDERLOH; KURTTI, 1989) suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado, 10% de caldo de triptose fosfatada, 0,1% de lipoproteína bovina concentrada (MP Biomedicals®), 1% de L-glutamina (200mM) e 1% da solução de antibióticos penicilina (10.000 UI) e estreptomicina (10mg/mL), com pH ajustado para 6.8.

As culturas foram monitoradas diariamente por exame direto com o auxílio de microscópio de luz invertido.

3.3 Isolamento de Cepas de *Anaplasma marginale* Oriundas do Município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

Dois bovinos aparentemente saudáveis, sem nenhuma sintomatologia clínica ou histórico de doenças, pertencentes ao setor de bovinocultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro foram utilizados no experimento. Amostras de sangue desses animais naturalmente infectados com *A. marginale* foram coletadas através de sistema vacuntainer® com Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA). Esmegões sanguíneos fixados com metanol por 3 minutos e corados com Giemsa (1:10) por 40 minutos revelaram uma parasitemia de 10% de cada animal. Uma alíquota de sangue de cada animal foi congelada para posterior análise molecular. No momento da coleta os animais não apresentavam sintomatologia clínica, provavelmente devido à baixa patogenicidade das amostras.

Quatro dias após coleta, no laboratório da LMU, as amostras foram processadas seguindo metodologia descrita por Blouin et al. (2000). Três mililitros de sangue de cada animal foram centrifugados por 10 minutos a 700 xg com 10 mL de PBS 1x. Células brancas foram removidas com auxílio de pipeta e os eritrócitos foram centrifugados mais 2 vezes com PBS 1x pelo mesmo tempo e velocidade descrita acima. O “pellet” formado de cada amostra foi ressuspensão na proporção 1:1 com meio Leibovitz's-L15 com 10% de DMSO e então criopreservado à -80°C em criotubos.

Após 48 horas, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C, ressuspensas em meio L15 e centrifugadas à 9000 xg por 10 minutos. O “pellet” formado foi ressuspensão em 5mL de meio Leibovitz's L15B contendo 5% de soro bovino inativado, 10% de caldo de triptose fosfatada, 0,1% de lipoproteína bovina concentrada, 1% de L-glutamina (200mM) e 1% da solução de antibióticos penicilina (10.000 UI) e estreptomicina (10mg/mL), NaHCO₃ (2,5g/L) e HEPES, com pH ajustado para 7.4. A amostra de cada animal foi inoculada em frascos de 25cm²

contendo monocamada de linhagem de células IDE8 e incubada a 34°C. A primeira troca de meio foi realizada após 24 horas com a retirada de todo o meio, e as subsequentes trocas foram feitas 2 vezes por semana com a retirada de apenas 60% do meio.

As culturas infectadas foram monitoradas diariamente por exame direto sob microscópio invertido e/ou por exame microscópico semanal de lâminas de citocentrífuga, fixados com metanol por 5 minutos e corados com Giemsa (1:10) por 20 minutos.

3.4 Congelamento das Cepas

Após três repiques, um frasco de cada cepa foi utilizado para congelamento quando a infecção atingiu 80% de infecção das células IDE8. As células de cada frasco foram suspensas por agitação e rinsagem e o material foi transferido para tubos falcon de 15 mL para centrifugação à 200 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o “pellet” suspenso em 4 mL de solução de sacarose - fosfato – glutamato (SPG) refrigerado. O material foi transferido para 4 criotubos com 1 mL em cada e mantidos em container com isopropanol ao fundo (NalgeneTMCryo 1°C Freezing container) em freezer -80°C por 90 minutos para atingir uma taxa de congelamento de -1°C por minuto. Após decorridos 90 minutos, os criotubos foram transferidos para botijão de Nitrogênio Líquido (-196°C), onde foi mantido até o descongelamento.

3.5 Caracterização dos Isolados

DNAs das amostras de sangue e das culturas inoculadas foram extraídos utilizando QIAamp DNA Mini Kit® (QIAGEN) e as análises de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) em tempo real (qPCR) foram realizadas para confirmação da presença dos patógenos. Nas amostras de sangue e células inoculadas com eritrócitos, foi realizado qPCR para o gene *msp1β* de *A. marginale* com 95 pares de base (pb) como descrito nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1. Primers e sonda utilizados no qPCR para *Anaplasma marginale* (CARELLI et al., 2007).

PCR	Primer	Sequência de oligonucleotídeo
qPCR para <i>Anaplasma marginale</i> (gene <i>msp1β</i>)	AM-For	5' TTGGCAAGGCAGCAGCTT 3'
	AM-Ver	5' TTCCGCGAGCATGTGCAT 3'
	AM-Pb	6FAM – TCGGTCTAACATCTCCAGGCTTTCAT – BHQ1

Tabela 2. Condições das reações para realização do qPCR para *Anaplasma marginale* (CARELLI et al., 2007).

PCR	Reagentes	Concentração	Volume
qPCR para <i>Anaplasma marginale</i> (gene <i>msp1β</i>)	Taq Man MasterMix		15,0µl
	Primer f AM-For (10µM)	10µM	2,25µl
	Primer r AM-Rev (10µM)	10µM	2,25µl
	Sonda AM-Pb (10µM)	10µM	0,5µl
	DNA		5,0µl
	Volume total		25,0µl

Tabela 3. Condições de termociclagem no qPCR para *Anaplasma marginale* (CARELLI et al., 2007).

PCR	Reação	Temperatura	Duração	Ciclo
qPCR para <i>Anaplasma marginale</i> (gene <i>mplβ</i>)	Incubação	50°C	2 min	1x
	Ativação	95°C	10 min	1x
	Desnaturação	95°C	15 seg	40x
	Anelamento e extensão	60°C	1 min	40x

Após a primeira visualização do patógeno (*A. marginale*) na célula por meio de lâminas de citocentrífuga corados com Giemsa, alíquotas das culturas infectadas foram coletadas para análise molecular. O DNA foi extraído utilizando QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen) e quantificado com auxílio de espectrofotômetro (NanoDrop®ND-1000, Erlangen, Germany). Inicialmente foi realizado qPCR para o gene *mplβ* de *A. marginale*, seguindo o protocolo descrito acima. Com o objetivo de verificar a variabilidade genética presente nas cepas de *A. marginale*, foi realizado uma semi-nested PCR de acordo com Lew et al. (2002) para o gene *mplα*. As reações foram realizadas utilizando os primers 1733F (5' TGTGCTTATGGCAGACATTTCC 3'), 3134R (5' TCACGGTCAAACCTTTGCTTACC 3') e 2957R (5' AAACCTTGTAGCCCCAACTTATCC 3'). O primeiro ciclo de amplificação apresentou uma desnaturação à 94°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, com uma extensão final à 72°C por 7 minutos. As mesmas condições foram utilizadas na segunda amplificação, porém com a temperatura de anelamento de 60°C.

Os produtos da semi-nested PCR para *A. marginale* foram separados em gel de agarose 2% corados com GelRed® (Biotium, USA, Gel 50mL, GelRed 5µl) utilizando o marcador de 100pb (Ladder Mix1/2 Loading dye, Fermentas Life Science, Germany) e visualizados sob luz UV.

A purificação do produto da PCR foi realizada com QIAquick PCR Purification Kit® (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Após a purificação, o produto foi enviado para sequenciamento (Eurofins, MWG, Operon, Ebersberg). Os resultados foram avaliados com Chroma©Lites (www.technelysium.com.au/chromas_lite.html) e as similaridades das sequências foram pesquisadas pela análise de alinhamento local (BLASTn) ([www.ncbi.nlm.nih.gov.library.vu.edu.au/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/library.vu.edu.au/BLAST/)).

As cepas isoladas foram identificadas baseadas na sequência das repetições em tandem do gene *mplα* (DE LA FUENTE et al., 2007; CABEZAS-CRUZ et al., 2013) e microssatélite (ESTRADA-PEÑA et al., 2009), uma vez que apesar do gene *mplα* possuir uma alta variabilidade entre cepas, este é considerado um marcador genético estável. Resumidamente, o microssatélite está localizado na região não traduzida (5' - UTR) de MSP1a entre a sequência de Shine-Dalgarno (SD) (GTAGG) e o códon de iniciação da tradução (ATG), com a estrutura: GTAGG (**G / A TTT**) m (**GT**) n **T** ATG (sequência microssatélite em negrito). As distâncias SD-ATG foram calculados nos nucleotídeos como $(4 \times m) + (n \times 2) + 1$. Sequências nucleotídicas foram traduzidas para sequências de aminoácidos (aa) utilizando a ferramenta de tradução ExPASy (<http://web.expasy.org/translate>).

As mesmas análises moleculares foram repetidas três vezes após várias passagens dos isolados em IDE8 e congelamento, para verificar se possíveis modificações na sequência do gene *mplα*.

3.6 Análise Filogenética

As análises filogenéticas foram realizadas com sequências de aminoácidos de MSP1a alinhadas com MAFFT (v7) configurado para a mais alta precisão (KATO; STANDLEY, 2013). Após o alinhamento, as regiões com lacunas foram removidas a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos. Árvores filogenéticas foram construídas utilizando os métodos Máxima Verossimilhança, Neighbor Joining e Inferência Bayesiana como implementados em PhyML (v3.0 alrt) (GUINDON; GASCUEL, 2003; GASCUEL; STEEL, 2006), PHYLIP (v3.66) (FELSENSTEIN, 1989) e MrBayes (v3.1.2), respectivamente. A confiabilidade para os ramos internos da Máxima Verossimilhança foi avaliada através do método de inicialização (1000 replica de inicialização) e o teste da razão de verossimilhança aproximada (aLRT – SH-Like) (GASCUEL; STEEL, 2006). A confiabilidade para a árvore de Neighbor Joining foi avaliada utilizando o método de inicialização (1000 réplicas de bootstrap). Dez mil (10.000) gerações de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) foram executados por MrBayes. A representação gráfica e edição das árvores filogenéticas foram realizadas com TreeDyn (v 1.98,3) (CHEVENET et al., 2006).

3.7 Reconstrução de Ancestral

A reconstrução da sequência de aminoácidos ancestral foi realizada utilizando uma Árvore de Neighbour Joining sob o modelo Dayhoff de substituições que foi estimado para ser o melhor modelo de ajuste dos dados reais. Utilizaram-se três métodos de reconstrução: reconstrução conjunta (PUPKO et al., 2000), reconstrução marginal (YANG *et al.*, 1995) e da amostra (NIELSEN, 2002) que foram aplicados em servidor DataMonkey.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento e Propagação de *A. marginale*

Após 60 dias de cultivo, pequenas colônias no interior das células de IDE8 foram observadas nas lâminas preparadas com a citocentrífuga de cada isolado (Fig. 3A). Após 21 dias, estas colônias foram visualizadas em 70% das células, com várias colônias no interior da mesma célula (Fig. 3B). Durante essa fase, o crescimento das colônias causou a compressão e deslocamento do núcleo. A formação de grandes colônias foi seguida por rompimento das membranas vacuolares liberando os corpúsculos internos no meio de cultivo (Fig. 3C). O primeiro subcultivo foi realizado com 21 dias após a primeira visualização. Subsequentemente, subcultivos foram realizados todas as vezes que a cultura atingiu 70-80% de infecção, a cada 30-45 dias, quando grande parte das células já se desprendia do fundo dos frascos de cultivo.

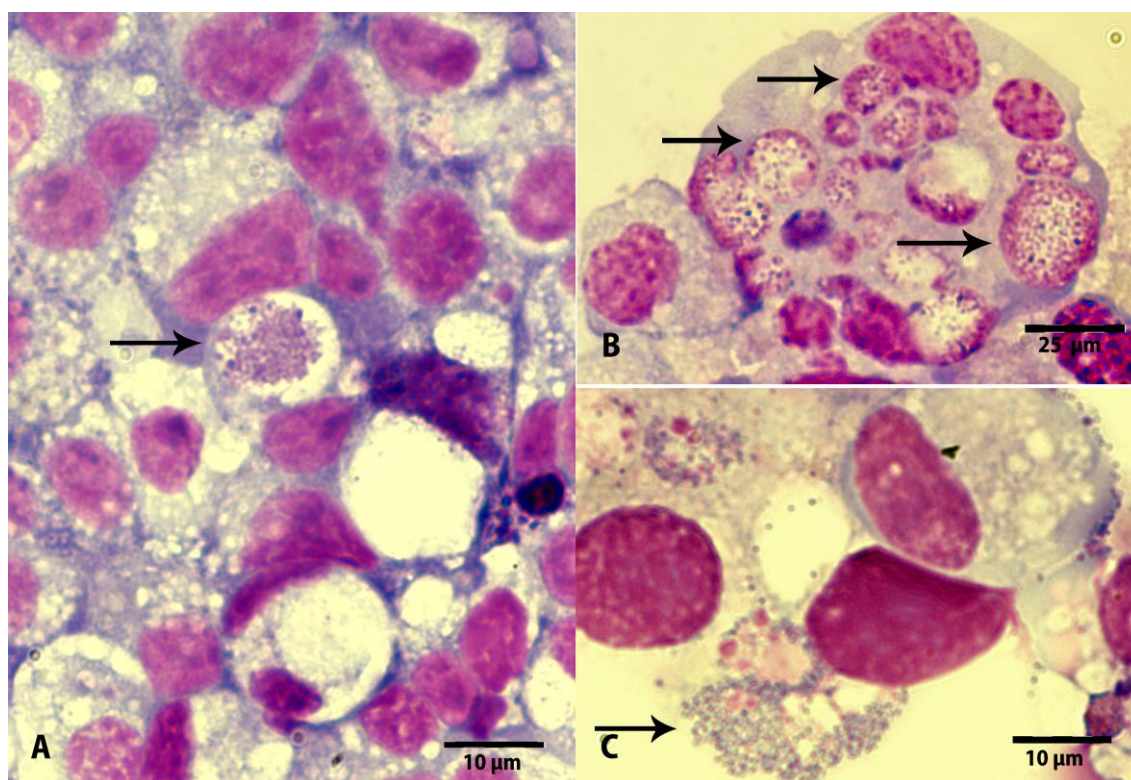


Figura 3. Visualização de lâminas de citocentrífuga coradas com Giemsa de células IDE8 infectadas com *A. marginale* do Rio de Janeiro, Brasil. (A) Formação de pequena colônia no interior da célula – 60 dias de cultivo; (B) várias colônias na mesma célula com deslocamento do núcleo – 81 dias de cultivo; (C) Ruptura de uma colônia liberando corpúsculos no meio de cultivo – 88 dias de cultivo. Setas indicam colônias de *A. marginale*.

Após 30 dias de congelamento, as cepas foram descongeladas em banho-maria a 34°C e inoculadas em frascos contendo monocamadas de células IDE8. Foram verificados a mesma morfologia e tempo de crescimento mesmo após congelamento

para ambas as cepas, demonstrando o sucesso no estabelecimento das cepas *in vitro*. As cepas foram mantidas congeladas por 12 meses sem alterações.

4.2 Caracterização das Cepas de *A. marginale*

Os dois frascos com isolados de animais distintos foram positivos tanto no qPCR como na semi-nested PCR. As cepas isoladas foram então nomeadas de AmRio1 e AmRio2. A qPCR realizada logo após a primeira visualização no cultivo, obteve um limiar de detecção (C_q – “cycle quantification”) de 30 e 33 ciclos para as cepas AmRio1 e AmRio2, respectivamente. A partir do nested PCR do gene *msp1a* um amplicon de aproximadamente 1.1 Kb foi isolado correspondendo ao tamanho marcado para o fragmento do gene *msp1a*.

Durante a caracterização molecular, foi utilizado um conjunto final de dados de 732 nucleotídeos para AmRio1 e 879 nucleotídeos para AmRio2.

A análise microssatélite do gene *msp1a* resultou em um genótipo para ambas as cepas do Rio de Janeiro, genótipo **E**. As sequências do microssatélite produziram as mesmas distâncias SD-ATG de nucleotídeos (Tabela 4).

Tabela 4. As análises microssatélites do gene *msp1a* de *A. marginale* a partir de cepas do Rio de Janeiro.

Isolados	Genótipos	m*	n**	Distância SD-ATG (nucleotídeo)
AmRio1	E	2	7	23
AmRio2	E	2	7	23

O microssatélite estava localizado entre o Shine-Dalgarno (SD; sequência em negrito) e o códon de iniciação (ATG) com a estrutura: GTAGG (**G/ATTT**) m* (**GT**)n** T ATG. A distância SD-ATG foi calculada nos nucleotídeos com $(4xm) + (2xn) + 1$.

Nesse estudo, cinco repetições em tandem de *msp1a* foram identificados nos isolados do Rio de Janeiro. A sequência de aminoácidos das repetições em tandem a partir da cepa AmRio1, resultou em uma nova sequência (nomeada 162) com um aminoácido diferente como apresentado da tabela 5. Ambos os isolados tiveram três diferentes repetições em tandem de *msp1a* e o número de repetição foi cinco em cada (Fig. 4). Além disso, a sequência *msp1a* não modificou após seis passagens *in vitro*.

Tabela 5. Nova sequência de repetições em tandem de *msp1a* encontrada em isolado de *A. marginale* do Rio de Janeiro (cepa AmRio1).

Repetições em Tandem	Sequência codificada
17	T D S S S A S G Q Q Q E S G V S S Q S G Q A S T S S Q L G
162	A

Um código de aminoácidos foi utilizado para descrever as diferenças encontradas nas repetições MSP1a. Pontos indicam aminoácidos idênticos. A forma de repetição 17 foi utilizada como modelo para comparar a nova repetição.

Isolados	Estrutura de repetições em tandem de MSP1 α					Nº de repetições
AmRio1	162	F	17	F	F	5
AmRio2	α	β	β	β	F	5

Figura 4. Estrutura da região de repetição de MSP1 α de *A. marginale*, seguindo a numeração de Cabezas-Cruz et al. (2013).

4.3 Análises Filogenéticas

Para determinar a relação filogenética entre as cepas de *A. marginale* isoladas neste estudo e outras cepas de regiões próximas, foram realizadas análises filogenéticas de Máxima Verossimilhança, Neighbor Joining e Inferência Bayesiana. As topologias obtidas com os três métodos foram muito parecidas, portanto apenas uma é apresentada (Neighbor Joining) (Fig. 5). Sequência de aminoácido de MSP1 α das diferentes cepas de *A. marginale* registradas no Brasil (Br) (DE LA FUENTE et al., 2004b; POHL et al., 2013) e Argentina (Ar) (RUYBAL et al., 2009) foram usadas para realizar a análise filogenética. As cepas AmRio1 e AmRio2 apresentaram uma composição de repetições em tandem diferente, no entanto, caem no mesmo cluster filogenético (Cluster α) com cepas previamente relatadas na Argentina e no Brasil (Fig. 5). Cepas de *A. marginale* deste agrupamento filogenético apresentam alta abundância de tandem de repetições α e β , que foram encontrados apenas em AmRio2. Apesar de ambas as linhagens, AmRio1 e AmRio2, terem sido isoladas do Rio de Janeiro, a cepa AmRio2 parece estar mais próxima da cepa (C-F-N), de Minas Gerais (DE LA FUENTE et al, 2004b) (distância genética entre AmRio2 e cepa (C-F-N) é 0,043), do que da AmRio1 (distância genética entre AmRio1 e AmRio2 é 0,065). Curiosamente, a evolução dos dois clusters (Cluster τ e Cluster α) parece ser diferente. Em comparação com o ancestral (círculo azul no Cluster τ), duas das cepas em cluster τ aumentam o número de repetições em tandem (de 5 no ancestral para 7 na cepa τ -11-10-10-11-10-15 e 6 na cepa 23-24-25-26-27-27), enquanto no cluster α , ao qual pertencem AmRio1 e AmRio2, todas as cepas perderam repetições em tandem, desde a separação do ancestral (círculo vermelho no cluster α). O ancestral do Cluster τ apresenta dois repetições em tandem com nova sequência de aminoácidos, ASRI (ADSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQSGVG) e ASRII (TDSSSAGNQQQESSVLPQSGQASTSSQLG) (Fig. 5).

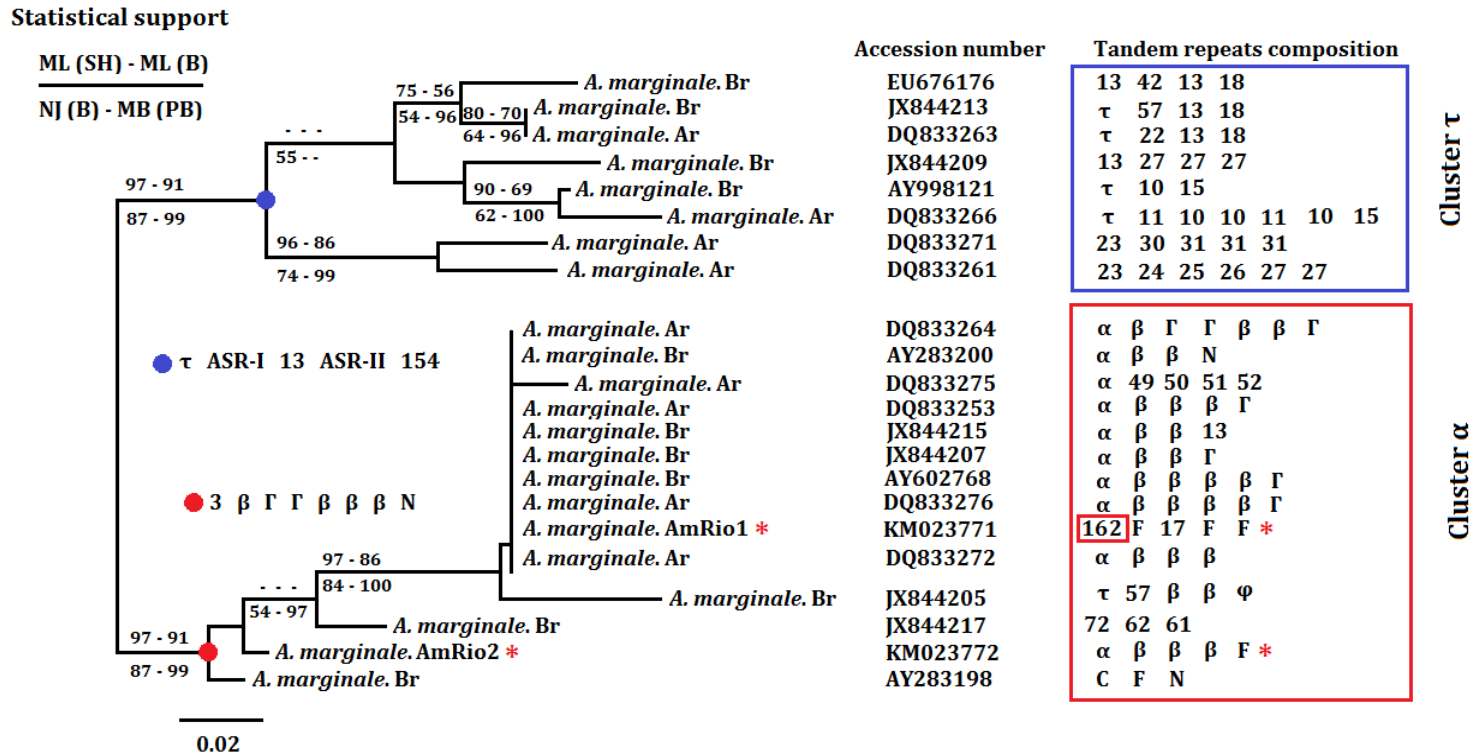


Figura 5. Análise filogenética utilizando o método Neighbor Joining. As sequências de cepas AmRio1 e AmRio2 de *A. marginale* isoladas nesse estudo estão em destaque (asterisco vermelho). Sequência de aminoácido de MSP1α das diferentes cepas de *A. marginale* registradas no Brasil (Br) e Argentina (Ar). Os dois clusters foram nomeados como Cluster τ e Cluster α. A posição e composição de repetições em tandem das sequências de MSP1α ancestrais estão apresentadas para os dois clusters (Círculos azul e vermelho). O número acima e abaixo dos braços representam valores de suporte estatísticos como indicado na figura. Apenas os valores maiores que 50 estão apresentados. O número de acesso ao GenBank e a composição das repetições em tandem utilizados na árvore filogenética estão apresentados.

