

ANGELINA CIRELLI MORAES

**Estabelecimento e caracterização de células embrionárias de *Amblyomma sculptum*
Berlese (Acari: Ixodidae).**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dr^a Darci Moraes Barros- Battesti

Versão Corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP(BDTD)

São Paulo
2015

RESUMO

MORAES, A. C. **Estabelecimento e caracterização de células embrionárias de *Amblyomma sculptum* Berlese (Acari:Ixodidae)**. 2015. 106 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Cultura *in vitro* de células de carrapatos, é uma ferramenta importante, para isolar e estudar os agentes causais de doenças transmissíveis. A espécie *Amblyomma sculptum* é o principal vetor da *Rickettsia rickettsii*, o agente da febre maculosa humana. O objetivo do presente estudo foi estabelecer e caracterizar as células deste carrapato e mostrar o seu potencial uso como substrato para o crescimento e isolamento de patógenos. As culturas primárias, que resultaram no estabelecimento da linhagem IBU/ASE-16, foram obtidas das massas de ovos de *A. sculptum* e preparadas em meio L-15B, sendo os cultivos mantidos à 30 °C. Quando as culturas atingiram a confluência necessária foram feitos os subcultivos, e após a quarta passagem iniciou-se a criopreservação. A recuperação das células criopreservadas foi bem sucedida, obtendo-se assim o estabelecimento da linhagem IBU/ASE-16. A identidade celular foi confirmada por meio de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e sequenciamento gênico. Experimentos com inoculação de patógenos como: *Rickettsia* spp, *Trypanosoma theileri* e *Leishmania infantum chagasi*, mostraram que a linhagem celular IBU/ASE-16, tem grande potencial como substrato para o crescimento destes microorganismos, bem como para estudos de interação parasita-hospedeiro. A expressão de biomarcadores de células-tronco, diferenciação e maturação das células da linhagem IBU/ASE-16, foi analisada por citometria de fluxo utilizando-se de marcadores de proliferação, pontos de checagem, reguladores do ciclo celular e morte celular. O potencial elétrico mitocondrial mostrou atividade funcional das mitocôndrias, como também a ausência de células inativas e com DNA fragmentado. A caracterização celular por microscopia confocal, realizada com o microscópio confocal de varredura (CLSM- Confocal Laser Scanning Microscope), permitiu a localização tridimensional de estruturas celulares e moléculas marcadas com fluorocromos. Na microscopia eletrônica de varredura da linhagem IBU/ASE-16, foi possível observar células em monocamada, em divisão, conexões e junções intercelulares, formação de matriz extracelular e a formação de redes neuronais. Foi realizado também teste de tumorigênese em camundongos Balb/c^{nu/nu}, não resultando em crescimento de tumores.

Palavras-chave: *Amblyomma sculptum*. Cultura de células. Células embrionárias. Linhagem celular. Biomarcadores. Patógenos.

ABSTRACT

MORAES, A. C. **Establishment and characterization of embryonic cells of *Amblyomma sculptum* Berlese (Acari: Ixodidae)**. 2015.106 p.

Ph. D. (Biotechnology) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

In vitro culture of tick cells is an important tool to isolate and study causative agents of transmissible diseases. The species *Amblyomma sculptum* is the main vector for *Rickettsia rickettsii*, the causing agent of human spotted fever. The aim of the present study was to establish and characterize the cells of this tick and show their potential use as a substrate for growing and isolating pathogens. The primary cultures, which resulted in the establishment of the IBU/ASE-16 lineage, were obtained from *A. sculptum* egg masses prepared in L-15B medium and maintained at 30°C. When cultures reached the necessary confluence, subcultures were made, and after the fourth passage, cryopreservation began. The recovery of cryopreserved cells was successful and the IBU/ASE-6 lineage was established. The cellular identity was confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and gene sequencing. Experiments with inoculation of pathogens such as *Rickettsia* spp, *Trypanosoma theileri infantum* and *Leishmania chagasi* showed that the IBU/ASE-16 has great potential as a substrate for the growth of these microorganisms as well as for host-parasite interaction studies. The expression of stem cell biomarkers, differentiation and maturation of cells of the IBU/ASE-16 lineage was analyzed by flow cytometry using proliferation markers, checkpoints, cell cycle and cell death regulators. The mitochondrial electric potential showed functional activity of mitochondria, as well as the absence of inactive cells with fragmented DNA. Cell characterization using confocal microscopy, performed with the scanning confocal microscope (Confocal Laser CLSM- Scanning Microscope), allowed the three-dimensional location of cellular structures and molecules marked with fluorochromes. The scanning electron microscopy of the IBU/ASE-16 lineage showed cells in monolayers, in division, intercellular connections and junctions, extracellular matrix and neuron network formations. A tumorigenesis test was performed on Balb/c^{nu/nu} mice resulting in no growth of tumors.

Keywords: *Amblyomma sculptum*. Cell culture. Embryonic cells. Cell line. Biomarkers. Pathogens.

1 INTRODUÇÃO

No mundo são conhecidas aproximadamente 900 espécies de carrapatos classificadas em 3 famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (GUGLIELMONE et al., 2010; GUGLIELMONE; NAVA, 2014). As duas primeiras possuem ampla distribuição geográfica enquanto que a última está restrita ao continente africano, (MANS et al., 2011).

Na região Neotropical ocorrem cerca de 200 espécies de carrapatos que, juntamente com seus hospedeiros, constituem grande proporção da biodiversidade total. No Brasil, são 22 carrapatos argasídeos e 45 ixodídeos, totalizando 67, mas esse número deve ser aumentado, porque novas espécies estão sendo descritas (BARROS-BATTESTI et al., 2015; DANTAS-TORRES et al., 2012).

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos de diversos vertebrados, inclusive do homem, sendo responsáveis pela transmissão de agentes causadores de zoonoses. Infestações em animais domésticos podem ocasionar grandes perdas econômicas na pecuária, especialmente em decorrência da transmissão de agentes patogênicos e diminuição da produção animal, além do comprometimento da qualidade do couro (GUGLIELMONE et al., 2003, 2006).

Algumas espécies podem representar risco real ou potencial na transmissão de agentes patogênicos. As principais zoonoses transmitidas por carrapatos são rickettsioses, borrelioses, ehrlichioses e protozoonoses.

As rickettsioses estão principalmente associadas ao gênero *Amblyomma*, enquanto que as borrelioses estão mais associadas ao gênero *Ixodes* e aos argasídeos do gênero *Ornithodoros*. As ehrlichioses e protozoonoses são transmitidas, em sua maioria, pelo gênero *Rhipicephalus*.

1.1 Doenças associadas aos carrapatos

1.1.1 *Rickettsioses*

A *Rickettsia rickettsii* é o agente causador da Febre Maculosa nas Américas. Várias outras riquetsias encontradas infectando carrapatos no continente americano podem ser observadas no Quadro 1. A maioria delas pertence ao grupo da Febre Maculosa com exceção de *R. belli* (LABRUNA, 2009; NIERI-BASTOS, 2012).

Quadro 1 - Espécies de riquetsias encontradas infectando carrapatos nas Américas.

