

LEIDIANE LIMA DUARTE

**Cultura de células embrionárias de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* para cultivo de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale***

São Paulo

2017

LEIDIANE LIMA DUARTE

**Cultura de células embrionárias de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* para cultivo de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de Concentração:**

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

**Orientador:**

Profa. Dra. Darci Moraes Barros Battesti

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3437  
FMVZ

Duarte, Leidiane Lima

Cultura de células embrionárias de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* para cultivo de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale*. / Leidiane Lima Duarte. – 2017. 94 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Darci Moraes Barros Battesti.

1. *Rhipicephalus sanguineus s.l.* 2. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 3. Culturas de células embrionárias. 4. *Ehrlichia canis*. 5. *Anaplasma marginale*. I. Título.

## RESUMO

LIMA-DUARTE, L. **Cultura de células embrionárias de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* para cultivo de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale*.** [Embryonic cell culture of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae), of temperate origin, for *Ehrlichia canis* culture]. 2017. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

No Brasil, carrapatos do gênero *Rhipicephalus* são representados pelas espécies *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Latreille) e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini), sendo que a primeira espécie possui especificidade com cães domésticos e a segunda com bovinos. Para o cão, *R. sanguineus* s.l. é o principal vetor de agentes causadores da babesiose canina e da erliquiose, enquanto que nos bovinos, *R. microplus* é responsável, principalmente, pela transmissão de agentes causadores da babesiose e anaplasiose. Alguns dos patógenos causadores dessas doenças são difíceis de serem cultivados *in vitro*, e não crescem em meios artificiais, especialmente *Anaplasma* spp. Assim, muitas linhagens celulares de carrapatos foram desenvolvidas nos últimos 40 anos e têm sido amplamente utilizadas para isolamento e propagação de microrganismos patogênicos. Cultivos celulares obtidos de células embrionárias de carrapatos oferecem um sistema de vetor *in vitro*, que é útil principalmente para estudos de agentes intracelulares. Dessa forma, a obtenção de culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* (origens tropical e temperada) e de *R. (B.) microplus*, bem como, sua infecção com *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale*, respectivamente, são objetivos do presente estudo. Os cultivos celulares dessas espécies de carrapatos foram preparados com massas de ovos de diferentes idades e mantidos à 30 °C em meio de cultura L15-B, suplementado com 10% de Triptose Fosfato e 20% de Soro Fetal Bovino. Subcultivos foram realizados após a formação da monocamada celular confluyente. As identidades celulares foram confirmadas pela PCR e sequenciamento, utilizando um fragmento do gene mitocondrial 16S rDNA. As sequências das culturas de células de *R. sanguineus* (tropical e temperada) e de *R. microplus* foram depositadas no GenBank. Essas culturas de células foram infectadas com *E. canis* e *A. marginale* (cepas Jaboticabal), respectivamente, e mantidas em meio L-15B (Vitrocell) suplementado com Soro Fetal Bovino enriquecido com ferro (Hyclone) nas concentrações de 2% e 5%. As células infectadas foram mantidas em propagações sucessivas até a terceira passagem, para novas culturas de células não infectadas, sendo então criopreservadas. O DNA extraído das células infectadas e não infectadas de *R. sanguineus* (de ambas as origens) e de *R. microplus*, foi analisado pela PCR quantitativa em tempo real (qPCR), utilizando os genes *E. canis-dsb* e *mSP1β*, respectivamente. Propagações de células de carrapatos infectadas para as novas culturas

de *R. sanguineus* (origem tropical) e *R. (B) microplus*, foram bem sucedidas. Por outro lado, as células de *R. sanguineus* (origem temperada) não se tornaram infectadas no presente estudo.

Palavras-chave: *Rhipicephalus sanguineus* L., *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, culturas de células embrionárias, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma marginale*.

## ABSTRACT

LIMA-DUARTE L. **Embryonic cell culture of ticks of the genus *Rhipicephalus* for cultivation of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma marginale*.** [Cultura de células embrionárias de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* para cultivo de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale*]. 2017. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

In Brazil, ticks of the genus *Rhipicephalus* are represented by the species *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Latreille) and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini), being that the first one has specificity with domestic dogs and the second with cattle. For dogs, *R. sanguineus* s.l. is the main vector of causative agents of canine babesiosis and ehrlichiosis, whereas in cattle, *R. microplus* is responsible, mainly, for the transmission of agents that cause babesiosis and anaplasmosis. Some of the pathogens that cause these diseases are difficult to grow in vitro, and do not grow on artificial media, especially *Anaplasma* spp. Therefore, many tick cell lines were developed in the last 40 years and have been used for the isolation and propagation of pathogenic microorganisms. Cell cultures obtained from embryonic tick cells offer an in vitro vector system, which is mainly useful for studies of intracellular agents. The aim of the present study was to obtain cultures of *R. sanguineus* (tropical and temperate lineages) and *R. microplus* embryonic cells and their infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma marginale*. Cell cultures from the tick species were prepared with egg masses of different ages and kept at 30 °C in L15-B culture medium supplemented with 10% Tryptose Broth and 20% Fetal Bovine Serum. Subcultures were done after confluent cell monolayer formation. Cellular identities were confirmed by PCR and sequencing using a 16S rDNA mitochondrial gene fragment. Sequences of *R. sanguineus* (tropical and temperate) and *R. microplus* cell cultures were deposited on GenBank. These cell cultures were infected with *E. canis* and *A. marginale* (Jaboticabal strains), respectively, and maintained in L-15B medium and Fetal Bovine Serum with iron (Hyclone) supplemented at 2% and 5% concentrations. The infected cells were maintained in successive propagations until the third passage, to new cultures of uninfected cells, and then were cryopreserved. DNA extracted from infected and uninfected *R. sanguineus* (both origin) and *R. microplus* cells was analyzed by quantitative real-time PCR (qPCR) using the *E. canis*-dsb and msp1 $\beta$  genes, respectively. Propagations of infected tick cells to the new cultures of *R. sanguineus* (tropical origin) and *R. microplus*, were successful. On the other hand, the *R. sanguineus* cells (temperate origin) did become infected in the present study.

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus* l., *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, embryonic cell culture, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma marginale*

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente são catalogadas mais de 900 espécies de carrapatos agrupadas na ordem Ixodida (Metastigmata), incluídas nas famílias Ixodidae, “carrapatos duros”, apresentando aproximadamente 722 espécies, Argasidae, “carrapatos moles”, com 208 espécies, e Nuttalliellidae, família representada por uma única espécie, *Nuttalliella namaqua* Bedford, 1931. Os gêneros compreendidos na família Ixodidae são: *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* e *Rhipicephalus*. Aqueles que pertencem à família Argasidae são: *Argas*, *Antricola*, *Nothoaspis*, *Ornithodoros* e *Otobius* (GUGLIELMONE et al., 2010; NAVA et al., 2017).