5 DISCUSSÃO

Durante a propagação das duas cepas brasileiras de *A. marginale* o tempo até a primeira detecção de 60 dias foi consideravelmente maior que o registrado em outros estudos (MUNDERLOH et al., 1996; BLOUIN et al., 2000; BASTOS et al., 2009) que obtiveram períodos variando entre 8 e 34 dias de detecção. Este retardo na primeira visualização do parasito nas células de IDE8 pode estar relacionado a diversos motivos. No presente estudo, o percentual de eritrócitos infectados a partir dos animais doadores para o início dos inóculos foi de apenas 10%, nos demais estudos uma taxa de 30 a 64% de eritrócitos infectados foi registrada pelos autores (MUNDERLOH et al., 1996; BLOUIN et al., 2000; BASTOS et al., 2009). Além disso, um tempo relativamente longo de transporte do Brasil para a Alemanha pode ter influenciado negativamente na sobrevivência dos organismos, retardando o desenvolvimento do cultivo. No entanto, apesar desse longo tempo até a primeira visualização, as colônias de ambas as cepas desenvolveram-se nas células de carrapato IDE8 de maneira similar às já descritas (BASTOS et al., 2009; BLOUIN; KOCAN, 1998; BLOUIN et al., 2000).

Em estudo realizado por Blouin e Kocan (1998) foi verificado que as formas cultivadas de *A. marginale* são morfológicamente as mesmas das encontradas nas células de carrapato *in vivo*. Além disso, esses autores verificaram que o ciclo de desenvolvimento é similar ao encontrado em carrapatos naturalmente infectados. A invasão de células hospedeiras é iniciada por uma adesão das formas densas de *A. marginale* na membrana da célula, onde distintas projeções da membrana plasmática das células hospedeiras se aderem ao longo da membrana externa de *A. marginale*. A adesão entre a riquetsia e a membrana da célula de carrapato aumenta, formando uma depressão na membrana da célula hospedeira até que os organismos de *A. marginale* são incluídos pela membrana da célula hospedeira e interiorizados, formando um vacúolo parasitóforo. Dentro do vacúolo, *A. marginale* se transforma na forma vegetativa (reticulada), a qual se divide por fissão binária. Divisões repetitivas resultaram na formação, de colônias que contém centenas de riquetsias. Após um tempo, a membrana da colônia começa a se fundir com a membrana plasmática da célula hospedeira, e isso é seguido pela ruptura do complexo de membrana abrindo um ponto nas membranas das células fusionadas, que permite a liberação das formas densas a partir do vacúolo parasitóforo sem perda do citoplasma da célula hospedeira. As riquetsias então são liberadas, iniciando uma nova série de infecções, resultando em células hospedeira contendo 5 ou mais colônias por células (BLOUIN; KOCAN, 1998). No presente estudo, todas essas etapas descritas acima foram observadas. A infecção atingiu aproximadamente 80% das células hospedeiras, sendo que várias células continham diversas colônias, quando as culturas foram então repicadas para novo frasco de células IDE8. O mecanismo de entrada de *A. marginale* nas células de carrapato por endocitose e a saída por um processo envolvendo a fusão das membranas da colônia e da célula hospedeira, parece ser o mecanismo controlado pela célula e pelo parasito, sugerindo uma molécula de adesão na superfície de *A. marginale* reconhecida pelo receptor de células hospedeiras (BLOUIN; KOCAN, 1998).

Outros estudos também verificaram a presença de células hospedeiras com diversas colônias por células (MUNDERLOH et al., 1996; BASTOS et al., 2009), além disso, essas colônias podem crescer consideravelmente e conter centenas de riquetsias (MUNDERLOH et al., 1996). Desta forma, uma garrafa de 25 cm² de IDE8 infectada

pode resultar em muito mais organismos de *A. marginale* do que a mesma quantidade de sangue altamente infectado, uma vez que as inclusões eritrocíticas contêm apenas de 4 a 10 riquetsias (RISTIC; WATRACH, 1963).

O momento de repique das células infectadas, com despreendimento das mesmas do fundo do frasco, confirmou o efeito citopático aparente que ocorre quando a maioria das células se torna infectada (BLOUIN; KOCAN, 1998).

As sequências do gene *msp1 α* de *A. marginale* a partir de bezerros mantiveram-se as mesmas após pelo menos seis passagens nas linhagens de células IDE8 e mesmo após a criopreservação e descongelamento. Estudos prévios demonstraram que a sequência da MSP1 α tende a permanecer a mesma após sucessivas passagens ou transmissão pelo carrapato (BASTOS et al., 2009; BOWIE et al., 2002).

Vários isolados geográficos têm sido descritos ao redor do mundo, apresentando uma diversidade genética entre eles. Essa diversidade está baseada principalmente no gene *msp1 α* (ALLRED et al., 1990; DE LA FUENTE et al., 2001a; DE LA FUENTE et al., 2002). A MSP1 α está envolvida na adesão e transmissão de *A. marginale* pelos carrapatos e varia em número e sequência de repetições em tandem entre as cepas geográficas, influenciando na infectividade dos isolados (DE LA FUENTE et al., 2007; DE LA FUENTE et al., 2005a). Apesar da grande diversidade genética do gene *msp1 α* , esse é considerado como um marcador genético estável conservado durante a riquetsemia aguda e persistente em bovinos e ainda durante a multiplicação em carrapatos (PALMER et al., 2000; BOWIE et al., 2002; DE LA FUENTE et al., 2003a).

Para a classificação de cepas de *A. marginale* são necessárias análises de genes variáveis que acumularam modificações filogenéticas suficientes durante a evolução e que permitam um alinhamento em vários locais. Genes como *msp5*, *gltA*, 16S RNAr, *groEL*, *groES* entre outros, são muito conservados entre as cepas de *A. marginale*, não fornecendo informações filogenéticas. A MSP1 e a MSP4 vêm apresentando-se úteis em estudos de análises filogenéticas (DE LA FUENTE et al., 2002). Porém, em algumas cepas, onde genes como MSP4 são conservados, as repetições em tandem de MSP1 α possuem modificações que permitem melhor diferenciação entre as diferentes cepas (ALAMZÁN, et al., 2008). No entanto, MSP1 α não é uma ferramenta perfeita e devido ao alto grau de variação da sequência dentro das áreas endêmicas, a sequência de MSP1 α não é capaz de fornecer informações filogeográficas como MSP4 faz (DE LA FUENTE et al., 2005a). Apesar disso, alguns estudos apresentaram sequências de MSP1 α presentes em cepas a partir de uma única região geográfica (CABEZAS-CRUZ et al., 2013; DE LA FUENTE et al., 2007).

A maioria das cepas de *A. marginale* tem sido registrada em uma determinada região geográfica, no entanto, outras cepas podem ser identificadas em mais de uma região (CABEZAS-CRUZ et al., 2013). A heterogeneidade genética entre as cepas dentro de uma mesma região endêmica pode ser explicada pelo movimento de bovinos e pela manutenção de genótipos diferentes através dos diferentes eventos de transmissão (ALAMZÁN et al., 2008; PALMER et al., 2004). Palmer et al. (2004) propõem um modelo de transmissão biológica estocástica, ou seja, não há evidência de ocorrência da transmissão de cepas preferenciais dentro de uma população persistentemente infectada, sendo assim pode-se ter uma grande diversidade genética numa mesma população.

Os resultados da análise filogenética demonstraram que as populações de *A. marginale* no Brasil e Argentina formam dois grandes clusters. Baseado em diversos fatores, pode-se verificar que o Cluster τ é mais variável que o Cluster α . Primeiramente, o Cluster τ tem oito cepas com 16 diferentes repetições em tandem,

enquanto que o Cluster α tem 14 cepas com apenas 19 repetições em tandem, ou seja, a proporção de repetições em tandem diferentes é maior no Cluster τ .

Outro fator é que das oito cepas presentes no Cluster τ , apenas duas se encontram dentro do mesmo braço da árvore, enquanto que no Cluster α , 10 das 14 cepas encontram-se no mesmo braço, desta forma, parece que as linhagens no Cluster τ diferem mais rapidamente a partir de linhagens parentais do que no Cluster α .

Apenas duas repetições em tandem (τ e 13) a partir do ancestral do Cluster τ são mantidas nas cepas deste cluster, e outras 3 repetições em tandem (ASR-I, ASR-II e 154) foram perdidas durante a diversificação genética desse grupo. Em contrapartida, todas as repetições em tandem presentes no Cluster α , exceto uma (repetição em tandem 3), estão mantidas nas cepas desse cluster. Assim, a substituição das repetições em tandem é mais rápida no Cluster τ do que no Cluster α .

Outra diferença entre os Clusters é que após a diversificação a partir dos ancestrais, algumas cepas no Cluster τ ganharam repetições em tandem enquanto que todas as cepas do Cluster α perderam. Esse aumento no número de repetições em tandem está associado à diversificação genética de MSP1a nessas cepas *A. marginale*.

Esses resultados sugerem que as linhagens pertencentes a esses dois clusters podem estar sob diferentes pressões de seleção. Um aumento na diversidade genética de MSP1a foi observado em áreas da Argentina onde *R. (B.) microplus* estava presente (RUYBAL et al., 2009). Outro estudo desenvolvido por Estrada-Peña et al. (2009) demonstrou um menor percentual de aminoácidos conservados em MSP1a oriundos de ecoregiões com *R. (B.) microplus*. As repetições em tandem de MSP1a, implicadas na interação patógeno-carrapato e o aminoácido na posição 20, implicado na adesão de extratos de células de carrapato (DE LA FUENTE et al., 2003b), estão sob seleção positiva (MUTSHEMBELE et al., 2014). Além disso, esta molécula contém um epítipo sensível à neutralização (ALLRED et al., 1990) e um epítipo de células B imuno-dominante (GARCIA-GARCIA et al., 2004) que estão sob seleção purificadora (seleção negativa) e seleção positiva (MUTSHEMBELE et al., 2014). Assim, duas forças evolutivas importantes podem estar formando uma diversidade de MSP1a: sistema imune do hospedeiro e as interações patógeno-carrapato. Novas combinações de repetições em tandem podem dar vantagem adaptativa para *A. marginale* em regiões com alta imunidade do hospedeiro e transmissão por carrapatos.

Assumindo que todas as cepas do Cluster α têm um ancestral comum de MSP1 α com estrutura de repetição em tandem (3- β - Γ - Γ - β - β -N), pode-se considerar AmRio1 como uma cepa altamente divergente quando comparada à AmRio2, que ainda conserva 3 repetições em tandem tipo β a partir do ancestral. No entanto, não está evidente se esta diversificação está relacionada ou não à transmissão por *R. (B.) microplus*. Mais estudos de transmissão são necessários para determinar se essas novas cepas isoladas e caracterizadas são transmissíveis por *R. (B.) microplus* e, se transmissíveis, se existe diferenças de aptidão de transmissão entre as cepas AmRio1 e AmRio2 relacionadas a essas diferenças nas sequências de MSP1a.

6 CONCLUSÕES

A linhagem de células de carrapato *I. scapularis* (IDE8) foi efetiva no isolamento e propagação de duas cepas de *A. marginale*.

As cepas isoladas AmRio1 e AmRio2 são geneticamente divergentes.

Análises do gene de uma repetição em tandem de MSP1a a partir da cepa AmRio1 resultou em uma nova sequência (nomeada de 162) com um aminoácido diferente.

Os resultados da análise filogenética demonstraram que as amostras isoladas de *A. marginale* no Brasil e Argentina formam dois grandes clusters, com a cepa AmRio2 mais próxima de cepas de Minas Gerais do que da cepa AmRio1.

Mesmo após seis passagens, a criopreservação por 6 meses e o descongelamento, a morfologia e as sequências do gene *msp1 α* dos *A. marginale* isolados mantiveram-se as mesmas.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALAMZÁN, C.; MEDRANO, C.; ORTRIZ, M.; DE LA FUENTE, J. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an outbreak of bovine anaplasmosis in an endemic area. **Veterinary Parasitology** v. 158 n. 1-2 p. 103-109, 2008.

ALLEMAN, A. R.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; MCELWAIN, T. F.; PERRYMAN, L. E.; BARBET, A. F. *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 1, p. 156, 1997.

ALLRED, D. R.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; LEIB, S. R.; HARKINS, T. M.; MCELWAIN, T. F.; BARBET, A. F. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 8, p. 3220-3224, 1990.

ARAUJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 139-148, 2003.

AUBRY, P.; GEALE, D. W. A review of bovine anaplasmosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 58, n. 1, p. 1-30, 2011.

BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; Myler, P. J.; MCGUIRE, T. C. Characterization of an Immunoprotective Protein Complex of *Anaplasma marginale* by Cloning and Expression of the Gene Coding for Polypeptide Am1O5L **Infection and Immunity**, v. 55, n. 10, p. 2428-2435, 1987.

BASTOS, C. V. **Isolado de Anaplasma marginale de baixa patogenicidade: cultivo in vitro e avaliação de proteção ao desafio com isolado de alta patogenicidade**. 2009. 130f. Tese (Doutorado em Parasitologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

BASTOS, C. V.; PASSOS, L. M. F.; VASCONCELOS, M. M. C.; RIBEIRO, M. F. B. *In vitro* establishment and propagation of a brazilian strain of *Anaplasma marginale* with appendage in IDE8 (*Ixodes scapularis*) cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 399-403, 2009.

BAUMGARTNER, W.; SCHLERKA, G.; FUMICZ, M.; STÖGER, J.; AWAD-MASALMEH, M.; SCHULLER, W.; WEBER, P. Seroprevalence survey for *Anaplasma marginale*-infection of Austrian cattle. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 39, n. 2, p. 97-104, 1992.

BELL-SAKYI, L.; PAXTON, E. A.; MUNDERLOH, U. G.; SUMPTION, K. J. Growth of *Cowdria ruminantium*, the causative agent of heartwater, in a tick cell line. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1238-1240, 2000.

BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F.; YI, J.; KOCAN, K. M.; SALIKI, J.T. Establishment and characterization of an Oklahoma isolate of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 301-313, 2000.

BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in cultured *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) cells. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 788–797, 1998.

BOWIE, M. V.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. **Gene**, v. 282, n. 1–2, p. 95-102, 2002.

CABEZAS-CRUZ, A.; PASSOS, L. M. F.; LIS, K.; KENNEIL, R.; VALDÉS, J. J.; FERROLHO, J.; TONK, M.; POHL, A. E.; GRUBHOFFER, L.; ZWEYGARTH, E.; SHKAP, V.; RIBEIRO, M. F. B.; ESTRADA-PEÑA, A.; KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J. Functional and Immunological Relevance of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a Sequence and Structural Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e65243, 2013.

CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V.; CECI, L.; BUONAVOGLIA, C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 1–2, p. 107-114, 2007.

CECI, L.; CARELLI, G. Tick-borne diseases of livestock in Italy: general review and results of recent studies carried out in the Apulia region. **Parassitologia**, v. 41, Suppl 1, p. 25-29, 1999.

CHEVENET, F.; BRUN, C.; BANULS, A. L.; JACQ, B.; CHRISTEN, R. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 10, p. 439, 2006.

CHOMEL, B. B.; CARNICIU, M. L.; KASTEN, R. W.; CASTELLI, P. M.; WORK, T. M.; JESSUP, D. A. Antibody prevalence of eight ruminant infectious diseases in California mule and black-tailed deer (*Odocoileus hemionus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, n. 1, p. 51-59, 1994.

CRINGOLI, G.; OTRANTO, D.; TESTINI, G.; BUONO, V.; DI GIULIO, G.; TRAVERSA, D.; LIA, R.; RINALDI, L.; VENEZIANO, V.; PUCCINI, V. Epidemiology of bovine tick-borne diseases in southern Italy. **Veterinary Research**, v. 33, n. 4, p. 421-428, 2002.

DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 2, p. 145-153, 2001a.

DE LA FUENTE, J.; LEW, A.; LUTZ, H.; MELI, M.L.; HOFMANN-LEHMANN, R.;

SHKAP, V.; MOLAD, T.; MANGOLD, A.J.; ALMAZÁN, C.; NARANJO, V.; GORTÁZAR, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; GARCÍA-PÉREZ, A.L.; BARRAL, M.; OPORTO, B.; CECI, L.; CARELLI, G.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75-89, 2005a.

DE LA FUENTE, J.; PASSOS, L. M. F.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; RIBEIRO, M. F. B.; FACURY-FILHO, E. J.; KOCAN, K. M. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 121, n. 3-4, p. 307-316, 2004b.

DE LA FUENTE, J.; RUYBAL, P.; MTSHALI, M. S.; NARANJO, V.; SHUQING, L.; MANGOLD, A. J.; RODRÍGUEZ, S. D.; JIMÉNEZ, R.; VICENTE, J.; MORETTA, R.; TORINA, A.; ALMAZÁN, C.; MBATI, P. M.; DE ECHAIDE, S. T.; FARBER, M.; ROSARIO-CRUZ, R.; GORTAZAR, C.; KOCAN, K. M. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. **Veterinary Microbiology**, v. 119, n. 2-4, p. 382-390, 2007.

DE LA FUENTE, J.; TORINA, A.; NARANJO, V.; CARACAPPA, S.; VICENTE, J.; MANGOLD, A. J.; VICARI, D.; ALONGI, A.; SCIMECA, S.; KOCAN, K. M. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from cattle farms in the province of Palermo, Sicily. **J. Vet. Med. Ser. B-Infect. Dis. Vet. Public Health**, v. 52, n. 5, p. 226-229, 2005b.

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; GARCIA-GARCIA, J. C.; RODRIGUEZ, S. D.; GARCIA, M. A.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 275-285, 2002.

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; KOCAN, K. M. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 65-76, 2001b.

DE LA FUENTE, J., GARCIA-GARCIA, J.C., BLOUIN, E.F., KOCAN, K.M. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. **Veterinary Microbiololy** v. 91, p. 265-283, 2003b.

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; PRADO, T. M.; KOCAN, K. M. *Anaplasma marginale* msp1alpha genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1609-1616, 2003a.

DE LA FUENTE, J.; VICENTE, J.; HÖFLEA, U.; RUIZ-FONS, F.; MERRA, I. G. F.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; KOCAN, K. M.; GORTAZAR, C. *Anaplasma* infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla-La Mancha, Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 3-4, p. 163-173, 2004a.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of 176 some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “EGH agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n.1, p.2145- 2165, 2001.

ESTRADA-PENA, A.; NARANJO, V.; ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; MANGOLD, A. J.; KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J. Phylogeographic analysis reveals association of tick- borne pathogen, *Anaplasma marginale*, MSP1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance. **BMC Biology**, v. 7, n. 57, p. 1-13, 2009.

EWING, S.A. **Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods.** In: Hidalgo, R.J., Jones, E.W. (Eds.), Proc. 7^o Nat. Anaplasmosis Conf., Mississippi State University, MS, p.395–423, 1981.

FELSENSTEIN, J. Mathematics vs. Evolution: Mathematical Evolutionary Theory. **Science**, v. 246, n. 4932, p. 941-2, 1989.

FRENCH, D. M.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Emergence of *Anaplasma marginale* Antigenic Variants during Persistent Rickettsemia. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 5834, 1999.

FRENCH, D. M.; MCELWAIN, T.F.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H. Expression of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2? Variants during Persistent Cyclic Rickettsemia. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 3, p. 1200, 1998.

GARCIA-GARCIA, J. C.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; HALBUR, T.; ONET, V. C.; SALIKI, J. T. Mapping of B-cell epitopes in the N-terminal repeated peptides of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and characterization of the humoral immune response of cattle immunized with recombinant and whole organism antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 98, n. 3-4, p. 137–151, 2004.

GASCUEL, O.; STEEL, M. Neighbor-joining revealed. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 11, p. 1997-2000, 2006.

GE, N. L.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; MURPHY, G. L. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adult using nonradioactive in situ hybridization. **Journal of Medical Entomology**, v.33, n.6, p.911–920, 1996.

GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil Epidemiology and control of bovine babesiosis and anaplasmosis in Southeast region of Brazil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 187, 2000.

- GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1–3, p. 109-119, 1995.
- GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 696-704, 2003.
- HILDAGO, R. J. Propagation of *Anaplasma marginale* in bovine lymph node cell culture. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 5, p. 635–640, 1975.
- JONSSON, N. N.; REID, S. W. J. Global climate change and vector borne diseases. **Veterinary Journal**, v. 160, n. 2, p. 87-89, 2000.
- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.
- KESSLER, R. H.; RISTIC, M. *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale*: invasion of and development of noninfected erythrocytes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, n. 12, p. 1744–1776, 1979.
- KESSLER, R. H.; RISTIC, M.; SELLS, D. M.; CARSON, C. A. *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale*: growth pattern and morphologic appearance **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, n. 12, p. 1767–1773, 1979.
- KOCAN, K. M. Development of *Anaplasma marginale* in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host. . In: LTD, E. H. (Ed.). **Morphology, Physiology and Behavioral Ecology of Ticks**. England: Sauer, J.R., Hair, J.A., 1986. p.472–505.
- KOCAN, K. M. DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F; EWING, S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2–4, p. 95-107, 2010.
- KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; GARCIA-GARCIA, J. C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v. 129, p. 285, 2004.
- KOCAN, K. M.; FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELENDEZ, R. D. Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 698, 2003.
- KOCAN, K. M.; GOFF, W. L.; STILLER, D.; CLAYPOOL, P. L.; EDWARDS, W.; EWING, S. A.; HAIR, J. A.; BARRON, S. J. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible cattle. . **Journal of Medical Entomology** v. 29, n. 4, p. 657–668, 1992.

- KUTTLER, K. L. *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 20, n. 1, p. 12-20, 1984.
- LEW, A.E., BOCK, R.E., MINCHIN, C.M., MASAKA, S., 2002. A msp1 alpha polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. **Veterinary Microbiology**. v. 86, n. 4, p. 325-335, 2002.
- MADRUGA, C. R.; AYCARDI, E. I.; PUT, N. Epidemiologia da anaplasmosse e babesiose em bovinos da região do cerrado do Estado de Mato Grosso do Sul. I. Prevalência. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 35, n. 5, p. 631-640, 1983.
- MARBLE, D. W.; HANKS, M. A. A tissue culture method for *Anaplasma marginale*. **Cornell Veterinary**, v. 62, n. 2, p. 196-205, 1972.
- MAZZOLA, V.; AMERAULT, T. E.; ROBY, T. O. Survival of *Anaplasma marginale* in *Aedes albopictus* cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, n. 8, p. 987-989, 1976.
- 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. 656-64, 1996.
- MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Formulation of medium for tick cell culture. **Experimental and Applied Acarology**, v. 7, n. 3, p. 219-29, 1989.
- MUNDERLOH, U. G.; LIU, Y.; WANG, M.; CHEN C.; KURTTI, T. J. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. **The Journal of Parasitology**, v. 80, n. 4, p. 533-43, 1994.
- MUTSHEMBELE, A. M.; CABEZAS-CRUZ, A.; MTSHALI, M. S.; THEKISOE, O. M. M.; GALINDO RUTH, C.; DE LA FUENTE, J. Epidemiology and evolution of genetic variability of *Anaplasma marginale* in South Africa. **Tick and Tick Borne Diseases**. v. 5, n. 6, p. 624-631, 2014.
- NIELSEN, R. Mapping mutations on phylogenies. **Systematic Biology**, v. 51, n. 5, p. 729-739, 2002.
- OTTE, M. J.; PÉREZ, Y. A. La anaplasmosis bovina en el departamento de Córdoba. Epidemiología, efectos de la infección en terneros y evaluación de las pérdidas económicas. Curso sobre actualización de prácticas pecuarias en bovinos de doble propósito . ICA-TURIPANA. 1987, 13p.
- PALMER, G. H.; BROWN, W. C.; RURANGIRWA, F. R. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 2, p. 167-176, 2000.