Rickettsia	Espécies de Carrapato	Localidades	Referências
<i>R. rickettsii</i>	<i>Amblyomma sculptum</i> Berlese (<i>citado como Amblyomma cajennense</i>) <i>Amblyomma aureolatum</i> (Pallas) <i>Amblyomma longirostre</i> Koch <i>Ixodes loricatus</i> Neumann <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille) <i>Amblyomma americanum</i> (Linnaeus) <i>Amblyomma imitator</i> Kohls <i>Dermacentor andersoni</i> (Stiles) <i>Dermacentor variabilis</i> (Say) <i>Dermacentor nitens</i> Neumann <i>Haemaphysalis leporispalustris</i> (Packard)	Brasil, México, USA, Panamá, Costa Rica Colombia, Argentina	Labruna e Machado (2006), Oliveira et al. (2010), Labruna et al. (2011a), Ogrzewalska et al. (2012), Nava (2013), Parola et al. (2013), Almeida et al. (2013) Szabó et al. (2013) Martins et al. (2014)
<i>R. parkeri</i>	<i>Amblyomma maculatum</i> Koch <i>Amblyomma triste</i> Koch <i>Amblyomma tigrinum</i> Koch <i>Amblyomma ovale</i> Koch <i>Amblyomma calcaratum</i> Neumann <i>Amblyomma dubitatum</i> Neumann <i>A. ovale</i>	Brasil, Bolívia Argentina, Uruguai, USA Brasil	Padock et al. (2004), Labruna e Machado (2006), Tomassone et al. (2010), Szabó et al. (2013), Parola et al. (2013), Nava (2013) Ogrzewalska et al. (2013), Grasperge et al. (2014), Monge et al. (2014), Martins e Martins (2014) Labruna e Machado (2006), Szabó et al. (2013), Ogrzewalska et al. (2013), Almeida et al. (2013)
<i>R. parkeri</i> -like			
<i>R. rhipicephali</i>	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i> Cooley	Brasil	Labruna (2009), Labruna et al. (2011a)
<i>R. bellii</i>	<i>A. dubitatum</i> <i>A. aureolatum</i> <i>Amblyomma incisum</i> Neumann <i>A. ovale</i> <i>Amblyomma oblongoguttatum</i> Koch <i>Amblyomma rotundatum</i> Koch <i>Amblyomma humerale</i> Koch <i>Amblyomma scalpturatum</i> Neumann <i>Amblyomma neumanni</i> Ribaga <i>Amblyomma nodosum</i> Neumann <i>H. juxtakochi</i> <i>I. loricatus</i> <i>Amblyomma varium</i> Koch	Brasil, Peru Argentina	Labruna (2009), Tomassone et al. (2010), Labruna et al. (2011a), Ogrzewalska et al. (2012), Almeida et al. (2013), Martins e Martins (2014), Sakai et al. (2014)

<i>R. amblyommii</i>	<i>A. sculptum</i> (citado como <i>A. cajennense</i>), <i>Amblyomma coelebs</i> Neumann, <i>A. longirostre</i> <i>A. neumanni</i> <i>Amblyomma auricularium</i> (Conil)	Argentina, Brasil, Panamá, Guiana Francesa, Costa Rica	Labruna et al. (2011a), Saraiva et al. (2013)
<i>R. massiliae</i>	<i>R. sanguineus</i>	Argentina USA	Labruna (2009), Beeler et al. (2011), Nava (2013)
<i>Cadidatus</i> “ <i>R. andeanae</i> ”	<i>Ixodes boliviensis</i> Neumann, <i>A. maculatum</i> , <i>A. triste</i> <i>Amblyomma parvum</i> Aragão	Peru, Chile, Brasil, Argentina, USA	Blair et al. (2004); Pacheco et al. (2006); Abarca et al. (2012); Nieri-Bastos et al. (2014), Ferrari et al. (2013)
<i>R. monteiroi</i>	<i>A. incisum</i>	Brasil	Pacheco et al. (2011)
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>A. incisum</i> <i>A. dubitatum</i> <i>I. boliviensis</i>	Brasil, Costa Rica Argentina	Pacheco et al. (2011), Martins e Martins (2014), Matias et al. (2015), Monge et al. (2015).

O principal gênero de carrapato envolvido na transmissão é *Amblyomma*, embora outros gêneros também possam participar dos ciclos de transmissão (LABRUNA, 2009; PACHECO et al., 2011; PINTER; LABRUNA, 2006). As espécies de carrapatos *A. sculptum* (citado como *A. cajennense*)¹ e *A. aureolatum* são comprovadamente os principais vetores de *R. rickettsii* na região metropolitana de São Paulo (LABRUNA, 2009; PINTER; LABRUNA, 2006) e em outras áreas do sudeste brasileiro. A espécie *A. dubitatum* parece relacionada com o ciclo enzoótico da Febre Maculosa Brasileira (SAKAI et al., 2014). Segundo estes autores, embora *A. dubitatum* possa, naturalmente, estar infectada com *R. bellii*, isto não a impede de adquirir e transmitir *R. rickettsii* para cobaias em condições laboratoriais. Uma riquetsiose mais branda causada por *R. parkeri* ocorre no estado de Santa Catarina (MEDEIROS et al., 2011) e o carrapato envolvido na transmissão é *A. aureolatum*.

¹ A espécie *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888, juntamente com *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, foram durante muitos anos, sinônimas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). Porém, recentemente, estudos morfológicos e moleculares de populações de *A. sculptum* na América do Sul (BEATI et al., 2013; NAVA et al., 2014) demonstraram que existe um complexo de espécies sob este táxon, o qual foi desmembrado em 6 espécies: *A. cajennense* “sensu strictu” distribui-se na região Amazônica, ocorrendo até o Estado do Mato Grosso (Martins, 2014), enquanto que a *A. sculptum* ocorre desde as áreas úmidas do norte da Argentina, áreas adjacentes da Bolívia e Paraguai, bem como na região costeira e centro-oeste brasileiro. A espécie *A. mixtum* está presente desde o Texas ao oeste do Equador, e as três espécies novas, *Amblyomma patinoi* Labruna, Nava & Beati, *Amblyomma tonelliae* Nava, Beati & Labruna, 2014 e *Amblyomma interandinum* Beati, Nava & Cáceres, 2014 (Nava et al., 2014), ocorrem, respectivamente, no leste da cordilheira da Colômbia, áreas secas da região do Chaco estendendo-se desde o centro-norte argentino à Bolívia e Paraguai, e na parte norte do vale interandino do Perú.

Outras espécies como *A. triste* e *A. ovale* (SABATINI et al., 2010; VENZAL et al., 2004, 2008), também são vetores para esta riquettsiose.

1.1.2 Borrelioses

As borrelioses são enfermidades infecciosas determinadas por espiroquetas intracelulares do gênero *Borrelia*, transmitidas principalmente por argasídeos e piolhos (HOOSTRAAL, 1985). Exceção ocorre com a *Borrelia burgdorferi*, agente etiológico da Doença de Lyme no hemisfério norte, transmitido por carrapatos do gênero *Ixodes*, especialmente aquelas espécies do complexo “*Ixodes ricinus*” (STEERE, 1994). No Brasil, em áreas com casos humanos, foi detectada uma enfermidade com entidade nosológica desconhecida, denominada de Doença de Lyme símile ou Síndrome Baggio-Yoshinari, mas o agente etiológico nunca foi isolado. (FONSECA et al., 2005; MANTOVANI et al., 2007, 2012; YOSHINARI et al., 1999). No hemisfério sul, a presença de borrelíias do grupo “*B. burgdorferi*” foi confirmada recentemente no Uruguai (BARBIERI et al., 2013), no Chile (IVANOVA et al., 2014) e Argentina (NAVA et al., 2014), infectando carrapatos do gênero *Ixodes*.

1.1.3 Ehrlichioses, protozoonoses

Apesar das ehrlichioses e protozoonoses estarem associadas principalmente aos membros da subfamília Rhipicephalinae, elas também podem ser transmitidas por outros gêneros como demonstrado no (Quadro 2). Embora os casos humanos não tenham sido confirmados molecularmente, nos Estados Unidos a ehrlichiose humana parece ser causada por *E. chaffeensis* e *E. ewingii* (DUMLER et al., 2001) e os vetores envolvidos são *Amblyomma americanum* (Linnaeus) e *Ixodes scapularis* Say. Na Ásia e Europa os vetores são *Ixodes persulcatus* Schulze e *Ixodes ricinus* (Linnaeus), respectivamente (DUMLER et al., 2007). No Brasil os raros casos relatados foram apenas por suspeitas clínicas e pesquisa sorológica (CALIC et al., 2004; LABRUNA et al., 2007).