No Brasil, até a presente data, a fauna ixodológica é de 70 espécies, composta por 46 Ixodídeos e 24 Argasídeos (KRAWCZAK et al., 2015; WOLF et al., 2016) distribuída em nove gêneros: *Antricola*, *Argas*, *Ornithodoros*, *Nothoaspis*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus* (MARTINS et al., 2013; NAVA et al., 2017).

O gênero *Rhipicephalus* KOCH, 1844 compreende 84 espécies no mundo, incluindo cinco espécies do subgênero *Boophilus* (GUGLIELMONE et al., 2010; HORAK et al., 2013). No Brasil, esse gênero está representado pelas espécies *Rhipicephalus sanguineus* L. (Latreille, 1806) e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887), a primeira é parasita de cães e responsável pela babesiose e ehrlichiose canina, enquanto que a segunda parasita os bovinos e transmite os agentes da babesiose e anaplasmose bovina.

### 1.1 *Rhipicephalus sanguineus* L. (Latreille, 1806),

A espécie *R. sanguineus* s.l., inicialmente nomeada como *Ixodes sanguineus*, é conhecida popularmente como carrapato marrom do cão, possui alta capacidade adaptativa a diversas condições climáticas e conjuntos ecológicos que permitem sua ampla distribuição nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas (FLECHTMANN, 1973; DANTAS-TORRES, 2008).



O hospedeiro natural de *R. sanguineus* é o cão doméstico e as populações caninas são as principais fontes de manutenção destes parasitos no ambiente (DANTAS-TORRES, 2008; SERRA-FREIRE, 2009). Entretanto, estes carrapatos podem eventualmente parasitar outros hospedeiros, inclusive humanos (DANTAS-TORRES et al., 2006; LOULY et al., 2006).

Para completar seu ciclo de vida *R. sanguineus* s.l. necessita de três hospedeiros, podendo haver de 2 a 3 gerações por ano (GUGLIELMONE et al. 2006).

O carrapato *R. sanguineus* sensu stricto (s.s.), é a espécie mais controversa do complexo “*R. sanguineus*” que inclui 17 espécies (WAKLER et al., 2000; NAVA et al., 2014; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015).

A origem de *R. sanguineus* s.s. é duvidosa, uma vez que o espécime tipo foi perdido. Hoogstraal (1956) considerou que o *R. sanguineus* s.s. é uma espécie africana, enquanto Feldman-Muhsam (1967), Morel e Vassiliades (1963) e Pomerantsev et al. (1940) a consideraram uma espécie do Mediterrâneo.

Durante a última década, alguns estudos biológicos (SZABÓ et al., 2005), morfológicos (OLIVEIRA et al., 2005; SANCHES et al., 2016) e moleculares (SZABÓ et al., 2005; BURLINI et al., 2010; MORAES-FILHO et al., 2010; NAVA et al., 2012), indicaram que o táxon *R. sanguineus* é composto por mais de uma espécie.

Moraes-Filho et al. (2010) realizaram uma análise filogenética através do gene 16S, e os resultados demonstraram a existência de no mínimo dois “grupos” de *R. sanguineus* na América Latina.

Nava et al. (2012) realizaram análise genética de sequências do gene rDNA mitocondrial 16S e 12S de *R. sanguineus*, e os resultados filogenéticos revelaram dois haplótipos, sendo denominados como “Linhagem sul ou temperada” (parte da Argentina, Uruguai, Chile, Itália, e sul do Brasil) e “Linhagem norte ou tropical”, para as populações de *R. sanguineus* das regiões tropicais e subtropicais (Brasil com exceção do sul do Rio Grande do Sul, Paraguai, Colômbia, África do Sul, Moçambique e Norte da Argentina).

A espécie *R. sanguineus* s.l. está envolvida no ciclo epidemiológico de agentes que provocam diferentes doenças em cães e em seres humanos, atuando como vetores biológicos e mecânicos, transmitindo vírus, bactérias e protozoários (PAROLA et al., 2005; OTRANTO et al., 2009; BOWMAN et al., 2011).

As principais doenças transmitidas por *R. sanguineus* s.l. aos cães são a Babesiose, causada por *Babesia vogeli* e a Ehrliquiose Monocítica Canina (EMC) causada por *Ehrlichia canis* (DANTAS-TORRES, 2008; CHAO et al., 2015). A EMC constitui-se em uma das doenças infecciosas de cães mais importantes no Brasil (VIEIRA et al., 2011).

A doença é caracterizada por manifestações clínicas multissistêmicas, que variam na intensidade de acordo com as fases da doença: aguda, assintomática (subclínica) e crônica. Após um período de incubação de 8 a 20 dias, o agente se multiplica nos órgãos do sistema mononuclear fagocítico (fígado, baço e linfonodos). Logo, na fase aguda, a infecção acarreta uma hiperplasia linfocitária com posterior inflamação (COSTA et al., 2015)

Até recentemente, pensava-se que *E. canis* infectasse apenas caninos. Porém, em 1994, a bactéria foi isolada e molecularmente caracterizada a partir de amostras de sangue de humanos assintomáticos na Venezuela (PEREZ et al., 1996). Em 2006, *E. canis* foi detectada em pacientes humanos com sinais clínicos compatíveis com erliquiose (PÉREZ et al., 2006). Mais recentemente, Bouza-Moura et al. (2017) detectaram DNA de *E. canis* em amostras obtidas do banco de sangue da Costa Rica, país onde a EMC é endêmica.

No Brasil, embora ainda não tenha sido detectado DNA de *E. canis* em humanos, anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. foram obtidos em pacientes com sintomatologia clínica compatível com erliquiose humana (CALIC et al., 2004; COSTA et al., 2006). Desde então, *E. canis* é considerada por alguns autores como um agente potencial de doenças humanas em áreas endêmicas para EMC, causada por essa bactéria (NICHOLSON et al., 2010).

Na América Latina, ficou demonstrado que a EMC ocorre nas áreas tropicais, enquanto que nas áreas temperadas, os carrapatos não são suscetíveis à bactéria. Então, essas diferenças taxômicas das populações de *R. sanguineus* também refletem a situação da EMC na América do Sul (CICUTTIN et al., 2015; MORAES-FILHO et al., 2015).

A bactéria *E. canis*, tem sido cultivada em células de carrapatos não vetores, predominantemente na linhagem celular de *Ixodes scapularis* Say, 1821 (ISE6) (BELL-SAKYI et al., 2007). Porém, outras linhagens celulares, como as de *Dermacentor variabilis* (SAY, 1821), *Hyalomma anatolicum* (KOCH, 1844), *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), *R. appendiculatus*, *Rhipicephalus evertsi* (NEUMANN, 1897) e *R. microplus* também suportam o crescimento de *E. canis* (FERROLHO et al., 2016).

## **1.2 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887)**

A espécie *R. microplus*, conhecida popularmente como “carrapato do boi”, tem ampla distribuição geográfica, tendo se adaptado a diferentes regiões do mundo, juntamente com seu hospedeiro (principalmente bovinos), devido às importações.

Inicialmente esta espécie era citada como *Boophilus microplus*, porém, estudos moleculares e morfológicos, comprovaram sua relação filogenética com o gênero *Rhipicephalus*, ficando *Boophilus* na posição subgenérica (MURRELL; BARKER, 2003).

