

Daniella Aparecida Franze

Cultura de células embrionárias-simile de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) para isolamento e cultivo de patógenos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dr^a Darci Moraes Barros- Battesti

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

FRANZE, D. A. **Cultura de células embrionárias-simile de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) para isolamento e cultivo de patógenos.** 2014. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

As principais doenças transmitidas por carrapatos são riquetsioses, borrelioses, ehrlichioses e protozoonoses. Essas duas últimas são causadas por bioagentes transmitidos, em sua maioria, por carrapatos do gênero *Rhipicephalus*. Alguns desses microrganismos de importância clínica não crescem em meios de cultura sintéticos, daí a necessidade de cultivá-los em células de carrapatos para isolamento e produção de antígenos. Diversas linhagens de células embrionárias de carrapatos já foram estabelecidas em outras regiões do mundo, e são utilizadas para isolar e propagar patógenos. A obtenção de cultivos de células embrionárias de *Rhipicephalus sanguineus s.l.*¹ (Latreille) é um dos objetivos do presente estudo, pois uma vez a linhagem estabelecida, ela poderá ser usada como substrato para crescimento de agentes transmitidos por esta e outras espécies de carrapatos. Para tanto, o presente estudo foi dividido em dois capítulos, o primeiro abordando a obtenção dos cultivos primários e estabelecimento da linhagem celular e o segundo, utilizando as culturas como substrato para infecção com agentes patogênicos. As massas de ovos de *R. sanguineus* foram preparadas em meio L-15B e os cultivos foram mantidos à 30°C, sendo o meio substituído semanalmente. Quando monocamadas celulares se tornaram confluentes, as culturas foram repicadas e/ou congeladas em diferentes passagens. O descongelamento dos cultivos criopreservados a partir da terceira passagem foi bem sucedido. A identidade celular foi confirmada por sequenciamento utilizando o fragmento 16S rDNA mitocondrial. As células foram infectadas com *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum chagasi* e *Trypanosoma cruzi*. Apenas para *E. canis*, as células de *R. sanguineus* mostraram-se eficientes como substrato para crescimento desse patógeno.

Palavras-chave: *Rhipicephalus sanguineus*. Células embrionárias-simile. Cultivos primários. Linhagem celular. Patógenos.

¹ Sensu lato: foi citado somente aqui e explicado na página 17

ABSTRACT

FRANZE, D.A. **Tick embryonic-like cell culture of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) for pathogen isolation and cultivation.** 2014. 62 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The main zoonosis transmitted by ticks are rickettsiosis, borreliosis, ehrlichiosis and protozoonoses. These last two are caused by bioagents transmitted mostly by ticks of the genus *Rhipicephalus*. Some of important clinically microorganisms don't grow in synthetic culture medium, hence the need to cultivate them in tick cells for isolation and production of antigens. Several lines of embryonic cells of ticks already been established in other regions of the world, and are used to isolate and propagate pathogens. Obtaining cultures of embryonic cells of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) is one objective of the present study, because once the lineage established, it can be used as a substrate for growth of agents transmitted by this and other species of ticks. Thus, the present study was divided into two sections, the first addressing obtaining primary cultures and established cell line and the second, using as a substrate for cultures infected with pathogens. The egg masses of *R. sanguineus* were prepared in L-15B medium and cultures were maintained at 30 °C, with the medium replaced weekly. When a confluent cellular monolayer was obtained, the cultures were passaged and / or frozen in different passages. Defrosting of cryopreserved cultures from the third passage was successful. Cell identity was confirmed by sequencing using 16S rDNA gene fragment. Cells were infected with *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum chagasi* and *Trypanosoma cruzi*. Only for *E. canis* the cells of *R. sanguineus* were effective as a substrate for growth of this pathogen.

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus*. Embryonic-like cell. Primary cultures. Cell line. Pathogens.

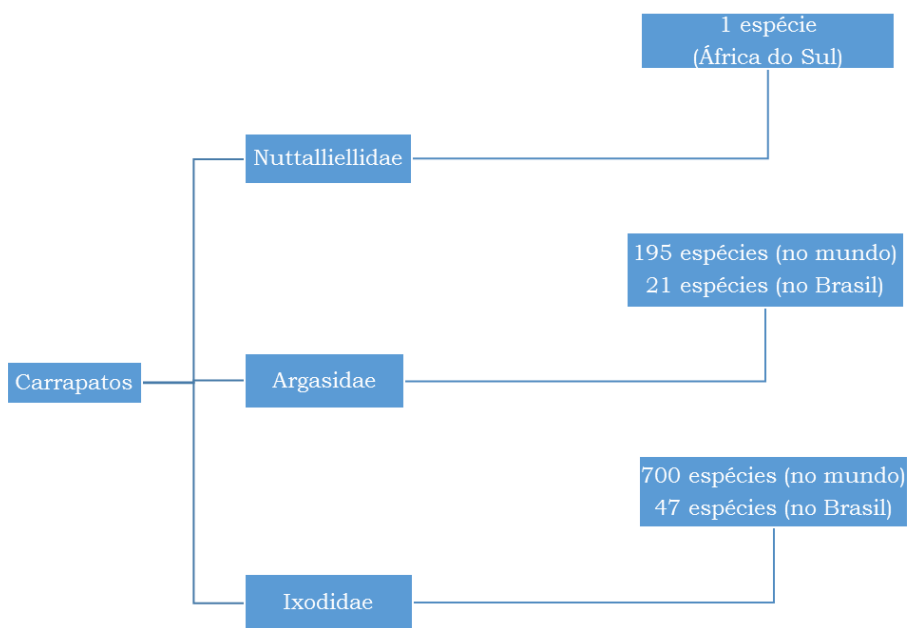
1 INTRODUÇÃO GERAL

Os carrapatos são artrópodes de grande interesse na saúde humana e animal, por serem hematófagos de diversos vertebrados, incluindo o homem (GUGLIELMONE et al., 2006). Devido ao seu comportamento alimentar podem acarretar danos diretos além de atuarem como vetores e agentes de doenças, algumas consideradas letais (DANTAS-TORRES, 2007).

