

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

**TESE**

**Cultivo de Esporocinetos de *Babesia bigemina***  
**em Hemócitos e Células Embrionárias de**  
***Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

**Jania de Rezende**

**2012**



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

**CULTIVO DE ESPOROCINETOS DE *Babesia bigemina* EM  
HEMÓCITOS E CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE  
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

**JANIA DE REZENDE**

*Sob a Orientação do Professor*

**Adivaldo Henrique da Fonseca**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do Grau de **Doutor em  
Ciências**, no curso de Pós-Graduação  
em Ciências Veterinárias, área de  
concentração Parasitologia Veterinária

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2012

595.429

R467c

T

Rezende, Jania de, 1978-

Cultivo de esporocinetos de babesia bigemina em hemócitos e células embrionárias de Rhipicephalus (Boophilus) microplus / Jania de Rezende - 2012.

59 f.: il.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.

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

Bibliografia: f. 38-46.

1. Carrapato - Citologia - Teses. 2. Carrapato - Doenças - Teses. 3. Boophilus microplus - Teses. 4. Babesia - Teses. I. Fonseca, Adivaldo Henrique da, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

Bibliotecário: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

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

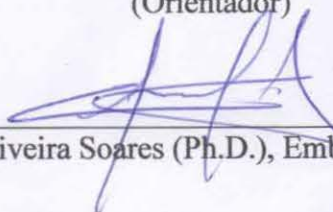
**JANIA DE REZENDE**

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

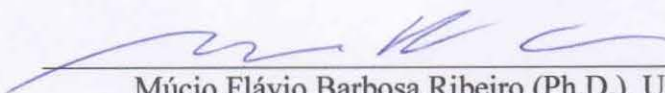
TESE APROVADA EM 15/02/2012



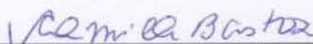
\_\_\_\_\_  
Adivaldo Henrique da Fonseca (Ph.D. e LD); UFRRJ  
(Orientador)



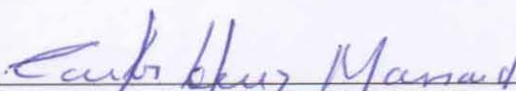
\_\_\_\_\_  
Cleber Oliveira Soares (Ph.D.), Embrapa - CNPPGC



\_\_\_\_\_  
Múcio Flávio Barbosa Ribeiro (Ph.D.), UFMG



\_\_\_\_\_  
Camila de Valgas e Bastos Castro (Ph.D.), UFMG



\_\_\_\_\_  
Carlos Luiz Massard (Ph.D.), UFRRJ

**"E tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração..."**

**Colossenses 3: 23**

**"Deus a nós se dirige constantemente como um caminho, um livro, um amigo".**

**O caminho que a Ele conduz é a natureza. O livro que Ele fala é a Bíblia. O amigo que nos confidência na intimidade, coração a coração, é o próprio Deus.**

*Jacques Laew.*

**DEDICO...**

**"A toda minha família que amo de coração, que mesmo distante apoiou-me,**

**e aos amigos que fazem parte de minha história".**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Senhor Deus. Devo tudo àquele que me deu sabedoria para escolher minha vocação e força para superar todos os obstáculos.

Aos meus pais do coração, Cleodete e Domingos, meus amados irmãos, meus sobrinhos, meus tios do coração Cleusa e Manoel, bisa Anália e vó Erotildes (*in memoriam*), muito obrigada por existirem em minha vida e pelo apoio especial.

À tia Oneide, pelo apoio e pelos conselhos incentivadores. Muito obrigada pelo carinho e consideração!

Ao meu querido orientador Adivaldo Henrique da Fonseca, o meu respeito, admiração, gratidão e afeto por confiar em mim e sempre se mostrar disponível com sua humildade. Muito obrigada por abrir as portas do laboratório para mim e pelos oito anos de convivência e aprendizagem!

A querida Marília Massard Fonseca, pelo carinho e por ser sempre generosa e acolhedora. Obrigada por àquele abraço caloroso!

Ao Dr. Raul Henrique Kessler, por me ingressar na pesquisa científica, sempre gentil e atencioso, pessoa de grande sabedoria e humildade.

Ao professor Carlos Luís Massard, pelos ensinamentos, apoio, incentivo e pelo exemplo de humildade.

Ao professor Múcio F. B. Ribeiro, pela atenção, disposição, apoio e pelo exemplo de humildade. Obrigada pelos ensinamentos e por receber-me no seu laboratório sempre com muito respeito.

À Dr<sup>a</sup> Carina Elisei, Dr<sup>a</sup> Alessandra Scofield e Dr. Cleber Soares que me incentivou a partir para a pós-graduação, demonstrando total apoio e confiança. Obrigada pelo carinho, convívio e amizade!

Aos amigos sul-mato-grossense, Valdirene, Vilma, Ana Dauria, Jully, Rose, Éder, Édson, Carlos, Elaine, Ana Caroline.

Aos grandes amigos Seropedissense e ruralense, que conviveram comigo nestes oito anos, Leci, Rodrigo, Rogério, Nathalie, Renata, Cátia, Luciana, Fabiola, Cristina, Cristiane, Rita de Cássia, Rosane, Geise, Elise e Ana Paula. Amizade essencial seria difícil sem vocês, obrigada de coração!

À minhas grandes e fiéis amigas, Jackeline, Priscila e Rosângela, por tanto tempo de amizade, carinho, orações, zelo e respeito. Nossa amizade é como cordão de três dobras!

Aos amigos, Charles pela grande contribuição na realização do trabalho e à Fabiola pela ajuda na PCR. Aos meus colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias, que indiretamente contribuíram no trabalho, Fábio Jorge, Jenevaldo Barbosa da Silva, Antônio Têmbue. À Neide, por zelar de nosso laboratório.

À todos, do laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Júlia, Camila, Mercês, Paula, Bruna e Diana. Obrigada por me receberem com sorriso, atenção, respeito e ajuda. Parabéns pela equipe madura e disciplinar que vocês consolidaram.

Aos amigos de turma do curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias-CPGCV, Geisi, Leonardo, Joice, Saulo, Danielle e Melissa.

Ao professor Douglas McIntosh, pelos ensinamentos na biologia molecular, pela atenção e paciência! Aos professores do CPGCV, muito obrigada por contribuir para meus conhecimentos! À Tássia, técnica do laboratório Multiusuário de Biologia molecular, obrigada pelo carinho, atenção e respeito. Ao Arthur, secretário do CPGCV, muito obrigada pela atenção e carinho.

A todo pessoal do Laboratório Coccidios e Coccidioses, em especial ao professor Carlos Wilson Lopes, Walter Flausino, Walter Teixeira Filho e Bruno Berto, obrigada pelo respeito e apoio.

À CAPES, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro indispensável.