Apesar da disseminação de *R. microplus* não ser bem documentada, a espécie é possivelmente originária da Índia (HOOGSTRAL, 1986). A introdução de *R. microplus* no Brasil, ocorreu entre os séculos XVI e XVII (BARRÉ; UILENBERG, 2010).

É um carrapato monoxeno que tem bovinos como principais hospedeiros, podendo ser eventualmente encontrado em outros animais domésticos e em alguns ungulados silvestres (FURLONG, 2005). O ciclo de vida de *R. microplus* ocorre praticamente sobre o hospedeiro; e a fase de vida livre restringe-se às fêmeas alimentadas e as larvas em jejum. As condições climáticas (temperatura do ar e pluviosidade), e o grau de resistência do hospedeiro são fatores que influenciam a duração do ciclo de vida do carrapato e, também, no peso das teleóginas (OLIVEIRA et al. 1974; ROCHA, 1984; LEMOS, et al., 1985).

Durante o ano podem ocorrer de 3 a 4 gerações de carrapatos, porém, somente 1 a 2% dessa população alcança a fase adulta, isto por causa de predadores como insetos, fungos, aves e bactérias (GONZÁLES, 1993).

A espécie *R. microplus* é considerada um dos ectoparasitos que mais acarretam impacto econômico em áreas tropicais (JONSSON, 2006). Altas infestações propiciam grandes perdas para bovinocultura, resultando em prejuízos anuais de bilhões de dólares na pecuária nacional (MARTINEZ et al., 2006; RODRIGUES et al., 2014; MILKPOINT, 2017). Tais prejuízos estão associados, principalmente, à ingestão de sangue que afeta a produção de carne e leite, à transmissão de agentes infecciosos, à inoculação de toxinas nos hospedeiros, gerando diversas alterações e consequências como a inapetência alimentar. Grandes infestações também reduzem a qualidade do couro do animal, devido às cicatrizes geradas durante a alimentação (HORN, 1983; FURLONG, 1993; KLAFKE et al., 2006). Este carrapato é responsável por transmitir os patógenos das enfermidades que integram o complexo “Tristeza Parasitária Bovina” (TPB), que incluem os protozoários do gênero *Babesia* e bactérias do gênero *Anaplasma* (DE LEÓN et al., 2010).

A espécie *R. microplus* ocorre de forma endêmica, e as evidências epidemiológicas indicam que ela é a principal vatora de *Anaplasma marginale* (GUGLIELMONE, 1995, KESSLER, 2001; DE CAMPOS-PEREIRA et al., 2008).

*Anaplasma marginale* é o agente etiológico da anaplasmoze bovina. Sua transmissão pode ser realizada tanto pelo carrapato *R. microplus*, como também por vetores mecânicos, tais como os insetos hematófagos *Stomoxys calcitrans*, tabanídeos e culicídeos (ARTECHE et al.,

1992; OLIVEIRA et al., 2003; CARELLI et al., 2007 AUBRY; GEALE, 2011). No entanto, estudos demonstraram que a transmissão biológica feita por carrapatos é pelo menos duas vezes mais eficiente que a transmissão mecânica feita pela mosca de estábulo (SCOLES et al., 2005).

A anaplasmoze bovina é responsável por causar grandes perdas econômicas, principalmente, em países de clima tropical e subtropical, com alta morbidade e mortalidade em bovinos (BARROS et al., 2005; JÚNIOR et al., 2008; KOCAN et al., 2010).

A bactéria *A. marginale*, tem sido cultivada em linhagens de células de carrapatos não vetores, como *I. scapulares* (ISE6-IDE8), *Ixodes ricinus* (IRE/CTVM18) e em células do vetor *R. microplus* (BME26) (MUDERLOH et al.,1996; BLOUIN et al., 2003; MUDERLOH et al.,2004; ZWEYGARTH et al.,2006; BASTOS et al., 2009; ESTEVES et al., 2009; VILLAR et al., 2010; AYLLON et al., 2013).

### 1.3 Linhagens de células de carrapatos

O cultivo de células consiste em processos de isolamento e manutenção da viabilidade e da proliferação das células de um determinado tecido (animal ou vegetal) em um sistema in vitro constituído de nutrientes e fatores essenciais à sobrevivência, sob condições de temperatura, pH e osmolaridade controladas (DO AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011). A cultura celular é basicamente dividida em dois grandes grupos: culturas primárias, as quais são obtidas diretamente de tecidos, são heterogêneas, mantêm-se pouco tempo em cultura e são mais propícias ao desenvolvimento de contaminações; e linhagens celulares, que são obtidas a partir de culturas primárias, podem ser células imortalizadas (devido a alterações genéticas), apresentam crescimento rápido e contínuo e proliferação ilimitada ou limitada a um número elevado de divisões celulares (COIMBRA, 2008).

Alguns dos agentes patogênicos transmitidos por picadas de carrapatos são muito difíceis de serem cultivados em meios de cultura artificiais. Dessa forma, linhagens contínuas de células a partir de várias espécies de carrapatos ixodídeos e argasídeos já foram estabelecidas e representam uma ferramenta muito útil para o isolamento e propagação de patógenos. Apesar de existir aproximadamente 900 espécies de carrapatos mundialmente conhecidas, há relativamente poucas linhagens celulares de carrapatos estabelecidas até o momento (BELL-SAKYI et al., 2007).

As tentativas de cultivar células de carrapatos datam de mais de 50 anos. A primeira tentativa foi realizada por Weyer (1952), que obteve células a partir de tecidos de *Rhipicephalus bursa* Canestrini & Fanzago, 1878; no entanto, o cultivo durou apenas oito dias. Embora alguns avanços tenham ocorrido desde a primeira tentativa, o sucesso do cultivo de células de carrapato in vitro se limitava às culturas primárias. Contudo melhorias na metodologia possibilitaram o estabelecimento da primeira linhagem celular de tecido de carrapato (ninfa) da espécie *Rhipicephalus Appendiculatus* Neumann, 1901 (VARMA et al., 1975).

Linhagens de células foram estabelecidas a partir de carrapatos dos gêneros *Rhipicephalus* (VARMA et al., 1975, KURTTI et al., 1982, PUDNEY et al., 1979, HOLMAN; RONALD, 1980), *Dermacentor* (BHAT e YUNKER, 1977; YUNKER et al., 1981; KURTTI et al., 1983), *Hyalomma* (BELL-SAKYI et al., 2007), *Ixodes* (MUNDERLOH et al., 1994; KURTTI et al., 1996; SIMSER et al., 2002; LAWRIE et al., 2004; BELL-SAKYI, 2004), *Ornithodoros* (KURTTI et al., 2005; BELL-SAKYI et al., 2009) e *Amblyomma* (BELL-SAKYI et al., 2000; BELL-SAKYI, 2004; KURTTI et al., 2005; SINGU et al., 2006; CIRELLI-MORAES, 2015). As linhagens de células de *R. microplus* e *R. sanguineus* já foram estabelecidas há mais de 20 anos (HOLMAN; RONALD, 1980; KURTTI et al., 1988; MUNDERLOH; KURTTI, 1989; COSSIO-BAYUGAR et al., 2002; BELL-SAKYI, 2004).