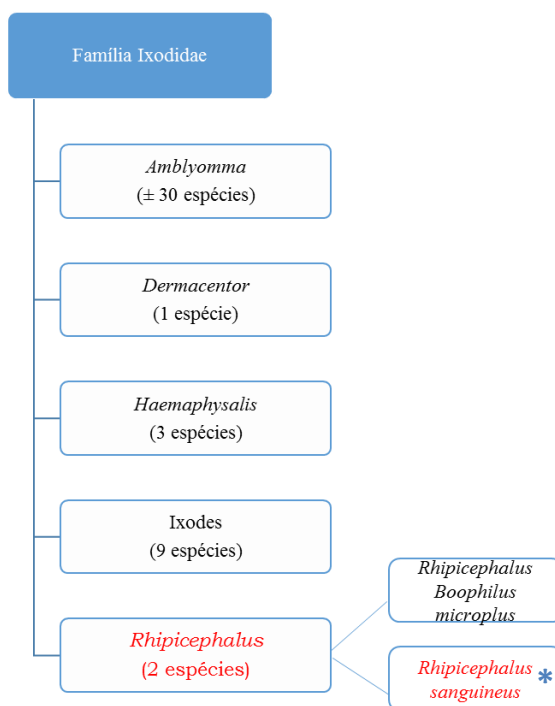
São conhecidas aproximadamente 900 espécies de carrapatos no mundo, distribuídas nas famílias Nuttalliellidae, Argasidae e Ixodidae (GUGLIELMONE et al., 2010) (Esquema 1).

Até recentemente acreditava-se que a família Nuttalliellidae fosse filogeneticamente intermediária entre as outras duas. Entretanto, um estudo realizado por Mans et al. (2011) demonstrou que ela ocupa, de fato, a posição basal. É representada por apenas uma espécie e sua distribuição geográfica compreende a África do Sul (LABRUNA; MACHADO, 2006), excluindo a Tanzânia (MANS et al., 2011). A família Argasidae possui aproximadamente 195 espécies (GUGLIELMONE et al., 2010; NAVA et al., 2010) no mundo, e a região Neotropical inclui 87 delas, dentre as quais 21 ocorrem no Brasil (BARROS-BATTESTI et al., 2013). A família Ixodidae (cujos membros são conhecidos como “carrapatos duros” pela presença de escudo em todos os estágios) possui uma posição sistemática e filogenética melhor estabelecida, sendo a mais evoluída, mais numerosa em espécies, e a mais estudada do ponto de vista taxonômico, biológico e epidemiológico. Mundialmente está representada por cerca de 700 espécies, com aproximadamente 200 na região Neotropical, dentre as quais, 45 ocorrem no Brasil. Os gêneros que compõem a família Ixodidae são: *Amblyomma* (± 30 espécies), *Dermacentor* (1 espécie), *Haemaphysalis* (3 espécies), *Ixodes* (9 espécies) e *Rhipicephalus* (2 espécies), este último contendo o subgênero *Boophilus*. *Rhipicephalus* (*B.*) *microplus* (Canestrini) apresenta maior especificidade em parasitar bovinos enquanto que *R. sanguineus* é comum aos cães, ambas sendo responsáveis, respectivamente, pela tristeza parasitária bovina e canina (Esquema 2). Entretanto, um estudo demonstrou que existem duas populações distintas de *R. sanguineus* na América do Sul (MORAES-FILHO et al., 2011; SZABÓ et al., 2005). As duas linhagens ocorrem no Brasil, sendo, a de origem tropical, encontrada na maioria dos Estados com exceção do Rio Grande do Sul; enquanto que a de origem temperada ocorre neste Estado e também no Centro Sul da Argentina, Uruguai e Chile, além de alguns países europeus (NAVA et al., 2012).

Esquema 1: Classificação das famílias de carrapatos (GUGLIELMONE et al., 2010).



Esquema 2: Classificação dos gêneros e espécies dentro da família Ixodidae. *Duas linhagens presentes no Brasil (SZABÓ et al., 2005).