## Resumo

Rezende, Jania. **Cultivo de esporocinetos de *Babesia bigemina* em hemócitos e células embrionárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2012. 45p. Tese (Doutorado em Ciências, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Os hemoparasitos pertencentes ao gênero *Babesia* são intensamente estudados devido sua importância na economia da pecuária mundial. Culturas de hemócitos e células embrionárias de carrapatos constituem excelentes substratos para o isolamento e cultivo de hemoparasitos patogênicos, incluindo *Babesia* spp. Esta metodologia contribui para estudos da biologia, fisiopatologia, bem como controle da espécie. O presente estudo teve como objetivos cultivar *in vitro*, esporocinetos de *Babesia bigemina* em hemócitos e em células embrionárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Após desinfecção superficial de fêmeas ingurtitadas, a hemolinfa foi coletada e transferida para frascos de cultura com 25 cm<sup>2</sup> e tubo de 10cm<sup>2</sup> e incubados a 28 °C. Para iniciar o cultivo primário embrionário, fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* foram incubadas à 28°C e após 13 dias de postura, os ovos foram desinfetados superficialmente, macerados, filtrados e transferidos para meio de cultivo L15 suplementado e em temperatura de 28°C. Observações foram realizadas diariamente em microscópio de contraste de fase invertido. Realizou-se Citospin e gota espessa das amostras, que foram coradas com Giemsa e observadas em microscopia de luz. Foram realizadas PCR para *B. bigemina* e *Babesia bovis*, utilizando dois pares de iniciadores para identificar o gene 18SrRNA para ambas espécies e também foi realizado a morfometria dos esporocinetos para confirmação da espécie. Esporocinetos de *B. bigemina* criopreservados a partir da cultura de hemócitos, foram descongelados, reativados em hemócitos livres de infecção e em células de linhagem CTVM/BME2. Observou-se o desenvolvimento dos esporocinetos de *B. bigemina* a partir do primeiro dia do cultivo, após reativação nas células. Os protozoários apresentaram boa motilidade e capacidade de aderência na membrana celular pela extremidade apical. No citoplasma dos hemócitos observou-se formas redondas, móveis e com núcleo visível de esporocinetos de *B. bigemina*. Nas amostras coradas do 3° e 17° dia do cultivo de esporocinetos de *B. bigemina* em hemócitos foram observadas formas íntegras piriformes de esporocinetos imaturos e maduros, com núcleo corado de vermelho escuro, as vezes, centralizado ou próximo da extremidade apical. Nas amostras do 17° dia de cultivo foram observados muitas formas pequenas redondas e ovais, compatíveis com esporocinetos imaturos. Pela técnica PCR foi possível a amplificação do DNA para o gene 18SrRNA de *B. bigemina*, assim como pelo estudo comparativo das mensurações dos esporocinetos. Os hemócitos e células embrionárias de *R. (B.) microplus* constituíram-se em substratos eficientes para cultivo *in vitro* de esporocinetos de *B. bigemina*. Foi possível a criopreservação de esporocinetos de *B. bigemina* em nitrogênio líquido e a sua reativação em cultura de hemócitos de *R. (B.) microplus* e em células da linhagem BME2.

Palavras-chave: Célula de carrapato, criopreservação, *Babesia* spp.



## Abstract

Rezende, Jania. **Cultivation of sporokinetes of *Babesia bigemina* in hemocytes and embryonic cells of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2012. 45p. Thesis (Doctor in Science, Veterinary Parasitology). Institute of Veterinary, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The hemoparasitos belonging to the genus *Babesia* are intensively studied because of its importance in the livestock economy worldwide. Cultures of embryonic cells and hemocytes of ticks are excellent substrates for the isolation and cultivation of hemoparasites pathogens, including *Babesia* spp. This methodology contributes for biological and physiopathology studies, as well as control of the species. The present study had as goals to cultivate *in vitro* sporokinetes of *Babesia bigemina* in hemocytes and embryonic cells of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. After superficial disinfection of engorged females, the hemolymph was collected and transferred to culture flasks with 25 cm<sup>2</sup> and tube 10 cm<sup>2</sup> and incubated at 28 ° C. To start the primary embryonic culture, engorged females of *R. (B.) microplus* were incubated at 28 ° C and 13 days after oviposition, the eggs were superficially disinfected, broken, filtered and transferred to medium culture supplemented L15 and at a 28°C. Examinations were daily performed by contrast microscope inverted in phase. Cytospin and thick drop samples, which were stained with Giemsa and observed under light microscopy. It was realized PCR for *B. bigemina* and *Babesia bovis*, using two pairs of primers to identify the gene 18SrRNA for both species and were also carried to morphometry of the sporokinetes of confirm the species. Sporokinetes of *B. bigemina* cryopreserved from the culture of hemocytes were thawed, reactivated in hemocytes free of infection and in cell line CTVM/BME2. It was observed the development of sporokinetes *B. bigemina* from the first day of cultivation, cells after reactivation. The protozoa showed good motility and capacity to adhere to the cell membrane by the apical extremities. In the cytoplasm of hemocytes was observed round shapes, moving, and with visible nuclei sporokinetes of *B. bigemina*. In the stained samples of 3<sup>rd</sup> and 17<sup>th</sup> days of cultivation of *B. bigemina* sporokinetes in hemocytes were observed pyriformes integrity forms of sporokinetes immature and mature, with dark red stained nuclei, sometimes centralized or near the apical extremities. In samples from the 17<sup>th</sup> day of cultivation were observed many small round and oval shapes, compatible with immature sporokinetes. By PCR technique, it was possible to amplify the DNA to 18SrRNA gene of *B. bigemina*, as well as the comparative study of measurements of sporokinetes. The hemocytes and embryonic cells of *R. (B.) microplus* consisted in efficient substrates for *in vitro* *B. bigemina* sporokinetes cultivation. It was possible to cryopreservation *B. bigemina* sporokinetes in liquid nitrogen and its reactivation in cultured hemocytes of *R. (B.) microplus* and BME2 cell lines.

Keywords: tick cell, cripreservation, *Babesia* spp.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Delineamento para o cultivo de hemócitos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus*, em meio L15 suplementado. Grupos, números de carrapato, início da coleta da hemolinfa e modo de incubação dos cultivos. **14**

**Tabela 2.** Comprimento e largura de esporocinetos de *Babesia bigemina* obtidos a partir da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas, do cultivo *in vitro* de hemócitos e da reativação após criopreservação -196°C. **29**