Quadro 2- Ehrlichioses, protozoonoses, vetores e distribuição geográfica

Patógeno	Espécie de carrapato	Localidade e Referência	
<i>E. canis</i>	<i>R. sanguineus</i>	América Latina, Brasil	Labruna e Machado (2006), Aguiar et al. (2007), Vieira et al. (2011)
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	<i>Amblyomma variegatum</i> (Fabricius) <i>Amblyomma</i>	Continente Africano, Caribe, Brasil	Labruna e Machado (2006) Vieira et al. (2011)
<i>Anaplasma marginale</i>	<i>R. microplus</i>	Neotrópico Filipinas	Labruna e Machado (2006), Ybañes et al. (2013)
<i>Babesia bovis</i> , <i>Babesia bigemina</i> <i>Babesia divergens</i>	<i>R. microplus</i>	Cosmopolita	Labruna Machado (2006), Heekin et al. (2013)
<i>Babesia microti</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i>	Europa, América do Norte	Labruna e Machado (2006) Wójcik - Flata et al. (2009)
<i>Babesia canis</i>	<i>R. sanguineus</i> , <i>Amblyomma</i> sp., <i>Dermacentor</i> spp., <i>Ixodes</i> spp., <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Vários países do Neotrópico Norte de Portugal	Labruna e Machado (2006), Cardoso et al. (2010)
<i>Theileria equi</i>	<i>Hyalomma</i> sp., <i>Dermacentor</i> sp., <i>Rhipicephalus</i> sp.	Países do Velho Mundo e Neotrópico	Souza et al. (2000), Labruna e Machado (2006), Mealey et al. (2012)

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 o carrapato de maior repercussão na clínica

de pequenos animais. No Brasil há duas “linhagens” de *R. sanguineus*, sendo uma temperada (que abrange o estado do Rio Grande do Sul, Argentina, Uruguai, Chile e Itália) e outra tropical que ocorre no restante do país, norte da Argentina, Paraguai, Colômbia, África do Sul, Moçambique (BURLINI et al., 2010; LEVIN et al., 2012; MORAES-FILHO et al., 2011; SZABÓ et al., 2005). Entretanto, parece que, até o momento, apenas a linhagem tropical está envolvida na transmissão das ehrlichioses (MORAES-FILHO, 2013). No caso dos bovinos, a espécie de carrapato envolvida na transmissão é *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini), porém a bactéria é *Anaplasma bovis* que anteriormente era citada como *Ehrlichia bovis*. Ambas as espécies de *Rhipicephalus* apresentam especificidade parasitária com cães e bovinos, respectivamente, porém, eventualmente podem picar humanos.

Com relação às protozoonoses, mais de 100 espécies de protozoários do gênero *Babesia* já foram relatadas em animais, porém, a babesiose humana é considerada uma doença zoonótica emergente (LABRUNA; MACHADO, 2006).

O primeiro caso de babesiose humana foi identificado na Croácia (SKRABALO; DEANOVIC, 1957). Em 1968, a espécie *B. divergens* foi relatada como agente causador da doença na Europa. Casos humanos foram notificados na Ásia, África do Sul e no continente americano, causados por outras espécies de babesias (KIM et al., 2007; MARATHE et al., 2005). Vannier et al. (2008) nos Estados Unidos e Senanayake et al. (2012) na Austrália registraram a *B. microti* em humanos.

A presença de *B. bovis* em humanos, também já foi noticiada na Colômbia e em Cuba (HERNÁNDEZ et al. 1997). Alecrim et al. (1983), descreveram a doença em um paciente com suspeita clínica de malária benigna, em Pernambuco. Quando o sangue foi analisado, os autores observaram a presença de protozoários do gênero *Babesia*, sendo esse o primeiro relato registrado no Brasil. A co-infecção entre babesia e doença de Lyme símile foi demonstrada pela detecção de anticorpos contra *B. burgdorferi* e altos títulos de anticorpos IgM contra *B. bovis* (YOSHINARI et al., 2003).

Nos animais, Smith e Kilborne (1983) relataram pela primeira vez a doença em bovinos nos Estados Unidos, citando *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Say) (citado como *B. annulatus*) como vetor.

A espécie *Theileria equi* é o agente etiológico da piroplasmose equina, também conhecida como babesiose equina ou nutaliose (LABRUNA; MACHADO, 2006).

Essa doença, acomete os equinos de forma endêmica no Brasil e em diversos outros países tropicais e subtropicais, sendo considerada uma das mais importantes doenças de equinos, causando danos à saúde animal e consideráveis perdas econômicas (BALDANI et al., 2011). Infecções agudas resultam em queda no desempenho físico e reprodutivo dos acarretando prejuízos a proprietários e treinadores.

No velho Mundo a *T. equi* é transmitida por carrapatos dos gêneros *Hyalomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus*, enquanto que no neotrópico o vetor é o *R. microplus*. No entanto, há evidências epidemiológicas para um possível papel de *A. sculptum* (citado como *A. cajennense*) como vetor de *T. equi* no Estado de São Paulo (LABRUNA; MACHADO, 2006).

1.2 Linhagens celulares de carrapatos: histórico, importância e aplicabilidade

1.2.1 Histórico

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 & Fanzago. A duração do cultivo foi de apenas oito dias. Outras culturas celulares de diferentes espécies de carrapatos foram obtidas posteriormente, como: *Hyalomma dromedarii* Koch, *Hyalomma anatolicum excavatum* Koch, *R. sanguineus*, *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, *Dermacentor marginatus* (Sulzer), *Dermacentor reticulatus* (Fabricius) (= *Dermacentor pictus*), *D. andersoni*, *R. annulatus* (citado como *Boophilus annulatus*), *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *decoloratus* (Koch) (citado como *Boophilus decoloratus*), *R. microplus* (citado como *Boophilus microplus*) e *I. ricinus* (PUDNEY et al., 1973). Subcultivos de células embrionárias de *Hyalomma asiaticum asiaticum* Schulze & Schlottke foram obtidos até a décima passagem (MEDVEDEVA et al., 1972). Pudney et al. (1973) subcultivaram células embrionárias de *R. microplus* até a vigésima passagem, porém, segundo os autores, após a última, as células atingiram o estágio de senescência.

Apesar dos consideráveis avanços desde os primeiros trabalhos até o início dos anos 70, o sucesso do cultivo de células de carrapatos *in vitro* se limitava às culturas primárias. Varma et al. (1975) estabeleceram as três primeiras culturas de células de linhagem de carrapatos (TTC-219, TTC-243 e TTC-257), cultivadas a partir de *R. appendiculatus*. Bhat e Yunker (1977) estabeleceram a linhagem RML-14, utilizando

células embrionárias de *Dermacentor parumapertus* Neumann. Quatro anos depois, seis novas linhagens de *D. variabilis* e de *D. parumapertus* (RML-15, RML-16, RML-17, RML-18, RML-19 e RML-20) foram estabelecidas por Yunker et al. (1981). Após uma década, 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) descreveram um método que permitia a viabilidade celular mesmo após o congelamento e descongelamento das células. Assim, foram estabelecidas novas linhagens utilizando células embrionárias de *I. scapularis*, sendo a IDE8 a mais conhecida. Outras linhagens, incluindo células de algumas espécies de argasídeos já estão estabelecidas (BEL-SAKYI et al., 2009; MATTILA et al., 2007).

Entre 2001 e 2009, houve um aumento significativo no estabelecimento de linhagens com 39 linhagens de diferentes espécies de carrapatos estabelecidas e outras em fase de estabelecimento. Muitas linhagens anteriormente estabelecidas estão depositadas em Pirbright, Surrey (Reino Unido), no banco denominado “Biobank” (<http://www.pirbright.ac.uk/research/Tickcell/Default.aspx>). Até a presente data este banco possui 35 linhagens estabelecidas de carrapatos duros e 4 linhagens de carrapatos moles. As células são mantidas em parte criopreservadas e em parte em cultivos, porque algumas linhagens são comercializadas por um preço de L\$535 cada, somado ao valor do envio. A manutenção das células de carrapatos do biobank, tem sido de responsabilidade técnica de Lesley Bell-Sakyi, que foi a idealizadora do banco celular.