1.1 A espécie *R. sanguineus* (Latreille, 1806)

Este carrapato é denominado popularmente como “carrapato marrom do cão” ou “carrapato dos canis”. Parasita especialmente dos cães, mas pode, eventualmente, parasitar outros hospedeiros, incluindo os seres humanos. O ciclo biológico desta espécie ocorre em 3 hospedeiros (espécie trioxena). Pode haver de 2-3 gerações ao ano (GUGLIELMONE et al., 2006), embora este número possa variar conforme a região geográfica. As fêmeas ingurgitadas realizam posturas de milhares de ovos (em torno de 3000 a 4000) e os períodos de pré-oviposição e incubação variam de 17-27 dias. Após a eclosão, as larvas com idade de 2 a 3 semanas estão prontas para o repasto sanguíneo, que se realiza entre 3 e 5 dias. A larva ingurgitada sofre ecdise e muda para ninfa nesse mesmo período de tempo e quando a cutícula endurece (de 15-20 dias), as ninfas estão prontas para procurar um hospedeiro. A alimentação da ninfa leva em torno de 5-7 dias. As ninfas ingurgitadas sofrem ecdise depois de 2 a 3 semanas, tornando-se adultos (machos e fêmeas). Em 15-20 dias a cutícula endurece e os adultos procuram o hospedeiro para alimentação e acasalamento. As fêmeas ingurgitadas possuem um hábito diferenciado das outras espécies de ixodídeos. Elas sobem em locais altos para realização da postura, e os carrapatos passam de uma casa a outra, escalando os muros e paredes. Trata-se de um carrapato urbano e muito adaptado às habitações domésticas. Além disso, é considerado um vetor de diversos agentes causadores de doenças, como por exemplo, *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* e *Rickettsia rickettsii* (DANTAS-TORRES, 2008a). Ocorre tanto em áreas rurais como urbanas apresentando um grande potencial de adaptação para viverem dentro de habitações humanas. São ativos durante todo o ano não somente nas regiões tropicais e subtropicais, mas também em algumas áreas temperadas. Um estudo recente demonstrou que esse carrapato, quando exposto a altas temperaturas, possui a capacidade de se fixar e alimentar mais rapidamente em humanos e coelhos. Essa observação sugere que o risco de parasitismo por *R. sanguineus* poderia aumentar em zonas atingidas por verões mais quentes e conseqüentemente, aumentaria o risco de transmissão de agentes zoonóticos (DANTAS-TORRES, 2010a) ao homem.

1.1.1 Situação taxonômica

Durante anos, diversos estudos moleculares tentaram avaliar a variabilidade genética de *R. sanguineus*. Szabó et al. (2005) verificaram evidências biológicas e moleculares indicando duas populações distintas de *R. sanguineus* nas Américas. Esses estudos foram confirmados evidenciando a existência de duas linhagens divergentes dentro de *R. sanguineus* (BURLINI et al., 2010; LEVIN et al., 2012; MORAES-FILHO et al., 2011). Segundo Nava et

al. (2012), a “linhagem sul” compreende as espécies temperadas e a “linhagem norte”, as espécies tropicais. A linhagem sul inclui carrapatos da Argentina, Uruguai, Chile, Itália e França, enquanto que a linhagem norte abrange os carrapatos do Brasil, Paraguai, Colômbia, África do Sul, Moçambique e duas localidades do norte da Argentina. De acordo com os dados genéticos preliminares, os autores sugeriram que a linhagem norte representa uma espécie diferente de *R. sanguineus* s.s., ao passo que os carrapatos da linhagem sul representam, provavelmente, os verdadeiros *R. sanguineus* s.s. Dantas-Torres et al. (2013) sugeriram que seria fundamental uma nova descrição de *R. sanguineus* s.s. baseando-se em morfologia biológica e genética, porém, não se sabe onde está o tipo “verdadeiro” (GUGLIELMONE et al., 2003). Aqueles autores também sugeriram que até que a espécie seja redescrita com base em um consenso entre os taxonomistas, o uso do nome *R. sanguineus* s.s. deve ser evitada. No presente estudo, citamos “s.l.” apenas no resumo, para não ficar repetitivo ao longo do texto (nota de rodapé).

1.2 Agentes transmitidos pela picada de *R. sanguineus*

Na maioria dos casos as ehrlichioses e protozoonoses são transmitidas pelo gênero *Rhipicephalus* (MASSARD; FONSECA, 2004).

Apesar das ehrlichioses e protozoonoses se apresentarem associadas principalmente ao gênero *Rhipicephalus*, elas também podem ser transmitidas por outros gêneros de carrapatos. Nos Estados Unidos, a Ehrlichiose em humanos é causada por *E. chaffeensis* e *E. ewingii* (DUMLER et al., 2001) e os vetores envolvidos são *Amblyomma americanum* e *Ixodes scapularis* (EUA) e *Ixodes persulcatus* (Ásia) e *I. ricinus* (Europa) (DUMLER et al., 2007). No Brasil casos de Ehrlichiose humana foram relatados apenas por suspeitas clínicas e pesquisa sorológica (CALIC et al., 2004; LABRUNA et al., 2007).

Em cães, a doença é principalmente causada pela bactéria *Ehrlichia canis* (DAGNONE et al., 2003; DUMLER et al., 2001; MOREIRA et al., 2003), que é transmitida por *R. sanguineus* sendo este carrapato o de maior repercussão na clínica de pequenos animais. O diagnóstico é clínico e laboratorial. No neotrópico, *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus microplus* (Canestrini), são os principais vetores, ainda que ambas tenham especificidade parasitária com cães e bovinos, e ocasionalmente picam humanos (MASSARD; FONSECA, 2004). O ciclo da *E. canis* é constituído de três fases principais: (1) penetração dos corpúsculos nos monócitos; (2) multiplicação do agente, por um período de 3 a 5 dias, com a formação do corpo inicial; e (3) formação das mórulas (são colônias

intracitoplasmáticas), sendo estas constituídas por um conjunto de corpos elementares envoltos por uma membrana (McQUISTON; McCALL; NICHOLSON, 2003). Além de *Ehrlichia canis* que compromete a saúde dos cães em praticamente todas as regiões do mundo, outra espécie, *Ehrlichia ruminantium*, compromete a saúde de rebanhos nas áreas de ocorrência de *Amblyomma variegatum* (Fabricius) que também é vetor de *Rhickettsia africae* que acomete humanos nas regiões subsaarianas da África (LORUSSO et al., 2013).