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Quadro resumido da literatura disponível sobre o estabelecimento de células de linhagens de carrapatos cultivados *in vitro* **8**
- Quadro 2.** Resumo dos diferentes meios de cultura utilizados para cultivo de *Babesia* spp. em células de carrapato. **10**
- Quadro 3.** Resumo dos diferentes meios de cultivo utilizados para cultivo de *Babesia* spp. a partir de células eritrocíticas com CO<sub>2</sub>. **11**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exp 2- Hemócitos de *R. (B.) microplus* livres de hemoparasitos com sete dias de cultivo *in vitro*, incubados a 28°C. Contraste de fase invertido, objetiva de 20x. **18**
- Figura 2.** Monocamada das células BME sem confluência, 3° dia de subcultivo. Contraste de fase invertido, objetiva 40x. **19**
- Figura 3.** Esporocinetos de *Babesia bigemina* em hemolinfa de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: A, B) estruturas piriformes e arredondadas observadas no 6° dia postura. Giemsa, objetiva 100x. Barra 10µm. **21**
- Figura 4.** Esporocinetos de *Babesia bigemina* cultivados *in vitro* em hemócitos de *R. (B.) microplus*. Contraste de fase invertido. Grupo A- C) 4° dia de incubação, estruturas piriformes livres (20x). D, E) 10° dia de incubação, (40x). **D)** estruturas piriformes aderidas com a extremidade apical na membrana da célula epitelíode; E) estruturas de esporocinetos arredondadas, epicelular na células fibroblastóide; Grupo B - **F)** 8° dia de incubação, estruturas de esporocinetos piriformes e arredondadas aderidos pela extremidade apical na membrana da célula epitelíode e livres. **22**
- Figura 5.** Grupo B- **G)** 22° dias de incubação, estruturas piriformes de esporocinetos de *Babesia bigemina*, aderido na célula fibroblastóides vacuolizada. Contraste de fase invertido (40x); Grupo C- **H, I, J)** 4° dia de incubação, Contraste de fase invertido (40x). **H, I)** Estruturas piriformes de esporocinetos aderidos na membrana da célula arredondadas e livres, **J)** Estruturas piriformes de esporocinetos livres. **23**
- Figura 6.** Grupo B. **K)** Estruturas piriformes de esporocinetos de *Babesia bigemina* com presença de núcleo e vacúolo, 4° dia de incubação. Giemsa (100x), **L, M)** 17° dia de incubação, colônia de estruturas arredondadas e piriformes imaturas e maduras de esporocinetos. Giemsa (100x). Barra de 10µm. **24**
- Figura 7.** Exp. 1. Células primárias embrionárias de *R. (B.) microplus*, infectadas com esporocinetos de *Babesia bigemina*, **N)** 34° dia de incubação, monocamada de Grau 4, **O)** 58° dia de incubação, estruturas arredondadas de *Babesia bigemina* aderidos na célula fibroblastóide. Contraste de fase invertido (40x); **P, Q)** 4° dia de incubação, estruturas piriformes de *Babesia bigemina* cultivados em células primárias embrionárias de *R. (B.) microplus*. Giemsa (100x). **26**
- Figura 8.** Eletroforese do produto da PCR no gel de agarose. PM: padrão de massa molecular 100pb; C-: controle negativo; Bi1: amostra de soro do bezerro positivo para *Babesia bigemina*; Bi2: amostra de esporocinetos em hemócitos *in vitro* de *R. (B.) microplus*, positivo para *B. bigemina*; BiC+: DNA controle positivo de *Babesia bigemina*, diluição de 10<sup>-3</sup>; Bo1: amostra de soro do bezerro negativo para *B. bovis*; Bo2: Amostra de esporocinetos em hemócitos *in vitro*, de *R. (B.) microplus*, negativo para *B. bovis*; BoC+ DNA controle positivo de *B. bovis*, diluição de 10<sup>-2</sup>. **27**
- Figura 9.** Exp. 2: Esporocinetos de *Babesia bigemina* reativados nas células hemócitos livres de infecção. R) 7° dia de incubação, estruturas arredondadas de esporocinetos aderidos na membrana da célula fibroblastóides vacuolizada e volumosa e estruturas piriformes livres; S) 12° dia de incubação, estrutura piriforme invaginada na célula

fibroblastóide vacuolizada e volumosa; T) 7° dia de incubação, estruturas piriformes livres. Giemsa 100x, Barra 10µm.

28

**Figura 10.** Esporocinetos de *Babesia bigemina* reativados nas células de linhagem BME: U) 2° dia de incubação, estruturas piriformes de esporocinetos próximo à célula embrionária; V) 6° dia de incubação, estruturas arredondadas epicelular e aderidos na células. Contraste de fase invertido (40x); X, Z,W) 6° dia de incubação; X,Z) estruturas em anéis de esporocinetos livres; Y) 17° dia de incubação; W,Y) estruturas arredondas de esporocinetos aderidos na células. Giemsa 100x.

31

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	3
2.2 Hemócitos de carrapatos	3
2.3 <i>Babesia bovis</i> e <i>Babesia bigemina</i>	4
2.4 Cultivo Celular	6
2.4.1 Células de carrapatos como substrato para o cultivo de patógenos	7
2.5 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Babesia</i> spp. em células de carrapato	9
2.6 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Babesia</i> spp. em eritrócitos	10
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
3.1 Local de execução do trabalho	12
3.2 Origem dos carrapatos <i>R. (B.) microplus</i> e das células de linhagem CTVM/BME2	12
3.3 Animais utilizados para obtenção e manutenção de carrapatos	12
3.4 Delineamento experimental	12
3.4.1 Experimento 1: Exame da hemolinfa de <i>R. (B.) microplus</i> e morfometria de esporocinetos de <i>Babesia bigemina</i> ; Cultivo primário de hemócitos e células embrionárias de <i>R. (B.) microplus</i> infectados naturalmente com esporocinetos de <i>Babesia bigemina</i> e a criopreservação do protozoário	13
3.4.2 Experimento 2- Reativação e cultivo de esporocinetos de <i>Babesia bigemina</i> em hemócitos <i>in vitro</i> de <i>R. (B.) microplus</i> livres de infecção; Morfometria e Contagem de <i>Babesia bigemina</i>	17
3.4.3 Experimento 3- Linhagem de células embrionárias de <i>R. (B.) microplus</i> – CTVM/BME2 (BME2)	18
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 Exame de esporocinetos na hemolinfa de <i>R.(B.) microplus</i>	21
4.2 Cultivo de esporocinetos de <i>Babesia bigemina</i> em hemócitos de <i>R. (B.) microplus</i>	21
4.3 Desenvolvimento das células primárias embrionárias do carrapato <i>R. (B.) microplus</i> cultivadas <i>in vitro</i>	25
4.4 Infecção de esporocinetos em células primárias embrionárias de <i>R. (B.) microplus</i>	25
4.5 Diagnóstico molecular de <i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i> por meio da técnica de PCR	26
4.6 Cultivo de hemócitos de <i>R. (B.) microplus</i> livres de infecção	27
4.6.1 Reativação de esporocinetos de <i>Babesia</i> spp em cultivo de hemócitos de carrapato <i>R. (B.) microplus</i> livres de infecção	27
4.6.2 Morfometria dos esporocinetos de <i>Babesia bigemina</i>	29
4.6.3 Contagem de esporocinetos de <i>Babesia bigemina</i>	29
4.7 Desenvolvimento do subcultivo de células embrionárias de linhagem BME2	29
4.7.1 Desenvolvimento dos esporocinetos de <i>Babesia bigemina</i> nas células embrionárias de linhagem BME2	29
4.8 Esporocinetos de <i>Babesia</i> spp cultivados livres de células	32
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>

**6 CONCLUSÕES..... 37**

**7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 38**

## 1 INTRODUÇÃO

As pesquisas científicas com hemoparasitos de eritrócitos de bovinos iniciaram-se no século XIX, quando Viktor Babès fez o primeiro relato da existência de um agente etiológico em eritrócitos de bovinos na Romênia. A continuidade dessa pesquisa ficou a cargo de Starcovici, que em 1893 nomeou este agente etiológico de *Babesia bovis*.