No Brasil, a primeira linhagem celular estabelecida com sucesso foi da espécie *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (IBU/ASE-16) (CIRELLI-MORAES, 2015), cujo método resultou em patente internacional (PCT/BR2016/0501901).

Atualmente existem mais de 40 linhagens de células de carrapatos de diferentes espécies, 14 Ixodidae e uma de Argasidae (Quadro 1.1). A maioria está depositada no Instituto Pirbright, Surrey (Reino Unido), no banco denominado Biobank (<https://www.pirbright.ac.uk/search?keywords=biotick;type=All>).

#### 1.4 Aplicabilidade

As culturas de células de carrapatos oferecem um simplificado sistema de vetor in vitro, agregando maior conhecimento sobre a biologia e a interação hospedeiro-vetor-patógeno. São também utilizadas para análises genéticas e proteômicas (BELL-SAKYI et al. 2007).

Há mais de 30 anos, as linhagens celulares de *R. appendiculatus* são utilizadas para propagação de arbovírus (VARMA et al., 1975; VARMA, 1989; PUDNEY, 1987). E linhagens

celulares de outras espécies de carrapatos também foram aplicadas com sucesso para propagar outros patógenos (LAWRIE et al., 2004; GARCIA et al., 2005; BELL-SAKYI et al. 2016). Propagação de agentes patogênicos como *Ehrlichia*, *Rickettsia* e *Anaplasma* já foram realizadas em linhagens de células de carrapatos, entre os quais, a bactéria *A. marginale* tem sido mais estudada (MUNDERLOH et al., 1996; BLOUIN et al., 2002). A linhagem celular de *R. appendiculatus* (RAE25) também foi utilizada para propagação de *Rickettsia* sp. (MUNDERLOH et al., 1998). Além desses agentes, muitos outros microrganismos foram isolados em culturas de células de carrapatos, tais como clamídias (SHATKIN et al., 1977); micoplasmas (TULLY et al., 1981) e borrelíias (KURTTI et al., 1993; OBONYO et al., 1992). Valera et al. (2007) reportaram o primeiro isolamento de *Borrelia lonestari* (cepa LS-1) na linhagem celular de *Ixodes scapularis* (ISE6), sendo que essa borrelíia, não sobrevivia em outros substratos. Deste modo, a aplicação de linhagens celulares de carrapatos representa uma ferramenta muito útil para fornecimento de material antigênico sem a utilização de animais experimentais (PASSOS, 2012).

**Quadro 1.1** –Linhagens de células de carrapatos estabelecidas

<b>Espécies de Carrapato</b>	<b>Instar</b>	<b>Nome da linhagem</b>	<b>Referências</b>
<i>Amblyomma americanum</i>	Ovos	AAE2,12	(Kurtti et al., 2005) (Singu et al., 2006)
<i>Amblyomma sculptum</i>	Ovos	IBU/ASE-16	(Cirelli-Moraes, 2015)
<i>Amblyomma variegatum</i>	Larva	AVL/CTVM13,17	(Bell-Sakyi,2004) (Bell-Sakyi et al.,2000)
<i>Carios capensis</i>	Ovos	CCE,1,2,3,5	(Kurtti et al., 2005)
<i>Dermacentor albipictus</i>	Ovos	DALBE3 DAE3, 15, 100	(Kurtti et al., 2005) (Munderloh et al., 1996) (Policastro et al., 1997)
<i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i>	Ovos	ANE58	(Simser et al., 2001) (Kurtti et al., 2005)
<i>Dermacentor variabilis</i>	Ovos	DVE1	(Kurtti et al., 2005)
<i>Hyalomma anatolicum anatolicum</i>	Ovos	HAE/CTVM7, 8, 9, 10, 11	(Bell-Sakyi,1991)
<i>Ixodes scapularis</i>	Ovos	IDE2, 8, 12 ISE5, 6, 18, 25	(Munderloh et al.,1994) (Kurtti et al.,1996)
<i>Ixodes ricinus</i>	Ovos	IRE11 IRE/CTVM18, 19, 20	(Lawrie et al., 2004) (Bell-Sakyi, 2004) (Simser et al., 2002)
<i>Ornithodoros moubata</i>	Ovos/Larvas	OME/CTVM21 22,24,27	(Bell-Sakyi et al., 2009)
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Ovos	RAE25 RAE/CTVM1	(Kurtti, et al.,1988) (Bell-Sakyi, 2004)
	Ninfa	RA243, 257 RAN/CTVM3	(Varma et al.,1975) (Bekker et al., 2002)
<i>Rhipicephalus evertsi</i>	Ovos	REE/CTVM31	(Alberdi et al., 2012)
	Ninfa	REN/CTVM32	(Bell-Sakyi et al., 2015)
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Ovos	B. MICROPULUS IX,VII- SCC BMM 26 BME/CTVM2,4,6,6	(Kurtti, et al.,1988) (Cossio-Bayugar et al., 2002) (Bell-Sakyi,2004) (Holman ; Ronald, 1980)
<i>Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus</i>	Ovos	BDE/CTVM12,14 e 16	(Bell-Sakyi,2004)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ovos	RSE8 RML-RSE	(Kurtti, et al.,1988) (Yunker et al.,1984; 1987)

Fonte: Modificada de Bell-Sakyi et al. 2007

## 1.5 Justificativa

Muitos bioagentes transmitidos por carrapatos são autóctones e não crescem em meios sintéticos ou não se adaptam a outros substratos. Assim sendo, a obtenção de culturas a partir de células embrionárias de carrapatos para testar a viabilidade e o crescimento de patógenos ou a sua propagação, poderá representar um avanço significativo na compreensão das relações patógeno/vetor/hospedeiro. Além disso, uma linhagem celular estabelecida poderá significar baixo custo, rapidez de resultados e diminuição no uso de animais de laboratório, propostas estas, que vem a favor das normas estabelecidas pelo Conselho de Ética em Experimentação Animal.

## 4. CONCLUSÃO GERAL

- A idade dos ovos para a viabilidade de cultivos primários de células embrionárias de *R. sanguineus* (origem temperada e tropical) na temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  e umidade de  $90\% \pm 5$  é de 12 a 14 dias
- A idade para a viabilidade de cultivos primários de células a partir de ovos embrionários de *R. microplus* é de 15 dias  $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  e umidade de  $90\% \pm 5$
- Foi estabelecido a linhagem de células de *R. microplus* no 12<sup>a</sup> subcultivo.
- Culturas de células embrionárias de *R. sanguineus* de origem tropical, mostraram-se eficientes como substrato para o crescimento de *E. canis* (cepa Jaboticabal), permitindo sua propagação em novos cultivos após o descongelamento.
- As Culturas de células embrionárias *R. sanguineus* de origem temperada não foram capazes de manter *E. canis*.
- Culturas de células embrionárias de *R. microplus* mostraram-se eficientes como substrato para o crescimento de *A.a marginale* (cepa Jaboticabal).