Quando se compara o número de linhagens celulares de insetos, (mais de 500) de aproximadamente 120 espécies diferentes, (GAW et al., 1959; GRACE 1962; YEH et al., 2007), é grande o contraste com o número de linhagens celulares de carrapatos disponíveis.

1.2.2 Importância e Aplicabilidade

Muitos microrganismos transmitidos por carrapatos não crescem em meios de cultura artificiais. Mesmo em células primárias, algum sucesso foi obtido no cultivo de vírus e bactérias do gênero *Rickettsia* (REHÁCEK, 1971, 1972; YUNKER, 1971). Mas a partir do estabelecimento das primeiras linhagens, as culturas de células dos diferentes órgãos e tecidos de carrapatos foram efetivamente utilizadas para o

isolamento de vários microrganismos, tais como arbovírus (LEAKE et al., 1980; VARMA et al., 1975; YUNKER et al., 1981); clamídias (SHATKIN et al., 1977); protozoários (BHAT et al., 1979), micoplasmas (TULLY et al., 1981), borrelíias (KURTTI et al., 1993; OBONYO et al., 1999; VARELA et al., 2004), ehrlichias (MUNDERLOH et al., 1996), riquetsias (SIMSER et al., 2001) e anaplasmas (BLOUIN et al., 2002).

À exceção de *R. microplus* (México) e *R. sanguineus* (USA), que são espécies distribuídas em praticamente todos os continentes, as células de linhagem estabelecidas até o momento não são do neotrópico. Daí a importância de se obter o estabelecimento de células de linhagem de *A. sculptum* e de outras espécies neotropicais, uma vez que todas elas podem ser potencialmente vetores de microrganismos, alguns de alta letalidade como as riquetsias do grupo da Febre Maculosa.

Linhagens de células embrionárias de carrapatos têm sido estabelecidas com o propósito de servirem de substrato para o crescimento e isolamento de patógenos. Também são utilizadas para compreender as relações hospedeiro-vetor-patógeno, genômica, proteômica e manipulações genéticas, evidenciando, portanto, o grande potencial de suas aplicações. Ainda, as linhagens de células são ferramentas essenciais para o desenvolvimento e o aprimoramento de várias tecnologias tais como: expressão de proteínas de interesse; agentes vacinais; produção de antígenos e anticorpos; manutenção de microrganismos; *screening* seletivo de drogas e fármacos de uso humano e veterinário; genotipagem; detecção de biomarcadores e estudo de doenças neurológicas, neurodegenerativas e autoimunes, entre outras.

De maneira geral, os bioagentes são transmitidos através da saliva injetada no local da picada, que por sua vez, apresenta toxinas, substâncias anestésicas, analgésicas e anticoagulantes, estes últimos com aplicabilidade terapêutica. Após a construção da biblioteca de cDNA a partir de glândulas salivares de *A. sculptum* (citado como *A. cajennense*) (BATISTA et al., 2008), foi eleita uma proteína recombinante, denominada Amblyomin-X, que demonstrou além da capacidade anticoagulante, também uma ação antitumoral (SIMONS et al., 2011).

1.3 Caracterização celular por Citometria de Fluxo e por Microscopia de Confocal - uso de marcadores

Esteves et al. (2008) avaliaram células da linhagem BME26 de *R. microplus* como potenciais microbicidas e autofágicas, através de uma caracterização citológica por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Esses autores também relataram o uso de técnicas de biologia molecular para caracterização celular. A Citometria de Fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Permite a análise de vários parâmetros simultaneamente, sendo conhecida também por citometria de fluxo multiparamétrica. Através de um aparelho de detecção óptico-eletrônico, são possíveis análises de características físicas e/ou químicas de uma simples célula (SAELENIS et al., 2004). O microscópio confocal de varredura a laser (CLSM - Confocal Laser Scanning Microscope) é uma ferramenta importante na pesquisa biológica, na análise química e de materiais, permitindo a localização tridimensional de estruturas e moléculas marcadas com fluorocromos nas células.

A caracterização por meio de marcadores de células-tronco e de diferenciação celular ainda não foi explorada para as células de carrapatos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O meio mais indicado para cultivar células embrionárias do carrapato *A. sculptum* é o L-15 B completo, suplementado com 10% de SBF.
- A idade ideal da massa de ovos para se iniciar o cultivo de células embrionárias de carrapatos é pouco acima da metade do período de incubação da espécie.
- O peso da massa de ovos de 0,13g, quando no período ideal de incubação de *A. sculptum*, possui células suficientes para dar início ao cultivo celular.
- Após o descongelamento, as células de *A. sculptum* demoram até mais ou menos 30 dias para retomarem seu ritmo normal de proliferação.
- O tempo para o estabelecimento da linhagem IBU/AS-16, foi de aproximadamente um ano.
- O sequenciamento gênico evidenciou que a espécie que deu a origem à linhagem celular é de fato *Amblyomma sculptum*.
- Os cultivos celulares de *A. sculptum* mostraram-se eficientes para o crescimento de bactérias *R. parkeri* e *R. bellii* bem como de tripanossomatídeos *T. theileri* e *L. i.chagasi*.
- As células de linhagem IBU/AS-16 possuem receptores para os marcadores (anticorpos) usados evidenciando a presença de células-tronco e tipos celulares diferenciados.

8 CONCLUSÕES

- A linhagem celular do carrapato da espécie *A. sculptum*, obtida a partir de massas de ovos embrionados, foi estabelecida e denominada IBU/ASE-16.
- As células da linhagem IBU/ASE-16 foram caracterizadas através de biomarcadores.

REFERÊNCIAS*

ABARCA, K.; LÓPEZ, J.; ACOSTA-JAMETT, G.; LEPE, P.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. A third *Amblyomma* species and the first tick-borne rickettsia in Chile. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 1, p. 219-222, 2012.

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M.; LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 1, p. 126-132, 2007.

ALAM, A.; COHEN, L. L.; AOUAD, S.; SÉKALY, R. P. Early Activation of Caspases during T lymphocyte Stimulation Results in Selective Substrate Cleavage in Nonapoptotic Cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.190, n. 11, p. 1879-1890, 1999.

ALECRIM, I.; PINTO, B.; ÁVILA, T.; COSTA, R.; PESSOA, I. Registro do primeiro caso de infecção humana por *Babesia* spp. no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 12, n.1, p. 11-29, 1983.

ALMEIDA, R. F. C.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; MATIAS, J.; SILVA, E. A.; MATOS, M. F. C.; ANDREOTTI, R. Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: first report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 60, p. 63-72, 2013.

ALMEIDA, R. F.C.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; MATIAS, J.; LABRUNA M. B.; ANDREOTTI, R. The first report of *Rickettsia* spp. in *Amblyomma nodosum* in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, p. 156-159, 2013.

BALDANI, C. D.; HILARIO, E.; NAKAGHI, A. C. H.; BERTOLINI, M.C; MACHADO, R. Z. Produção da proteína recombinante EMA-1 e sua aplicação para o diagnóstico baseado no imuno ensaio enzimático de *Theileria equi* em equinos do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 54-60, 2011.

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 and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 3, p. 147-153, 2013.

BARKER, T. H.; HAGOOD, J. S. Getting a grip on Thy-1 signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, n. 5, p. 921-923, 2009.

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

BARROS-BATTESTI, D. M.; LANDULFO, G. A.; LUZ, H. R.; MARCILI, A.; ONOFRIO, V. C.; FAMADAS, K. M. *Ornithodoros faccinii* n. sp. (Acari: Ixodida: Argasidae) parasitizing the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, p.1-11, 2015.

BATISTA, I. F.; CHUDZINSKI-TAVASSI A. M.; FARIA, F.; SIMONS, S. M.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; LEÃO, L. I.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE- AZEVEDO, I. L. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Toxicon**, v. 51, n. 5, p. 823-834, 2008.

BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; GUGLIEMORE, A. A.; CÁCERES, A. G.; GUZMÁN-CORNEJO, C.; LÉON, R.; DURDEN, A. L.; FACCINI, J. L. H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 1-20, 2013.