A primeira investigação de relação entre carrapatos, piroplasmas e bovinos foi realizada em 1893 por Smith e Kilborne, nos Estados Unidos da América, através de observações clínicas da doença descrita como “Texas Fever”. Estes autores identificaram parasitos piriformes unidos pelas extremidades formando pares no interior dos eritrócitos de bovinos e relataram a primeira participação de um carrapato como vetor de patógeno. Desde então os protozoários *Babesia bigemina* e *B. bovis* são identificados como responsáveis pela babesiose bovina que se caracteriza por ser uma das doenças que causam elevadas perdas econômicas na agropecuária bovina em regiões tropicais e subtropicais do mundo incluindo as Américas. A infecção pelos protozoários podem causar alta parasitemia resultando em anemia hemolítica e hemoglobinúria (YOUNG; MORZARIA, 1986; KURTTLER, 1988).

A transmissão de *B. bigemina* e *B. bovis* para bovinos é realizada pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (FRIEDHOFF; SMITH, 1981). No hospedeiro invertebrado, formas evolutivas de *B. bigemina* e *B. bovis* são encontradas após sua reprodução sexuada e assexuada, incluindo os esporocinetos que são identificados em vários órgãos e em tecidos como a hemolinfa (RIEK, 1964; FRIEDHOFF; SCHOLTYSECK, 1969; BARREIRA et al., 2005a). Os ciclos de vida das espécies economicamente importantes como *B. bovis* e *B. bigemina* tem sido intensamente investigadas (MEHLHORN; SCHEIN, 1984; YOUNG; MORZARIA, 1986).

Desde 1980 foi estabelecido um sistema contínuo de cultura a partir da monocamada de eritrócitos bovinos (Microaerophilous Stationary Phase-MASP) para propagação *in vitro* de *B. bovis*, oferecendo imunógenos a partir de merozoítas e exoantígenos derivados a partir de merozoíta (LEVY; RISTIC, 1980; SMITH et al., 1981). A obtenção de imunógenos produzidos a partir do cultivo de merozoítas de *Babesia* spp. em eritrócitos, é considerada extremamente difícil, devido a purificação dos parasitos e a presença de antígenos provenientes de componentes dos eritrócitos (RISTIC et al., 1981). O Sistema de cultura de eritrócitos é iniciado utilizando sangue fresco e cepas de *Babesia* spp. adquiridas por meio da transmissão do carrapato *R. (B.) microplus* em condições de laboratório e/ou por passagens de sangue infectado em bezerros esplenectomizados (RISTIC; JAMES, 1988).

Para os estudos sobre a biologia, fisiopatologia e controle das espécies de *Babesia* como, por exemplo, *B. bigemina*, ainda são utilizadas técnicas rudimentares que contrariam os novos anseios éticos da experimentação animal. No entanto, uma tarefa importante da parasitologia é o desenvolvimento de técnicas com potencial para refinar, reduzir ou mesmo substituir a experimentação animal. O cultivo *in vitro* de parasitas para estudo de parte ou de todo seu ciclo de vida é uma valiosa ferramenta para a substituição da experimentação animal em parasitologia (ECKERT, 1997).

Como alternativa, as células de carrapatos cultivadas *in vitro* têm fornecido um sistema de interação vetor e patógeno para estudo do ciclo de vida, substrato para produção de antígenos com baixo custo e produção de imunógenos. Além disso, torna possível a substituição de alguns experimentos científicos com animais (BHAT et al., 1979; MEHLHORN; SCHEIN, 1984; KURTTI; MUNDERLOH, 1982; MOSQUEDA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2009).



As culturas de células de carrapatos podem originar-se de ovos embrionados, órgãos como intestinos, ovário e túbulos de Malpighi e tecidos como os hemócitos. Com poucas semanas de cultivo, dependendo do sucesso de manipulação no preparo, as células formam uma monocamada propícia para receber um patógeno. Alternativamente, as células podem ser subcultivadas podendo ocorrer proliferação indefinidamente *in vitro* e poderão ser propagadas como uma linhagem de célula.

As células embrionárias são diferenciadas morfológicamente, adequadas para a propagação de agentes patogênicos e para estudos de caracterização antigênica com a finalidade de produção de imunógenos (UILENBERG, 1986). Raramente os hemócitos de carrapatos são cultivados, provavelmente devido a pequena quantidade de células disponíveis. Tentativas de cultivo de hemócitos foram realizadas a partir da hemolinfa dos carrapatos *Hyalomma asiaticum*, *Dermacentor andersoni* e *Ornithodoros lahorensis* (ŘEHÁČEK, 1963; CORY; YUNKER, 1971; SIDOROV et al., 1979). O cultivo de hemócitos é importante por causa de sua longa viabilidade e boa sensibilidade para cultivo de vírus, assim como de outros patógenos como protozoários e rickettsias parasitas (ŘEHÁČEK, 1976). Os hemócitos são referidos como imunócitos, o que é fundamental para uma resposta imune eficaz para microrganismos invasores (KUHN, 1996).

O estabelecimento de culturas *in vitro* de hemócitos e células embrionárias de carrapatos representam excelentes substratos para o cultivo e isolamento de agentes patogênicos, como *Babesia* spp. No entanto, há carência de dados na literatura sobre a utilização desta metodologia, requerendo-se mais estudos, a fim de melhorar seu entendimento e aperfeiçoar sua aplicação no meio científico.