1.3 O papel de *R. sanguineus* na transmissão de patógenos comuns a outros vetores

Carrapatos estão sendo apontados como potenciais vetores de agentes zoonóticos patogênicos geralmente transmitidos por outros tipos artrópodes, tais como mosquitos (Leishmaniose) e pulgas (Bartonelose) (BANETH, 2014). Recentemente, houve debate científico focado em *Leishmania infantum*, o agente zoonótico canino causador da leishmaniose visceral humana. Esta doença é naturalmente causada pela picada de flebotomíneos infectados. A epidemiologia da Leishmaniose frequentemente se sobrepõe a outras infecções caninas causadas por *Ehrlichia canis* e *Babesia vogeli*. Estes dois patógenos são de fato transmitidos por *R. sanguineus* (DANTAS -TORRES, 2008). Existem relatos da presença do DNA de *Leishmania infantum* em carrapatos pesquisados em áreas endêmicas de leishmaniose (DANTAS-TORRES et al., 2010b; TROTTA et al., 2012).

A tripanossomíase canina é causada por protozoários do gênero *Trypanosoma* (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*) e as espécies que infectam cães no Brasil são *Trypanosoma evansi* (FRANCISCATO et al., 2007; HERRERA et al., 2005; SAVANI et al., 2005) e *Trypanosoma cruzi* (HERRERA et al., 2005; MAYWALD et al., 1996). Os vetores são triatomíneos hematófagos, popularmente conhecidos como “barbeiros”. Esses insetos são da ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae* (LENT; WYGODZINSKY, 1979). É possível que a espécie *Trypanosoma rangeli* (LUCHEIS et al., 2005) também seja transmitida aos cães, mas normalmente não é patogênica (DANTAS-TORRES, 2008b). Os vetores de *T. cruzi* pertencem aos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (*Hemiptera: Triatominae*). A infecção com *T. cruzi* em cães é predominante em todas as regiões, exceto no Sul (FALAVIGNA-GUILHERME et al., 2004). Carrapatos *R. sanguineus* que se alimentam de cães infectados pelo *T. cruzi* podem adquirir a infecção (PINTO DIAS et al., 2005). Entretanto, não há nenhuma evidência confirmando o desenvolvimento do patógeno nos carrapatos e a subsequente transmissão para cães saudáveis (DANTAS-TORRES, 2008b).

1.4 Linhagem de células embrionárias de carrapatos

1.4.1 Histórico

Alguns dos agentes patogênicos transmitidos por picadas de carrapatos são muito difíceis de serem cultivados em meios de cultura tradicionais. 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. As linhagens também servem para a produção de anticorpos e antígenos para testes diagnósticos e para estudos das relações entre hospedeiro-vetor-patógenos. Sistemas de cultivo *in vitro* contribuem para a redução do uso de animais de experimentação, visto que permitem a produção de grandes quantidades de material antigênico sem o uso de sistemas espécie-específicos *in vivo* (PASSOS, 2012).

Apesar de mais de 800 espécies de carrapatos mundialmente identificadas, relativamente poucas linhagens celulares foram estabelecidas até o momento. Os primeiros estudos com culturas de células de carrapatos foram realizados nos anos 50 por Weyer (1952), que obteve células, a partir tecidos de *Rhipicephalus bursa* Canestrini e Fanzago. Este cultivo teve a duração de apenas oito dias (PUDNEY; VARMA; LEAKE, 1973). Em 1975 foi estabelecida a primeira cultura contínua de células de carrapatos (VARMA; PUDNEY; LEAKE, 1975) e desde então, o número de linhagem de células estabelecidas tem aumentado, oriunda das espécies ixodídeos e argasídeos (PASSOS, 2012). Esses autores estabeleceram as três primeiras culturas de células de linhagem de carrapatos (TTC-219, TTC-243 e TTC-257), cultivadas a partir de *Rhipicephalus appendiculatus* Neuman. Bhat e Yunker (1977) estabeleceram as células de linhagem RML-14, utilizando células embrionárias de *Dermacentor parumapertus* Neumann. Seis novas linhagens a partir de células embrionárias de *Dermacentor variabilis* Say e *D. parumapertus* (RML-15, RML-16, RML-17, RML-18, RML-19 e RML-20) foram estabelecidas por Yunker, Cory e Meibos (1981). Bell-Sakyi (1991) estabeleceu cinco novas linhagens (HAE CT VM 7, HAE CT VM 8, HAE CT VM 9, HAE CT VM 10, HAE CT VM 11), a partir de células embrionárias de *Hyalomma anatolicum anatolicum* Koch. Munderloh et al. (1994) propuseram um método que permitia a viabilidade celular mesmo após o congelamento e descongelamento das células. Deste modo, foram estabelecidas novas linhagens utilizando células embrionárias de *Ixodes scapularis* Say, sendo ISC6 e IDE8 as mais conhecidas.