BEELER, E.; ABRAMOWICZ, K. F.; ZAMBRANO, M. L.; STURGEON, M. M.; KHALAF, N.; HU, R.; DASCH, G. A.; EREMEEVA, M. E. A focus of dogs and *Rickettsia massiliae*-infected *Rhipicephalus sanguineus* in California. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 244-249, 2011.

BELL-SAKYI, L. Continuous cell lines from the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Journal of Parasitology**, v. 77, n. 6, p. 1006-1008, 1991.

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

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

BELL-SAKYI, L.; KOHL, A.; BENTE, D. A.; FAZAKERLEY, J. K. Tick Cell Lines for Study of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus and Other Arboviruses. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.12, n.9, p. 769-781, 2012.

BHAT, U. K.; 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.

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

BILLETER, S. A.; DINIZ, V. P.; BATTISTI, M. J.; MUNDERLOH U. G.; BREITSCHWERDT, E. B.; LEVY, M. G. Infection and replication of *Bartonella* species within a tick cell line. **Experimental and Applied Acarology**, v. 49, p. 193-208, 2009.

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.

BLAIR, P. J.; SCHOELER, G. B.; MORON, C.; ANAYA, E.; CACEDA, R.; CESPEDES, M.; CRUZ, C.; FELICES, V.; GUEVARA, C.; HUAMAN, A.; LUCKETT, R.; MENDOZA, L.; RICHARDS, A. L.; RIOS, Z.; SUMNER, J. W.; VILLASECA, P.; OLSON, J. G. Evidence of rickettsial and leptospira infections in Andean northern Peru. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 4, p. 357-363, 2004.

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.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 11, p. 615- 647, 2003.

BURDEN, R. E.; GORMLEY, J. A.; JAQUIN, T. J.; SMALL, D. M.; QUINN, D. J.; HEGARTY, S. M.; WARD, C.; WALKER, B.; JOHNSTON, J. A.; OLWILL, S. A.; SCOTT, C. J. Antibody-mediated inhibition of cathepsin S blocks colorectal tumor invasion and angiogenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 19, p. 6042-6051, 2009.

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 & Applied Acarology**, v. 50, n. 4, p. 361-374, 2010.

CALIC, S. B.; GALVÃO, M. A. M.; BACELLAR, F.; ROCHA, C. M. B. M.; MAFRA, C. L.; LEITE, R. C.; WALKER, D. H. Human Ehrlichioses in Brazil: First Suspect Cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 268-262, 2004.

CARDOSO, L.; YISASCHAR- MEKUZAS, Y.; RODRIGUES, F. T.; COSTA, A.; MACHADO, J.; DIZ-LOPES, D.; BANETH, G. Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2010.

CASTAGNOLA, A.; EDA, S.; JURAT-FUENTES, J. L. Monitoring stem cell proliferation and differentiation in primary midgut cell cultures from *Heliothis virescens* larvae using flow cytometry. **Differentiation**, v. 1, p. 192-198, 2011.

CHEN, L. B. Mitochondrial membrane potential in living cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 4, p. 155-181, 1988.

CHEN, L. B.; SUMMERHAVES, I. C.; JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; BERNAL, S. D.; LAMPIDIS, T. J. Probing Mitochondria in Living Cells with

Rhodamine 123. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 46, n. 1, p. 141-155, 1982.

CIRELLI-MORAES, A. YOSHINARI, N. H.; FONSECA, A. H.; KURTTI, T.; MUNDERLOH, U.; LABRUNA, M. B.; MENDONÇA, R. Z.; BARROS-BATTESTI, D.M. Primary culture of embryonic cells of *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma rotundatum*, *Ixodes schulzei* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **XIII International Congress of Acarology**, p.57, 2010.

COQUERET, O. New roles for p21 and p27 cell cycle inhibitors: a function for each cell compartment? **Trends in Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 65-70, 2003.

COSSIO-BAYUGAR, R.; MIRANDA-MIRANDA, E. Heterologous gene expression in a cattle tick *Rhipicephalus microplus* embryonic cell culture. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 6, n. 10, p. 1214-1218, 2007.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**, 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*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

DANTAS-TORRES, F.; VENZAL, J. M.; BERNARDI, L. F.; FERREIRA, R. L.; ONOFRIO, V. C.; MARCILI, A.; BERMÚDEZ, S. E.; RIBEIRO, A. F.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari: Argasidae) from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 98, n.1, p. 36-45, 2012.

DE VRIES, C.; ESCOBEDO, J. A.; UENO, H.; HOUCK, K.; FERRARA, N.; WILLIAMS, L. T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. **Science**, v. 255, p. 989-991, 1992.

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*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

DUMLER, J. S.; MADIGAN, J. E.; PUSTERLA, N.; BAKKEN, J. S. Ehrlichioses in humans: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 45, p. 45-51, 2007.

EHRENBERG, B.; MONTANA, V.; WEI, M. D.; WUSKELL, J.P.; LOEW, L. M. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution cationic dyes. **Biophysical Journal**, v. 53, n. 5, p. 785-794, 1988.

EIDE, P. E.; CALDWELL, J. M. A method for obtaining primary culture of dispersed embryonic tissue from the lone star tick, *Amblyomma americanum*. North Dakota-USDA. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 66, n. 4, p. 891-893, 1973.

EMAUS, R. K.; GRUNWALD, R.; LEMASTERS, J. J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 850, n. 3, p. 436-448, 1986.

ERIKSSON, U.; ALITALO, K. VEGF-R1 receptor 1 stimulates stem-cell recruitment and new hope for angiogenesis therapies. **Nature Medicine**, v. 8, p. 775-777, 2002.

ESTEVEES, E.; LARA, F. A.; LORENZINI, D. M.; COSTA, G. H.; FUKUZAWA, A. H.; PRESSINOTTI, L. N.; SILVA, J. R.; FERRO, J. A.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; DAFFRE, S. "Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*". **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, v. 38, n. 5, p. 568-580, 2008.

FERNANDO, P.; KELLY, J. F.; BALAZSI, K.; SLACK, R. S.; MEGENEY, L. A. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 17, p. 11025-11030, 2002.

FERRARI, F. A.; GODDARD, J.; M ORARU, G .M.; SMITH, W. E.; VARELA-STOKES, A. S. Isolation of "Candidatus Rickettsia andeanea" (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in embryonic cells of naturally infected *Amblyomma maculatum* (Ixodida: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 5, p. 1118-1125, 2013.

FONG, G. H.; ROSSANT, J.; GERTSENSTEIN, M.; BREITMAN, M. L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. **Nature**, v. 376, p. 66-70, 1995.

FONSECA, A. H.; SALLES, R. S.; SALLES, S. A. N.; MADUREIRA, R. C.; YOSHINARI, N. H. Borreliose de Lyme simile: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 2, p. 171-178, 2005.

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.

FURUKAWA, Y. Cell cycle regulation of hematopoietic stem cells. **Human Cell**, v. 11, n.2, p. 81-92, 1998.

- GAW, Z. Y.; LIU N. T.; ZIA T. U. Tissue culture methods for the cultivation of virus grasserie. **Acta Virologica**. v. 3 (Suppl), p. 55-60, 1959.
- GIBSON, P. C.; COOPER, K. CD117 (KIT): a diverse protein with selective applications in surgical pathology. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 9, n.1, p.65-69, 2002.
- GIMENEZ, D. F. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. **Stain Technology**, v. 39, p. 135 -140, 1964.
- GRACE, T. D. C. Establishment of four strains of cells from Insect Tissues Grown *in vitro*. **Nature**, v. 195, p. 788-789, 1962.
- GRASPERGE, B. J.; MORGAN, T. W.; PADDOCK, C. D.; PETERSON, K. E.; MACALUSO, K. R. Feeding by *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) Enhances *Rickettsia parkeri* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Infection in the Skin. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 4, p. 855-863, 2014.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.
- GUERRA, E. N. S.; PAULA, E. C.; OLIVEIRA, J. C.; JÚNIOR, D. S. P.; ARAÚJO, V. C.; ARAÚJO, N. S. Cyclin D1 and p16 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: correlation with TMN classification and location. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, n.1, p. 31-37, 2005.
- GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical zoogeographical region. **International Consortium of Ticks and Tick-borne Diseases**, Houten, Holanda, 173 p, 2003.
- 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-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental & Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83-100, 2006.
- GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R.G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, 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.
- GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): valid, synonyms, incertae sedis, nomina dubia, nomina nuda, lapsus, incorrect and suppressed names - with notes on confusions and misidentifications. **Zootaxa**, v. 3767, n.1, p. 001-256, 2014.
- HAKIM, R. S.; CACCIA, S.; LOEB, M.; SMAGGHE, G. Primary culture of insect midgut cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 45,p. 106-110, 2009.