PALMER, G. H.; KNOWLES JR, D. P.; RODRIGUEZ, J. L.; GNAD, D. P.; HOLLIS, L. C.; MARSTON, T.; BRAYTON, K. A. Stochastic Transmission of Multiple Genotypically Distinct *Anaplasma marginale* Strains in a Herd with High Prevalence of *Anaplasma* Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5381–5384, 2004.

PALMER, G. H.; RURANGIRWA, F. R.; KOCAN, K. M.; BROWN, W. C. Molecular Basis for Vaccine Development against the Ehrlichial Pathogen *Anaplasma marginale*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 7, p. 281-286, 1999.

PALMER, G. H.; RURANGIRWA, F. R.; MCELWAIN, T. F. Strain composition of the Ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 631-635, 2001.

PASSOS, L. M. F.; LIMA, J. D. Diagnóstico de anaplasmosse bovina congênita em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 36, n.6, p. 743-744, 1984.

PASSOS, L. M. F. *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in tick cell lines: a review. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria**, v. 21, n. 2, p. 81-86, 2012.

PÉREZ, E.; LEROY, E.; CARRILLO, J. M. Anaplasmosis y piroplasmosis: estudio epidemiológico en la Estación Experimental Los Diamantes. **Ciencias Veterinarias (Heredia)**. v. 2, n. 1, p. 7-20, 1980.

POHL, A. E.; CABEZAS-CRUZ, A.; RIBEIRO, M. F. B.; DA SILVEIRA, J. A. G.; SILAGHI, C.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. F. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 129-135, 2013.

PUPKO, T.; PE'ER, I.; SHAMIR, R.; GRAUR, D. A fast algorithm for joint reconstruction of ancestral amino acid sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 6, p. 890-6, 2000.

RISTIC, M. Anaplasmosis. **Advances in Veterinary Science**, v. 7, n. 1, p. 111-192, 1960.

RISTIC, M. Y., WATRACH, A. Anaplasmosis. VI. Studies and a hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. **American Journal of Veterinary Research**, v. 24, n. 1, p. 267–277, 1963.

RUYBAL, P.; MORETTA, R.; PEREZ, A.; PETRIGH, R.; ZIMMER, P.; ALCARAZ, E.; ECHAIDE, I.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; FARBER, M. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1–2, p. 176-180, 2009.

SAMISH, M.; PIPANO, E.; HANA, G. Cultivation of *Anaplasma marginale* from cattle in a *Dermacentor* cell line **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 254–256, 1988.

SEVILLA, R. G.; CORCHERO, E.; PEÑA, J.; HABELA, M. A. Anaplasmosis y borreliosis bovina. **Bovis**, v. 108, n.1, p.77–84. 2002

SILAGHI, C.; KAUFFMANN, M., PASSOS, L. M. F.; PFISTER, K.; ZWEYGARTH, E. Isolation, propagation and preliminary characterisation of *Anaplasma phagocytophilum* from roe deer (*Capreolus capreolus*) in the tick cell line IDE8. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 2, n. 4, p. 204-208, 2011.

SMITH, T. H.; KILBORNE, F. L. Investigation into the nature causation and prevention of Texas or southern cattle fever. **Department of Agriculture Bureau of Animal Industry**, v. 1, n. 1, p. 177-304, 1983.

STICH, R. W.; KOCAN, K. M.; PALMER, G. H.; EWING, S. A.; HAIR, J. A.; BARRON, S. J. Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 8, p. 1377–1380, 1989.

THEILER, A. *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.): the marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. **Report of the Government Veterinary Bacteriologist for the year**, p. 7-64, 1910.

TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D. P; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; SUAREZ, C. E.; MCELWAIN, T. F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme- linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 777, 1998.

TORO BENÍTEZ, M., ARENAS, E. L.; GUILLÉN, A. T.; GARCÍA, J. A.; URBINA, R.; SILVA, M.; RISTIC, M.; MONTENEGRO-JAMES, S. Evaluación a campo de una vacuna inactivada bivalente (*B. bovis/B. bigemina*) contra la babesiosis bovina. **Veterinaria Tropical (Venezuela)**, v. 16, n. 1, p. 17-28, 1991.

YANG, Z.; KUMAR, S.; NEI, M. A new method of inference of ancestral nucleotide and amino acid sequences. **Genetics**, v. 141, n. 4, p. 1641-50, 1995.

ZAUGG, J. L.; GOFF, W. L; FOREYT, F.; HUNTER, D. L. Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *A. ovis*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 32, n. 1, p. 62-6, Jan 1996.

ZAUGG, J. L.; KUTTLER, K. L. Bovines anaplasmosis: in utero transmission and the immunologic significance of ingested colostral antibodies **American Journal of Veterinary Research** v. 45, n. 3, p. 570-572, 1984.

ZWEYGARTH, E.; JOSEMANS, A. I.; SPICKETT, A. M.; STEYN, H. C.; PUTTERILL, J.; TROSKIE, P. C.; MTSHALI, M. S.; BELL-SAKYI, L.; SHKAP, V.;

FISH, L.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F. *In vitro* cultivation of a south African isolate of an *Anaplasma* sp. in tick cell cultures. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 4, p. 251-5, 2006.

CAPÍTULO 2.
ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS DE CÉLULAS
EMBRIONÁRIAS DO CARRAPATO *Rhipicephalus*
(Boophilus) microplus

RESUMO

BAÊTA, Bruna de Azevedo. **Estabelecimento de linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2015. 97p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O cultivo de células dos diferentes órgãos e tecidos dos carrapatos constitui-se num substrato para cultivo de agentes por eles transmitidos. O objetivo do presente estudo foi estabelecer novas linhagens de células embrionárias de carrapato de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* com cepas oriundas do Brasil e caracterizá-las. Os carrapatos utilizados foram provenientes de cepa mantida em bezerros no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Após coleta, esses carrapatos foram lavados e esterilizados devidamente, colocados em placas de Petri estéreis e mantidos a estufa a 27°C, UR de 80%. No 13º dia de postura, a massa de ovos foi esterilizada, macerada, filtrada e centrifugada a 200 xg por 10 minutos. O “pellet” foi suspenso em meio Leibovitz’s L15 e dividido em 6 frascos de 25 cm², dos quais 3 contaminaram, um foi depositado no banco de células do Instituto Pirbright e outros 2 foram caracterizados no presente estudo através da análise molecular do gene 16S DNAr (PCR), curva de crescimento e microscopia de luz e epifluorescência. Com 60 dias de cultivo, as células passaram a apresentar um aspecto confluyente, caracterizando a formação da monocamada. O primeiro subcultivo foi realizado com sete meses e subsequentes passagens foram realizadas com intervalos de 30 a 45 dias, com taxa de divisão de 1:2 ou 1:3. Cada frasco primário e seus descendentes foram mantidos como linhagens independentes. Existiu uma completa similaridade (100%) das novas linhagens BMEBR1 e BMEBR2 com *R. (B.) microplus* do Brasil (EU918178.1), da Costa Rica (EU918179.1), do Paraguai (EU918180.1), entre outros. Ambas as cepas apresentaram menor crescimento que a linhagem de *R. (B.) microplus* BME/CTVM2 oriunda da Costa Rica. Além disso, essas linhagens possuem características de acidificação, produção de corpúsculo lipídico e estresse oxidativo diferentes entre si. As novas linhagens foram congeladas e descongeladas com sucesso não apresentando alterações morfológicas e de taxa de crescimento.

Palavras-chave: linhagem de células de carrapato, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, caracterização.

ABSTRACT

BAÊTA, Bruna de Azevedo. **Establishment of embryonic cell lines from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2015. 97p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The cell cultures of different organs and tissues of ticks are substrate to the culture of tick-borne pathogens. The aim of this study was to establish new lines of embryonic cells of *R. (B.) microplus* tick, with strains from Brazil and the characterization of them. The *R. (B.) microplus* ticks were from strains kept on calves in Parasitic Diseases Laboratory in Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. After collection, these ticks were properly washed, sterilized, placed in sterile Petri dishes, and kept at 27 ° C, 80% RH. On the 13th day of laying, the pool of eggs was sterilized, macerated, filtered and centrifuged at 200 xg for 10 minutes. The “pellet” was suspended Leibotiz’s L15 medium and divided into 6 flasks of 25 cm², of which 3 were contaminated, one was deposited in the tick cell bank of the Pirbright Institute and others two were characterized in the present study through molecular analysis of the 16S rDNA gene (PCR), growth curve and epifluorescence and light microscopy. Sixty days in culture, the cells began to show confluent aspect, reaching the formation of the monolayer. The first subculture was performed with seven months and subsequent passages were performed at intervals of 30 to 45 days, with a split ratio of 1: 2 or 1: 3. Each primary flask and their descendants were kept as independent lines. There was a complete similarity (100%) of new lines BMEBR1 and BMEBR2 with *R. (B.) microplus* in Brazil (EU918178.1), Costa Rica (EU918179.1), Paraguay (EU918180.1), among others. Both strains showed lower growth than *R. (B.) microplus* line from Costa Rica, BME/CTVM2. In addition, these strains have acidification characteristics, lipid corpuscle production and oxidative stress different from each other. The new strains were frozen and defrosted successfully, showing no morphological and growth rate changes.

Key-words: tick cell line, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, characterization

1 INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae), conhecido como carrapato dos bovinos, é originário da Ásia e sua distribuição se estende na América Central, América do Sul, Oriente, Sul da Flórida e África (GONZÁLES, 2002). A ocorrência e a dispersão desse carrapato em bovinos no Brasil são favorecidas por fatores climáticos e pela disponibilidade de raças sensíveis. Esse carrapato destaca-se como vetor principalmente da riquetsia *Anaplasma* sp e do protozoário *Babesia* spp, causadores da “Tristeza Parasitária Bovina”, responsáveis por prejuízos a pecuária brasileira.

Estudo provaram que linhagens celulares de carrapatos são ferramentas úteis para ajudar a definir a natureza complexa da relação hospedeiro-vetor-patógeno. O cultivo de células dos diferentes órgãos e tecidos dos carrapatos constitui-se num substrato para cultivo de agentes por eles transmitidos.

Diversas linhagens de células de *R. (B.) microplus* a partir de células embrionárias de carrapato já foram registradas, além de alguns estudos com inoculação de patógenos tais como riquetsias e borrelíias. Para elucidarem aspectos envolvidos na interação do carrapato e microrganismos por ele transmitidos, alguns estudos utilizaram a infecção de *Borrelia burgdorferi* em linhagens de células de carrapato, verificando a capacidade fagocítica de diversas linhagens (TEIXEIRA, 2014; KURTTI et al., 1993).

No Brasil, alguns estudos com cultivos primários de células embrionárias das espécies *R. (B.) microplus*, *Amblyomma cajennense* (REZENDE, 2008), *Rhipicephalus sanguineus* (TEIXEIRA, 2010) e *Dermacentor nitens* (BAÊTA, 2011) foram desenvolvidos, porém não foi possível o estabelecimento de linhagens de células de carrapatos no país.

O objetivo do presente estudo foi estabelecer *in vitro* novas linhagens de células embrionárias do carrapato *R. (B.) microplus* com cepas oriundas do Brasil e realizar a caracterização morfofuncional destas linhagens.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultivo Celular

Um método para estudar o comportamento de células animais livres de variações sistêmicas *in vivo* foi desenvolvido no início do século XX a partir do crescimento de fibras nervosas de embriões de sapos (HARRISON, 1907) e tecido conjuntivo de aves jovens (CARREL, 1912). Apenas em 1952, foi registrada a primeira tentativa de cultivo de tecido de carrapato, quando Weyer (1952) tentou manter riquetsias oriundas de intestino de piolhos em cultura de tecidos não infectados do carrapato *Rhipicephalus bursa*, mantendo a cultura por aproximadamente oito dias. Novas tentativas foram realizadas com ninfas, com sobrevivência das células por aproximadamente cinco meses (MARTIN; VIDLER, 1962; YUNKER; CORY, 1965). Em seguida, ovos de carrapatos passaram a ser material de estudo para tentativas de cultivos primários (EIDE; CALDWELL, 1973).

As culturas de células de carrapatos podem se originar de ovos embrionários e de órgãos como intestino, ovário e tubos de Malpighi. Segundo Kurtti e Büscher (1979), os dois estágios mais comumente utilizados para o cultivo de células é a ninfa e os ovos, pois esses possuem consideráveis atividades mitóticas. O primeiro estabelecimento de cultura de células de origem embrionárias de carrapato foi realizado por Medvedeva et al. (1972) com a espécie *Hyalomma asiaticum*, e posteriormente Pudney et al. (1973) estabeleceram o segundo cultivo com ovos de *R. (B.) microplus*.

O meio de cultivo utilizado parece ser um fator determinante na manutenção das células de carrapato. Para o cultivo de células de carrapatos, inicialmente, Řeháček e Brzostowski (1969) formularam um meio baseado na composição bioquímica da hemolinfa do carrapato na tentativa de criar condições fisiológicas para o cultivo *in vitro* das células desses artrópodes. Entretanto, a formulação não promoveu o crescimento celular contínuo previsto, levando assim à utilização de meios de cultivo empregados para células de vertebrados. O meio Leibovitz'sL-15, originalmente formulado para células de mamíferos, quando suplementado com soro fetal bovino e caldo triptose fosfato, permitiu o isolamento e a manutenção de células de diversas espécies de ixodídeos (KURTTI; MUNDERLOH, 1982; KURTTI et al., 1982). No entanto algumas células são mais exigentes e requerem a suplementação de alguns minerais e vitaminas presentes no meio Leibovitz'sL-15B (MUNDERLOH; KURTTI, 1985), que supriu as deficiências nutricionais presentes no Leibovitz'sL-15 (MUNDERLOH; KURTTI, 1989).

Outro fator importante é a temperatura de crescimento dessas células. A maioria delas cresce em temperatura de incubação entre 28°C e 34°C, embora existam células que suportam o crescimento a 37°C. Além disso, o pH do meio de cultura pode limitar o seu desenvolvimento, onde 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), e outras são propagadas em pH neutro a alcalino, capacitando o crescimento de patógenos ácido-sensíveis (MUNDERLOH et al., 1996). A capacidade de algumas espécies suportarem o crescimento em temperatura e pH mais altos, como no caso da linhagem de células de *Ixodes scapularis* (IDE8), que suporta o crescimento a 34°C e em pH 7,4, permitiu o co-cultivo de diversos patógenos como *Anaplasma marginale* (MUNDERLOH et al., 1996), *Ehrlichia ruminantium* (BELL-SAKYI et al., 2000) e *Ehrlichia canis* (EWING et al., 1995).

Durante o cultivo primário de células embrionárias de carrapato, o período de incubação dos ovos pode influenciar no estabelecimento de linhagens. Os embriões com aproximadamente metade do período de incubação representam um desenvolvimento satisfatório, estando em período de organogênese ativo e antes da formação da cutícula (KURTTI; BÜSCHER, 1979). Diversos cultivos primários estabelecidos a partir de ovos embrionados de carrapatos utilizaram ovos com idades próximas à metade do período de incubação total do ovo, como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (PUDNEY et al., 1973) e *Hyalomma asiaticum* (MEDVEDEVA et al., 1972) com ovos de 12-13 e 10-14 dias de incubação, respectivamente. As células de carrapatos iniciam a aderência na superfície do frasco após algumas horas de cultivo, ainda que por alguns dias essa aderência pode não ser completa (YUNKER, 1987). Após fixação, uma grande variedade de tipos celulares pode ser observada e formam ilhas de tecidos organizados, como músculos que se contraem (BAËTA, 2011). Células arredondadas, fusiformes e estreladas podem ser encontradas (KURTTI; MUNDERLOH 1983; TEIXEIRA, 2010; PUDNEY et al., 1973).

A formação da camada de células confluentes e subcultiváveis é o objetivo de qualquer tentativa de desenvolvimento de uma linhagem celular. A velocidade pela qual é atingida depende de vários fatores, mas principalmente do tamanho do inóculo e meio utilizado. Em geral, este estágio é atingido dentro de quatro semanas (KURTTI; BÜSCHER, 1979).

Após a formação da monocamada, um fator muito importante para o estabelecimento e manutenção de uma linhagem de células é a taxa de crescimento dessas células, influenciando diretamente na taxa de divisão, ou seja, uma linhagem de crescimento frágil e lento, como as células de carrapato, deve ter uma taxa de divisão de 1:2, enquanto que uma linhagem de células vigorosa e com crescimento rápido pode ser dividido em 1:8 ou 1:16 (FRESHNEY, 2005). A taxa de divisão, ou diluição, é também escolhida para estabelecer o intervalo de subcultivo e garantir que as células não sejam diluídas abaixo da concentração necessária para retomarem ao ciclo de crescimento dentro de um período razoável de 24 horas ou menos e não atingirem um platô antes do próximo subcultivo (FRESHNEY, 2005).

Durante o subcultivo das linhagens de células, existe um padrão normal de crescimento que deve ser respeitado para o sucesso da manutenção da linhagem. Um período de retardo (fase *lag*) logo após semear as células é seguido por um período de crescimento exponencial, chamado de fase *log*. Quando a densidade das células (célula/cm²) atinge um nível em que todo o espaço é ocupado, ou quando a concentração de células (célula / mL) excede a capacidade do meio, o crescimento cessa ou é reduzido (fase de platô) (Fig. 6) (FRESHNEY, 2005). A quantificação desse crescimento da cultura é importante para a rotina de manutenção, sendo um elemento crucial para monitorar a consistência da cultura e conhecer melhor o tempo para subcultivo, a diluição ótima e a eficiência do subcultivo em diferentes densidades celular. O tempo de duplicação da população (PDT), ou seja, o tempo necessário para a cultura duplicar no meio da fase exponencial de crescimento, é considerado um bom monitorador da cultura durante a passagem serial e possibilita o cálculo do rendimento da célula e do fator de diluição requerido para o subcultivo (FRESHNEY, 2005).

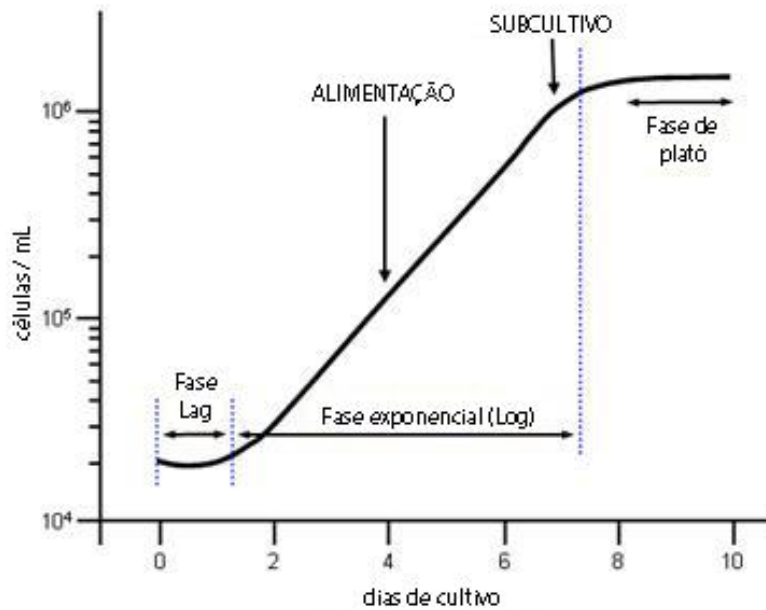


Figura 6. Curva de crescimento e manutenção. Concentração celular versus tempo a partir do subcultivo, indicando as fases *Lag*, *Log* e de platô, e o tempo ideal para a realização do subcultivo e alimentação. Adaptado de Freshney (2005).

Culturas de linhagens de células de carrapato podem ser extremamente duradouras, sobrevivendo durante vários anos com mudanças de meio regulares e subculturas ocasionais, refletindo a habilidade de carrapatos ixodídeos em resistir por períodos extremamente longos de tempo entre repastos sanguíneos na natureza (BELL-SAKYI et al., 2007). No entanto, o estabelecimento de linhagens contínuas não é tão simples, pois algumas células podem simplesmente parar de crescer mesmo após anos de manutenção. A primeira linhagem de célula de carrapato foi estabelecida a partir de tecidos de adultos em desenvolvimento de *Rhipicephalus appendiculatus* (VARMA et al., 1975). A maioria das atuais linhagens de células de carrapatos disponíveis foi estabelecida de células embrionárias, utilizando metodologias simples descrito por Kurtti et al. (1988), devido à grande capacidade de multiplicação desse estágio de desenvolvimento.

Algumas espécies de carrapato, tais como *R. appendiculatus* e *R. (B.) microplus*, têm produzido diversas linhagens de células em diferentes laboratórios, enquanto que células de outras espécies têm demonstrado dificuldades para o cultivo ininterrupto (YUNKER, 1987). Os argasídeos, por exemplo, têm recebido menor atenção que ixodídeos, retardando o estabelecimento de linhagens de células de argasídeos (KURTTI et al., 2005).

No Brasil, alguns estudos com cultivos primários de células embrionárias das espécies *R. (B.) microplus*, *A. cajennense* (REZENDE, 2008), *R. sanguineus* (TEIXEIRA, 2010) e *D. nitens* (BAÊTA, 2011) foram desenvolvidos, porém não foi possível o estabelecimento de linhagens de células de carrapatos no país.

As culturas de células de carrapatos *in vitro* fornecem sistemas de interações vetor e patógeno, surgindo como ferramentas úteis para ajudar a definir a natureza complexa da relação hospedeiro-vetor-patógeno (BELL-SAKYI et al., 2007). Além disso, podem ser utilizadas como substrato para produção de antígenos para diagnósticos, produção de vacinas e ainda substituem experimentos com animais. Esse

sistema fornece um modelo útil para estudos tais como a análise molecular, a transcrição do gene, as relações celulares e moleculares entre agentes patogênicos e vetores, e estudos comparativos *in vitro/in vivo* (PASSOS, 2012). A cultura de tecidos também dispõe da oportunidade para estudo da embriologia, fisiologia e morfologia de tecidos de carrapatos em suas diferentes fases de crescimento (MARTIN; VIDLER, 1962). Alguns estudos destacaram as características morfofuncionais das linhagens de carrapato, assim como a interação molecular entre células de carrapato e patógenos (DE LA FUENTE et al., 2007; ESTEVES et al., 2008; ESTEVES et al., 2009).

Borrelia burgdorferi foi utilizada para verificar a capacidade fagocítica de diversas linhagens de carrapato apresentando uma interação diferente para cada espécie de carrapato (TEIXEIRA, 2014). Alguns estudos com cultivo de células demonstraram a capacidade ou incapacidade vetorial de algumas espécies de carrapatos no cultivo de *B. burgdorferi*. (KURTTI et al., 1988b). Segundo Kurtti et al. (1988a), o cultivo de tecidos de carrapatos pode contribuir para esclarecimento dos mecanismos de aderência celular, migração dentro do hospedeiro, mecanismos de transmissão e a interação de espiroqueta com células do hospedeiro. A espiroqueta não parece ser altamente específica, embora tenham sido observadas diferenças em suas afinidades por células embrionárias de diferentes espécies de carrapatos (KURTTI et al., 1993). Esse sistema pode elucidar características morfofuncionais e auxiliar na caracterização das linhagens de carrapato de acordo com as respostas de cada uma frente a uma infecção.