1.4.2 Aplicabilidade do cultivo de células de carrapato

Sistemas de cultivo *in vitro*, têm tido aplicabilidade para vários estudos, tais como análises morfológicas, genéticas, proteômicas, incluindo genômica transcricional e expressões protéicas, permitindo comparações entre células dos hospedeiros e dos vetores. Tais sistemas constituem, portanto, uma nova abordagem para melhor entendimento das relações entre patógenos e células de carrapatos (BELL-SAKYI et al., 2007).

Bactérias de diferentes gêneros, especialmente *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Borrelia* e *Rickettsia*, e muitos arbovírus foram propagados em cultura de células de carrapatos (BELL-SAKYI et al., 2007). Dessa maneira a aplicação de linhagens celulares de carrapatos para estudos de uma série de agentes infecciosos representa um enorme potencial para o fornecimento de material antigênico em elevada quantidade e sem uso de animais experimentais (PASSOS, 2012).

Em uma abordagem proteômica foi demonstrado que proteínas expressas em macrófagos infectados são produtos dos genes que diferem daquelas expressas em células de carrapatos infectados, daí a importância de se comparar concomitantemente as duas situações *in vivo* e *in vitro* para a elaboração de produtos vacinais (BELL-SAKYI et al., 2007).

Uma primeira linhagem sulamericana foi recentemente estabelecida no Brasil (em fase de registro no CGEN), para a espécie *A. sculptum*. Os resultados da aplicabilidade do uso desta linhagem ainda não foram publicados (Projeto FAPESP 2007/57749-2) porque estão sendo analisados para obtenção de patente.

O banco de linhagens denominado “The Tick Cell Biobank” localizado em Pirbright, Surrey (Reino Unido), contém muitas outras linhagens anteriormente estabelecidas, que lá estão depositadas (<http://www.pirbright.ac.uk/research/Tickcell/Default.aspx>)

1.5 Justificativa

Muitos bioagentes transmitidos por carrapatos são autóctones e não crescem em meios sintéticos ou não se adaptam a outros substratos, sendo mantidos em sangue. Cultivo em células podem auxiliar o diagnóstico e isolamento desses hemoparasitos. Entretanto, para a obtenção de culturas primárias de células embrionárias de carrapatos é fundamental a utilização de muitos animais de laboratório. Além disso, a manutenção dos hospedeiros demanda alto custo. Uma vez a linhagem celular estabelecida, pode significar baixo custo, rapidez de resultados e diminuição no uso de animais de laboratório, o que está em acordo às

normas estabelecidas pelo Conselho de Ética em Experimentação Animal. Dessa maneira, justifica-se a relevância do desenvolvimento do presente estudo que está apresentado em dois capítulos, cujos objetivos estão abaixo.

1.6 Objetivos

Padronização de cultivo de células embrionárias-simile de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) e seu uso como substrato para o cultivo de patógenos.

4. CONCLUSÕES GERAIS

- A idade ideal para a viabilidade de cultivos primário de células a partir de ovos embrionados de *R. sanguineus* é de 14 dias.
- A concentração ideal de SFB (soro fetal bovino) para viabilizar os cultivos primários de células, a partir de ovos embrionados de *R. sanguineus*, foi de 20%, pelo menos em culturas livres de patógenos.
- A confluência celular total na garrafa de 25cm², não foi suficiente para manutenção das células. Foi necessário respeitar o intervalo de 30 dias entre as propagações, para viabilizar as culturas de células de *R. sanguineus*, e de 60 dias da primeira para a segunda propagação.
- A recuperação das células de *R. sanguineus*, após a criopreservação, somente foi viável a partir da 3^a. propagação, ou seja, em culturas com cerca de 150 dias a contar do início do cultivo.
- Culturas de células de *R. sanguineus* de origem tropical, infectadas com *L. infantum chagasi* e *T. cruzi* não foram bons substratos para crescimento e manutenção desses protozoários.
- As culturas de células de *R. sanguineus* de origem tropical, infectadas com *E. canis*, não mantém a infecção após 60 dias, quando o meio é suplementado com SFB enriquecido com ferro, na concentração de 20%.
- A concentração de SFB enriquecido com ferro, durante a manutenção das células de *R. sanguineus* de origem tropical, infectadas com *E. canis*, deve ser de 10% para manter a infecção e o crescimento celular em equilíbrio.
- As culturas de células de *R. sanguineus* de origem tropical, suplementada com SFB enriquecido com ferro, na concentração de 10%, foram eficientes como substrato para o crescimento de *E. canis*.
- Culturas de células de *R. sanguineus* de origem tropical, infectadas com *E. canis* puderam ser propagadas em novos cultivos e mantiveram a infecção.