HAKIM, R. S.; BALDWIN, K.; SMAGGHE, G. Regulation of Midgut Growth, Development, and Metamorphosis. **Annual Review of Entomology**, v.55, p. 593-608, 2010.

HEEKIN, A. M.; GUERRERO, F. D.; BENDELE, K. G.; SALDIVAR, L.; SCOLES, G. A.; DOWD, S. E.; GONDRO, C.; NENE, V.; DJIKENG, A.; BRAYTON, K. A. Gut transcriptome of replete adult female cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, feeding upon a *Babesia bovis*-infected bovine host. **Parasitology Research**, v. 112, n. 9, p. 3075-3090, 2013.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HERNÁNDEZ, M. S.; CASTELLANO, M. A.; MARTÍNEZ, R. P.; PÉREZ, B. S.; GONZÁLEZ, J. B.; SIBELLO, A. S. Pesquisaje de *Babesia* en trabajadores agropecuarios y donantes en La provincia de Ciego de Ávila. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 135-139, 1997.

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

ISHIZAKI, Y.; JACOBSON, M. D.; RAFF, M. C. A Role for Caspases in Lens Fiber Differentiation. **Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 1, p. 153-158, 1998.

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, F. C. *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.

JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; BOCKUS, B. J.; CHEN, L. B. Monitoring of Relative Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells by Fluorescence Microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 88, p. 526-535, 1981.

KAYA, M.; WADA, T.; KAWAGUCHI, S.; NAGOYA, S.; SHINDOH, M.; HIGASHINO, F.; MEZAWA, F.; OKADA, F.; ISHII, S. Increased pre-therapeutic serum vascular endothelial growth factor in patients with early clinical relapse of osteosarcoma. **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 6, p. 864-869, 2002.

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.

KIM, J. Y.; CHO, S. H.; JOO, H. N.; TSUJI, M.; CHO, R. S.; PARK, I. J.; CHUNG, G. T.; JU, W. J.; CHEUN, H. I.; LEE, H. W.; LEE, Y. H.; KIM, T. S. First case of human babesiosis in Korea: detection and characterization of a novel type of *Babesia* sp. (KO1) similar to ovine babesia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, N. 6, p. 2084-2087, 2007.

KNOWLES, D. JR. Equine babesiosis (Piroplasmosis): a problem in the international movement of horses. **British Veterinary Journal**, v. 152, n. 2, p. 123-126, 1996.

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

KURTTI, T. J.; KRUEGER, D. P.; JOHNSON, R. C.; SCHWAN, T. G. Adhesion to and invasion of cultured tick (Acari: 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.; MATTILA, J. T.; HERRON, M. J.; FELSHEIM, R. F.; BALDRIDGE, G. D.; BURKHARDT, N. Y.; BLAZAR, B. R.; HACKETT, P. B.; MEYER, J. M.; MUNDERLOH, U. G. Transgene expression and silencing in a tick cell line: a model system for functional tick genomics. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 963-968, 2008.

LABRUNA, M. B.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R. Study of the Weight of Eggs from Six Ixodid Species from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n.2, p. 205-207, 1997.

LABRUNA, M. B.; FUGISAKI, E. Y. Y; PINTER, A.; DUARTE, J. M. B.; SZABÓ, M. J. P. Life cycle and host specificity of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental & Applied Acarology**, v.30, n. 4, p. 305-316, 2003.

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

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. **Experimental and Applied Acarology**, v. 43, p. 147-160, 2007.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M.; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WLLIAMSON, P. C.; STICH, R. W.; LONG, S. W.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. A preliminary investigation of Ehrlichia species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Barzil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189-195, 2007.

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

LABRUNA, M. B.; MATTAR, S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S. M.; VENZAL, J. M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; SOUSA, R.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsiosis in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Cordoba**, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, 2011a.

LEAKE, C. J.; PUDNEY, M.; VARMA, M. G. R. Studies on arboviruses in established tick cell lines. In: KURSTAK, E.; MARAMOROSCH, K.; A. DUBENDORFER, A. (eds). **Invertebrate systems in vitro**. Amsterdam: Elsevier, 1980. p. 325-335.

LEMOINE, N. R. ras oncogenes in human cancers. In: Sluyser, M. (ed) **The biology of cancer genes**. Chichester: Horwood, 1990. p. 82-118.

LEVIN, M. L.; STUDER, E.; KILLMASTER, L.; ZEMTSOVA, G.; MUMCUOGLU, K. Y. Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Experimental & applied acarology**, v. 58, n. 1, p. 51-68, 2012.

LIN, T.; CHAO, C.; SAITO, S.; MURPHY, M. E. APPELLA, E.; XU, Y. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 165-171, 2005.

LING, E.; SHIRAI, K.; KANEKATSU, R.; KIGUCHI, K. Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. **Cell and Tissue Research**, v. 320, p. 535-543, 2005.

LOEB, M. J.; HAKIM, R. S. Insect Midgut Epithelium In Vitro: an Insect Stem Cell System. **Journal of Insect Physiology**, v. 42, n. 11-12, p. 1103-1111, 1996.

LOPES, C. M. L.; OLIVEIRA, P. R.; HADDAD, J. P.; DOMINGUES, L. N.; PINHEIRO, R. R.; BORGES, L. M. F.; LABRUNA, M. B.; LEITE, R. C. Biological parameters of ticks (*Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) under field and laboratory conditions in Pedro Leopoldo, estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 14-17, 2008.

LYONS, A. B.; HASBOLD, J.; HODGKIN, P. D. Flow cytometric analysis of cell division history using dilution of CFSE, a stably integrated fluorescent probe. **Methods Cell Biol.**, v. 63, p. 375-398, 2001.

LYONS, A. B.; DOHERTY, K. V. Flow cytometric analysis of cell division by dye dilution. **Current Protocols in Cytometry**, Chapter 9: Unit 9.11, 2004.

MAFI, P.; HINDOCHA, S.; MAFI, R.; GRIFFIN, M.; KHAN, W. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature. **The Open Orthopedics Journal**, v. 5, p. 253-260, 2011.

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.

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

MANTOVANI, E.; MARANGONI, R. G.; GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L.; YOSHINARI, N. H. Amplification of the *flge* gene provides evidence for the existence of a brazilian borreliosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 3, p. 153-157, 2012.

MARATHE, A.; TRIPATHI, J.; HANDA, V.; DATE, V. Human babesiosis—a case report. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 267-269, 2005.

MARTINS, J. R.; LEITE, R.C.; DOYLE, R.L. Tripanosomatides like *Trypanosoma theileri* in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 113-114, 2008.

MARTINS, T. F. **Estudo do complexo *Amblyomma cajennense* no Brasil**. 2014.113f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MARTINS, M. E. P.; MARTINS, K. C. S. Riquetsioses (*Rickettsia* spp.) transmitidas por carrapatos. **Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v. 10, n. 18, p. 2739, 2014.

MATIAS, J.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; AGUIRRE, A. A. R.; BARROS, J. C. CSORDAS, B. G.; ANDREOTTI, R. Spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma dubitatum* tick from the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, p. 107–110, 2015.

MATTLA, 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.

MEALEY, R. H.; KAPMEYER, L. S.; UETI, M. W.; WAGNER, B.; KNOWLES, D. P. Protective Effects of Passively Transferred Merozoite-Specific Antibodies against *Theileria equi* in Horses with Severe Combined Immunodeficiency. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 10, n. 1, p. 100-104, 2012.