2.2 Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Descrito pela primeira vez em 1887 por Canestrini, Flechtmann (1990), cita a seguinte classificação sistemática para o carrapato *Boophilus microplus*:

Filo – Arthropoda Von Siebold & Slannius, 1845

Subfilo – Chelicerata Heymons, 1901

Classe – Aracnida Lamarck, 1802

Subclasse- Acari Leach, 1817

Ordem – Parasitiformes Renter 1909

Subordem – Metastigmata Canestrini, 1891

Superfamília – Ixodida Leach, 1815

Família – Ixodidae Koch, 1844

Gênero – *Boophilus* Curtice, 1891

Em 2001, Beati e Keirans observaram algumas semelhanças moleculares entre os gêneros *Rhipicephalus* e *Boophilus*, onde com a construção de uma árvore filogenética o gênero *Boophilus* apresentou-se monofilético e agrupado dentro do gênero *Rhipicephalus*, no entanto evidenciaram a importância de alguns caracteres morfológicos que os diferenciavam. Já em 2003, Murrel e Barker propõem que *Boophilus* fosse considerado um sinônimo júnior e um subgênero de *Rhipicephalus* Koch, 1844, assim todas as espécies de *Boophilus* tornaram-se membros de *Rhipicephalus*. Desta forma a atual classificação denomina a espécie como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887).

O carrapato *R. microplus*, conhecido como carrapatos dos bovinos, é originário da Ásia e sua distribuição ocorre entre os paralelos 32° Norte e 32° Sul compreendendo, portanto, a América Central, América do Sul, Oriente, Sul da Flórida e África (GONZÁLES, 2002). A ocorrência e a dispersão desse carrapato em bovinos no Brasil

são favorecidas por fatores climáticos e pela disponibilidade de raças sensíveis (GRISI et al., 2014).

Rhipicephalus (Boophilus) microplus é um carrapato de único hospedeiro, onde seu ciclo biológico possui uma fase parasitária e outra não parasitária (Fig. 7). Na fase parasitária, as larvas infestam o bovino e se alimentam por 6-8 dias até sofrerem muda para ninfas, as quais atingem o estágio adulto em 7-9 dias com período total de parasitismo variando de 18-22 dias, podendo se estender até 30 dias (BARROS-BATTESTI et al., 2006). A fase não parasitária do ciclo é marcada pela oviposição das fêmeas no ambiente, seguida da eclosão das larvas e do acesso dessas a seus hospedeiros (WHARTON, 1974). Apesar de parasitarem preferencialmente bovinos, outros animais podem servir de hospedeiros e quando em alta infestação podem, eventualmente, parasitar humanos durante manipulação do animal (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

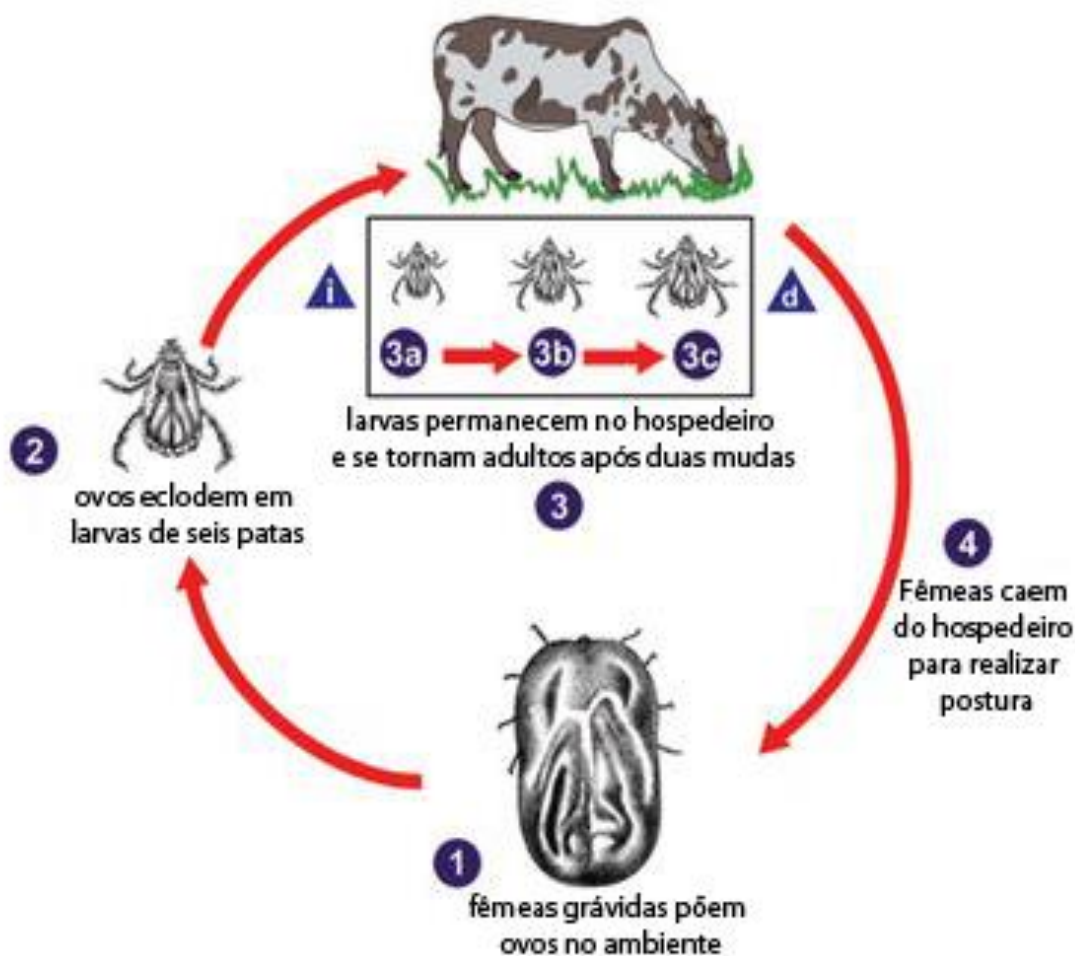


Figura 7. Ciclo biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Fêmeas grávidas põem ovos no meio ambiente (1). Os ovos eclodem em larvas de três pares de patas (2). Larvas procuraram e fixam-se ao hospedeiro e depois de duas mudas (larva-ninfa e ninfa-adulto), desenvolvem-se em adultos (3a-3c). As fêmeas caem do hospedeiro para realização da postura (4). O adulto de um carrapato ixodídeo (duro) é considerado o estágio de diagnóstico, onde a identificação em nível de espécie é melhor alcançada com adultos. Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention – CDC (CDC, 2014).

Esse carrapato destaca-se como vetor principalmente da riquetsia *Anaplasma* sp e do protozoário *Babesia* spp, responsáveis pela “Tristeza Parasitária Bovina”, causadora de grandes prejuízos ao sistema de produção. Nunes et al. (2005) verificaram a presença de microrganismos nas glândulas salivares de alguns espécimes desta espécie, o que evidencia a potencialidade destes carrapatos na transmissão de patógenos.

Nas áreas com altas infestações por *R. (B.) microplus*, os danos produzidos pelo carrapato levam a grandes prejuízos, os quais estão relacionados à mortalidade, diminuição no ganho de peso, efeitos sobre o couro, gastos com carrapaticidas e diminuição na produção de leite (GRISI et al., 2014). Além de predispor a miíases e transmitirem os agentes patogênicos causadores da anaplasmose e babesiose.

2.3 Cultivo de Células Embrionárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

A primeira linhagem de células de *R. (B.) microplus* registrada foi desenvolvida a partir de culturas de células embrionárias (PUDNEY et al., 1973). Durante o experimento, ovos com idade de 12-13 dias de incubação foram utilizados para a preparação do macerado de células, o qual foi filtrado e lavado com solução salina contendo penicilina e estreptomicina. Após centrifugação e remoção do sobrenadante o “pellet” foi ressuspenso em meio de solução salina balanceada de Hanks’ com 0,5% de lactalbumina bovina (H-Lac) suplementado com soro fetal bovino (10%), penicilina (1000U) e estreptomicina (1ng), pH 6,9. As culturas foram incubadas a 28°C. As células obtiveram variação na morfologia, com a maioria arredada ou epitelial. Além disso, células tipo fibroblastos também foram observadas.

Em 1979, Bhat et al. (1979), seguindo a metodologia de cultivo descrita por Pudney et al. (1973) desenvolveram cultivos primários de células embrionárias de *R. (B.) microplus* em meio L-15 para o co-cultivo de *Babesia bovis* a partir de sangue bovino infectado.

Um ano após, uma nova linhagem de células embrionárias de *R. (B.) microplus* foi estabelecida com ovos de 10 dias de incubação em meio contendo Meio Mínimo Essencial (MEM) e L-15, suplementado com soro fetal bovino (20%), caldo triptose fosfato (10%), 1% de albumina bovina fração V, estreptomicina (200 µl/mL), penicilina (200 U/mL) e anfotericina B (0,5 µl/mL) (HOLMAN; RONALD, 1980). Em 2004, outras duas novas linhagens foram estabelecidas com utilização de meio L-15 para estudo de interação patógeno-vetor com *Ehrlichia ruminantium* (BELL-SAKYI, 2004).

Cultivo de órgãos de *R. (B.) microplus* foram desenvolvidos apenas em 2008, a partir de glândula salivar, intestino e ovário (MOSQUEDA et al., 2008). Esses órgãos foram dissecados em diferentes dias após infestação em bovinos, com utilização de enzimas proteolíticas como tripsina e colagenase tipo I e II, para a desagregação dos tecidos e geração de culturas primárias. O meio de cultura utilizado foi o mesmo descrito por Holman e Ronald (1980). Órgãos dissecados com 18 a 20 dias após infestação dos bovinos apresentaram melhores diferenciações celulares com maior facilidade de visualização da morfologia celular. A colagenase tipo I obteve melhores resultados na desagregação celular para ovários, porém não para intestinos e glândula salivar, já a colagenase tipo II foi mais eficaz para a glândula salivar, enquanto que tripsina foi eficaz apenas para o intestino. Nesse estudo, os cultivos primários de intestino e ovário foram mantidos durante 4 semanas, enquanto que as glândulas salivares foram viáveis por 8 meses.

Estudos com culturas de células primárias de diferentes órgãos de carrapatos são ferramentas valiosas para a pesquisa da relação parasita-hospedeiro para protozoários

como *Babesia* sp, pois estes infectam diferentes órgãos e possuem diferentes estágios de vida, dificultando seu desenvolvimento apenas em células embrionárias (KURTTI et al., 1983; RIBEIRO et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem dos Carrapatos

Fêmeas ingurgitadas da espécie *R. (B.) microplus*, mantidas em laboratório com mais de 20 gerações em bezerros foram obtidas a partir de infestação experimental de bezerros saudáveis, sem sintomatologia clínica, pertencentes ao setor de bovinocultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.2 Cultivo Primário de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

No laboratório de doenças parasitárias, dez fêmeas foram lavadas com água corrente e água destilada. Em capela de fluxo laminar, para a esterilização das superfícies, os carrapatos foram lavados com álcool 70%, hipoclorito de sódio 1%, clorexidina 0,2% e álcool 70%, por 1 minutos cada, e por fim água ultrapura estéril com adição de antibiótico 100 un/ml de penicilina e 1 ng/ml estreptomicina e antifúngico anfotericina B. Em seguida, as teleóginas foram secas com gaze esterilizada, colocadas em placas de Petri estéreis, e incubadas em estufa tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D.) a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar superior de 80%, para realização da postura.

O método de cultivo celular foi baseado no trabalho de Yunker (1987), com modificações descritas a seguir. O meio de cultivo utilizado para as células embrionárias de *R. (B.) microplus* foi o Leibovitz'sL-15 (Sigma®), suplementado com 10% de caldo triptose fosfato (Sigma®), 20% de soro fetal bovino inativado (Invitrogen®), 1% de glutamina (Sigma®) e 0,1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma®). O pH foi ajustado para 6,8 e o meio esterilizado em filtro de nitrocelulose com porosidade 0,22 μm .

Após dois dias da coleta e lavagem dos carrapatos, iniciou-se a oviposição e ovos com 13 dias de incubação (aproximadamente metade do tempo de desenvolvimento total do ovo) foram utilizados. Os ovos embrionados foram removidos da placa de Petri para um béquer com o auxílio de uma pinça e submetidos a três lavagens com álcool 70% e uma lavagem com água ultrapura estéril. Posteriormente, com o acréscimo de 2 mL de meio de cultura L-15 suplementado, os ovos foram macerados por pressão, com o auxílio de um êmbolo de seringa hipodérmica de vidro de 20mL. Após a ruptura da maioria dos ovos, o material em suspensão foi filtrado com um filtro de malha de 200 fios estéril um para a remoção dos ovos intactos e das cascas. Em seguida, o material foi centrifugado a 200xg por oito minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso cuidadosamente em 12 mL de meio L-15 suplementado. Volumes iguais desta nova suspensão foram distribuídos em 6 frascos de 25cm², com adição do meio L-15 suplementado para obtenção de volume final igual a 5mL/frasco e incubados à 28°C.

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

3.3 Congelamento e Manutenção da Linhagem

Na quarta passagem, com o objetivo de verificar a estabilidade das células após a criopreservação, um frasco de cada uma das duas linhagens estabelecidas, ao atingirem uma densidade celular de 1,5 a 2 x 10⁶ células/mL (FRESHNEY, 2005),

foram criopreservados em meio de cultura L-15 com dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% como criopreservante. Após ressuspender as células, cada linhagem foi transferida para tubo Falcon de 15 mL e centrifugada à 200xg por 10 minutos. Posteriormente, o material foi ressuspensão em 2 mL de meio L15 refrigerado e então acrescentado mais 2 mL de meio L15 com DMSO a 20%, desta forma a concentração final de DMSO foi de 10%. A suspensão de células com DMSO foi transferida para quatro criotubos, com 1 mL em cada, e então os criotubos foram mantidos em container com isopropanol ao fundo (NalgeneTMCryo 1°C Freezing container) em freezer -80°C por 90 minutos para atingir uma taxa de congelamento de -1°C por minuto. Após decorridos 90 minutos, os criotubos foram transferidos para botijão de Nitrogênio Líquido (-196°C), onde foi mantido até o descongelamento.

3.4 Taxa de Crescimento

Seguindo protocolo utilizado para quantificar o crescimento de células com taxa de crescimento lento descrito por Freshney (2005), placas de 24 poços foram semeadas com três linhagens de células embrionárias de *R. (B.) microplus*, BMEBR1 e BMEBR2 (estabelecidas nesse estudo) e BME/CTVM2 (originária da Costa Rica) (BELL-SAKYI, 2004), para efeito de comparação. As primeiras duas linhagens foram subcultivadas na 15ª passagem e a última na 140ª passagem. Todas essas linhagens utilizavam o meio L15 suplementado para manutenção.

Cada linhagem foi semeada em 24 poços na concentração de 1×10^5 células/mL, com 1 mL em cada poço, e incubadas a 30°C. A cada 3 dias, 2 poços de cada linhagem era ressuspensão e a contagem das células era realizada utilizando câmara de Neubauer para determinar a concentração de células (células/mL) e a curva de crescimento.

Trocas semanais de meio foram realizadas com retirada lentamente de 0,5 mL para evitar que as células se soltassem do fundo da placa.

O PDT de cada linhagem foi calculado durante a fase exponencial com base na seguinte fórmula:

$$G = \ln 2 / \mu$$

onde G é tempo de duplicação,

μ é a velocidade de crescimento, calculada pela equação de uma reta ($y = b+ax$), onde $a = \mu$. A equação da reta é baseada no log neperiano (ln) da contagem celular.

3.5 Extração de DNA, Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e Sequenciamento

O DNA foi extraído utilizando QIAamp DNA Mini Kit® (QIAGEN) a partir de cada cultura de células de carrapato quando essa atingiu 10^6 células/mL na quinta passagem. As condições de PCR incluíram uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos para anelamento dos primers e 45 segundos a 72°C para extensão. A temperatura de anelamento dos primeiros 7 ciclos foi aumentada de 0,3°C a cada ciclo de 47 para 48,8°C, seguido por 28 ciclos com temperatura de anelamento de 50°C. A extensão final foi realizada por 7 minutos à 72°C. Os primers utilizados para a amplificação do fragmento X do gene 16S DNAr com tamanho variando de 378-397 pares de base (pb) (MANGOLD et al., 1998).

O produto da PCR foi separado em gel de agarose 1,5% e corado com Brometo de Etídio utilizando o marcador de 100pb (Ladder Mix1/2 Loading dye, Fermentas Life Science, Germany) e visualizados sob luz UV.

A purificação do produto da PCR foi realizada com kit da GE Healthcare e quantificada com Low DNA Mass Ladder seguindo as recomendações do fabricante. Após a purificação, o produto foi enviado para sequenciamento. O sequenciamento de ambas as fitas foi realizado utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit e analisado no ABI 3730 DNA Analyser (tecnologia a partir da technology Applied Biosystems). Os resultados foram avaliados com Chroma©Lites (www.technelysium.com.au/chromas_lite.html) e as similaridades das sequências foram pesquisadas pela análise de alinhamento local (BLASTn) (www.ncbi.nlm.nih.gov.library.vu.edu.au/BLAST/).

3.6 Microscopia

3.6.1 Morfologia

Para a verificação da morfologia das células das linhagens estabelecidas no presente estudo, aproximadamente 1000 células de cada linhagem estabelecida a partir da décima passagem foram plaqueadas em placas de 24 poços com lamínulas e incubadas em meio L-15 completo por 3 dias. Após esse período, as lamínulas foram lavadas com PBS e observadas em microscopia de fluorescência convencional e contraste diferencial de fase (DIC) utilizando um microscópio Zeiss Axioplan 2.

3.6.2 Microscopia de epifluorescência

As linhagens foram caracterizadas através da microscopia de fluorescência verificando a influência da infecção por *Borrelia burgdorferi* em três linhagens de células embrionárias do carrapato *R. (B.) microplus*, BMEBR1, BMEBR2 (estabelecidas neste estudo) e BME/CTVM2, para efeito de comparação das linhagens. Cada linhagem foi depositada sobre lamínulas inseridas em poços de placas de cultivo de 24 poços na concentração de 2×10^5 células/mL, 1mL/poço, com 6 repetições de cada linhagem para cada ensaio experimental. Três repetições de cada linhagem foram mantidas negativas, utilizadas como controle, as demais foram infectadas com *B. burgdorferi* marcada ou não com fluoróforo, dependendo do ensaio.

Seguindo a metodologia descrita por Teixeira (2014) para marcação da borrelia, primeiramente estas foram mantidas em cultivo no meio BSK-H suplementado com 6% de soro de coelho, então foram contadas em câmara de Neubauer para determinação da concentração. Em uma capela de fluxo laminar, transferiu-se 1mL de bactéria à concentração de aproximadamente 4×10^7 espiroquetas/mL para tubo estéril de 1,5mL do tipo Eppendorf®, que foi centrifugado por $9.000 \times g$ por 5 minutos em microcentrífuga. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e o “pellet” foi ressuspenso em 1mL de solução salina balanceada de Hanks’ (HBSS) (Life Technologies®). O tubo foi centrifugado à mesma rotação e pelo mesmo tempo e o sobrenadante foi retirado. Em outro tubo, preparou-se a solução de 200µL de diluente C + 2µL do corante PKH (componentes do minikit PKH67 ou PKH26). O “pellet” foi ressuspenso em 200µL de diluente C e posteriormente adicionou-se 200µL da solução de diluente + corante, com incubação a temperatura ambiente por 5 minutos, agitando periodicamente a cada minuto. Após a incubação, interrompeu-se a coloração avolumando 1mL de soro fetal bovino inativado (Life Technologies®), incubando à temperatura ambiente por 1 minuto. Novamente o material foi centrifugado a $9.000 \times g$ por 5 minutos, o sobrenadante removido e o “pellet” ressuspenso em 200µL do meio BSK-H.

Para todas as análises de fluorescência, foi utilizado o microscópio de epifluorescência Axio Observer.Z1 (Zeiss®), do Laboratório de Microbiologia Celular

do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - RJ. As imagens foram capturadas através de CCD (AxioCam, Zeiss, Germany) controlada pelo software Axiovision (Zeiss, Alemanha). Contraste e brilho foram posteriormente ajustados de maneira igualitária através do uso do Photoshop. A média da fluorescência de cada ensaio foi mensurada no programa ImageJ 1.48v, através das imagens geradas em microscópio de epifluorescência. Para comparação das médias utilizou-se os testes paramétricos análise de variância e teste de Tukey com nível de significância 5%. A análise foi realizada com o auxílio do programa InStat 3.3v.

3.6.2.1 Ensaio de percentual de infecção

Para microscopia de fluorescência as linhagens, após serem depositadas nos poços, foram inoculadas com 10 µL de borrelias marcadas com PKH67 em três poços de cada linhagem, totalizando aproximadamente 1×10^6 espiroquetas/poço, avolumando os poços com volume total de meio L15 de 300 µL/ poço. Decorridas 6 horas de incubação a 30°C 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 2µM do 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 depositadas em lâminas sobre solução de montagem ProlongGold e seladas com esmalte Etelan para posterior leitura em microscópio de epifluorescência AxiObserver Z1 (Zeiss, Alemanha), utilizando o Filtro Zeiss 60 e LED 365nm no sistema de excitação Colibri (Zeiss, Alemanha).

3.6.2.2 Ensaio de corpúsculo lipídico

No ensaio de verificação de corpúsculo lipídico, 10 µL de borrelias marcadas com PKH67 foram inoculadas em três poços de cada linhagem, totalizando aproximadamente 1×10^6 espiroquetas/poço, avolumando os poços com volume total de meio L15 de 300 µL/ poço. A placa foi incubada por 6 horas a 30°C, ao abrigo da luz. Após esse tempo, todos os poços das três linhagens foram lavados três vezes com HBSS e então as células foram marcadas por 1 min utilizando-se corante hidrofóbico Bodipy 30µM em meio L15, utilizando filtro Zeiss 61 e LED 450nm no sistema de excitação Colibri (Zeiss, Alemanha).

3.6.2.3 Ensaio de acidificação

Para o ensaio de acidificação, o mesmo protocolo para Bodipy foi utilizado com o marcador Laranja de Acridina (LA) na concentração de 40µM, responsável por emissão verde em ambiente neutro e vermelho em ambientes ácidos. A bactéria não foi marcada. No momento da leitura, as lamínulas foram retiradas dos poços e sobrepostas em lâminas de vidro para visualização no microscópio de fluorescência. Foram utilizados os filtros Zeiss 61 e LED 470nm para o registro dos ambientes neutros. As estruturas ácidas foram observadas utilizando-se o filtro Zeiss 28 em associação com LED 530nm no sistema de excitação Colibri (Zeiss, Alemanha).

3.6.2.4 Ensaio de estresse oxidativo

No ensaio de estresse oxidativo, foi utilizado o marcador DHE (di-hidroetídio) na concentração de 5 μ M, no entanto a bactéria não foi marcada. Essa marcação indica a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). No momento da leitura, as lamínulas foram retiradas dos poços e sobrepostas em lâminas de vidro para visualização no microscópio de fluorescência. Utilizamos os filtros Zeiss 28 com o LED 530 nm no sistema de excitação Colibri (Zeiss, Alemanha).

3.7 Citometria de Fluxo

Durante a citometria, três linhagens de células embrionárias de carrapato *R. (B.) microplus*, BMEBR1, BMEBR2 (estabelecidas neste estudo) e BME/CTVM2, foram utilizadas para efeito de comparação das linhagens. Cada linhagem foi depositada em poços de placas de cultivo de 24 poços sem lamínulas na concentração de 2 x 10⁵ células/mL sem lamínulas, 1mL/poço, com 6 repetições de cada linhagem para cada ensaio experimental. Três repetições de cada linhagem foram mantidas negativas, utilizadas como controle, as demais foram infectadas com *B. burgdorferi* marcada com fluoróforo.