REFERÊNCIAS²

- ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; FELTRIN, A. F. C.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E. M.; STUCCHI, R. S. B.; SILVA, L. J. Brazilian Spotted Fever: a case series from an endemic área in Southeastern Brazil – Clinical Aspects. **Ann. NY. Acad. Sci.**, v. 1078, p. 252-254, 2006.
- BANETH, G. Tick-borne infections of animals and humans: a common ground. **Int. J. Parasitol.**, v. 44, n. 9, p. 591-596, 2014.
- BARBIERI, A. M.; VENZAL, J. M.; MARCILI, A.; ALMEIDA, A. P.; GONZÁLEZ, E. M.; LABRUNA, M. B. *Borrelia burgdorferi sensu lato* infecting ticks of the *Ixodes ricinus* complex in Uruguay: first report for the Southern Hemisphere. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 13, n. 3, p. 147-153, 2013.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; RAMIREZ, D. G.; LANDULFO, G. A.; FACCINI, J. L. H.; DANTAS-TORRES, F.; LABRUNA, M. B.; VENZAL, J. M.; ONOFRIO, V. C. Immature argasid ticks: diagnosis and keys for Neotropical region. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 4, p. 443-456, 2013.
- BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; GUGLIELMONE, A. A.; CÁCERES, A. G.; GUZMÁN-CORNEJO, C. M.; LEÓN, R.; DURDEN, L. A.; FACCINI, J. L. H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC. Evol. Biol.** v. 13, p. 26-36, 2013.
- BELL-SAKYI, L. Continuous cell lines from the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Journal of Parasitology**, v. 7, n. 6, p. 1006-1008, 1991.
- BELL-SAKYI, L. *Ehrlichia ruminantium* grows in cell lines from four ixodid tick genera. **J. Comp. Pathol**, v. 130, p. 285-293, 2004.
- BELL-SAKYI, L.; ZWEYGARTH, E.; BLOUIN, F. E.; GOULD, A. E.; JONGEJAN, F. Ticks cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. **Trends in Parasitology**, vol. 23, n. 9, p. 450-457, 2007.
- BHAT, U. K. M.; YUNKER, C. E. Establishment and characterization of a diploid cell line from tick *Dermacentor parumapertus* Neumann (Acarina: Ixodidae). **Journal of Parasitology**, v. 63, n. 6, p. 1092-1098, 1977.
- BLACK, W. C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard- and- soft tick taxa (Acari:Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 91, p. 10034-10038, 1994.
- BURLINI, L.; TEIXEIRA, K. R.; SZABÓ, M. P.; FAMADAS, K. M. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with

² De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

samples throughout the world: is there a geographical pattern? **Exp. Appl. Acarol.**, v. 50, p. 361-374, 2010.

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. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 8, p. 259-262, 2004.

CIRELLI-MORAES, A.; MENDONÇA, R. Z.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; BARROS-BATTESTI, D. M. Células embrionárias de *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) como substrato para crescimento de isolamento de patógenos. In: XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Rickettsia, 2012.

COMER, J. A.; NICHOLSON, W. L.; OLSON, J. G.; CHILDS, J. E. Serologic testing for human granulocytic ehrlichiosis at a national referral center. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 558-564, 1999.

CORREDOR, A.; GALLEGO, J. F.; TESH, R. B.; MORALES, A.; CARRASQUILA, C. F.; KREUTZER, R. D.; BOSHELL, J.; PALAU, M. T., CACERES, E.; PELAEZ, D. Epidemiology of visceral leishmaniose in Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 40, p. 408-486, 1989.

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

DAGNONE, A. S.; DE MORAES, H. S.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.117, n. 4, p.285-290, 2003.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Vet. Parasitol.**, v. 149, p. 139-146, 2007.

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

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, p. 25, 2008b.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasit. Vectors**, v. 3, p. 26, 2010a.

DANTAS-TORRES, F.; MARTINS, T. F.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, L. A.; LIMA, B. S.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. **Exp. Parasitol.**, v. 125, p. 184-185, 2010b.

DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M. S.; OTRANTO, D. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasit. Vectors**, v. 4, p. 56, 2011.

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, p. 1-17, 2013.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y. W.; CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C.; BLOCH, K. C.; LI, P.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W. Detection of medically important Ehrlichia by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the dsb gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, p. 504-510, 2005.

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 the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

DUMLER, J. S.; MADIGAN, J. E.; PUSTERIA, N.; BAKKEN, J. S. Ehrlichioses in Human: Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v.45, p.45-51, 2007.

EISEN, L.; EISEN, R. J.; LANE, R. S. Seasonal activity patterns of *Ixodes pacificus* nymphs in relation to climatic conditions. **Med. Vet. Entomol.**, v.16, p.235-244, 2002.

ENG, T. R.; HARKESS, J. R.; FISHBEIN, D. B. Epidemiologic, clinical, and laboratory finding of human ehrlichiosis in the United States, 1988. **JAMA**, v. 264, p. 2251-2258, 1990.

EWING, S. A.; MUNDERLOH, U. G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; KURTTI, T. J. Ehrlichia canis in tick cell culture. **Proceedings of the 76th Conference of Research Workers in Animal Diseases**, Chicago, USA, 13 to 14 November 1995.

ESTEVEZ, E.; LARA, F. A.; LORENZINI, D. M.; COSTA, G. H. N.; FUKUZAWA, A. H.; PRESSINOTTI, L. N.; SILVA, J. R. M. C.; FERRO, J. A.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; DAFFRE, S. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, n. 38, p. 568-580, 2008.

FALAVIGNA-GUILHERME, A. L.; SANTANA, R.; PAVANELLI, G. C.; LOROSA, E. S.; ARAÚJO, S. M. Triatomine infestation and vector-borne transmission of Chagas disease in northwest and central Parana, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, n. 5, p. 1191-1200, 2004.