MEDEIROS, A. P.; SOUZA, A. P.; 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 926-930, 2011.

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

MIETTINEN, M.; LASOTA, J. KIT (CD117): A Review on Expression in Normal and Neoplastic Tissues, and Mutations and Their Clinicopathologic Correlation. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 13, n. 3, p. 205-220, 2005.

MONJE, L. D.; NAVA, S.; ANTONIAZZI, L. R.; COLOMBO, V. C.; BELDOMENICO, P. M. In vitro isolation and infection intensity of *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* ticks from the Paraná River Delta region, Argentina. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 14, p. 924-927, 2014.

MONGE, L. D.; NAVA, S.; EBERHARDT, A. T.; CORREA, A. I.; GUGLIELMONE, A. A. BELDOMENICO, P. M. Molecular Detection of the Human Pathogenic *Rickettsia* sp. Strain Atlantic Rainforest in *Amblyomma dubitatum* Ticks from Argentina. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 2, p.167-169, 2015.

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.

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, p.141-174, 2003.

MORAES-FILHO, J. **Competência vetorial de carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* do Brasil, Argentina e Uruguai para a transmissão da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina.** 2013. 59 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MORZARIA, S. P.; LATIF, A. A.; JONGEJAN, F.; WALKER, A. R. Transmission of a *Trypanosoma* sp. to cattle by the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Veterinary Parasitology**, v.19, p. 13-21, 1986.

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

MUNDERLOH, U. G.; 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.

MUNDERLOH, U. G.; MADIGAN, J. E.; DUMLER, J. S.; GOODMAN, J. L.; HAYES, S. F.; BARLOUGH, J. E.; NELSON, C. M.; KURTTI, T. J. Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 664- 670, 1996.

NAVA, S. Avances en el conocimiento de los principales vectores de *Rickettsia* en Latinoamérica. **Acta Médica Costarricense**, IV Congreso Latinoamericano de Enfermedades Rickttsiales, Suplemento 1, 2013.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of taxonomic status of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of the 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 and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252-276, 2014.

NAVA, S.; BARBIERI, A. M.; MAYA, L.; COLINA, R.; MANGOLD, A. J.; LABRUNA, M. B.; VENZAL, J. M. *Borrelia* infection in *Ixodes parvicinus* ticks (Acari: Ixodidae) from northwestern Argentina. **Acta Tropica**, v. 139, p. 1- 4, 2014.

NIERI-BASTOS, F. A. **Avaliação da infecção de *Rickettsia parkeri* em carrapatos da espécie *Amblyomma triste***. 2012. 66 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NIERI-BASTOS, F. A.; LOPES, M. G.; CANÇADO, P. H. D.; ROSSA, G. A. R.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. *Candidatus Rickettsia andeanae*, a spotted fever group agent infecting *Amblyomma parvum* ticks in two Brazilian biomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 259-261, 2014.

OBENCHAIN, F. D.; OLIVER, J. H. Neurosecretory system of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). II. Distribution of secretory cell types, axonal pathways and putative neurohemal-neuroendocrine association; comparative histological and anatomical implications. **Journal of Morphology**, v. 145, p. 269-294, 1975.

OBENCHAIN, F. D.; OLIVER, J. H. The Heart and Arterial Circulatory System of Ticks (Acari: Ixodoidea). **Journal of Arachnology**, v. 3, p. 57-74, 1976.

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, K. A.; PINTER, A.; MEDINA-SANCHEZ, A.; BOPPANA, V. D.; WIKEL, s. k.; SAITO, T. B.; SHELITE, T.; BLANTON, L.; POPOV, V.; TEEL, P. D.; WALKER, D. H.; GALVAO, C. M.; BOUYER, D. H. *Amblyomma imitator* Ticks as Vectors of *Rickettsia rickettsii*, Mexico. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 1282- 1284, 2010.

OGRZEWALSKA, M.; SARAIVA, D. G.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; COSTA, F. B.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v. 139, p. 1283-1300, 2012.

OGRZEWALSKA, M.; LITERAK, I.; CARDENAS-CALLIRGOS, J.; CAPEK, M.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia bellii* in ticks *Amblyomma varium* Koch, 1844, from birds in Peru. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, p. 254-256, 2012.

OGRZEWALSKA, M.; MARTINS, T.; CAPEK, M.; LITERAK, I.; LABRUNA, M. B. A *Rickettsia parkeri*-like agent infecting *Amblyomma calcaratum* nymphs from

wild birds in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, p. 145-147, 2013.

PACHECO, R. C.; VENZAL, J. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1804-1805, 2006.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P.; CATROXO, M. H.; BOUYER, D. H.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5207-5211, 2011.

PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLSMITH, C. S.; GODDARD, J.; MCLELAN, S. L. F.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A. *Rickettsia parkeri*: A newly reconized cause of spotted fever rickettsiosis in United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n.6, p. 805-811, 2004.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; SOCOLOVSCHI, C.; LABRUNA, M. B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M. Y.; STENOS, J.; BITAM, I.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p. 657-702, 2013.

PEÑA, L. L.; NIETO, A. I.; PEREZ-ALENZA, D.; CUESTA, P.; CASTANO, M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, n. 3, p. 237-246, 1998.

PERRY, S. W.; NORMAN, J. P.; BARBIERI, J.; BROWN, E. B.; GELBARD, H. A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. **Biotechniques**, v. 50, n. 2, p. 98-115, 2011.

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.

PRATA, M. C. A.; DAEMON, E. Determinação do número de ovos por grama de postura de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.4, n.2, p. 81-82, 1997.

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.

RAHIMI, N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 818-829, 2006.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Review**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997.

REHACEK, J. Tissue cultures of blood-sucking arthropods and their use for the cultivation of viruses and rickettsiae. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 46, p. 197-231, 1971.

REHÁČEK, J. Use of invertebrate cell culture for study of animal viruses and rickettsiae. In: VAGO, C. (ed.) **Invertebrate tissue culture II**. New York: Academic Press, 1972. p. 280-320.

REZENDE, J.; KESSLER, R. H.; SOARES, C. O.; MARTINS, O. P. Ocorrência de *Borrelia* spp. em culturas de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 50-52, 2008.

RICKETTS, H. T. A micro-organism which apparently has a specific relationship to Rocky Mountain spotted fever. **The Journal of the American Medical Association**, v. 52, p. 379-380, 1909.

RODRIGUES, A. C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S.; DELL' PORTO, A.; MILDRE, R. V.; TAKEDA, G. F.; TEIXEIRA, M. M. G. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 185-207, 2003.

SABATINI, G. S.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an atlantic rain forest reserve in the state of São Paulo, Brazil. **Journal Medical Entomology**, v. 47, p. 913-916, 2010.

SADRUD-DIN, S. Y.; LOEB, M. J.; HAKIM, R. S. In vitro differentiation of isolated stem cells from the midgut of *Manduca sexta*. **Journal of Experimental Biology**, v. 199, p. 319-325, 1996.

SAELENS, X.; FESTJENS, N.; VANDE WALLE, L.; VAN GURP, M.; VAN LOO, G.; VANDENABEELE, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, p. 2861-2874, 2004.

SAKAI, R. K.; COSTA, F. B.; UENO, T. E. H.; RAMIREZ, D. G.; SOARES, J. F.; FONSECA, A. H.; LABRUNA, M. B.; BARROS-BATTESTI, D. M. Experimental infection with *Rickettsia rickettsii* in an *Amblyomma dubitatum* tick colony, naturally infected by *Rickettsia belli*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 917-923, 2014.

SANZ-RODRIGUEZ, F.; GUERRERO-ESTEO, M.; BOTELLA, L. M.; BANVILLE, D.; VARY, C. P. H.; BERNABÉU, C. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32858-32868, 2004.

SARAIVA, D. G.; NIERI-BASTOS, F. A.; HORTA, M. C.; SOARES, H. S.; NICOLA, P. A.; PEREIRA, L. C. M.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma auricularium* ticks in Pernambuco, northeastern Brazil:

isolation, transovarial transmission, and transtadial perpetuation. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 9, p. 615-618, 2013.