Para a quantificação de bactérias internalizadas, a espiroqueta foi previamente marcada com PKH26 seguindo a mesma metodologia descrita acima. Então 10 μ L da suspensão de bactéria foi inoculado em três poços de cada linhagem avolumados para 300 μ L de meio L15 por poço. Após 6 horas de incubação a 30°C, os meios de cultivo foram retirados dos poços por aspiração suave e os poços lavados gentilmente três vezes com HBSS para retirada das espiroquetas livres. Depois desse procedimento, as células foram ressuspensas gentilmente por raspagem e rinsagem com 500 μ L de HBSS/poço e colocadas em tubos de 1,5mL para realização da citometria.

Os ensaios de verificação de corpúsculo lipídico, de estresse oxidativo e de acidificação foram repetidos para a realização da citometria, no entanto, as células foram cultivadas em placas de 24 poços sem lamínula. Após a incubação com a bactéria por 6 horas a 30°C, as células foram marcadas com Bodipy, LA ou DHE por 1 min nas mesmas concentrações acima e então lavadas com HBSS para posterior realização da citometria.

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

4. RESULTADOS

4.1 Cultura Primária e Estabelecimento das Linhagens Celulares

Seis frascos de cultivo primário foram iniciados a partir do conjunto de ovos de 10 fêmeas de carrapato, porém três desses cultivos desenvolveram contaminação bacteriana. A partir do segundo dia de início de cultivo foi observada a fixação da maioria das células na superfície dos frascos, com inúmeros agregados celulares. Após fixação, foi observada uma grande variedade de tipos celulares que começaram a se diferenciar e formaram ilhas de tecidos organizados, como músculos (Fig. 8A). Estas ilhas gradativamente foram cobertas de células de morfologia não especializada, onde durante os primeiros 30 dias, foi observada a presença de células fibroblastóides e posteriormente, células epitelióides e arredondadas (Fig. 8B). Com 60 dias de cultivo, as células passaram a apresentar um aspecto confluyente, caracterizando a formação da monocamada (Fig. 8C).

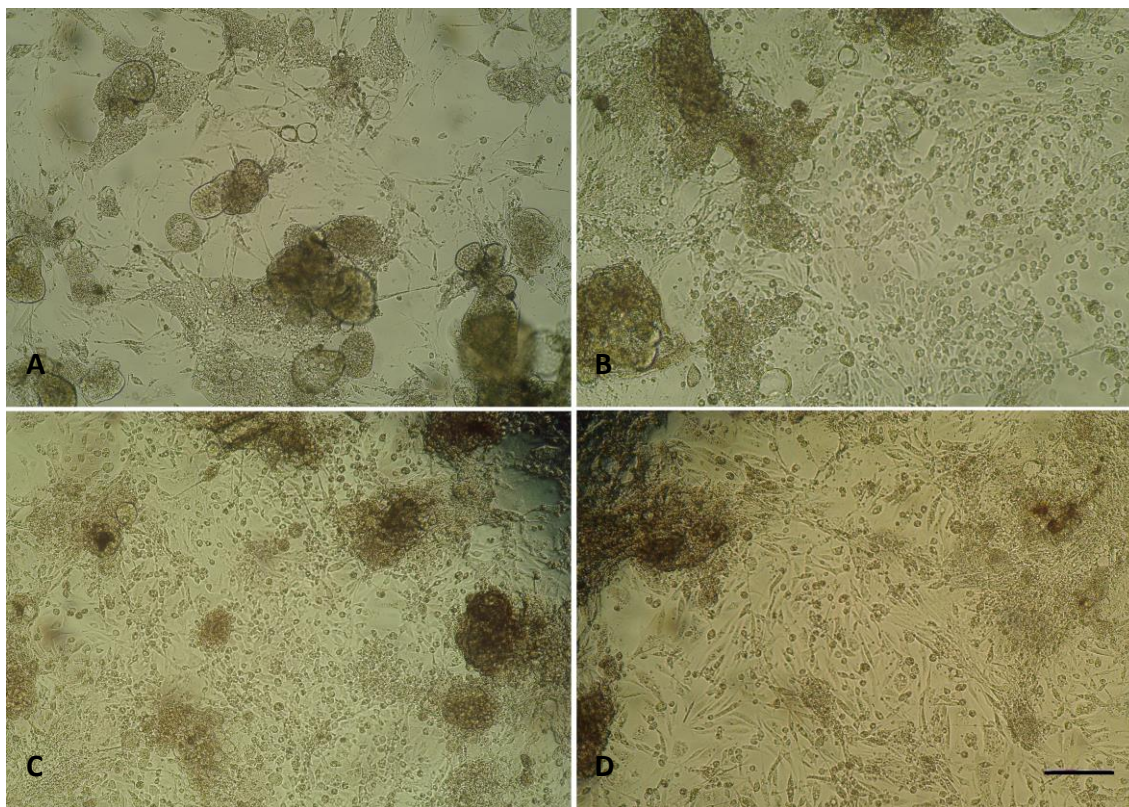


Figura 8. Cultura primária *in vitro* de células embrionárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cultivadas em meio Leibovitz's L-15 com dois (A), 30 (B), 60 (C) dias de cultivo e após o primeiro subcultivo (D). Microscópio de contraste de fase invertido. Barra de escala representa 250 μm .

Um desses três frascos restantes de cultivo primário foi depositado no banco de células de carrapato do Instituto Pirbright (Pirbright, Reino Unido), onde está sendo mantido com diversos repiques e congelamentos pela Dra. Lesley Bell-Sakyi. Os três frascos tiveram o primeiro subcultivo após 7 meses (Fig. 8D). A partir daí os dois frascos mantidos no Brasil tiveram subsequentes passagens com intervalos de 30 a 45 dias, com taxa de divisão de 1:2 ou 1:3. Após suspensão das células com pipeta Pasteur

estéril, metade foi transferido para novo frasco e outra metade mantido no frasco original. Cada frasco primário e seus descendentes foram mantidos como linhagens independente, nomeados como BOOM1, BOOM2 (mantidas no LDP-Brasil) e BOOM3 (depositado no Banco de células de carrapato do Instituto Pirbright – Reino Unido).

Na quarta passagem, um frasco de BOOM1 e de BOOM2, ao atingirem uma densidade celular de $1,5$ a 2×10^6 células/mL, foram criopreservados com 10% de DMSO e descongelado após 30 dias. Após a segunda criopreservação as células cresceram normalmente, não modificando sua morfologia e as linhagens foram renomeadas como BMEBR1 e BMEBR2.

Durante a quantificação do crescimento das linhagens BMEBR1, BMEBR2 e BME/CTVM2, foi possível verificar que as fases *log* e de platô e ainda o PDT da linhagem BME/CTVM2 foram atingidos em menor tempo que nas linhagens BMEBR1 e BMEBR2. Além disso, as duas linhagens estabelecidas no presente estudo apresentaram uma curva de crescimento similar, como demonstrado na figura 9. Na fase de platô da linhagem BME/CTVM2 foi verificada uma redução no número de células, porém esta manteve a mesma quantidade de células que as outras linhagens na mesma fase (Fig. 9).

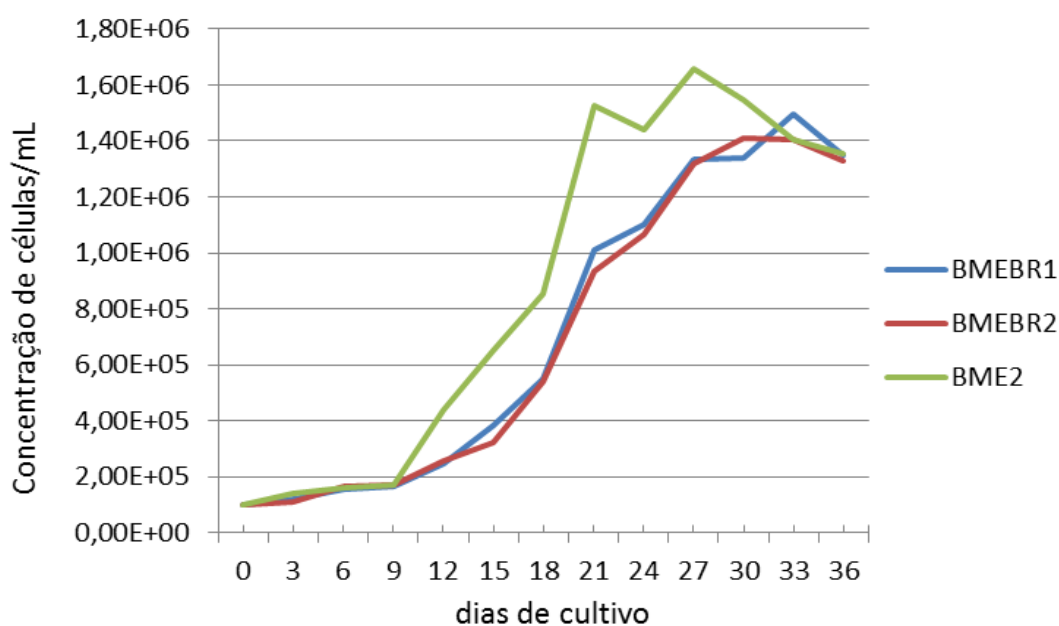


Figura 9. Curva de crescimento das linhagens de células de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* BMEBR1, BMEBR2 e BME/CTVM2 em meio de cultivo Leibovitz's-L15.

Com base no cálculo do PDT através das equações das retas durante o período exponencial (Fig. 10), a linhagem BME/CTVM2 apresentou menor valor, seguida das linhagens BMEBR1 e BMEBR2, com o período de 5,22, 5,70 e 5,78 dias respectivamente. As linhagens BMEBR1 e BMEBR2, após o dia 9 (fase *lag*) cresceram de forma logarítmica por 21 dias até atingirem a fase de platô ao 27º dia com uma concentração de células de aproximadamente $1,4 \times 10^6$ células/mL. Já a linhagem BME/CTVM2, após 9 dias (fase *lag*), obteve sua fase exponencial (*log*) que durou 15 dias, até alcançar a fase de platô ao 21º dia de cultivo.

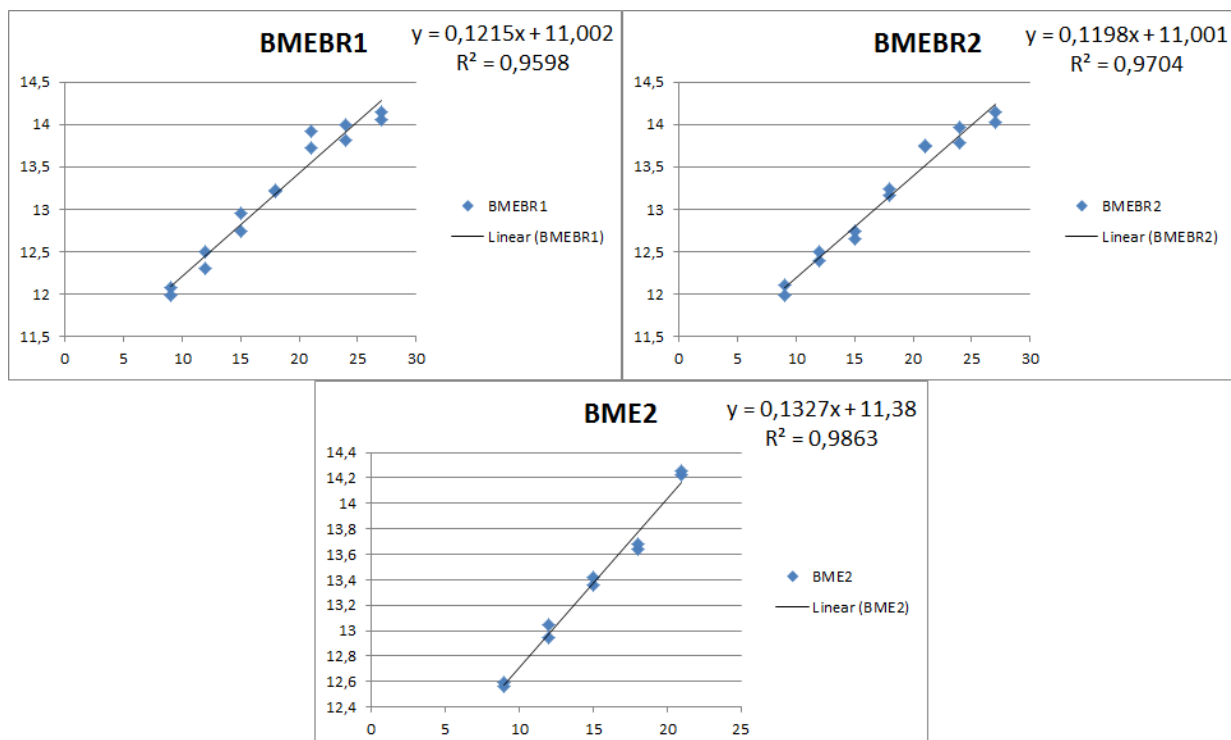


Figura 10. Linhas de tendência e equação da reta da fase exponencial das linhagens de células de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BMEBR1, BMEBR2 e BME/CTVM2), após transformação dos dados por *log* neperiano (ln).

4.2 Confirmação da Identidade das Linhagens de Células de *R. (B.) microplus*

A origem das novas linhagens de *R. (B.) microplus* foi confirmada pela amplificação do gene 16S DNAr. Existiu uma completa similaridade (100%) das linhagens BMEBR1 (Fig.11) e BMEBR2 (Fig. 12) com *R. (B.) microplus* do Brasil (EU918178.1), da Costa Rica (EU918179.1), do Paraguai (EU918180.1), entre outros.

Contagem	Identidade	Lacunas	Margem	
680 bits(368)	0.0	368/368pb(100%)	0/368(0%)	Plus/Minus
Query 1	ACTTCTTATTTTAATATCTTCATTAAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAAC		60	
Sbjct 383	ACTTCTTATTTTAATATCTTCATTAAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAAC		324	
Query 61	TTTTTTGTCAATATGATCTATCAAAAAATATAACGCTGTTATCCCTAGAGTatTTaatca		120	
Sbjct 323	TTTTTTGTCAATATGATCTATCAAAAAATATAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAATCA		264	
Query 121	tattttcattaataatggggtcatttttaaaattaaaaagtttttaaatatttttaaccgcc		180	
Sbjct 263	TATTTTCATTAATAATGGGTCATTTTAAATTAATAAGTTTTTAATATTTTAAACGCC		204	
Query 181	ccagttaaaatttaattaaaacaaaaatgtattatttaaatttttaaaattCCTAGGGT		240	
Sbjct 203	CCAGTTAAAATTTAATTAAAACAAAAATGTATTATTTAAATTTAAAATTCCTAGGGT		144	
Query 241	CTTCTTGTCTttaatttttataattgtttttacacaaattaaaaaaatttcaatttttaa		300	
Sbjct 143	CTTCTTGTCTTTAATTTTATAATTGTTTTTACACAAATTAATAAATTTCAATTTTAA		84	
Query 301	ttttaagaagttgttttttGATATTCATTCTCTTAGCATTCAATTAATAATCTTATTTTC		360	
Sbjct 83	TTTAAAGAAAGTTGTTTTTGTATTTCCATTCTCTTAGCATTCAATTAATAATCTTATTTTC		24	
Query 361	AATACCTT 368			
Sbjct 23	AATACCTT 16			

Figura 11. Alinhamento da linhagem de célula de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BMEBR1) com 100% de similaridade.

Contagem	Identidade	Lacunas	Margem	
676 bits(366)	0.0	366/366pb(100%)	0/366(0%)	Plus/Minus
Query 1	CTTCTTATTTTAATATCTTCATTAAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAAC		60	
Sbjct 382	CTTCTTATTTTAATATCTTCATTAAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAAC		323	
Query 61	TTTTTGTCAATATGATCTATCAAAAAATATAACGCTGTTATCCCTAGAGTatTTaatcat		120	
Sbjct 322	TTTTTGTCAATATGATCTATCAAAAAATATAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAATCAT		263	
Query 121	attttcattaataatggggtcatttttaaaattaaaaagtttttaaatatttttaaccgcc		180	
Sbjct 262	ATTTTCATTAATAATGGGTCATTTTAAATTAATAAGTTTTTAATATTTTAAACGCC		203	
Query 181	cagttaaaatttaattaaaacaaaaatgtattatttaaatttttaaaattCCTAGGGTC		240	
Sbjct 202	CAGTTAAAATTTAATTAAAACAAAAATGTATTATTTAAATTTAAAATTCCTAGGGTC		143	
Query 241	TTCTTGTCTttaatttttataattgtttttacacaaattaaaaaaatttcaatttttaaat		300	
Sbjct 142	TTCTTGTCTTTAATTTTATAATTGTTTTTACACAAATTAATAAATTTCAATTTTAA		83	
Query 301	tttaagaagttgttttttGATATTCATTCTCTTAGCATTCAATTAATAATCTTATTTCA		360	
Sbjct 82	TTTAAAGAAAGTTGTTTTTGTATTTCCATTCTCTTAGCATTCAATTAATAATCTTATTTCA		23	
Query 361	ATACCT 366			
Sbjct 22	ATACCT 17			

Figura 12. Alinhamento da linhagem de célula de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BMEBR2) com 100% de similaridade.

4.3 Características Citológicas das Linhagens Celulares de *R. (B.) microplus* e Citometria de Fluxo

As células de ambas as linhagens foram morfológicamente heterogêneas no início da cultura. Culturas de células com três dias de idade após repique tiveram células de aparência fibroblastóide e arredondada (Fig. 13). Os núcleos das células se estenderam sobre a maior parte do citoplasma, e algumas células possuíam vesículas citoplasmáticas. Quando as monocamadas atingiram a confluência, as células se tornaram arredondadas e pequenas. Essas características foram semelhantes para ambas as linhagens estabelecidas.

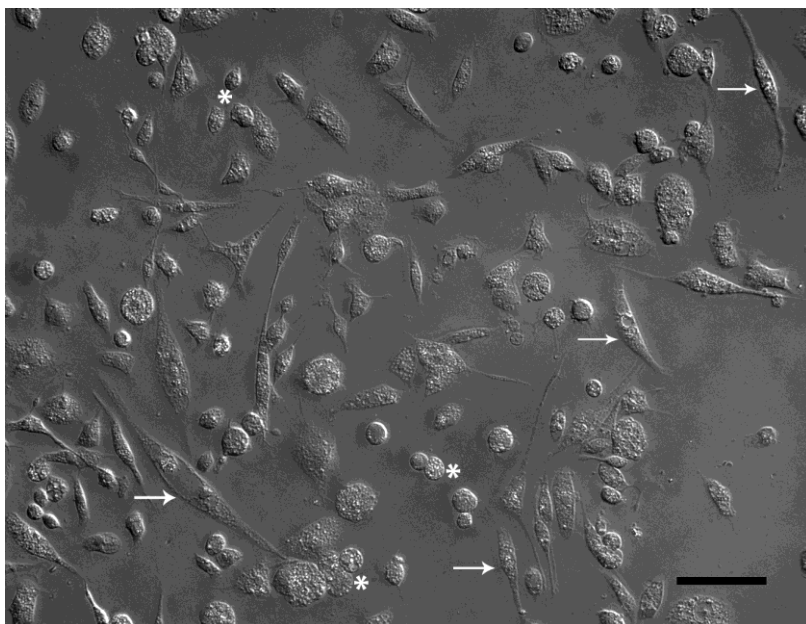


Figura 13. Culturas de células de *Rhipicephalus microplus* com três dias de idade após repique. Setas indicam células fibroblastóides com presença de vacúolos e asteriscos indicam células arredondadas. Microscopia de DIC. Barra de escala representa 50 μm .

Durante a microscopia de fluorescência das células inoculadas com *Borrelia burgdorferi*, verificou-se a fluorescência da bactéria com formato pontual no interior das três linhagens analisadas (Fig. 14), demonstrando a atividade fagocítica das mesmas. Essa atividade também foi confirmada através da citometria de fluxo, com percentuais diferentes de infecção, onde a linhagem BMEBR1 apresentou maior percentual de infecção (17,16%) quando comparada com as linhagens BME/CTVM2 (2,22%) e BMEBR2 (1,57%) (Fig. 15). A bactéria *B. burgdorferi* raramente foi visualizada em formato de espiroquetas fixadas às células de carrapatos ou livre. Além disso, a marcação com DAPI não revelou a presença de vesículas, marcando apenas o DNA nuclear das células.

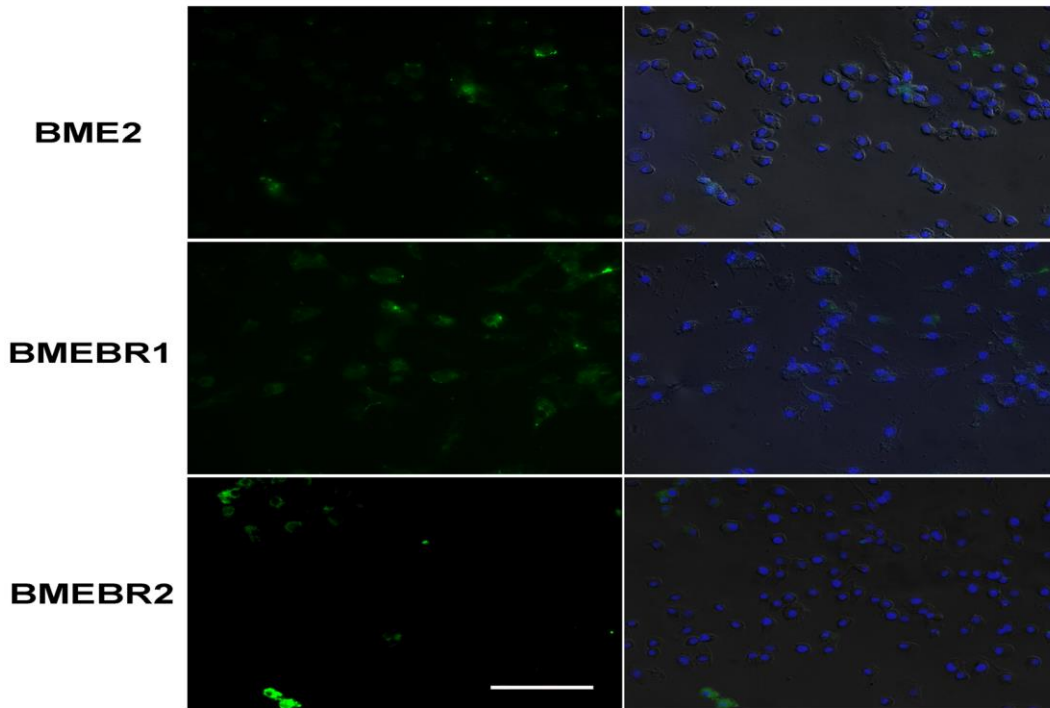


Figura 14. Linhagens de células de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inoculadas com a bactéria *Borrelia burgdorferi* marcada com o fluoróforo PKH67, após 6 horas. DNA nuclear corado com DAPI. Barra de escala representa 100 μ m.