## REFERÊNCIAS

ABU-ABSI, Nicholas R. et al. Automated flow cytometry for acquisition of time-dependent population data. **Cytometry Part A**, v. 51, n. 2, p. 87-96, 2003.

AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z.; LABRUNA, M.B. Serological diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis with Brazilian antigen of *Ehrlichia canis*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007

ALBERDI, M. P.; DALBY, M. J.; RODRIGUEZ-ANDRES, J.; FAZAKERLEY, J. K.; KOHL, A.; BELL-Sakyi, L. Detection and identification of putative bacterial endosymbionts and endogenous viruses in tick cell lines. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 3, n. 3, p. 137-146, 2012.

AYLLÓN, N.; VILLAR, M.; BUSBY, A. T.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; BONZÓN-KULICHENKO, E.; VÁZQUEZ, J. *Anaplasma phagocytophilum* inhibits apoptosis and promotes cytoskeleton rearrangement for infection of tick cells. **Infection and immunity**, v. 81, n. 7, p. 2415-2425, 2013.

ARTECHE, C. C. P. Imunoprofilaxia da tristeza parasitária bovina (TPB) no Brasil. Uso de cepas atenuadas da *Babesia* spp e de cepa de *Anaplasma*. **A Hora Veterinária**, ano, v. 11, p. 39-42, 1992.

AUBRY, P N. R.; Z.; A.; J.; B.; S. J.; & S.; F. A review of bovine anaplasmosis. *Transboundary and emerging diseases*, v. 58, n. 1, p. 1-30, 2011.

BAÊTA, B. A.; Ribeiro, C. C.; Teixeira, R. C.; Cabezas-Cruz, A.; Passos, L. M.; Zweygarth, E.; Fonseca, A. H. Characterization of two strains of *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Rio de Janeiro, Brazil, after propagation in tick cell culture. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 6, n. 2, p. 141-145, 2015.

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F. S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary microbiology**, v. 136, n. 3, p. 321-325, 2009.

BARRÉ, N.; UILENBERG, G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. **Revue scientifique et technique**, v. 29, n. 1, p. 149, 2010.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. ICTTD-3/Instituto Butantan, 2006.

BARROS, S. L.; MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; MENK, C. F.; DE ALMEIDA, M. A. O.; MELO, E. P.; & KESSLER, R. H. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 513-517, 2005.

BASTOS, R. G.; UETI, M. W.; GUERRERO, F. D.; KNOWLES, D. P.; SCOLES, G. A. Silencing of a putative immunophilin gene in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* increases the infection rate of *Babesia bovis* in larval progeny. **Parasites & vectors**, v. 2, n. 1, p. 57, 2009.

BASTOS, C. V.; DAS VASCONCELOS, M. M. C.; RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F. Use of refrigeration as a practical means to preserve viability of in vitro-cultured IDE8 tick cells. **Experimental and Applied Acarology**, v. 39, n. 3, p. 347-352, 2006.

BHAT, R.; KUHN, W.; SCHNEIDER, F. W. The Stirred Flow Reactor: Base Analog Incorporation in DNA Replication and Transcription. **Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie**, v. 81, n. 12, p. 1287-1293, 1977.

BELL-SAKYI, L.; WEISHEIT, S.; RÜCKERT, C.; BARRY, G.; FAZAKERLEY, J.; FRAGKLOUDIS, R. Microscopic Visualisation of Zoonotic Arbovirus Replication in Tick Cell and Organ Cultures Using Semliki Forest Virus Reporter Systems. **Veterinary Sciences**, v. 3, n. 4, p. 28, 2016.

BELL-SAKYI, L.; PALOMAR, A. M.; BRADFORD, E. L.; SHKAP, V. Propagation of the Israeli vaccine strain of *Anaplasma centrale* in tick cell lines. **Veterinary microbiology**, v. 179, n. 3, p. 270-276, 2015.

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

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

BELL-SAKYI, L.; KONEY, E. B. M.; DOGBEY, O.; WALKER, A. R. Incidence and prevalence of tick-borne haemoparasites in domestic ruminants in Ghana. **Veterinary Parasitology**, v. 124, N. 1, P. 25-42, 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 cell line. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1238-1240, 2000.

BELL-SAKYI, L. Continuous cell lines from the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **The Journal of Parasitology**, p. 1006-1008, 1991.

BHAT, R.; KUHN, W.; SCHNEIDER, F. W. The Stirred Flow Reactor: Base Analog Incorporation in DNA Replication and Transcription. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, v. 81, n. 12, p. 1287-1293, 1977.

BLACK, W.C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.91, n.21, p.10034-10038, 1994.

BLOUIN, E. F.; SALIKI, J. T.; DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; KOCAN, K. M. Antibodies to *Anaplasma marginale* major surface proteins 1a and 1b inhibit infectivity for cultured tick cells. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 2, p. 247-260, 2003.

BLOUIN, E. F.; DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; SAUER, J. R., SALIKI, J. T.; KOCAN, K. M. Applications of a cell culture system for studying the interaction of *Anaplasma marginale* with tick cells. **Animal health research reviews**, v. 3, n. 2, p. 57-68, 2002.

BOUZA-MORAL.; DOLZ, G.; SOLÓRZANO-MORALES, A.; ROMERO-ZUÑIGA, J. J.; SALAZAR-SÁNCHEZ, L.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, n. 1, p. 36-40, 2017.

BOWMAN, D. D. Introduction to the alpha-proteobacteria: *Wolbachia* and *Bartonella*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Ehrlichia*, and *Anaplasma*. *Topics in companion animal medicine*, v. 26, n. 4, p. 173-177, 2011.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. Estructura celular. Jawetz, melnick & adelberg: **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 6-30, 2000.

BURTON, G.; ENGELKIRK, P. G.; TOROS, E. F. *Microbiologia para as ciências da saúde*. **Guanabara Koogan**, 1998.

BURLINI, L.; TEIXEIRA, K. R.; SZABÓ, M. P.; FAMADAS, K. M. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern?. **Experimental and Applied Acarology**, v. 50, n. 4, p. 361-374, 2010.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA IV, G. Studies of Rocky Mountain Spotted Fever in Mexico. **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, v. 8, n. 2, p. 139-141, 1947.

CALIC, S. B.; GALVÃO, M. A.; BACELLAR, F.; ROCHA, C. M.; MAFRA, C. L.; LEITE, R. C.; WALKER, D. H. Human ehrlichioses in Brazil: first suspect cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 259-262, 2004.

CANESTRINI, G. La teoria di Darwin: Criticamente esposta. F. Dumolard, 1887.

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

CHAO, L. L.; YEH, S. T.; HSIEH, C. K.; SHIH, C. M. First detection and molecular identification of *Babesia vogeli* from *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Taiwan. **Experimental and Applied Acarology**, v. 68, n. 4, p. 539-551, 2016.

CICUTTIN, G. L.; TARRAGONA, E. L.; DE SALVO, M. N.; MANGOLD, A. J.; NAVA, S. Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 6, n. 6, p. 724-729, 2015.