Atualmente as inovações tecnológicas são promissoras para o estabelecimento do diagnóstico e controle de protozoários através do cultivo em sistemas *in vitro*. Desta forma, este estudo teve como objetivos cultivar esporocinetos de *B. bigemina* nos hemócitos e em células embrionárias *in vitro* do carrapato *R. (B.) microplus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

A partir de análises morfológicas e moleculares, o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, anteriormente denominado como *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), foi reclassificado como pertencente ao gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus* (MURRELL; BARKER, 2003). Sendo assim, ao longo deste estudo, optou-se pela utilização da nomenclatura *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Este carrapato pertence ao filo Artropoda, classe Arachnida, ordem Acarina e família Ixodidae. Trata-se de um ectoparasita hematófago originário da Ásia, amplamente distribuído entre os paralelos 32° N e 32° S, com alguns focos nos paralelos 35° (WHARTON, 1974; NUÑEZ et al., 1982; LEAL et al., 2003). Segundo Gomes (1998) o carrapato *R. (B.) microplus* veio para o Brasil através de bovinos adquiridos do Chile no início do século XVII e entrou no país através do Rio Grande do Sul. Os principais hospedeiros deste carrapato são os bovinos, porém outros animais podem ser parasitados, incluindo seres humanos durante a manipulação dos animais (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Em termos econômicos *R. (B.) microplus* é considerado o carrapato mais importante para a indústria bovina mundial (PRUETT et al., 2008). No Brasil, os prejuízos causados por este ixodídeo foram estimados em dois bilhões de dólares ao ano (GRISI et al., 2002). Tais prejuízos podem comprometer a produção de carne, leite e a qualidade da pele do animal e são determinados principalmente pela ingestão de sangue do hospedeiro, inoculação de toxinas e transmissão de agentes patogênicos, principalmente *Anaplasma* sp. e *Babesia* spp. (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

Este ixodídeo é tipicamente monoxeno e suas larvas infestam os hospedeiros alimentando-se por 6 a 8 dias até ocorrer a muda para ninfas, as quais atingem o estágio adulto entre 7 e 9 dias. O período total do parasitismo varia de 18 a 22 dias, podendo estender-se até 30 dias (GOMES, 1998). A fase parasitária é pouco influenciada pelas condições climáticas, enquanto a fase não parasitária depende do clima regional. *R. (B.) microplus* durante a fase parasitária ingere linfa, substratos teciduais e sangue. Em condições apropriadas, com alta umidade e temperatura em torno de 24 a 28°C, uma fêmea ingurgitada pode transformar de 50 a 60% de seu peso corporal em 2000 a 4000 ovos (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é vetor dos agentes etiológicos responsáveis pela “Tristeza Parasitária Bovina”, causada por protozoários do gênero *Babesia* e rickettsias do gênero *Anaplasma*. No Brasil, esta espécie de carrapato é endêmica na maior parte do território onde se criam bovinos. Nas áreas com altas infestações por *R. (B.) microplus*, os danos produzidos pelo carrapato levam a grandes prejuízos. Nas áreas com infestações baixas ou restrita a alguma época do ano, a importância da “Tristeza Parasitária Bovina” assume grandes proporções verificando assim, que em ambas as condições, *R. (B.) microplus* é uma fonte de prejuízo à bovinocultura (GONZALES, 1975).

### 2.2 Hemócitos de carrapatos

Os hemócitos dos carrapatos são células vacuolizadas, responsáveis por fagocitar bactérias e protozoários, servindo como células hospedeiras de uma variedade de microrganismos que se desenvolvem em carrapatos (SONENSHINE, 1991). Segundo este mesmo autor, o plasma da hemolinfa é uma solução complexa contendo além de água, numerosas proteínas, lipídeos, aminoácidos, carboidratos e vários sais inorgânicos.

A hemolinfa banha todos os órgãos e sua composição é variada, porém assim como o sangue nos animais vertebrados, a hemolinfa é dividida na porção celular, que contém os hemócitos e a porção fluida ou plasma. Além disso, podemos encontrar ainda muitos elementos não hemocíticos como fragmentos de músculos, glóbulos de gorduras, cristais livres, protozoários, bactérias, nematóides e células tumorais entre outros (ROMOSER, 1973). A hemolinfa é responsável pelo transporte de substâncias químicas solúveis, como hormônios e neurohormônios, assim como mediadores químicos do metabolismo.

Alves (1991) estudou a hemolinfa do carrapato *R. (B.) microplus*, concluindo que o pH obtido da hemolinfa, variou de 6,4 a 7,2, sendo que 95,19% das amostras mostraram um pH variando entre 6,7 e 7,0. A hemolinfa mostrou ser um líquido claro e incolor e nas amostras cujo o pH foi de 7,2 a cor observada foi rósea. O fracionamento protéico foi efetuado por meio da eletroforese em acetato celulose, revelando existir 6 a 15 frações protéicas, sendo que 79% das amostras analisadas continham 11 a 13 frações.

O maior componente da hemolinfa do carrapato é o hemócito, consistindo de 50-60% do seu conteúdo. Os hemócitos são pleomórficos e foram identificados e caracterizados de acordo com sua morfologia. Os tipos “prohemócitos” se diferenciam em outras células, são pequenas células redondas ou ovais com pouco citoplasma envolto pelo núcleo, possuem poucas mitocôndrias ou ribossomos, sem inclusão de corpos, grânulos ou vacúolos. Quando a hemolinfa é cultivada *in vitro* as células tronco, prohemócitos se proliferam formando monocamada, predominando a forma fibroblasto-like. Os “plasmatócitos” também são células pequenas, fusiformes ou irregulares com filamentos pseudópodes, que são ativos em fagocitoses, contém abundantes ribossomos livres, lipídeos e retículo endoplasmático rugoso. Os “granulócitos” são similares aos plasmatócitos, porém são caracterizados por seus numerosos corpos de inclusão, são caracterizados como tipo I e II, com presença de dois tipos de grânulos, um intensamente eletro-denso, presumivelmente rico em lipídeos insaturados e o outro denso com uma matriz de material fibrilar. Existem ainda os “esferulócitos”, que são pequenas células redondas ou ovais com grânulos grandes; os “adipohemócitos” células grandes ou pequenas, arredondadas com citoplasma repleto de gotas refringentes, nítidas ou disformes e os “oenócitos”, células grandes arredondadas (SONENSHINE 1991; CARNEIRO 1995).

Kuhn (1996) evidenciou por histologia a presença de tecido hemopoiético junto à proliferação de hemócitos. O entendimento do processo de imunização requer conhecimento da origem de proliferação e diferenciação dos hemócitos (LACKIE, 1988).

O fato da hemolinfa servir como carreador de patógenos como vírus, bactérias e protozoários, torna os hemócitos de ixodídeos e argasídeos passíveis de estudos intensivos concernentes à pesquisa destes patógenos (SONENSHINE 1991; CARNEIRO 1995; KUHN 1996). Infecção por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* pode ser diagnosticada na hemolinfa pela presença de esporocinetos (RIEK, 1964, 1966).

### **2.3 *Babesia bovis* e *Babesia bigemina***

Espécies do gênero *Babesia* são membros de um grupo de organismos denominados piroplasmas, devido a sua forma de pêra. Tendo sido descritos, cerca de 100 espécies de *Babesia* de mamíferos (SHUSTER, 2002).