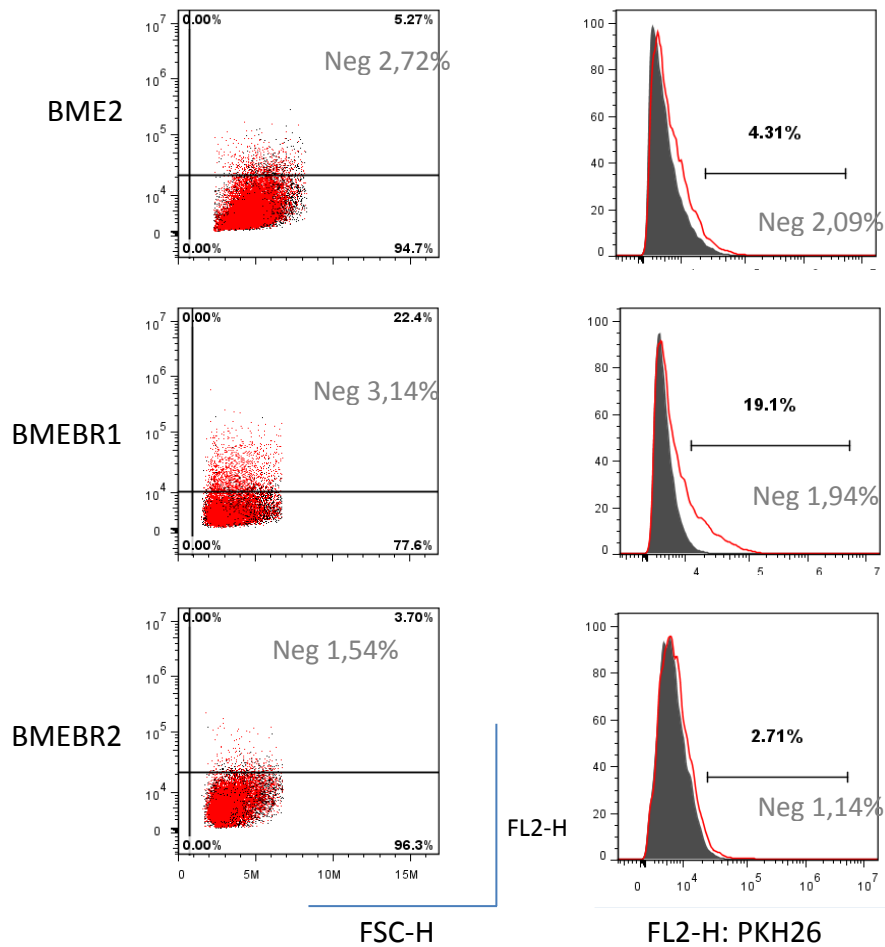


Figura 15. Overlays da citometria de fluxo mostrando a associação de *Borrelia burgdorferi* marcada com PKH26 em três linhagens de origem embrionária de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Linhas cinza preenchidas nos gráficos representam os controles de células de carrapatos não infectadas. Linhas vermelhas representam células infectadas. Valores dentro do gráfico representam o percentual médio de fluorescência nas células negativas (autofluorescência) e nas infectadas.

Com a marcação fluorescente de Bodipy, tanto na microscopia (Fig. 16 e 17) como na citometria (Fig. 18), verificamos a formação de corpúsculo lipídico, porém independente da infecção, sendo que a linhagem BME/CTVM2 ($p < 0,01$) forma mais corpúsculos lipídicos que BMEBR1 e BMEBR2.

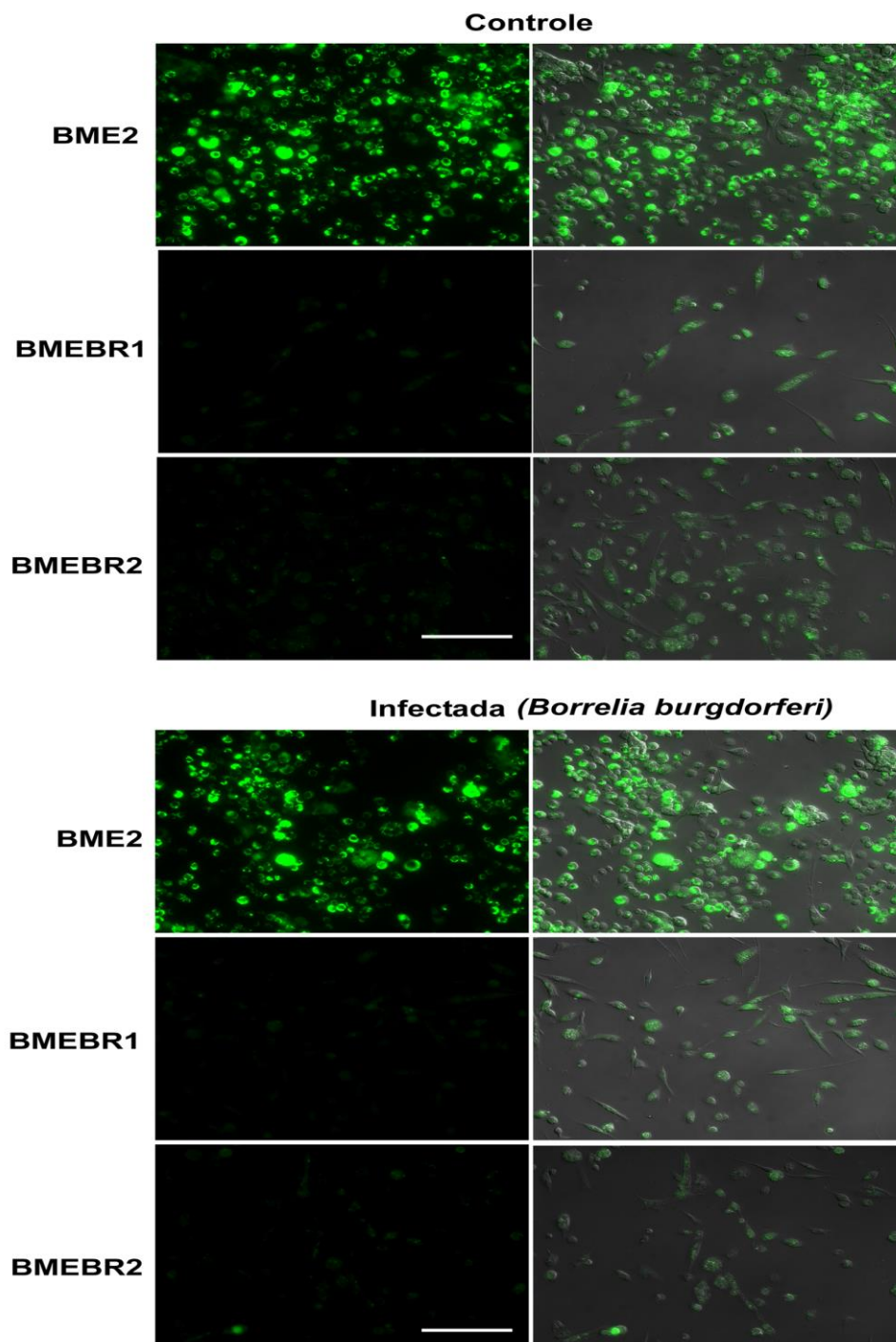


Figura 16. Linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* controles e inoculadas com a bactéria *Borrelia burgdorferi* após 6 horas, marcadas com o fluoróforo Bodipy. A intensidade da fluorescência foi medida com o filtro verde (Zeiss 61). Imagens com DIC foram utilizadas apenas para ilustração das células que fluoresceram. Barra de escala representa 100µm.

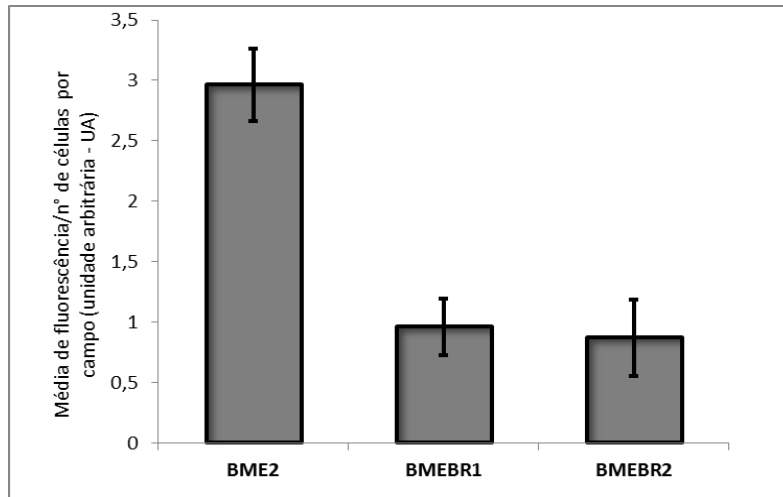


Figura 17. Média de fluorescência do marcador Bodipy por número de células em três linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A fluorescência foi mensurada no programa ImageJ 1.48v, através das imagens geradas em microscópio de epifluorescência Axio Observer.Z1 (Zeiss®).

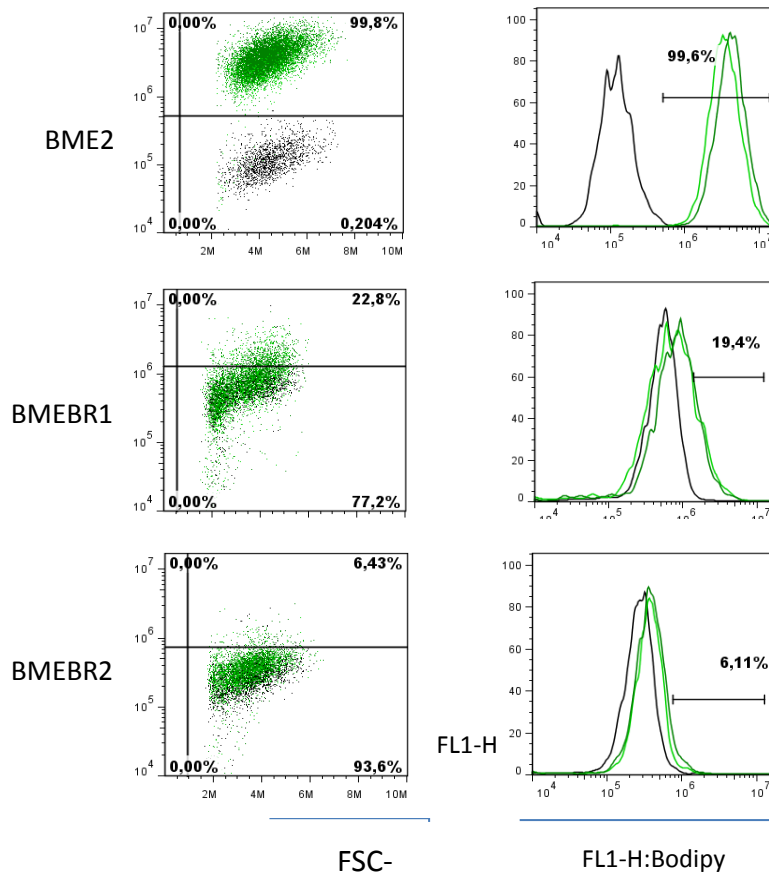


Figura 18. Overlays da citometria de fluxo mostrando a marcação de Bodipy em três linhagens de origem embrionária de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Linhas pretas nos gráficos representam os controles de células de carrapatos não infectadas. Linhas verdes representam células infectadas com *Borrelia burgdorferi*. Valores dentro do gráfico representam o percentual médio de fluorescência nas células.

Os resultados obtidos com a marcação de LA mostraram que as vesículas presentes no citoplasma apresentam diferentes graus de acidificação independente da infecção pela bactéria, no entanto, a linhagem BME/CTVM2 ($p < 0,01$) apresentou-se mais ácida na microscopia (Fig. 19 e 20). Os valores encontrados na citometria foram altos mesmo após diversas diluições (1:1000) do marcador, não permitindo a análise, uma vez que a alta fluorescência influenciou nos resultados.

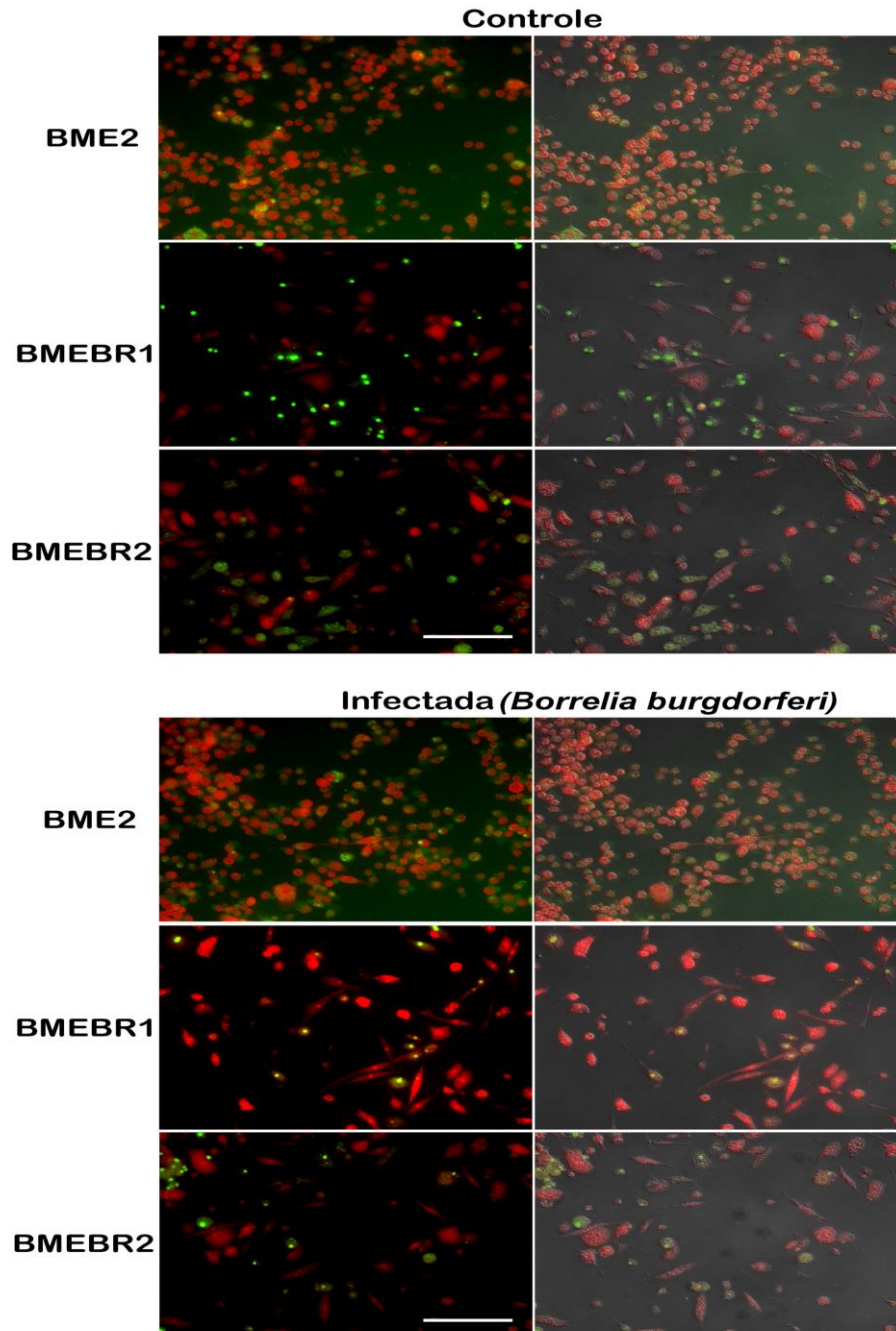


Figura 19. Linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* controles e inoculadas com a bactéria *Borrelia burgdorferi* após 6 horas, marcadas com o fluoróforo Laranja de Acridina, destacando os diferentes graus de acidificação no interior das vesículas do citoplasma. As intensidades da fluorescência foram medidas com o filtro vermelho (Zeiss 28) e verde (Zeiss 61). Imagens com DIC foram utilizadas apenas para ilustração das células que fluoresceram. Barra de escala representa 100µm.

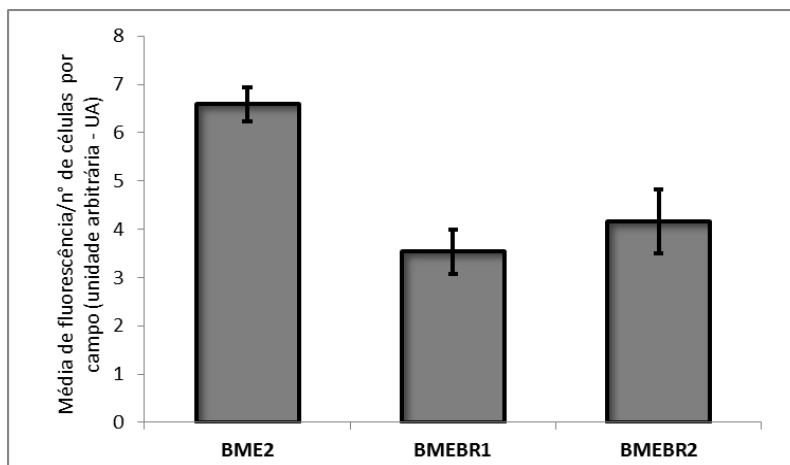


Figura 20. Média de fluorescência do marcador Laranja de Acridina por número de células em três linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A fluorescência foi medida no programa ImageJ 1.48v, através das imagens geradas em microscópio de epifluorescência Axio Observer.Z1 (Zeiss®).

Na avaliação do estresse oxidativo utilizando o marcador DHE, não foi verificada uma diferença entre as células infectadas e não infectadas, no entanto a linhagem BME/CTVM2 se estressa mais naturalmente que as demais linhagens ($p < 0,001$) (Fig. 21). Estatisticamente, não há diferença significativa na média de fluorescência por número de células encontrada na microscopia entre as linhagens BMEBR1 e BMEBR2 (Fig. 22). Os dados encontrados na citometria confirmaram a microscopia com BME/CTVM2 obtendo maior oxidação (Fig. 23), no entanto revelaram que na linhagem BMEBR1 não há a produção de superóxido.

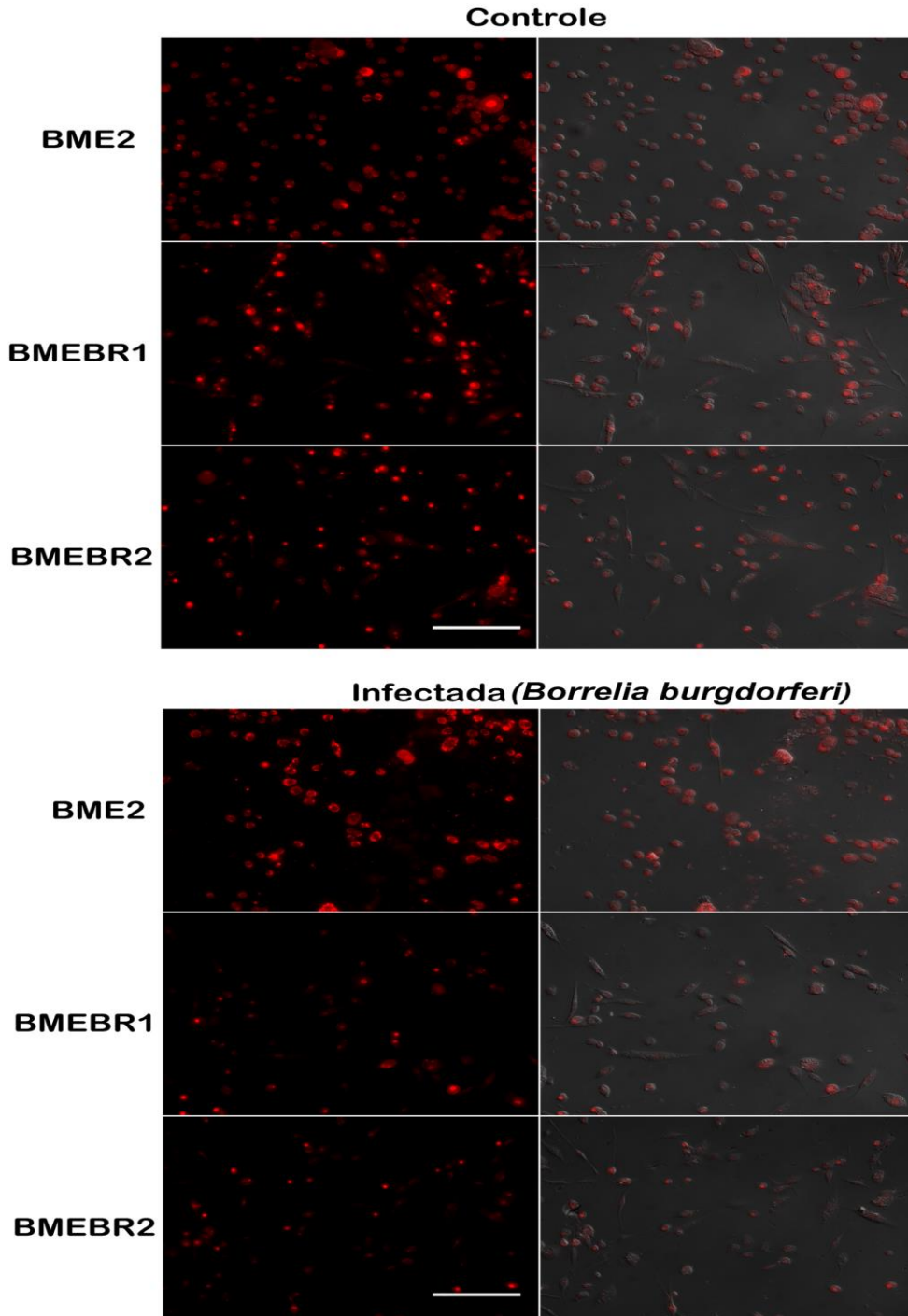


Figura 21. Linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* controles e inoculadas com a bactéria *Borrelia burgdorferi* após 6 horas, marcadas com o fluoróforo DHE. A intensidade da fluorescência foi medida com o filtro vermelho (Zeiss 28). Imagens com DIC foram utilizadas apenas para ilustração das células que fluoresceram. Barra de escala representa 100µm.

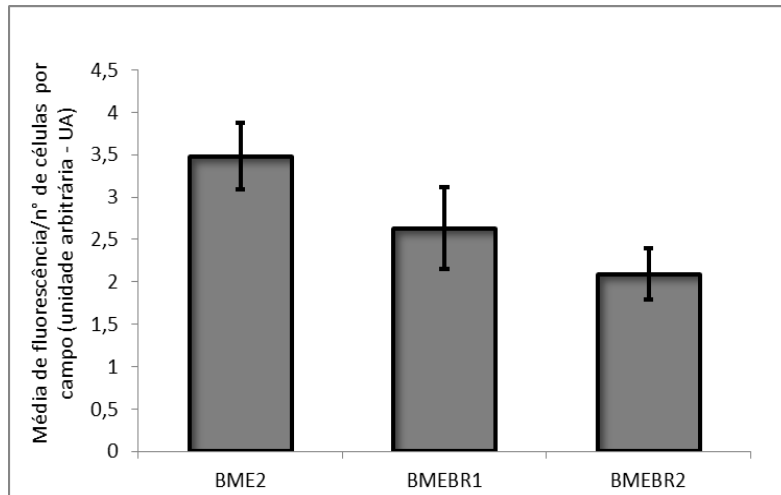


Figura 22. Média de fluorescência do marcador DHE por número de células em três linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A fluorescência foi medida no programa ImageJ 1.48v, através das imagens geradas em microscópio de epifluorescência Axio Observer.Z1 (Zeiss®).