CIRELLI-MORAES, A. Estabelecimento e caracterização de células embrionárias de *Amblyomma sculptum* Berlese (Acari: Ixodidae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. Infectious diseases of livestock. Volume Three. Oxford University Press, 2004.

COIMBRA, U. "Noções básicas de cultura de células." Retrieved Maio 2008.

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

COSTA, A.P. D.; D. M.; RIBEIRO, M. F. B.; DUARTE, A. L. L.; MANGUEIRA, J. M.; PESSOA, A. F. A.; AZEVEDO, S. S.; DE BARROS, A. T. M.; RIET-CORREA, F.; LABRUNA, M. B. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 28-35, 2015.

COSTA, P. S. G. D.; VALLE, L. M. D. C.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. More about human monocytotropic ehrlichiosis in Brazil: serological evidence of nine new cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 7-10, 2006.

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1, p. 149-155, 2005.

DA COSTA MARQUES, Dorcimar. Criação de bovinos. Nobel, 1974.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus*(Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*(Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3, p. 173-185, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M. S.; WEIGL, S.; TARALLO, V. D.; LIA, R. P.; OTRANTO, D. Hepatozoon canis infection in ticks during spring and summer in Italy. **Parasitology research**, v. 110, n. 2, p. 695-698, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M. S.; ANNOSCIA, G.; GIANNELLI, A.; PARISI, A.; OTRANTO, D. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus*sensu lato from the New and Old Worlds. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 213, 2013.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Domenico. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus*group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1, p. 9-13, 2015.

DE CAMPOS-PEREIRA, M.; BAHIA-LABRUNA, M.; SZABÓ, M. P. J.; MARCONDES-KLAFFE, G. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* biologia, controle e resistência. Primeira edição. São Paulo. **Editorial MedVet**, 2008.

DE LEÓN, A. A. P.; STRICKMAN, D. A.; KNOWLES, D. P.; FISH, D.; THACKER, E.; DE LA FUENTE, J.; KRAUSE, P.J.; WIKEL, S.K.; MILLER, R.S.; WAGNER, G.G.; ALMAZAN, C.; HILLMAN, R.; MESSENGER, M.T.; UGSTAD, P.O.; DUHAIME, R.A.; TEEL, P.D.; ORTEGA-SANTOS, A.; HEWITT, D.G.; BOWERS, E.J.; BENT, S.J.; COCHRAN, M.H.; MCELWAIN, T.F.; SCOLES, G.A.; SUAREZ, C.E.; DAVEY, R.; FREEMAN; ALMAZÁN, C. L. One Health approach to identify research needs in bovine and human babesioses: workshop report. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 36, 2010.

DE OLIVEIRA P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; SAITO, K. C.; NUNES, E. T.; SZABÓ, M. P. J.; MATHIAS, M. I. C. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus*(Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1, p. 139-147, 2005.

DO AMARAL, J. B.; REZENDE-TEIXEIRA, P.; FREITAS, V. M.; MACHADO-SANTELLI, G. M.MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 17, n. 11, p. 1097-1107, 2011.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y. W.; CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C.; MCBRIDE, J. W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the dsb gene. **The Journal of molecular diagnostics**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005.

ESTEVEZ, E.; LARA, F. A.; LORENZINI, D. M.; COSTA, G. H.; FUKUZAWA, A. H.; PRESSINOTTI, L. N.; DAFFRE, S. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 5, p. 568-580, 2008.

ESTEVEES, E.; BASTOS, C. V.; ZIVKOVIC, Z.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.; BLOUIN, E.; DAFFRE, S. Propagation of a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale* with appendage in a tick cell line (BME26) derived from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1, p. 150-153, 2009.

EWING, S. A.; MUNDERLOH, U. G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; KURTTI, T. J. *Ehrlichia canis* in tick cell culture. In: Proceedings of the 76th Conference of Research Workers in Animal Diseases, Chicago, USA. 1995.

FERROLHO, J.; SIMPSON, J.; HAWES, P.; ZWEYGARTH, E.; BELL-SAKYI, L. Growth of *Ehrlichia canis*, the causative agent of canine monocytic ehrlichiosis, in vector and non-vector ixodid tick cell lines. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 4, p. 631-637, 2016.

FLECHTMANN, Carlos HW. Ácaros de importância médico-veterinária. **NBL Editora**, 1973.

FONSECA, A. H. D.; Salles, R. D. S.; & Salles, S. D. A. N. Borreliose de Lyme simile: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. **An. bras. dermatol**, v. 80, n. 2, p. 171-178, 2005.

FURLONG, J. Ecologia do carrapato *Boophilus microplus* na região da Zona da Mata de Minas Gerais. 1993.

FUSSENEGGER, M.; BAILEY, J. E. Molecular regulation of cell-cycle progression and apoptosis in mammalian cells: implications for biotechnology. **Biotechnology progress**, v. 14, n. 6, p. 807-833, 1998.

GOMES, A. Dinâmica populacional de *Boophilus microplus* (canestrini, 1987)(Acari: ixodidae) em bovinos nelore (*Bos indicus*) e cruzamentos em infestações experimentais. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1995.

GONZALES, J. C.; MUNIZ, R. A.; FARIAS, A.; GONCALVES, L. C. B.; REW, R. S. Therapeutic and persistent efficacy of doramectin against *Boophilus microplus* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 107-119, 1993.

GRAF, J.-F.; Gogolewski, R.; Leach-Bing, N.; Sabatini, G. A.; Molento, M. B.; Bordin, E. L.; Arantes, G. J. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S427-S442, 2004.

GRAY J.; DANTAS-TORRES, F.; ESTRADA-PEÑA, A.; LEVIN, M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 4, n. 3, p. 171-180, 2013.

GROVES, M. G.; DENNIS, G. L.; AMYX, H. L.; HUXSOLL, D. L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American journal of veterinary research**, v. 36, n. 7, p. 937-940, 1975.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; SHAO, R.; BARKER, S. C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. 2010.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; ESTRADA-PENÑA. Ticks (ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83-100, 2006.

GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 109-119, 1995.

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.

HOOGSTAL, H. Theobald Smith: his scientific work and impact. Bulletin of the ESA, v. 32, n. 1, p. 22-35, 1986.

JAIN, J. K.; PAULSON, R. J. Oocyte cryopreservation. Fertility and sterility, v. 86, n. 4, p. 1037-1046, 2006.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1-10, 2006.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S3-S14, 2004.

JUNIOR, G.; DANIEL, S.; ARAÚJO, F. R.; SILVA, F. J.; RANGEL, C. P.; BARBOSA NETO, J. D.; & FONSECA, A. H. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 105-109, 2008.

KESSLER, R. H.; GOMES, A.; CAPIBARIBE, P. R.; SILVA, D. D.; SCHENK, M. A. M. Estabelecimento de cultura in vitro de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus*. Embrapa Gado de Corte-Séries anteriores (INFOTECA-E), 1999.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.