Viktor Babès, no ano de 1888 fez o primeiro relato da existência de um organismo pequeno nos eritrócitos de bovinos na Romênia e denominando-o de *Haematococcus bovis*. Dando prosseguimento à pesquisa, Starcovici em 1893, renomeou este agente etiológico de *Babesia bovis* em homenagem ao pesquisador Babès. Nos Estados Unidos da América,

durante a investigação sobre a causa da febre do Texas em bovinos, a qual levou grande perda econômica, Smith e Kilborne (1893) demonstraram a presença de parasitos no sangue, o qual fazia parte do gênero *Babesia*, tendo sido denominado como *Babesia bigemina*. A partir de uma série de experimentos estes autores conseguiram comprovar a participação do carrapato *Boophilus annulatus* na transmissão do parasito e a ocorrência de transmissão transovariana no carrapato. Este foi o primeiro relato de transmissão de um parasito por carrapato. No Brasil, a presença destes protozoários foi descrita pela primeira vez por Fajardo (1901), ao examinar amostras de sangue periférico obtidas de bovinos jovens e adultos recém importados. *B. bigemina* e *B. bovis* são as únicas espécies encontradas infectando bovinos no Brasil, sendo transmitidas exclusivamente pelo carrapato *R. (B.) microplus* (VANZINI; RAMIRES,1995).

A babesiose bovina causada pelos protozoários intraeritrocíticos *B. bigemina* e *B.bovis*, caracteriza-se por ser uma doença de grande importância em regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo as Américas (MCCOSKER, 1981; KESSLER; SHENK, 1998; MOSQUEDA et al., 2004). Ambas as espécies são transmitidas transovarialmente pelo carrapato *R. (B.) microplus*. Somente as larvas transmitem *B. bovis*, enquanto as ninfas e os adultos são responsáveis pela transmissão de *B. bigemina* (HOYTE, 1961; YOUNG; MORZARIA, 1986; KESSLER; SHENK, 1998).

Mahoney et al. (1971) demonstraram que somente um carrapato infectado é necessário para transmitir *B. bigemina*. Larvas de *R. (B.) microplus* com infecção por *Babesia* spp. de 0,7% podem causar infecção em bezerros por via intravenosa (MAHONEY et al., 1974). A infecção por *B.bigemina* causa alta parasitemia resultando em anemia hemolítica e hemoglobinúria, enquanto a infecção por *B. bovis* causa uma síndrome de choque agudo (YOUNG; MORZARIA, 1986).

Koch (1906), Dennis (1932) e Riek (1964) foram os primeiros a realizar estudos referentes ao desenvolvimento de parasitos do gênero *Babesia* em carrapatos e reportaram evidências do ciclo sexual no intestino de fêmeas ingurgitadas (YOUNG; MORZARIA, 1986). Segundo Young e Morzaria (1986), inicialmente existiram muitas controvérsias em relação ao ciclo sexual do gênero *Babesia*. De uma forma geral, o ciclo evolutivo é realizado a partir da forma esporozoíta que se desenvolve na glândula salivar do carrapato. Quando o carrapato se alimenta, o parasito é transmitido e imediatamente invade os eritrócitos dos bovinos. A liberação do conteúdo das róptrias parece ser necessária para iniciar a invaginação da membrana do eritrócito e a formação de um vácúolo parasitóforo. Em seguida, a membrana da célula se apresenta aumentada e ocorre a formação de um vacúolo ovóide, que acomoda a entrada do merozoíta. Durante o processo de invaginação, o revestimento da superfície da membrana é removido. Após a invasão, o parasita é envolto por duas membranas, uma via membrana do parasito e a outra é a membrana do vacúolo parasitóforo que se origina a partir do hospedeiro e logo começa a desintegrar-se, possibilitando maior flexibilidade ao parasito. Fatores mecânicos e bioquímicos induzidos pelo parasita podem ser responsáveis por alterações na estrutura das células hospedeiras (IGARASHI et al., 1988). No interior dos eritrócitos, os esporozoítas originam os trofozoítas, que realizam a merogonia formando duas células-filhas chamadas merozoítas, as quais parasitam outras células após o rompimento dos eritrócitos parasitados, repetindo a merogonia de forma contínua, até se diferenciarem em gametócitos.

Nos carrapatos *R. (B.) microplus* alimentados em bovinos infectados os gametócitos continuam seu desenvolvimento no lúmen do intestino com a formação do zigoto, que se diferencia em oocineto. Esta estrutura penetra nas células do epitélio intestinal, sofre um processo de reprodução por fissão múltipla, diferenciando-se em esporocinetos móveis. Os

esporocinetos migram, rompem as células da parede intestinal e penetram em vários tecidos realizando sucessivas esporogonias, inclusive na glândula salivar. Durante o repasto sanguíneo, quando o carrapato se alimenta no hospedeiro vertebrado ocorre esporogonia resultando em muitos esporozoítas (MEHLHORN; SCHEIN, 1984; YOUNG; MORZARIA, 1986).

Os estágios intraeritrocíticos de *Babesia* spp. no intestino da fêmea ingurgitada permanecem no eritrócito do hospedeiro durante algumas horas, período em que a maioria destes estágios se deteriora. Alguns estágios esféricos ou ovóides sem complexo apical iniciam o desenvolvimento. Estes estágios ovóides ainda são morfológicamente idênticos aos trofozoítos intraeritrocíticos do hospedeiro mamífero. Assim gametócitos não podem ser identificados em animais domésticos. Dentro de algumas horas após o desprendimento das fêmeas ingurgitadas do carrapato, os corpos raiados desenvolvem-se, sendo alguns provavelmente, isogametas (RUDZINSKA et al., 1983; MEHLHORN; SCHEIN, 1984).

O metabolismo de *Babesia* em desenvolvimento na hemolinfa e no ovário do carrapato vetor pode ser um estágio específico, uma vez que estes estágios não são afetados por babesicidas (FRIEDHOFF; BUHR apud, 1983, Ristic 1988, p. 27).

Barreira (1988, 2001) e Barreira et al. (2005a, 2005b) estudaram formas evolutivas de *B. bovis* e *B. bigemina* em fêmeas ingurgitadas e larvas do carrapato *R. (B.) microplus*, respectivamente, verificando que o 5º e o 7º dias foram ideais para os diagnósticos de esporocinetos em ovos e hemolinfa. Observaram ainda que os esporocinetos na hemolinfa de fêmeas de *R. (B.) microplus* apresentaram formas imaturas com núcleo corado de vermelho, localizado na extremidade posterior, formas maduras com núcleo localizado na região mediana e citoplasma corado de azul-claro com pequenos vacúolos distribuídos em toda sua extensão.

Riek (1994, 1966) estabeleceu metodologia de caracterização de *B. bovis* e *B. bigemina*, através da identificação de esporocinetos presente no carrapato, principalmente na hemolinfa. Johnston (1967) foi capaz de diferenciar facilmente esporocinetos de *B. bovis* e *B. bigemina* em *R. (B.) microplus* naturalmente infectados na Austrália utilizando a morfometria e as descrições feitas por Riek (1964, 1966). Os esporocinetos de *B. bovis* possuem a extremidade apical curvada, semi-curvada ou reta (RIEK, 1966). Guglelmone et al. (1996) analisaram esporocinetos de *B. bovis* na hemolinfa de *R. (B.) microplus* e identificaram no estudo que 58% de esporocinetos mostraram a extremidade apical curvada, 24% e 18% mostraram semi-curvada e reta, respectivamente.