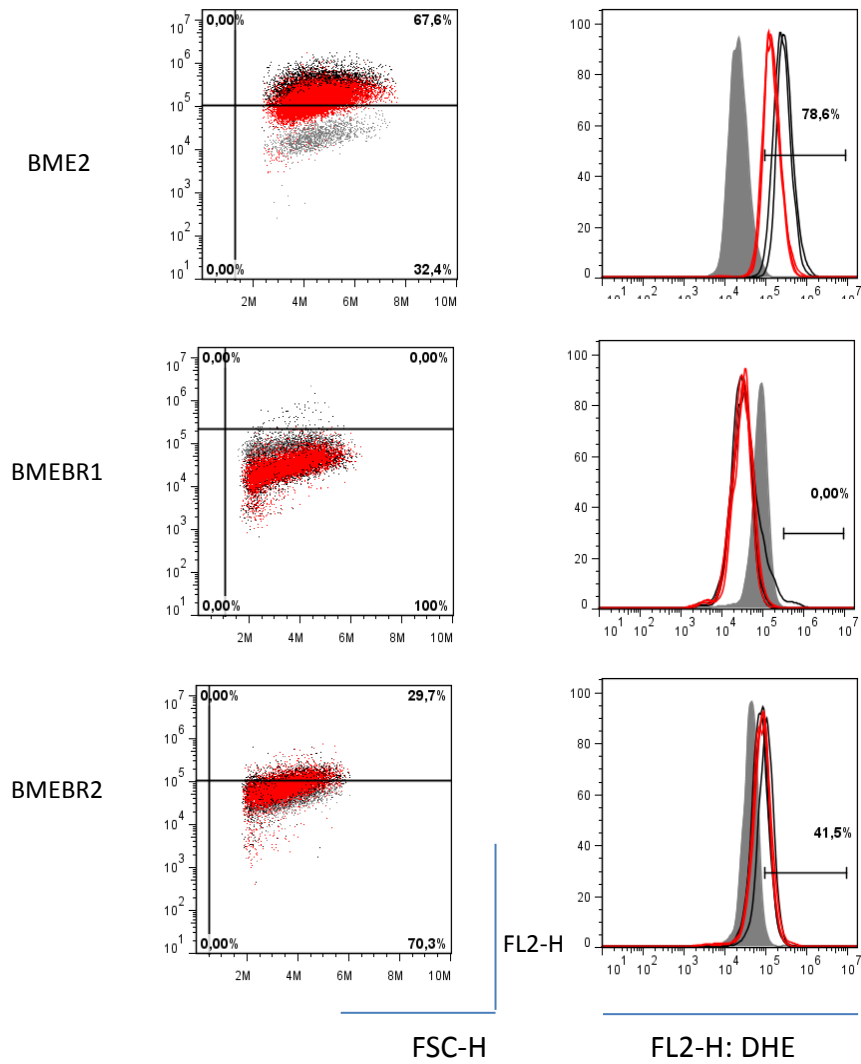


Figura 23. Overlays da citometria de fluxo mostrando a marcação de DHE em três linhagens de origem embrionária de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Linhas pretas nos gráficos representam os controles de células de carrapatos não infectadas. Linhas vermelhas representam células infectadas com *Borrelia burgdorferi*. Valores dentro do gráfico representam o percentual médio de fluorescência nas células.

5. DISCUSSÃO

Em linhagens de células de carrapato, diversos tipos celulares têm sido descritos como epiteliais, fibroblastóides, arredondadas, alongadas, musculares, entre outros. Com o subcultivo, essa diversidade de células diminui e apenas um ou dois tipos de células se tornam dominantes (MUNDERLOH et al., 1994). Os tipos celulares encontrados no estudo foram semelhantes aos reportados por Pudney et al. (1973), os quais observaram o aparecimento dos diversos tipos celulares e nos mesmos tempos do presente estudo, em cultura primária de células embrionárias de *R. (B.) microplus*, porém com formação de monocamada após 28 dias de cultivo. A formação da camada de células confluentes e subcultiváveis é o objetivo de qualquer tentativa de desenvolvimento de uma linhagem celular. A velocidade pela qual é atingida depende de vários fatores, mas principalmente do tamanho do inóculo e meio utilizado. Em geral, este estágio é atingido dentro de quatro semanas (KURTTI; BÜSCHER, 1979).

O sucesso após a criopreservação com DMSO das linhagens BMEBR1 e BMEBR2 confirmou o desenvolvimento das duas novas linhagens de células de carrapato *R. (B.) microplus*, sendo essa etapa de grande importância para a manutenção das linhagens em um laboratório, uma vez que um estoque congelado de células garante a manutenção da célula no laboratório mesmo após alguns problemas, como contaminação por microrganismos, contaminação cruzada por outras linhagens de células ou falha na incubação. A maioria das células cultivadas sobrevive melhor se a taxa de congelamento for de 1°C/min (LEIBO; MAZUR; 1971; LALLINGER et al., 2010). Esta taxa provavelmente minimiza o crescimento de cristais de gelo e favorece a migração extracelular de água (FRESHNEY, 2005). No presente estudo, a utilização do container de congelamento lento permitiu esse decréscimo de 1°C/min no freezer -80°C e após 90 minutos as células foram transferidas imediatamente para o Nitrogênio líquido atingindo uma temperatura de -196°C. A estocagem em nitrogênio líquido é atualmente o método mais satisfatório de preservação de cultura de células (HAY et al., 2000).

Outro fator importante para a sobrevivência das células é o crioprotetante, onde as células em suspensão são congeladas na presença de crioprotetor como o glicerol ou o DMSO. Entre esses, o DMSO parece ser o mais efetivo, uma vez que penetra melhor nas células que o glicerol (FRESHNEY, 2005). Lallinger et al. (2010) descreveram a utilização de DMSO a 6% com sacarose e de solução de congelamento de Sacarose-Fosfato-glutamato (SPG) como alternativas para congelamento de algumas linhagens, entre elas uma linhagem de *R. (B.) microplus* (BME6), no entanto, todas as linhagens testadas por esses autores apresentaram melhores resultados com relação à viabilidade celular e morfologia das células quando o DMSO suplementado com sacarose foi utilizado como crioprotetor.

O crescimento de células de carrapatos é mensurado pela frequência de passagens a partir de determinada diluição (taxa de divisão) e o tempo de duplicação da população (PDT) (KURTTI; MUNDERLOH, 1982). Culturas jovens são divididas geralmente na proporção de 1:2 (VARMA et al, 1975; PUDNEY et al, 1973; HOLMAN 1981) ou 1:3 (BHAT; YUNKER, 1977). Bhat e Yunker (1977) trabalhando com linhagem de *Dermacentor parumapertus* RML-14 encontraram resultados inferiores aos do presente estudo, com PDT de 3 dias, alcançando a fase de platô em 8 dias para culturas incubadas um 29°C. Outra linhagem de células embrionária de *R. (B.) microplus* obteve um tempo de duplicação de 3,8 dias (HOLMAN, 1981). No entanto,

Esteves et al. (2008), em experimento com linhagem de *R. (B.) microplus* (BME26) em meio L-15B300, preparado a partir de meio L-15B diluído a 3:1 com água de cultura de tecidos estéril (MUNDERLOH et al., 1999), obtiveram um PDT muito superior, com aproximadamente 15 dias. Além disso, esses autores obtiveram a formação da monocamada na fase de platô apenas após 2 meses. Em meio contendo apenas L15B, os mesmos autores verificaram uma diminuição do PDT para aproximadamente sete dias, aproximando-se do estudo realizado anteriormente por Munderloh e Kurtti (1989) para mesma linhagem BME26, onde obtiveram um PDT de 110-114 h. Portanto, a taxa de multiplicação de uma linhagem pode ser influenciada pela temperatura de incubação das células e pela formulação do meio.

Após a confluência, a taxa de crescimento das culturas é reduzida, e em alguns casos a proliferação cessa completamente após uma ou duas duplicações. Nesse estágio, a cultura entra numa fase estacionária e a fração de crescimento cai para entre 0 e 10%. Devido ao contato das células em confluência, ocorrerá a inibição por contato, caracterizada pela cessação de motilidade, da atividade da membrana e do crescimento (ABERCROMBIE; HEAYSMAN, 1954; FRESHNEY, 2005). Essa inibição pode envolver também a redução na propagação de células (FOLKMAN; MOSCONA, 1978), a formação de inibidores e depleção dos nutrientes no meio (DUBELCCO; ELKINGTON, 1973; STOKER, 1973). No entanto, o tempo platô não implica no completo cessamento da proliferação celular, ao invés disso, representa um estado de estabilidade, na qual a divisão celular é balanceada pela perda de células (FRESHNEY, 2005), assim como foi observado nas linhagens BMEBR1, BMEBR2 e BME/CTVM2.

Linhagens de células derivadas de tecido embrionário não possui seu tipo celular definido (RITTIG et al., 1996), desta forma cada linhagem pode ter a prevalência de um tipo celular diferente, o que permite a diferenciação entre essas linhagens quanto as características morfológicas, produção de substâncias e ainda capacidade fagocítica. A fagocitose é realizada por células dedicadas à fagocitose (RITTIG et al., 1996), desta forma, acreditasse que a linhagem BMEBR1 seja mais competente na fagocitose que as demais linhagens de *R. (B.) microplus* utilizadas no estudo. Essa diferença observada na maior invasão da linhagem celular BMEBR1 pode ser interpretada como diferença refletida nos tipos de células que deram origem à cultura (KURTTI et al., 1993; MUNDERLOH et al., 1994). Teixeira (2014) e Mattila et al. (2007) estudaram a interação de *B. burgdorferi* entre várias linhagens de células de carrapato e verificaram diferenças na capacidade fagocítica, mesmo entre linhagens de mesma espécie de carrapato como IDE8 e ISE6 (ambas linhagens de *I. scapularis*), além disso, estes autores verificaram a formação de vacúolos tipo fagolisossomo degradando a bactéria apenas em algumas linhagens, confirmando a hipótese de que o tipo de célula que deu origem à cultura pode refletir na capacidade fagocítica das linhagens.

Um estudo realizado por Teixeira (2014) verificou valores mais elevados na capacidade fagocítica para BME/CTVM2 do que no presente estudo, essa diferença pode estar relacionada ao tempo de exposição da célula à *B. burgdorferi*, uma vez que o autor desenvolveu uma interação borrelia-células por 18 horas a mais.

Assim como em outros estudos (TEIXEIRA, 2014; MATTILA et al., 2007), as estruturas fluorescentes no interior das células apresentaram-se pontuais. Alguns autores sugerem a formação de cistos que fornecem um potencial de sobrevivência limitada sob uma condição de estresse e que podem ser revertidas em um ambiente nutricionalmente completo (WU, 2011; MURGIA; CINCO, 2004).

Os corpúsculos lipídicos são organelas ricas em lipídios e estão presentes em praticamente todos os organismos, incluindo plantas, fungos, procariotos, mamíferos e

não mamíferos (BOZZA et al., 2009). Durante um tempo, acreditou-se que essas organelas estavam associadas apenas ao armazenamento de lipídios, mas atualmente sabe-se que essas são multifuncionais e estão envolvidas no metabolismo de lipídios, sinalização celular e inflamação (MELO et al., 2011). Diversos estudos apresentam um aumento bastante significativo do número de corpúsculo lipídico nas células parasitadas em relação às células não parasitadas, indicando que a presença do parasito induz diretamente a formação deste (D'AVILA et al., 2011, SILVA, 2012; MELO; DVORAK 2012). Esperava-se que no presente estudo esse aumento também fosse verificado, porém isto não ocorreu. No entanto, num estudo com *Mycobacterium leprae*, verificou-se que as células não infectadas também podem apresentar corpúsculos lipídicos (MATTOS et al., 2010). Desta forma, a formação de corpúsculo lipídico das linhagens BME/CTVM2, BMEBR1 e BMEBR2 são basais e podem não ser influenciadas pela fagocitose de *B. burgdorferi*. Estudos com uso de inibidores ou outros patógenos são necessários para entender a dinâmica dessa relação.

Apesar da linhagem BME/CTVM2 ser mais antiga e ter uma PDT menor, essa mostrou-se mais sensível ao estresse oxidativo, independente da infecção por *B. burgdorferi*, do que as demais células, sugerindo que essa linhagem sofre maiores alterações com variações de temperatura, pH do meio ou qualquer outro tipo de manipulação. Estudo com *B. burgdorferi* em carrapato *Ixodes ricinus* demonstrou que genes relacionados à oxidação são fortemente induzidos na hemolinfa, glândula salivar e intestino (RUDENKO et al., 2005). Desta forma, sugere-se que as linhagens estudadas não possuem essa diferença quando infectada ou a cepa de borrelia utilizada na infecção não foi capaz de induzir essa oxidação.

Após incubação com LA, foram observados diferentes graus de acidificação nas vesículas até mesmo entre as células de mesma linhagem, assim como observado por Esteves et al. (2008). Essa diferença indica diferença no grau de maturação ou na estrutura das vesículas nas células, com algumas envolvidas na autofagia e outras na endocitose (ESTEVEES et al., 2008).

6 CONCLUSÕES

Foram estabelecidas duas novas linhagens embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BMEBR1 e BMEBR2) com cepas oriundas de Seropédica, RJ, Brasil, com 100% de similaridade molecular para o gene 16S DNAr com outras cepas da mesma espécie.

Ambas as linhagens apresentaram crescimento menor que a linhagem de *R. (B.) microplus* BME/CTVM2 oriunda da Costa Rica.

A linhagem BMEBR1 possui maior capacidade fagocítica que as linhagens BMEBR2 e BME/CTVM2.

Essas linhagens possuem características de acidificação, produção de corpúsculo lipídico e estresse oxidativo diferentes entre si.

As novas linhagens foram congeladas na quarta passagem e descongeladas após 30 dias com sucesso, e apresentaram-se estáveis com relação às características morfológicas e de taxa de crescimento.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABERCROMBIE, M.; HEAYSMAN, J. E. M. Observations in the social behavior of cells in tissue culture, II: "Monolayering" of fibroblasts. **Experimental Cell Research**, v. 6, n. 2, p. 293-306, 1954.

BAÊTA, B. A. **Co-cultivo de *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) em cultura primária de células embrionárias de *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae)**. 2011. 39f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**, Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006, 223 p.

BEATI, L.; KEIRANS, J. E. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 32–48, 2001.

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.; PAXTON, E. A.; MUNDERLOH, U. G.; SUMPTION, K. J. Growth of *Cowdria ruminantium*, the causative agent of heartwater, in a tick line. **Journal of Clinical Microbiology** v. 38, n. 3, p. 1238-1240, 2000.

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

BHAT, U. K. M.; MAHONEY, D. F.; WRIGHT, I. G. The invasion and growth of *Babesia bovis* in tick tissue culture. **Experientia**, v. 35, n. 6, p.752-753, 1979.

BHAT, U. K. M.; YUNKER, C. E. Establishment and characterization of a diploid cell line from the tick, *Dermacentor parumapertus* Neumann (Acarina: Ixodidae). **The Journal of Parasitology**, v. 63, n. 6, p. 1092-1098, 1977.

BOZZA, P. T.; MAGALHÃES, K. G.; WELLER, P. F. Leukocyte lipid bodies – biogenesis and functions in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, n. 6, p. 540-551, 2009.

CARREL, A. On the permanent life of tissues outside the organism. **Journal of experimental medicine**, v.15, n. 5, p. 516-528, 1912.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. One-Host Ixodid Tick Life Cycle. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dpdx/ticks/>> Acesso em: 01 ago. 2014.

D'AVILA, H.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; ROQUE, N. R.; TEIXEIRA, L.; BARJA-FIDALGO, C.; SILVA, A. R.; MELO, R. C.; DOSREIS, G. A.; CASTRO-FARIANETO, H. C.; BOZZA, P. T. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E2 generation and increased parasite growth. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 6, p. 951-961, 2011.

DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; MANZANO-ROMAN, R.; NARANJO, V.; ALMAZAN, C.; PEREZ DE LA LASTRA, J. M.; ZIVKOVIC, Z.; JONGEJAN, F.; KOCAN, K. M. Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen *Anaplasma marginale*. **Genomics**, v. 90, n. 6, p. 712–722, 2007.

DULBECCO, R.; ELKINGTON, J. Conditions limiting multiplication of fibroblastic and epithelial cells in dense cultures. **Nature**, v. 246, n. 1, p.197-199, 1973.

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.

ESTEVEZ, E.; BASTOS, C. V.; ZIVKOVIC, Z.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.; BLOUIN, E.; RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F.; DAFFRE, S. Propagation of a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale* with appendage in a tick cell line (BME/CTVM26) derived from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1, p. 150–153, 2009.

ESTEVEZ, E.; LARA, F. A.; LORENZINI, D. M.; COSTA, G. H.; FUKUZAWA, A. H.; PRESSINOTTI, L. N.; SILVA, J. R.; FERRO, J. A.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; DAFFRE, S. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME/CTVM26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 5, p. 568–580, 2008.

EWING, S. A., MUNDERLOH, U. G., BLOUIN, E. F., KOCAN, K. M.; KURTTI, T. J. 1995. **Ehrlichia canis in tick cell culture**. Proceedings of the 76th Conference of Research Workers in Animal Diseases, Chicago, USA, 13–14 November 1995. Ames: Iowa State University Press (Abstract no. 165).

FLECHTMANN, C.A.W. **Ácaros de importância médico veterinária**. 3.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 192 p.

FOLKMAN, I.; MOSCONA, A. Role of cell shape in growth control. **Nature**, v. 273, n. 1, p. 345-349, 1978.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A manual of basic technique**. 5° Ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2005, 642 p.

GONZÁLES, J. C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Revisão histórica e concensual). **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 23-28 2002.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

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

HAY, R. J.; MIRANDA-CLELAND, M.; DURKIN, S.; REID, Y. A. Cell line preservation and authentication. In: MASTERS, J. R. W. **Animal cell culture**. Ed., Oxford: Oxford University Press, 2000, p. 69-103.

HOLMAN, P. J. Partial characterization of a unique female diploid cell strain from the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 18, n. 1, p. 84-88, 1981.

HOLMAN, P. J.; RONALD, N. C. A new tick cell line derived from *Boophilus microplus*. **Research in Veterinary Science**, v. 29, n. 3, p. 383-387, 1980.

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

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

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

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

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

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

KURTTI, T. J., SIMSER, J. A., BALDRIDGE, G. D., PALMER, A. T., & MUNDERLOH, U. G. Factors influencing in vitro infectivity and growth of *Rickettsia peacockii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae), an endosymbiont of the Rocky Mountain

wood tick, *Dermacentor andersoni* (Acari, Ixodidae). **Journal of invertebrate pathology**, v. 30, n. 3, p. 177-186, 2005.

KURTTI, T.J., MUNDERLOH, U.G., STILLER, D. The interaction of *Babesia caballi* kinetes with tick cells. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 42, n. 3, p. 334–343, 1983.

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 (Online)**. v. 7, n. 58, p. 1-12, 2007.

MATTOS, K. A.; LARA, F. A.; OLIVEIRA, V. G.; RODRIGUES, L. S.; D'AVILA, H.; MELO, R. C.; MANSO, P. P; SARNO, E. N.; BOZZA, P. T.; PESSOLANI, M. C. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. **Cellular Microbiology**. v. 13, n. 2, p. 259–273, 2011.

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.

MELO, R. C. N.; DVORAK, A. M. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy?. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 7, 2012.

MELO, R. C. N.; D'AVILA, H.; WAN, H. C.; BOZZA, P. T.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 540-556, 2011a.

LALLINGER, G.; ZWEYGARTH, E.; BELL-SAKYI, L.; PASSOS, L. M. Cold storage and cryopreservation of tick cell lines. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 37, p. 1-6, 2010.

LEIBO, S. P. ; MAZUR, P. The role of cooling rates in low-temperature preservation. **Cryobiology**, v. 8, n. 5, p. 447-452, 1971.

MANGOLD, A. J.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastrata (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 84, n. 6, p. 478-484, 1998.

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

MOSQUEDA, J. et al. Primary Midgut, Salivary Gland, and Ovary Cultures from *Boophilus microplus*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, n. 1, p. 49, 2008.

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.

MUNDERLOH, U. G.; JAURON, S. D.; FINGERLE, V.; LEITRITZ, L.; HAYES, S. F.; HAUTMAN, J. M.; NELSON, C. M.; HUBERTY, B. W.; KURTTI, T. J.; AHLSTRAND, G. G.; GREIG, B.; MELLEMCAMP, M. A.; GOODMAN, J. L. Invasion and intracellular development of the human granulocytic ehrlichiosis agent in tick cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2518-2524, 1999.

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*. **The Journal of Parasitology**, v. 80, n. 4, p. 533-543, 1994.

MURGIA, R.; CINCO, M. Induction of cystic forms by different stress conditions in *Borrelia burgdorferi*. **APMIS** v. 112, n. 1, p. 57-62, 2004.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 3, p. 169-172, 2003.

NUNES, E. T.; BECHARA, G. H.; SAITO, K. C.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, P. R.; MATHIAS, M. I. C. Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary glands in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887)(Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 36, n. 5, p. 437-447, 2005.

NUÑES, J. L.; MUÑOZ COBENAS, M. E.; MOLTEDO, H. L. ***Boophilus microplus*, la garrapata comum del ganado vacuno**. Buenos Aires: Hemisfério Sur, 1982. 19 p.

PASSOS, L. M. F. *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in tick cell lines: a review. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria**, v. 21, n. 2, p. 81-86, 2012.

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.

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

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

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

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.

RUDENKO, N.; GOLOVCHENKO, M.; NEMEC, J.; VOLKAERT, J.; MALLATOVA, N.; GRUBHOFFER, L. Improved method of detection and molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in clinical samples by polymerase chain reaction without DNA purification. **Folia Microbiology**. v. 50, n. 1, p. 31-39, 2005.

SILVA, P. P. **Análise dos corpúsculos lipídicos em macrófagos humanos infectados pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e submetidos ao tratamento com a droga benzimidazol**, 2012, 91f., Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

STOKER, M. G. P. Role of diffusion boundary layer in contact inhibition of growth. **Nature**, v. 246, n. 5430, p. 200-203, 1973.

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

TEIXEIRA, R. C. **Cultivo de *Borrelia burgdorferi* e *Borrelia anserina* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) em diferentes linhagens celulares de carrapatos (Acari: Ixodidae)**. 2014. 71f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

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

WHARTON, R. H. Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. In: PAL, R.; WHARTON, R. H. **Control of arthropods of medical and veterinary importance**. London Plenum Press, 1974, p. 35-52.

WEYER, F. Explantationsversuche bei Läusen in Verbindung mit der Kultur von Rickettsien. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene**, v. 159, n. 1-2, p. 13-22, 1952.

WU, J.; WEENING, E. H.; FASKE, J. B.; HÖÖK, M.; SKARE, J. T. Invasion of eukaryotic cells by *Borrelia burgdorferi* requires β 1 integrins and Src kinase activity. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 338–1348, 2011.

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.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo com *A. marginale* permitirá avanços no diagnóstico sorológico e molecular da anaplasmoze, considerando principalmente cepas locais. Além disso, poderá ser utilizado como substrato para produção de vacinas.

Os isolados de *A. marginale* poderão ser utilizados em estudos na tentativa de esclarecer a forma de transmissão e testar a hipótese sobre a influência do genótipo e da variabilidade de MSP1a na transmissibilidade por carrapato.

São possíveis estudos para verificar a alteração da patogenicidade após cultivo *in vitro* através da reinoculação dos isolados de *A. marginale* em bovinos.

As novas linhagens do carrapato *R. (B.) microplus* permitirão avanços em isolamento e estudos de patógenos com cepas brasileiras e aprofundamento na relação patógeno-vetor, uma vez que nunca foram utilizadas linhagens brasileiras em cultivos de patógenos locais.

As novas linhagens poderão ser utilizadas em estudos na propagação das novas cepas de *A. marginale* isoladas.