KLAFKE, G. M.; SABATINI, G. A.; THAIS, A.; MARTINS, J. R.; KEMP, D. H.; MILLER, R. J.; SCHUMAKER, T. T. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3, p. 386-390, 2006.

KOCAN, K. M.; MUNDERLOH, U. G.; EWING, S. A. Development of the Ebony isolate of *Ehrlichia canis* in cultured *Ixodes scapularis* cells. In: **79th Conference of Research Workers in Animal Diseases**, Chicago. 1998.

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, n. S1, p. S285-S300, 2004.

- 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, p. 95-107, 2010.
- KOCH, C. L. Systematische übersicht über die Ordnung der Zecken. Archiv für Naturgeschichte, v. 10, n. 1, p. 217-239, 1844.
- KOCH, A. L.; HIGGINS, M. L. Cell cycle dynamics inferred from the static properties of cells in balanced growth. *Microbiology*, v. 128, n. 12, p. 2877-2892, 1982
- KONEMAN, E.; WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERBER, P.; WOODS, G. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. In: Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. **Guanabara koogan**, 2012.
- KRAWCZAK, F. S.; MARTINS, T. F.; OLIVEIRA, C. S.; BINDER, L. C.; COSTA, F. B., NUNES, P. H., LABRUNA, M. *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a parasite of wild mammals in southern Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 52, n. 1, p. 28-37, 2015.
- KURTTI, 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. 90, n. 3, p. 177-186, 2005.
- KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; ANDREADIS, T. G.; MAGNARELLI, L. A.; MATHER, T. N. Tick Cell Culture Isolation of an Intracellular Prokaryote from the Tick *Ixodes scapularis*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 67, n. 3, p. 318-321, 1996.
- KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; HAYES, S. F.; KRUEGER, D. E.; AHLSTRAND, G. G. Ultrastructural analysis of the invasion of tick cells by Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) in vitro. **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, n. 6, p. 977-994, 1994.
- 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.; 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, 1988.
- KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; STILLER, D. The interaction of *Babesia caballi* kinetes with tick cells. **Journal of invertebrate pathology**, v. 42, n. 3, p. 334-343, 1983.
- KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; SAMISH, Michael. Effect of medium supplements on tick cells in culture. *The Journal of Parasitology*, p. 930-935, 1982.
- LALLINGER, G.; ZWEYGARTH, E.; BELL-SAKYI, L.; PASSOS, L. M. Cold storage and cryopreservation of tick cell lines. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 37, 2010.



- LASTA, C. S.; SANTOS, A. P. D.; MESSICK, J. B.; OLIVEIRA, S. T.; BIONDO, A. W.; VIEIRA, R. F. D. C.; GONZÁLEZ, F. H. D. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 360-366, 2013.
- LAWRIE, C. H.; UZCATEGUI, N. Y.; ARMESTO, M.; BELL-SAKYI, L.; GOULD, E. A. Susceptibility of mosquito and tick cell lines to infection with various flaviviruses. **Medical and veterinary entomology**, v. 18, n. 3, p. 268-274, 2004.
- LEMOS, A. M.; TEODORO, R. L.; OLIVEIRA, G. P.; MADALENA, F. E. Comparative performance of six Holstein-Friesian × Guzera grades in Brazil 3. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions. **Animal Science**, v. 41, n. 2, p. 187-191, 1985.
- LOULY, C. C. B.; FONSECA, I. N.; DE OLIVEIRA, V. F.; BORGES, L. M. F. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2006.
- 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 Metastriata (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 84, n. 6, p. 478-484, 1998.
- MARIOTTE, C. O.; BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Specimens of *Rhipicephalus sanguineus* found naturally infected with Rocky Mountain Spotted Fever in Sonora (Mexico). **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, v. 5, n. 4, p. 297-300, 1944.
- MARTINEZ, M. L.; MACHADO, M. A.; NASCIMENTO, C. S.; SILVA, M. V. G. B.; TEODORO, R. L.; FURLONG, J.; PRATA, M. C. A.; CAMPOS, A. L.; GUIMARÃES, M. F. M.; AZEVEDO, A. L. S.; PIRES, M. F. A.; VERNEQUE, R. S. Association of BoLA-DRB3. 2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, v. 5, n. 3, p. 513-524, 2006.
- MATTILA, J. T.; BURKHARDT, N. Y.; HUTCHESON, H. J.; MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Isolation of cell lines and a *Rickettsial* endosymbiont from the soft tick *Carios capensis* (Acari: Argasidae: Ornithodorinae). **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 6, p. 1091-1101, 2007.
- MILKPOINT. Quais os danos causados por carrapatos bovinos? 2017. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/sobre-o-site/novas-do-site/video-quais-os-danos-causados-por-carrapatos-bovinos-105289n.aspx>>. Acesso em: 23 05. 2017.
- MONIUSZKO, A.; RÜCKERT, C.; ALBERDI, M. P.; BARRY, G.; STEVENSON, B.; FAZAKERLEY, J. K.; BELL-SAKYI, L. Coinfection of tick cell lines has variable effects on replication of intracellular bacterial and viral pathogens. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 4, p. 415-422, 2014.
- MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta tropica**, v. 117, n. 1, p. 51-55, 2011.

MORAES-FILHO, J.; KRAWCZAK, F. S.; COSTA, F. B.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. *PLoS One*, v. 10, n. 9, p. e0139386, 2015.

MUNDERLOH, U. G.; LYNCH, M. J.; HERRON, M. J.; PALMER, A. T.; KURTTI, T. J.; NELSON, R. D.; GOODMAN, J. L. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Veterinary microbiology*, v. 101, n. 1, p. 53-64, 2004.

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.; 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*, p. 533-543, 1994.

MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Formulation of medium for tick cell culture. *Experimental and Applied Acarology*, v. 7, n. 3, p. 219-229, 1989.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus*

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; ACUÑA, D. G.; MARTINS, T. F.; GUGLIELMONE, A. A. Ticks of the Southern Cone of America: Diagnosis, Distribution, and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. *Academic Press*, 2017.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp.; *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp.; and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). *Ticks and tick-borne diseases*, v. 5, n. 3, p. 252-276, 2014.

NAVA, S.; MASTROPAOLO, M.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Veterinary Parasitology*, v. 190, n. 3, p. 547-555, 2012.

NICHOLSON, W. L.; ALLEN, K. E.; MCQUISTON, J. H.; BREITSCHWERDT, E. B.; LITTLE, S. E. The increasing recognition of *Rickettsia* pathogens in dogs and people. *Trends in Parasitology*, v. 26, n. 4, p. 205-212, 2010.

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

OLIVEIRA, J. B.; MADRUGA, C. R.; SCHENK, M. A.; KESSLER, R. H.; MIGUITA, M.; ARAÚJO, F. R. Antigenic characterization of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 395-400, 2003.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E. B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. Trends in **Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 157-163, 2009.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

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

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B. Febre maculosa: aspectos clínico-epidemiológicos. **Clínica Veterinária**, v. 3, n. 12, p. 19-23, 1998.

PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2133-2139, 1996.