FELICIANGELI, M. D.; RODRIGUEZ, N.; DE GUGLIELMO, Z.; RODRIGUEZ, A. The re-emergence of American visceral leishmanioses in an old focus in Venezuela II. **Vectors and Parasites**, v. 6, p. 113-120, 1999.

FERRO, C.; MORRISON, A. C.; TORRES, M.; PRADO, R.; WILSON, M. L.; TESH, R. B. Age structure, blood-feeding behavior, and *Leishmania chagasi* infection in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, p. 618-625, 1995.

FRANCISCATO, C.; LOPES, S. T. A.; TEIXEIRA, M. M. G.; MONTEIRO, S. G.; GARMATZ, B. C.; PAIM, C. B. Cão naturalmente infectado por *Trypanosoma evansi* em Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, p. 288-291, 2007.

GALVÃO, M. A. M. **Febre maculosa em Minas Gerais**: um estudo sobre a distribuição da doença no Estado e o seu comportamento em área de foco Peri-urbano. 1996. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

GROVES, M. G.; DENNIS, G. L.; AMYX, H. L.; HUXSOLL, D. L. Transmission of Ehrlichia canis to dogs by ticks (Rhipicephalus sanguineus). **Am. J. Vet. Res.**, v. 36, p. 937-940, 1975.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PENA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. **Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical zoogeographical region**. Houten, Holanda, ICTTD-2, 2003. 173 p.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; ESTRADA-PENA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 40, n. 2, p. 83-100, 2006.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PENA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v. 2528, p. 1-28, 2010.

HERRERA, L.; D'ANDREA, P. S.; XAVIER, S. C.; MANGIA, R. H.; FERNANDES, O.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 99, p. 379-388, 2005.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; DURIGON, E. L.; SCHUMAKER, T. T. S. Isolation of *Rickettsia felis* in the mosquito cell line C6/36. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1705-1707, 2006.

IVANOVA, L. B.; TOMOVA, A.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MURÚA, R.; MORENO, C. X.; HERNÁNDEZ, C.; CABELLO, J.; CABELLO, C.; DANIELS, T. J.; GODFREY, H. P.; CABELLO, FC. *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 1069-1080, 2014.

KESSLER, R. H.; GOMES, A.; CAPIBARIBE, P. R.; SILVA, D.; SCHENK, M. A. M. Estabelecimento de cultura *in vitro* de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus*. **Embrapa Gado de Corte, Mato Grosso do Sul**, v. 54, p. 1-4, 1999.

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

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; SAMISH, M. Tick tissue and cell culture in vector research. **Adv.Dis.Vector Res.**, v. 5, p.87-109, 1988.

LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região Neotropical. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. (Ed.). **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies.** São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. p. 155-164.

LABRUNA, M. B.; SANFILIPPO, L. F.; DEMETRIO, C.; MENEZES, A. C.; PINTER, A.; GUGLIELMONE, A. A.; SILVEIRA, L. F. Ticks collected on birds in the state of São Paulo Brazil. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 43, n. 2, p. 147-160, 2007.

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156-166, 2009.

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

LAWRIE, C. H.; UZSATEGUI, N. Y.; ARMESTO, M.; BELL-SAKYI, L.; GOULD, E. A. Susceptibility of mosquito and tick cell lines to infection with various flaviviruses. **Med. Vet. Entomol.**, v. 18, n. 3, p. 268-274, 2004.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. **Bull. Am. Mus. Nat. History**, v. 163, p.127-520, 1979.

LEVIN, M. L.; STUDER, E.; KILLMASTER, L.; ZEMTSOVA, G.; MUMCUOGLU, K. Y. Crossbreeding between different geographical population of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Exp. Appl. Acarol**, v. 58, p. 51-68, 2012.

LORUSSO, V.; GRUSZKA, K. A.; MAJEKODUNMI, A.; IGWEH, A.; WELBURN, S.; PICOZZI, K. *Rickettsia africae* in *Amblyomma variegatum* ticks, Uganda and Nigeria [letter]. **Emerg. Infect. Dis.** Disponível em :<<http://doi:10.3201/eid1910.130389>>, 2013.

LUCHEIS, S. B.; SILVA, A. V.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P.; LANGONI, H.; MEIRA, D. A.; MACHADO, J. M. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas disease living in Botucatu town and surrounding region, São Paulo State, Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 11, n.4, p. 492-509, 2005.

MANS, B. J.; KLERK, D.; PIENAAR, R.; LATIF, A. A. *Nuttalliella namaqua*: A living Fossil and Closest Relative to the Ancestral Tick Lineage: Implications for the Evolution of Blood-Feeding in Ticks. **Plos one**, v.6, n.8, p. 1-11, 2011.

MARCILI, A.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; JUNQUEIRA, A. C. V.; SILVA, F. M.; PINTO, A. Y. N.; NAIFF, R. D.; CAMPANER, M.; COURA, J. R.; CAMARGO, E. P.; MILES, M. A.; TEIXEIRA, M. M. G. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages

TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 615-623, 2009.

McQUISTON, J. H.; McCALL, C. L.; NICHOLSON, W. L. Ehrlichiosis and related infections. **JAVMA**, v.223, n.12, p. 1750-1756, 2003.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.

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). **J. Med. Entomol.**, v. 44, n. 6, p. 1091-1101, 2007.