ANEXOS

Anexo A – Artigo Completo Publicado em Revista Indexada

Ticks and Tick-borne Diseases 6 (2015) 141–145



Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/ttbdis



Original article

Characterization of two strains of *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Rio de Janeiro, Brazil, after propagation in tick cell culture



Bruna A. Baêta^a, Carla C.D.U. Ribeiro^a, Rafaella C. Teixeira^a, Alejandro Cabezas-Cruz^{b,c}, Lygia M.F. Passos^d, Erich Zweggarth^{e,f}, Adivaldo H. Fonseca^{a,*}

^a Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^b Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), INSEEM U1019 – CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

^c SaBio, Instituto de Investigación de Recursos Cinegéticos, IREC-CSIC-UCLM-JCCM, Ciudad Real 13005, Spain

^d Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^e Institute for Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

^f Department of Veterinary Tropical Diseases, Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria, Private Bag X4, Onderstepoort 0110, South Africa

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2014

Received in revised form 30 October 2014

Accepted 3 November 2014

Available online 22 November 2014

Keywords:

Anaplasma marginale

Tick cell culture

Isolation

Msp1 α gene

ABSTRACT

IDEB tick cell cultures have been used for the isolation and propagation of several isolates of *Anaplasma marginale*. The genetic heterogeneity of *A. marginale* strains in cattle is diverse in endemic regions worldwide and the analyses of *msp1 α* (major surface protein 1 alpha) gene sequences have allowed the identification of different strains. This study reports the isolation and propagation of two new isolates of *A. marginale* in IDEB cells from blood of two cattle and their morphological and molecular characterization using light microscopy and the *msp1 α* gene, respectively. Small colonies were observed in cytospin smears of each of the isolates 60 days after culture initiation. Based on *msp1 α* sequence variation, the two isolates were found to be separate strains and were named AmRio1 and AmRio2. Analysis of *msp1 α* microsatellite in both strains resulted in a single genotype, genotype E. The amino acid sequence of one MSP1 α tandem repeat from the strain AmRio1 resulted in a new sequence (named 162) with one amino acid change. The results of these phylogenetic analyses demonstrated that *A. marginale* strains from Brazil and Argentina formed two large clusters of which one was less divergent than the other.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Anaplasma marginale is an intraerythrocytic rickettsial agent that causes bovine anaplasmosis in cattle worldwide. Bovine anaplasmosis is endemic in Brazil and the disease is characterized by anemia, weight loss, fever, abortion and even deaths in acute cases (Vidotto et al., 1998). *A. marginale* is biologically transmitted by ticks, mechanically by infective blood on fomites or on the mouthparts of biting insects, and transplacentally from dams to their calves (Aubry and Geale, 2011).

The genetic heterogeneity of *A. marginale* strains is high in cattle from endemic regions worldwide (de la Fuente et al., 2005, 2007; Pohl et al., 2013; Cabezas-Cruz et al., 2013). Three out of six major surface proteins (MSPs), MSP5, MSP4 and MSP1 α have

been extensively used for the molecular characterization of *A. marginale* (Aubry and Geale, 2011). The *msp5* gene is highly conserved among *Anaplasma* spp. and therefore can only be used to establish that organisms are in the genus *Anaplasma* and cannot be used for identification of the species. Furthermore, MSP5-based serologic tests result in cross reactions between *Anaplasma* species (as reviewed Kocan et al., 2012). However, previous analysis of the *msp4* gene from *A. marginale* isolates demonstrated sufficient sequence variation to support its use in phylogeographic studies (de la Fuente et al., 2003b). Analyses of *msp1 α* (major surface protein 1 alpha) gene sequences have allowed the identification of *A. marginale* strains worldwide (Cabezas-Cruz et al., 2013) and despite the *msp1 α* genetic diversity, this gene is considered as a stable genetic marker conserved during acute and persistent rickettsemia in cattle and also during multiplication in ticks (Palmer et al., 2001; Bowie et al., 2002; de la Fuente et al., 2003c). Furthermore, MSP1 α is an adhesin for bovine erythrocytes and tick cells. Binding residues are localized in the tandem repeated region of this protein, thus, tandem repeats provide information regarding tick transmissibility phenotypes of *A. marginale* strains (de la Fuente et al., 2003a).

* Corresponding author. Tel.: +55 2126821103.

E-mail addresses: babaeta@hotmail.com (B.A. Baêta), carlaazedo@yahoo.com.br (C.C.D.U. Ribeiro), rafaellaamedvet@hotmail.com (R.C. Teixeira), alejandrocabezasacruz@yahoo.es (A. Cabezas-Cruz), lygiapassos@yahoo.com (L.M.F. Passos), adivaldo Fonseca@yahoo.com (A.H. Fonseca).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.11.003>

1877-959X/© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Tick cell lines have provided an *in vitro* system for the study of tick–pathogen interactions and have reduced the use of cattle *A. marginale* research (Bell-Sakyi et al., 2007). One of the most widespread applications of tick cell lines is its use for isolation and propagation of several economically important tick-borne pathogens. The first continuous *in vitro* culture system for the pathogen *A. marginale* was established in the *Ixodes scapularis* cell line IDE8 from infected bovine erythrocytes (Munderloh et al., 1996). Subsequently, this system has been used for the isolation and propagation of several isolates of *A. marginale* (Bastos et al., 2009; Blouin et al., 2002).

The present study reports the isolation and propagation of two strains of *A. marginale* in IDE8 cells and their characterization through light microscopy and sequence analysis of the *msp1α* gene. These two strains are the first *A. marginale* isolates from cattle in Rio de Janeiro to be characterized after being propagated in tick cell culture.

Materials and methods

Isolation of *A. marginale*

Blood samples were collected from two naturally infected cattle (without clinical signs) with an approximate 10% parasitemia that were from the farm of Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. The blood were collected in EDTA and placed at 4 °C and then transported to Germany for propagations in tick cell culture. Therefore a delay of 7 days occurred before the samples were processed. The samples were processed as described by Blouin et al. (2000). Briefly, the red blood cells were washed three times by centrifugation (700 × g for 10 min) and resuspension in physiological phosphate-buffered saline solution (PBS). After each centrifugation, the buffy coat were removed. The red blood cell pellet were resuspended (1:1) in Leibovitz L-15 medium using DMSO (10%) as cryoprotectant and then cryopreserved at –80 °C.

After 48 h, the samples were quickly thawed, suspended in L15 medium and centrifuged at 9000 × g for 10 min. The pellet was suspended in 5 mL of Leibovitz L15B medium containing 5% inactivated fetal bovine serum, NaHCO₃ (2.5 g/L) and HEPES (Munderloh et al., 1996). The pH was adjusted to 7.4. A sample of each animal was individually inoculated into 25 cm² flasks containing monolayers of IDE8 cells and incubated at 34 °C. The first medium change was performed after 24 h with the removal of the all medium, subsequent changes were made twice a week with the renewal of 60% of the culture supernatant.

Cultures were monitored daily by direct observation under inverted microscope and weekly by microscopic examination of Giemsa-stained cytospin smears (Watson, 1966).

Characterization of the *A. marginale* strains

After the detection of the first small bacterial colonies in IDE8 cytospin smears of each flask, aliquots of the infected cultures were collected for molecular analysis. DNA from blood samples and cultures was extracted using QiAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN, Biotecnologia Brasil, São Paulo, Brazil) and quantified with a spectrophotometer (NanoDrop[®] ND-1000). Initially, real-time PCR was performed targeting the *msp1β* gene, following the protocol as described by Carelli et al. (2007), with modifications according to Pohl et al. (2013). In order to determine the genotype of the *A. marginale* strains, a PCR targeting the *msp1α* gene was performed according to Lew et al. (2002). The reactions were performed using the 1733F (5'-TGTGCTTATGGCAGACATTTC-3') and 2957R primers (5'-AAACCTGTAGCCCCAATTATCC-3'). The amplification cycle had denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 40

cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1.5 min and a final extension at 72 °C for 7 min. PCR products were separated in 2% agarose gels and stained with ethidium bromide, 100 bp marker was used for molecular size determination (Ladder Mix1/2 loading dye, Fermentas Life Science, Sinapse Biotecnologia, São Paulo, Brazil).

Purification of the PCR products was performed using a GFX PCR DNA kit (GE Healthcare Biosciences, São Paulo, Brazil) following the manufacturer's recommendations. After purification, the DNA samples were sequenced in the capillary type platform ABI 3730 DNA Analyser Equipment (Applied Biosystems, Life technologies do Brasil, São Paulo, Brazil) and sequences were analyzed with the Analysis 5.3.1 program. The results were evaluated with Chroma[®]Lites (www.technelysium.com.au/chromas_lite.html) and the similarities of the sequences were searched by BLASTn analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) in GenBank.

The isolated strains were identified based on the sequences of the *msp1α* tandem repeats (Cabezas-Cruz et al., 2013; de la Fuente et al., 2007) and the 5'-UTR microsatellite (Estrada-Pena et al., 2009). Briefly, the 5'-UTR microsatellite is located between the putative Shine–Dalgarno (SD) sequence (GTAGG) and the translation initiation codon (ATG) with the structure: GTAGG (**G/A TTT**) m (**GT**) n T ATG (microsatellite sequence is shown in bold letters), the SD–ATG distances were calculated in nucleotides as (4 × m) + (2 × n) + 1. Nucleotide sequences were translated to amino acid (aa) sequences using EXPASY translation tool (<http://web.expasy.org/translate>).

The phylogenetic analysis

The phylogenetic analyses were conducted with MSP1a amino acid sequences aligned with MAFFT (v7) configured for the highest accuracy (Katoh and Standley, 2013). After alignment, regions with gaps were removed from the alignment. Phylogenetic trees were reconstructed using maximum likelihood (ML), neighbor joining (NJ) and Bayesian inference (MB) methods as implemented in PhyML (v3.0 aLRT) (Gascuel and Steel, 2006; Guindon and Gascuel, 2003), PHYLIP (v3.66) (Felsenstein, 1989) and MrBayes (v3.1.2), respectively. The reliability for the internal branches of ML was assessed using the bootstrapping method (1000 bootstrap replicates) and the approximate likelihood ratio test (aLRT–SH–Like) (Gascuel and Steel, 2006). Reliability for the NJ tree was assessed using bootstrapping method (1000 bootstrap replicates). 10000 generations of Markov Chain Monte Carlo (MCMC) chains were run for MrBayes. Graphical representation and editing of the phylogenetic trees were performed with TreeDyn (v198.3) (Chevenet et al., 2006).

Ancestor reconstruction

The reconstruction of the ancestral amino acid sequence was performed using a Neighbor Joining Tree under the Dayhoff model of substitutions which was estimated to be the best model fitting the actual data. Three reconstruction methods were used: joint (Pupko et al., 2000), marginal (Yang et al., 1995) and sample (Nielsen, 2002) which are implemented in the Datamonkey webserver.

Results

Isolation and propagation of *A. marginale* from Rio de Janeiro

Sixty days after culture initiation, small bacterial colonies were observed in cytospin smears prepared from a sample collected from each flask (Fig. 1A). On day 81, these colonies were visible in 70% of the cells, with several colonies in the same cell

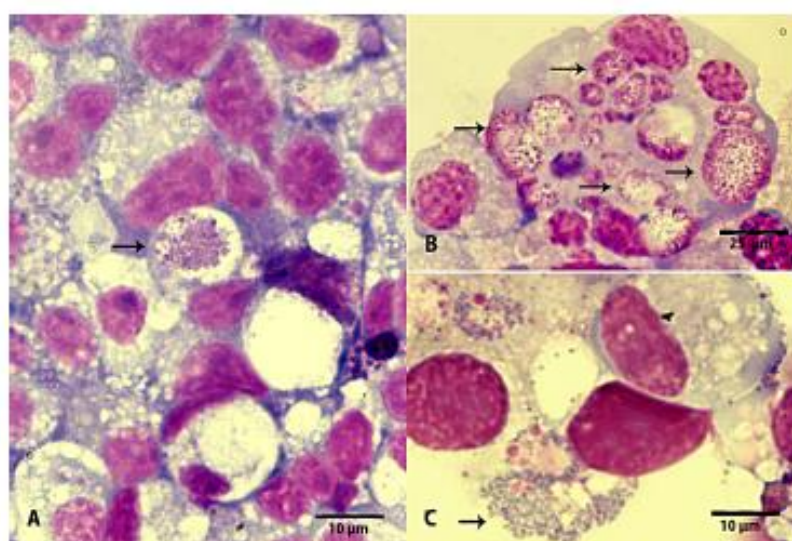


Fig. 1. Examination of Giemsa-stained cytospin smears of IDE8 cells infected with *A. marginale* from Rio de Janeiro, Brazil. (A) Formation of small colonies in the cells; (B) several colonies in the same cell with dislocation of the nucleus; (C) rupture of a colony releasing corpuscles. Arrows indicate the colonies and rupture of a colony.

(Fig. 1B). The formation of large colony was followed by the disruption of the vacuole membrane releasing the organisms into the culture medium (Fig. 1C). The first subculture was performed 81 days after culture initiation. Subsequently, subcultures were performed each time the culture reached an infection rate of approximately 70%. The isolated strains were named AmRio1 and AmRio2.

Molecular characterization of the A. marginale strains

All flasks were positive for *A. marginale* in the real-time PCR and conventional PCR. From the *msp1α* PCR an amplicon of approximately 1.1 kb was isolated corresponding to the size of the targeted *msp1α* gene fragment.

The *msp1α* microsatellite analysis resulted in one genotype from both strains, genotype E. The microsatellite sequences produced SD-ATG distances of nucleotides (Table 1).

In this study, five different *msp1α* tandem repeats were identified among the two isolates from Rio de Janeiro. The amino acid sequence of one MSP1α tandem repeat, from strain AmRio1, resulted in a new sequence (named 162) with one amino acid change as shown in Table 2. Both isolates had three different *msp1α* tandem repeats and the number of repeats was five. The structures of MSP1α tandem repeats of isolates were different, AmRio 1 (162-F-17-F-F) and AmRio2 (α-β-β-β-F). Moreover, the *msp1α* sequence was found to be the same after six passages *in vitro*.

Table 1
The *msp1α* microsatellite analysis of *A. marginale* from Rio de Janeiro strains.

Isolates	Genotype	m ⁿ	n ^m	SD-ATG distance (nucleotide)
AmRio1	E	2	7	23
AmRio2	E	2	7	23

The microsatellite was located between the Shine-Dalgarno (SD; sequence in brackets) and the translation initiation codon (ATG) with the structure: GTACG (G₄ATT) mⁿ (GT) n^m T ATG. The SD-ATG distance was calculated in nucleotides as (4 × m) + (2 × n) + 1.

Phylogenetic analysis

In order to determine the phylogenetic relationship between the *A. marginale* strains isolated in this study and other strains from nearby regions, we performed ML, NJ and MrBayes phylogenetic analyses (Fig. 2). The strains AmRio1 and AmRio2 presented a different tandem repeat composition, however, they fall in the same phylogenetic cluster (Cluster α) with strains previously reported in Argentina and Brazil (Fig. 2). *A. marginale* strains from this phylogenetic cluster present high abundance of tandem repeats α and β which were found only in AmRio2. Although both strains, AmRio1 and AmRio2, were isolated in Rio de Janeiro, strain AmRio2 seems to be closer to strain (C-F-N) from Minas Gerais (de la Fuente et al., 2004) (genetic distance between AmRio2 and strain (C-F-N) is 0.043) than to AmRio1 (genetic distance between AmRio1 and AmRio2 is 0.065). Interestingly, the evolution of the two clusters (Cluster τ and Cluster α) seems to be different. Compared to the ancestor (blue circle in Cluster τ), two of the strains in Cluster τ increase the number of tandem repeats (from 5 in the ancestor to 7 in strain τ-11-10-10-11-10-15 and 6 in strain 23-24-25-26-27-27) while in Cluster α, to which AmRio1 and AmRio2 belong, all the strain have lost tandem repeats since the separation from the ancestor (red circle in Cluster α) (Fig. 2).

Discussion

Two Brazilian *A. marginale* strains were propagated in IDE8 tick cell culture. First colonies were detected 60 days after culture initiation. The time until first detection, however, was considerably longer than reported in other studies (Bastos et al., 2009; Blouin et al., 2000; Munderloh et al., 1996) where periods between 8 and 34 days were observed. The reasons for this could have been manifold. In the present experiments the percentage of infected erythrocytes of the starting inoculum was only about 10% in contrast to a range of 30–64% of those reported by the above-mentioned authors. Furthermore, the relatively long transport from Brazil to Germany might have had a negative influence on the survival of

and positive selection (Mutshembele et al., 2014). Thus, two major evolutionary forces may be shaping a diversity of MSP1a: host immune system and pathogen-tick interactions. New combinations of tandem repeats may give adaptive advantage to *A. marginale* in regions with high host immunity and transmission by ticks.

Finally, assuming that all strains in Cluster α have a MSP1a common ancestor with tandem repeat structure (3- β -1'-1'- β - β -N), we could consider AmRio1 as a highly divergent strain compared to AmRio2 that still conserve 3 tandem repeats type β from the ancestor. However, we do not have enough evidence to certainly say whether this diversification is related or not to transmission by *R. microplus*. Further transmission studies are needed to determine whether these newly reported strains are transmissible by *R. microplus* and, in case of transmissible phenotype, whether AmRio1 have some transmission fitness differences with AmRio2 related to these differences in MSP1a sequences.

Conclusions

We successfully isolated two strains of *A. marginale* using IDEB tick cell cultures. The strains were genetically divergent and may be used in future for the development of anti-*A. marginale* vaccines and diagnostics tests. In addition, these strains may be useful to test the hypothesis regarding the tick-transmissibility genotype and MSP1a variability.

Acknowledgements

To the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and to the Coordination Office for Improvement of Higher-Education Staff (CAPES), for their financial support.

References

Allred, D.R., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Leib, S.R., Harkins, T.M., McElwain, T.F., Barbet, A.F., 1990. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3220–3224.

Aubry, P., Geale, D.W., 2011. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound. Emerg. Dis.* 58, 1–30.

Bastos, C.V., Passos, L.M.F., Vasconcelos, M.M.C., Ribeiro, M.F.B., 2009. In vitro establishment and propagation of a Brazilian strain of *Anaplasma marginale* with appendage in IDEB (Ixodes scapularis) cells. *Braz. J. Microbiol.* 40, 399–403.

Bell-Sakyl, L., Zweggarth, E., Blouin, E.F., Gould, E.A., Jongejans, F., 2007. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends Parasitol.* 23, 450–457.

Blouin, E.F., Barbet, A.F., Yi, J., Kocan, K.M., Saliki, J.T., 2000. Establishment and characterization of an Oklahoma isolate of *Anaplasma marginale* in cultured Ixodes scapularis cells. *Vet. Parasitol.* 87, 301–313.

Blouin, E.F., de la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Sauer, J.R., Saliki, J.T., Kocan, K.M., 2002. Applications of a cell culture system for studying the interaction of *Anaplasma marginale* with tick cells. *Anim. Health Res. Rev.* 3, 57–68.

Bowie, M.V., de la Fuente, J., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Barbet, A.F., 2002. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. *Gene* 282, 95–102.

Cabezas-Cruz, A., Passos, L.M.F., Lis, K., Kenneil, R., Valdes, J.J., Ferrolho, J., Tonk, M., Pohl, A.E., Grubhoffler, L., Zweggarth, E., Shikap, V., Ribeiro, M.F.B., Estrada-Peña, A., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2013. Functional and immunological relevance of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a sequence and structural analysis. *PLoS ONE* 8, e65243.

Carelli, G., Decaro, N., Lorusso, A., Elia, G., Lorusso, E., Mari, V., Ceci, L., Buonavoglia, C., 2007. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Vet. Microbiol.* 124, 107–114.

Chevenet, F., Brun, C., Bamals, A.L., Jacq, B., Christen, R., 2006. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinform.* 7, 439.

de la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 2001. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *Int. J. Parasitol.* 31, 145–153.

de la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 2003a. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Vet. Microbiol.* 91, 265–283.

de la Fuente, J., Passos, L.M.F., Van Den Bussche, R.A., Ribeiro, M.F.B., Facury-Filho, E.J., Kocan, K.M., 2004. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.* 121, 307–316.

de la Fuente, J., Ruybal, P., Mtshali, M.S., Naranjo, V., Shuqing, L., Mangold, A.J., Rodriguez, S.D., Jimenez, R., Vicente, J., Moretta, R., Torina, A., Almazán, C., Mbati, P.M., de Echaide, S.T., Farber, M., Rosario-Cruz, R., Cortazar, C., Kocan, K.M., 2007. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Vet. Microbiol.* 119, 382–390.

de la Fuente, J., Thomas, E.J.G., Van den Bussche, R.A., Hamilton, R.G., Tanaka, E.E., Druhan, S.E., Kocan, K.A., 2003b. Characterization of *Anaplasma marginale* isolated from north American bison. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5001–5005.

de la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Caracappa, S., Vicente, J., Mangold, A.J., Vicari, D., Alongi, A., Scimeca, S., Kocan, K.M., 2005. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from cattle farms in the province of Palermo, Sicily. *J. Vet. Med. Ser. B: Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 226–229.

de la Fuente, J., Van Den Bussche, R.A., Garcia-Garcia, J.C., Rodriguez, S.D., Garcia, M.A., Guglielmono, A.A., Mangold, A.J., Passos, L.M.F., Ribeiro, M.F.B., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 2002. Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. *Vet. Microbiol.* 88, 275–285.

de la Fuente, J., Van Den Bussche, R.A., Prado, T.M., Kocan, K.M., 2003c. *Anaplasma marginale* msp1alpha genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1609–1616.

Estrada-Peña, A., Naranjo, V., Acevedo-Whitehouse, K., Mangold, A.J., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2009. Phylogeographic analysis reveals association of tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale* MSP1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance. *BMC Biol.* 7, 57.

Felsenstein, J., 1989. Mathematics vs evolution: mathematical evolutionary theory. *Science* 246, 941–942.

Garcia-Garcia, J.C., de la Fuente, J., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Halbur, T., Onet, V.C., Saliki, J.T., 2004. Mapping of B-cell epitopes in the N-terminal repeated peptides of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and characterization of the humoral immune response of cattle immunized with recombinant and whole organism antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 98, 137–151.

Gascuel, O., Steel, M., 2006. Neighbor-joining revealed. *Mol. Biol. Evol.* 23, 1997–2000.

Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.

Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780.

Kocan, K.M., Coetzee, J.F., Step, D.L., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Reppert, E., Simpson, K.M., Boileau, M.J., 2012. Current challenges in the diagnosis and control of bovine anaplasmosis. *Bovine Practitioner* 46, 67–77.

Lew, A.E., Bock, R.E., Minchin, C.M., Masaka, S., 2002. A msp1 alpha polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Vet. Microbiol.* 86, 325–335.

Munderloh, U.G., Blouin, E.F., Kocan, K.M., Ge, N.L., Edwards, W.L., Kurti, T.J., 1996. Establishment of the tick (Acari: Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. *J. Med. Entomol.* 33, 656–664.

Mutshembele, A.M., Cabezas-Cruz, A., Mtshali, M.S., Theksoe, O.M.M., Galindo Ruth, C., de la Fuente, J., 2014. Epidemiology and evolution of genetic variability of *Anaplasma marginale* in South Africa. *Ticks Tick Borne Dis.* 5 (6), 624–631.

Nielsen, R., 2002. Mapping mutations on phylogenies. *Syst. Biol.* 51, 729–739.

Palmer, G.H., Rurangirwa, F.R., McElwain, T.F., 2001. Strain composition of the Ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. *J. Clin. Microbiol.* 39, 631–635.

Pohl, A.E., Cabezas-Cruz, A., Ribeiro, M.F.B., da Silveira, J.A.G., Silaghi, C., Pfister, K., Passos, L.M.F., 2013. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22, 129–135.

Pupko, T., Pe'er, I., Shamir, R., Graur, D., 2000. A fast algorithm for joint reconstruction of ancestral amino acid sequences. *Mol. Biol. Evol.* 17, 890–896.

Ruybal, P., Moretta, R., Perez, A., Petrih, R., Zimmer, P., Alcaraz, E., Echaide, I., de Echaide, S.T., Kocan, K.M., de la Fuente, J., Farber, M., 2009. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina. *Vet. Parasitol.* 162, 176–180.

Vidotto, O., Barbosa, C.S., Andrade, G.M., Machado, R.Z., Da Rocha, M.A., Silva, S.S., da Rocha, M.A., 1998. Evaluation of a fraction trivalent attenuated vaccine against Babesiosis and anaplasmosis in Brazil. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840, 420.

Watson, P., 1966. A slide centrifuge: an apparatus for concentrating cells in suspension onto a microscope slide. *J. Lab. Clin. Med.* 68, 494–501.

Yang, Z., Kumar, S., Nei, M., 1995. A new method of inference of ancestral nucleotide and amino acid sequences. *Genetics* 141, 1641–1650.