O tamanho dos esporocinetos de *B. bovis* e *B. bigemina* obtidos da hemolinfa de carrapatos *R. (B.) microplus* provenientes da Argentina foram claramente diferentes. Esta conclusão suporta a idéia de que um diagnóstico diferencial de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. (B.) microplus* coletadas em campo pode não ser dificultado (GUGLELMONE et al., 1996). O diagnóstico morfométrico de *B. bovis* e *B. bigemina* apresenta maior complicação devido a presença de variações intra-específicas no tamanho dos esporocinetos de diferentes origens geográficas.

## 2.4 Cultivo Celular

Os primeiros registros sobre cultivo de células foram iniciadas em 1907 por Harrison como um método para estudo do comportamento de células animais. O autor estudava variações de sistemas *in vivo*, durante a homeostase normal ou sob o estresse de um experimento (FRESHNEY, 2005). O cultivo de células a partir de explantes de tecido dominou este campo de pesquisa por mais de 50 anos e o termo “cultura de tecido” permaneceu em uso como um termo genérico. Os resultados mais relevantes no estudo sobre

o cultivo celular foram registrados na segunda metade do século XX graças a utilização de culturas de células dispersas (FISHER, 1925 apud Freshney 2005, p. 1; PARKER, 1961, apud, Freshney 2005, p. 1).

Culturas preparadas diretamente de tecidos de um organismo, com ou sem uma etapa inicial de fracionamento das células, são denominadas culturas primárias. Na maioria dos casos, células em cultura primária podem ser retiradas da placa de cultura e usadas para formar um número razoável de culturas secundárias; elas podem ser repetidamente subcultivadas desta forma, por semanas ou meses. Tais células se proliferarão indefinidamente e poderão ser propagadas como uma linhagem de célula (ALBERTS et al., 1997).

Em 1952, Weyer tentou transferir rickettsias a partir de intestino de piolhos infectados para tecidos não infectados do carrapato *Rhipicephalus bursa* cultivados *in vitro*. O meio de cultura utilizado foi constituído por plasma, baço, testículo de coelho e extrato de piolhos (YUNKER, 1987).

Řeháček (1958) transplantou para frascos tecidos de *Dermacentor marginatus* adultos, cultivando-os em vários meios de cultura e observou o crescimento de células fibroblastóides por 6 dias. A partir desta observação, foram conduzidos novos experimentos para melhorar a condição do crescimento *in vitro* de tecidos de carrapatos, o que marcou o início da cultura de células de carrapatos (YUNKER, 1987).

O primeiro estabelecimento de cultura de células embrionárias de carrapatos foi realizado por Medvedeva (1972), com a espécie *Hyalomma asiaticum* (SCHULZE; SCHLOTTKE, 1930), enquanto Pudney (1973) estabeleceu o segundo cultivo a partir de ovos de *R. (B.) microplus*. A primeira linhagem de células de carrapatos foi estabelecida por Varma (1975), a partir do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus*. Através destes cultivos de células de carrapatos, estes autores, observaram morfologias celulares fibroblastóides e epitelióides após algumas semanas de cultivo.

Rezende et al. (2009) cultivaram hemócitos de *R. (B.) microplus*, os quais foram mantidos por 26 dias em meio Leibovitz. Na observação das células-hemócitos coradas, estas apresentaram formas alongadas, fusiformes, com presença de vácuolos, algumas binucleadas, com núcleos volumosos e hipercromáticos. Řeháček (1976) enfatizou a importância do cultivo de hemócitos por causa de sua longa viabilidade e boa sensibilidade para cultivo de vírus e recomendou também o cultivo de outros patógenos como protozoários e rickettsias parasitas.

Muitos especialistas em cultivo de células de invertebrados, têm abandonado o uso de culturas primárias de tecidos devido aos laboriosos métodos e preparações. Muito interesse tem sido direcionado ao desenvolvimento de linhagens de células (ŘEHÁČEK, 1976; BELL - SAKYI, 2007) (Quadro 1).

#### **2.4.1 Células de carrapatos como substrato para o cultivo de patógenos**

Culturas *in vitro* de células de carrapato são capazes de fornecer sistema de interação vetor e patógeno, substrato para produção de diagnósticos com baixo custo, produção de vacinas, além de tornar possível a substituição de experimentos científicos com animais, que na prática requerem alto custo além de implicações éticas. Alguns fenômenos que ocorrem em cultura, como nas células epiteliais que formam extensivas lâminas como de um epitélio intacto, são acessíveis para estudar eventos que não são possíveis de serem estudados em tecidos *in vivo* (ALBERTS et al., 1997).

Interações celulares e moleculares entre patógenos e células de carrapatos *in vitro*

**Quadro 1.** Quadro resumido da literatura disponível sobre o estabelecimento de células de linhagens de carrapatos cultivados *in vitro*.

<b>Espécies de carrapatos</b>	<b>Origem do explantes</b>	<b>Meios de cultivo</b>	<b>Células de linhagem</b>	<b>Referências</b>
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Ninfas	VP12, H-LAC e Leibovitz's (L-15)	RA 243	Varma et al. (1975)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ninfa	-	ATC- 340, 308	Guru et al. (1976)
<i>Haemaphysalis obesa</i> e <i>Haemaphysalis spinigera</i>	Ninfa	-	ATC- 304, 310	Guru et al. (1976)
<i>Rhipicephalus microplus</i>	Ovos embrionados	L-15	ATC-281, 282, 309 IX, VIII633, BME26	Holman e Ronald (1980); Holman (1981); Kessler et al.*
<i>Dermacentor variabilis</i> e <i>Dermacentor Parumaperturs</i>	Ovos embrionados	L-15	RML 15; 18;19; 20	Yunker et al. (1981)
<i>Dermacentor nitens</i>	Ovos embrionados	-	ANE28	Kurtti et al. (1982)
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ovos embrionados	L-15B	RSE 25 RSE 8	Kurtti et al. (1982)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ovos embrionados Ovos embrionados	L-15 L-15/H-Lac	RML-21, -22 HAE	Yunker et al. (1984) Bell-Sakyi (1991)
<i>Hyalomma anatolicum anatolicum</i> e <i>Ixodes scapularis</i>	Ovos embrionados	L-15B	IDE8,12	Munderloh et al. (1994)

\* **Dados não publicados**

têm sido raramente examinadas. As culturas de células de carrapatos oferecem um simplificado sistema para o estudo de vetores *in vitro*, que podem ser particularmente úteis para estudos de patógenos intracelulares e epiteliais (MUNDERLOH; KURTTI, 1995). O sucesso de isolamento e propagação de alguns importantes patógenos em células de linhagens de carrapatos tem gerado um modelo vantajoso para estudo de interações entre células *in vitro* e estes agentes de doenças virais, bacterianas e também causadas por protozoários (BELL-SAKYI, 2007).