SARLOMO-RIKALA, M.; KOVATICH, A. J.; BARUSEVICIUS, A.; MIETTINEN, M. CD 117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. **Modern Pathology Journal**, v. 11, n. 8, p. 728-734, 1998.

SCHEIN, E. In: RISTIC, M. (ed.) **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 197-208.

SENANAYAKE, S. N.; PAPANINI, A.; LATIMER, M.; ANDRIOLO, K.; DASILVA, A. J.; WILSON, H.; XAYAVONG, M. V.; COLLIGNON, P. J.; JEANS, P.; IRWIN, P. J. First report of human babesiosis in Australia. **The Medical Journal of Australia**, v. 196, n. 5, p. 350- 352, 2012.

SHATKIN, A. A.; BESKINA, S. R.; MEDVEDEVA, G. I.; GROKHOVSKAYA, I. M. Cultivation of the agent of enzootic abortion of sheep in a continuous cell line of tick *Hyalomma* embryonic cells. **Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni**, v. 46, p. 420-423, 1977.

SHIBUYA, M.; YAMAGUCHI, S.; YAMANE, A.; IKEDA, T.; TOJO, A.; MATSUSHIME, H.; SATO, M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene(flt) closely related to the fms family. **Oncogene**, v.5, n.4, p. 519-24, 1990.

SHMELKOV, S. V.; BUTLER, J. M.; HOOPER, A. T.; HORMIGO, A.; KUSHNER, J.; MILDE, T.; ST.CLAIR, R.; BALJEVIC, M.; WHITE, I.; JIN, D. K.; CHADBURN, A.; MURPHY, A. J.; VALENZUELA, D. M.; GALE, N. W.; THURSTON, G.; YANCOPOULOS, G. D.; D'ANGELICA, M.; KEMENY, N.; LYDEN, D.; RAFII, S. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD 133⁺ and CD 133⁻ metastatic colon cancer cells initiate tumors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 6, p. 2111-2120, 2008.

SHERR, C. J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Research**, v. 60, n. 14, p. 3689-3695, 2000.

SICLARI, V. A.; QIN, L. Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 5, p. 1-10, 2010.

SIMONS, S. M.; JÚNIOR, P. L.; FARIA, F.; BATISTA, I. F.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 443-450, 2011.

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.

SKRABALO, Z.; DEANOVIC, Z. Piroplasmosis in man: report of a case. **Documenta de Medicina Geographica Et Tropica**, v. 9, n. 1, p. 11-16, 1957.

SMITH, T.; KILBORNE, F. L. Investigation into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. **Bureau of Animal Industry**, v. 1, p. 85-114, 1983.

STEERE, A. C. Lyme disease: a growing threat to urban populations. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 91, p. 2378- 2383, 1994.

SOUZA, A. P.; BELLATO, V. SARTOR, A. A.; SILVA, A. B. Prevalência de anticorpos ANTI *Babesia equi* em equinos no planalto catarinense. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 119-121, 2000.

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 the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 131-140, 2005.

SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontier in Cellular Infection Microbiology**, v. 3, p. 1-9, 2013.

TANG, K. H.; MA, S.; LEE, T. K.; CHAN, Y. P.; KWAN, P. S.; TONG, C. M.; NG, I. O.; MAN, K.; TO, K.F.; LO, C. M.; GUAN, X. Y.; CHAN, K.W. CD133 (+) liver tumor-initiating cells promote tumor angiogenesis, growth, and self-renewal through neurotensin/interleukin-8/CXL1 signaling. **Hepatology**, v. 55, n. 3, p. 807- 820, 2012.

TSAI, M. S.; LEE, J. L.; CHANG, Y. J.; HWANG, S. M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-semester amniotic fluid using a novel model two-stage culture protocol. **Human Reproduction**, v. 19, p. 1450-1456, 2004.

TOMASSONE, L.; CONTE, V.; PARRILLA, G.; DE MENEGHI, D. Rickettsia infection in dogs and *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma tigrinum* ticks, Cochabamba Department, Bolivia. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, p. 953- 958, 2010.

TRIEB, K.; KOTZ, R. Proteins expressed in osteosarcoma and serum levels as prognostic factors. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 11-17, 2001.

TROYO, A.; MOREIRA-SOTO, A.; CARRANZA, M.; CALDERÓN-ARGUEDAS, O.; HUN, L.; TAYLOR, L. Detection of an undescribed *Rickettsia* sp. in *Ixodes boliviensis* from Costa Rica. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 883-886, 2014.

TULLY, J. G.; ROSE, D. L.; YUNKER, C. E.; CORY, J.; WHITCOMB, R. F.; WILLIAMSON, D. L. Helical mycoplasmas (spiroplasmas) from *Ixodes* ticks. **Science**, v. 212, p. 1043-1045, 1981.

VANDER HEINDEN, M. G.; THOMPSON, C.B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? **Nature Cell Biology**, v. 1, p. 209-216, 1999.

VANNIER, E.; GEWURZ, B. E.; KRAUSE, P. J. Human babesiosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, n. 3, p. 469-488, 2008.

VARELA, A. S.; LUTTRELL, M. P.; HOWERTH, E. W.; MOORE, V. A.; DAVIDSON, W. R.; STALLKNECHT, D. E.; LITTLE, S. E. First Culture isolation of *Borrelia lonestari*, putative agent of Southern tick-associated rash illness. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1163-1169, 2004.

VARMA, M. G. R.; 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.

VENZAL, J. M.; PORTILLO, A.; ESTRADA PEÑA, A.; CASTRO, O.; CABRERA, P. A.; OTEO, J. A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infection Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1493-1495, 2004.

VENZAL, J. M.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; SOUZA, C. G.; FÉLIX, M. L.; NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A. *Amblyomma triste* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts and seasonality of the vector of *Rickettsia parkeri* in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 104-109, 2008.

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

VOUSDEN, K. H.; LANE, D. P. p53 in health and disease. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 4, p. 275- 283, 2007.

ZHONG, L. CD133: a stem cell biomarker and beyond. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 2, p. 1-8, 2013.

WEIL, M.; RAFF, M. C.; BRAGA, V. M. M. Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. **Current Biology**, v. 9, p. 361-364, 1999.

WENCESLAU, C. V. **Análise de células mesenquimais de saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos**. 2009. 198 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

WÓJCIK-FATLA, A.; SZYMANSKA, L.; WDOWIAK, A.; BUCSEK, A., DUTKIEWICZ, J. Coincidence of three pathogens (*Borrelia burgdorferi* sensu lato,

Anaplasma phagocytophilum and *Babesia microti*) in *Ixodes ricinus* ticks in the Lublin macroregion. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 16, p. 151-158, 2009.

YBAÑEZ, A. P.; SIVAKUMAR, T.; YBAÑEZ, R. H.; RATILLA, J. C.; PEREZ, Z. O.; GABOTERO, S. R.; HAKIMI, H.; KAWAZU, S.; MATSUMOTO, K.; YOKOYAMA, N.; INOKUMA, H. First molecular characterization of *Anaplasma marginale* in cattle and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in Cebu, Philippines. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 1, p. 27-36, 2013.

YEH, S. C.; LEE, S. T.; WU, C. Y.; WANG, C. H. A cell line (NTU-MV) established from *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Pyralidae) Characterization, viral susceptibility, and polyhedra production. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 138-146, 2007.

YOSHINARI, N. H.; BONOLDI, V. L. N.; BARROS-BATTESTI, D. M.; SCHUMAKER, T. T. S. Doença de Lyme-símile no Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 39, n. 2, p. 57-58, 1999.

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 borreliosis in patients from Cotia county, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 311-318, 2003.

YUNKER, C. E. In: WEISS, E. (ed.) **Current topics in microbiology and immunology**. New York: Springer-Verlag, 1971. p. 113-126.

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. In: **Arboviruses in arthropod cells in vitro**. Boca Raton: CRC Press, 1987. p. 35-51.