MAURER, H. R. Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture. In: FRESHNEY, R. **Animal cell culture: a practical approach**. Oxford:IRL, 1986. Cap 2, p.13-30.

MAYWALD, P. G.; MACHADO, M. I.; COSTA-CRUZ, J. M.; GONÇALVES-PIRES, M. Leishmaniose tegumentar, visceral e doença de Chagas caninas em municípios do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.12, p. 321-328, 1996.

MEDEIROS, A. P.; DE SOUZA, A. P.; DE MOURA, A. B.; LAVINA, M. S.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari:Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 926-930, 2011.

MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; LABRUNA, M. B. Ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America: molecular evidence for the presence of two species. **Acta Tropical**, v. 117, n. 1, p. 51-55, 2011.

MORAES-FILHO, J. **Competência vetorial de carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* no Brasil, Argentina e uruguaí para transmissão da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina**. 2013. 59f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAÚJO, R. B.; SANTOS, M.; PASSOS, L. M. F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arq Brás. Med. Vet. Zootec.**, v. 25, n. 2, p. 141-147, 2003.

MUNDERLOH, U. G.; YAN, L.; 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.

NAVA, S.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, M. A.; LABRUNA, M. B. Description of a new argasid tick (Acari: Ixodida) from bat caves in Brazilian Amazon. **J. Parasitol.**, v. 96, n. 6, p. 1089-1101, 2010.

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. **Vet. Parasitol**, v. 190, p. 547-555, 2012.

NAVA, S; LABRUNA, M. B; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) 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* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae) **Ticks Born. Dis.**, v. 5, n. 3, p. 252-276, 2014.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L. J; LEITE, R. C.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsia* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, n. 2, p. 148-155, 2010.

PASSOS, L. M. F. *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in tick cell lines: a review. **Ver. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 21, n. 2, p. 81-86, 2012.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals New York Academy Sciences**, v. 1078, p. 523-529, 2006.

PINTO DIAS, J. C.; SCHOFIELD, C. J.; MACHADO, E. M.; FERNANDES, A. J. Ticks, ivermectin, and experimental Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, p. 829-832, 2005.

PORNWIROON, W.; POURCIAU, S. S.; FOIL, L. D.; MACALUSO, K. R. *Rickettsia felis* from cat fleas: isolation and culture in a tick-derived cell line. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 8, p. 5589-5595, 2006.

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.

PUDNEY, M. Tick cell lines for the isolation and assay of arboviruses. In *Arboviruses in Arthropod Cells in Vitro*. (Vol. 1) (Yunker, C.E., ed.), **CRC. Press**, p. 87-101, 1987.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell. Biol.**, v. 17, n. 1, p. 208-212, 1963.

RODRIGUES, B. D.; MEIRELES, V. M. B.; BRAZ, M. N. Borreliose de Lyme-simile – Relato de caso. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 3, p. 63-67, 2007.

SAVANI, E. S. M. M.; NUNES, V. L.; GALATI, E. A.; CASTILHO, T. M.; ARAUJO, F. S.; ILHA, I. M.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N.; FLOETER-WINTER, L. M. Occurrence of co-infection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 739-741, 2005.

SHERLOCK, L. A. Ecological interations of visceral leishmaniasis in the state of Bahia. Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 671-683, 1999.

SIMSER, J. A.; PALMER A. T.; MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Isolation of a spotted fever group rickettsia, *Rickettsia peacockii*, in a Rock Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*, cell line. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 546-552, 2001.

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

TROTTA, M., NICETTO, M., FOGLIAZZA, A., MONTARSI, F., CALDIN, M., FURLANELLO, T., SOLANO GALLEGGO, L. Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, and *rickettsiae* in ticks removed from dogs living in Italy. **Ticks Tick Borne Dis.**, v. 3, p. 294-297, 2012.

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

VARMA, M. G. R. Progress in the study of human and animal pathogens in primary and established tick cell lines, pp. 119-128. In: MITSUHASHI, J. (Ed.). **Invertebrate Cell System Applications**. II Boca Raton. CRC Press Inc, 1989. p. 119-128.

WALKER, J. S.; RUNDQUIST, J. D.; TAYLOR, R.; WILSON, B. L.; AMDREWS, M. R.; BARCK, J.; HOGGE, A. L. JR.; HUXSOLL, D. L.; HIDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M. Clinical and clinic pathologic findings in tropical canine pancytopenia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 157, p. 43-55, 1970.

WALKER, D. H. The task force on consensus approach for ehrlichiosis. Diagnosis human ehrlichioses: current status and recommendations. **Am. Soc. Microbiol. News**, v.66, n. 5, p. 287-290, 2000.

WEYER, F. Explanation experiments on lice in connection with *Rickettsia* culture. **Zentralblatt Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten**, v. 159, p. 13-22, 1952.

YOSHINARI, N. H.; ABRÃO, M. G.; BONOLDI, V. L.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; SCOLFIELD, A.; MASSARD, C. L.; DA FONSECA, A. H.; Coexistence of antibodies to tick-borne agents of Babesiosis and Lyme Borrelioses in patients from Cotia country, State of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.98, n.3, p.311-318, 2003.

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

YUNKER, C. E. Preparation and maintenance of arthropod cell cultures: Acari, with emphasis on ticks. In: _____. **Arbovirus arthropod cells in vitro**. II Boca Raton. CRC Press Inc, 1987. p. 35-51.