POLICASTRO, P. F.; MUNDERLOH, U. G.; FISCHER, E. R.; HACKSTADT, T. E. D. *Rickettsia rickettsii* growth and temperature-inducible protein expression in embryonic tick cell lines. **Journal of medical microbiology**, v. 46, n. 10, p. 839-845, 1997.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. Microbiology, Wm. C. C. Brown, Dubuque, IA, 1996.

PUDNEY, M. Tick cell lines for the isolation and assay of arboviruses. **In Arboviruses in Arthropod Cells in Vitro**. v. 1, p. 87-101, 1987.

PUDNEY, M.; VARMA, M. G. R.; LEAKE, C. J. Establishment of cell lines from ixodid ticks. **Methods in Cell Science**, v. 5, n. 1, p. 1003-1007, 1979.

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.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of cell biology**, v. 17, n. 1, p. 208, 1963.

ROCHA, U. F. Biologia e controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini). 1984.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C.; GRISI, L.; MARTINS, J. R.; ANDREOTTI, R.; DE BARROS, A. T. M. Estimativa de perdas financeiras decorrente s do parasitismo por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* para o estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 1, p. 87-88, 2014.

SANCHES, B. V. Uso de propanediol ou DMSO na vitrificação de embriões produzidos in vitro, cultivados ou não na presença de forskolin. 2009.

SANCHES, G. S.; ÉVORA, P. M.; MANGOLD, A. J.; JITTAPALAPONG, S.; RODRIGUEZ-MALLON, A.; GUZMÁN, P. E.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 215, p. 78-87, 2016.

SANTIS, G. C.; PRATA, K. L. Criopreservação de células-progenitoras hematopoéticas. *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*, v. 42, n. 1, p. 36-47, 2009 .

SERRA-FREIRE, N. M.; BORSOI, A. B. P. Malformação em teleógina de *Rhipicephalus sanguineus* recolhida em ambiente intradomiciliar, no Rio de Janeiro, RJ. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 53-56, 2009.

SHATKIN, A. A.; BESKINA, S. R.; MEDVEDEVA, G. I.; GROKHOVSKAIA, I. M. Cultivation of the agent of enzootic abortion of sheep in a continuous line of *Hyalomma* tick embryonal cells. **Meditinskaja parazitologija i parazitarnye bolezni**, 1977.

SIMSER, J. A.; PALMER, A. T.; FINGERLE, V.; WILSKE, B.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia*, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4559-4566, 2002.

SIMSER, J. A.; PALMER, A. T.; MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Isolation of a spotted fever group *Rickettsia*, *Rickettsia peacockii*, in a Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*, cell line. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 546-552, 2001.

SINGU, V.; PEDDIREDDI, L.; SIRIGIREDDY, K. R.; CHENG, C.; MUNDERLOH, U.; GANTA, R. R. Unique macrophage and tick cell-specific protein expression from the p28/p30-outer membrane protein multigene locus in *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1475-1487, 2006.

STICH, R. W.; SCHAEFER, J. J.; BREMER, W. G.; NEEDHAM, G. R.; JITTAPALAPONG, S. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 256-273, 2008.

SZABÓ, M. P.; MANGOLD, A. J.; JOAO, C. F.; BECHARA, G. H.; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 1, p. 131-140, 2005.

SWEATMAN, G. K. Physical and biological factors affecting the longevity and oviposition of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks. *The Journal of Parasitology*, p. 432-445, 1967.

TANIKAWA, A. LABRUNA, M. B.; COSTA, A.; AGUIAR, D. M.; JUSTINIANO, S. V.; MENDES, R. S.; MELO, A.L.T.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S. S. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: Serology, molecular detection and associated factors. **Research in veterinary science**, v. 94, n. 3, p. 474-477, 2013.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia** 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005, 718p.

TROUGHTON, D. R.; Levin, M. L. Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 5, p. 732-740, 2007.

UNVER, A.; RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; YAMAMOTO, S. Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, and *Wolbachia* species from canine blood in Japan. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, n. 1, p. 692-698, 2003.

VARELA-STOKES, A. S. Transmission of bacterial agents from lone star ticks to white-tailed deer. **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 3, p. 478-483, 2007.

VARMA, M. G. R. Progress in the study of human and animal pathogens in primary and established tick cell lines. 1989.

VARMA, M. G. R.; PUDNEY, M.; LEAKE, C. J. The Establishment of Three Cell Lines from the Tick *Rhipicephalus Appendiculatus* (Agari: Ixodidae) and their Infection with Some Arboviruses. **Journal of medical entomology**, v. 11, n. 6, p. 698-706, 1975.

VIEIRA, R. F. D. C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P. D.; SANTOS, R. P. D.; DUTRA, L. H.; DINIZ P. P. V. P.; MORAIS H. A.; MESSICK J. B.; LABRUNA M. B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 01-12, 2011.

VILLAR, M.; AYLLÓN, N.; BUSBY, A. T.; GALINDO, R. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; VÁZQUEZ, J. Expression of heat shock and other stress response proteins in ticks and cultured tick cells in response to *Anaplasma spp.* infection and heat shock. **International journal of proteomics**, v. 2010, 2010.

VON SEEFRIED, A.; MACMORINE, H. G. The use of foetal, calf and adult bovine sera for the growth of serially subcultivated diploid cells. *Developments in biological standardization*, v. 37, p. 83-89, 1976.

WAKLER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. Accounts of individual species occurring outside the Afrotropical region. The genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): A guide to the brown ticks of the world. 2000.

WELLMAN, M. L.; KRAKOWKA, S.; JACOBS, R. M.; KOCIBA, G. J. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 24, n. 3, p. 223-229, 1988.

WEYER, F. Explantationsversuche bei Lausen in Verbindung mit der Kulture von Rickettsien. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Abt 1* 159: 13-22, 1952.

WOLF, W.; ARAGONA, M.; MUNOZ-LEAL, S.; PINTO, L. B.; MELO, A. L. T.; BRAGA, I. A.; LABRUNA, M. B. Ticks and Tick-borne Diseases. 2016.

YUNKER, C. E. Preparation and maintenance of arthropod cell cultures: Acari, with emphasis on ticks. 1987.

YUNKER, C. E.; CORY, J. C.; MEIBOS, H. R. Tick cell lines. U.S. Patent n. 4,447,537, 8 maio 1984.

YUNKER, C. E.; CORY, J.; MEIBOS, H. Coitinous cell lines from embryonic tissues of ticks (Acari: Ixodidae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 17, n. 2, p. 139-142, 1981.

ZWEYGARTH, E.; CABEZAS-CRUZ, A.; JOSEMANS, A. I.; OOSTHUIZEN, M. C.; MATJILA, P. T.; LIS, K.; PASSOS, L. M. In vitro culture and structural differences in the major immunoreactive protein gp36 of geographically distant *Ehrlichia canis* isolates. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 4, p. 423-431, 2014.

ZWEYGARTH, E.; JOSEMANS, A. I.; SPICKETT, A. M.; STEYN, H. C.; PUTTERILL, J.; TROSKIE, P. C.; KOCAN, K. M. 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. 251-255, 2006.