Virologistas têm utilizado células de *R. appendiculatus* para propagação e estudos de arboviroses por mais de 30 anos (VARMA et al., 1975; PUDNEY, 1987). *Ehrlichia canis* e *Anaplasma marginale* têm sido cultivados em células de linhagem de carrapatos, mas predominantemente em células de linhagem de *Ixodes scapularis* (MUNDERLOH et al., 1996; EWING et al., 1995; BLOUIN, 2002; BASTOS et al., 2009). Segundo Kocan et al. (2001) o estabelecimento e a caracterização de sistemas de cultura de células para multiplicação de *A. marginale* oferecem uma fonte de antígeno de *A. marginale* livre de células bovinas e patógenos.

Kurtti et al. (1988, 1993) e Rezende et al. (no prelo) reportaram o cultivo de *Borrelia burgdorferi* nas células embrionárias derivadas de algumas espécies de carrapatos e constataram o desenvolvimento da espiroqueta. Varela et al. (2007) isolaram *Borrelia lonestari* (cepa LS-1) em células embrionárias de *Ixodes scapularis* (ISE6). Rezende et al. (2008) identificaram espiroquetas em cultura primária de células embrionárias do carrapato *R. (B.) microplus*, infectando naturalmente estas células e, a partir do exame morfológico do microrganismo e do carrapato vetor envolvido sugeriram ser *Borrelia* spp.

Cory e Yunker (1971) cultivaram células de hemócitos do carrapato *Dermacentor andersoni* por 74 dias, com o objetivo de cultivar o vírus do gênero *Orbivirus* responsável pela Febre-Carrapato do Colorado, demonstrando que esse vírus não causou efeito citopático nos hemócitos. Rezende et al. (2010) detectaram, formas evolutivas de *Trypanosoma* sp. aderidos e iniciando a penetração nos hemócitos após 24 horas de incubação. Em uma semana de cultivo constatou-se a multiplicação por fissão binária, tendo os protozoários permanecidos viáveis por mais de 20 dias de cultivo. Rezende et al. (2010) confirmaram por reação de *nested*-PCR, infecção por *Anaplasma* sp. em hemócitos de *R. (B.) microplus* cultivados *in vitro*.

### **2.5 Cultivo *in vitro* de *Babesia* spp. em células de carrapato**

O cultivo das células de carrapatos como um sistema para estudo de *Babesia* spp. *in vitro*, promove expectativas para melhor entendimento dos aspectos biológicos e moleculares deste protozoário, além de diminuir a utilização de hospedeiros vertebrados (MOSQUEDA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2009). Diversos meios de cultura foram utilizados para o cultivo de *Babesia* spp. em células de carrapatos (Quadro 2).

Bhat et al. (1979) relataram o primeiro sucesso de crescimento *in vitro* de protozoários do gênero *Babesia*. Estes autores inocularam formas eritrocitárias de *B. bovis* em cultura de células de *R. (B.) microplus* e observaram a invasão nas células e a multiplicação dos parasitos por até 48 horas após o inóculo.

Kurtti et al. (1983) reportaram o primeiro cultivo de *B. caballi* em cultura primária a partir de ovos infectados, do carrapato *Dermacentor nitens*. Os parasitos foram detectados por três a cinco dias em microscopia de luz e após uma semana não foram mais observados no cultivo *in vitro*.



Mosqueda et al. (2003) inocularam esporocinetos de *B. bigemina*, oriundos da hemolinfa do carrapato *R. (B.) microplus*, em células primárias desta mesma espécie de carrapato. Através de Imunofluorescência indireta e utilizando anticorpos policlonais, os autores detectaram os parasitos dentro das células embrionárias após 48 horas de incubação, os quais permaneceram viáveis por até 10 dias.

Ribeiro et al. (2009) relataram o primeiro cultivo e a multiplicação de esporocinetos de *B. bigemina* em células embrionárias de linhagem do carrapato *I. scapularis*. Após 72 horas de incubação observaram os esporocinetos dentro das células em contato direto com o citoplasma e próximo ao núcleo. Após o 4º dia de incubação observaram que os parasitos aumentaram de tamanho e, que alguns apresentaram formas redondas. No 8º dia, as formas em anéis de esporocinetos foram observadas no interior das células ou livres no meio celular.

**Quadro 2.** Resumo dos diferentes meios de cultura utilizados para cultivo de *Babesia* spp. em células de carrapato.

Espécies de <i>Babesia</i>	Meio de cultivo	Tipo de soro (Concentração [%])	Referências
<i>Babesia bovis</i>	L-15	Bovino (10)	Bhat et al. (1979)
<i>Babesia bigemina</i>	L-15 (CO <sub>2</sub> )	Fetal bovino (20)	Mosqueda et al. (2003)
<i>Babesia bigemina</i>	L-15B	Fetal bovino (5)	Ribeiro et al. (2009)
<i>Babesia cabali</i>	L-15	Fetal bovino (20)	Kurt e Munderloh (1983)

### 2.6 Cultivo *in vitro* de *Babesia* spp. em eritrócitos

O desenvolvimento de métodos para o cultivo de *Babesia* spp. representa uma oportunidade significativa para estudar sua biologia. Além disso, o cultivo *in vitro* fornece uma base para o estudo da resposta imune de mamíferos a esses agentes infecciosos, com a esperança de produção de cepas atenuadas que poderiam ser utilizadas para imunizar os bovinos e talvez os seres humanos que vivem em áreas de endemicidade (SCHUSTER, 2002). A manutenção de *Babesia* spp em eritrócitos *in vitro* tem sido realizada a partir da utilização de diferentes meios de cultivo (Quadro 3).

Levy e Ristic (1980) cultivaram *B. bovis* em uma camada de eritrócitos de bovino e relataram a possibilidade do estudo da fisiologia e bioquímica deste protozoário em sistema *in vitro*. Rodriguez et al. (1983) cultivaram *B. bovis* em cultura de eritrócitos para realização de clonagem e constataram que a virulência dos organismos isolados e o subsequente crescimento de uma população homogênea podem ter aplicação no desenvolvimento de uma vacina viva contra *B. bovis*.

Existem evidências de que os esporozoítas de *Babesia* expressam antígenos específicos que induzem a proteção da resposta imunológica nos bovinos, da mesma forma que os merozoítas de *B. bovis* (HINES et al., 1995; WILKOWSKY et al., 2003; MOSQUEDA et al., 2004). Mosqueda et al. (2004) reportaram o primeiro antígeno de

esporozoíta de *B. bigemina* a partir da purificação e do cultivo em eritrócitos dos esporozoítas e análise de expressão de genes a partir do RNA total extraído, da realização de RT-PCR e imunohistoquímica, o que permitiu analisar a expressão do gene RAP-1a, o mesmo encontrado em merozoítas de *B. bovis*.

Vega et al. (1985) isolaram *B. bigemina* a partir de bovinos infectados e a cultivaram *in vitro* em uma suspensão de eritrócitos livres e meio de cultura contendo diferentes concentrações de soro fetal bovino. Após 72 horas iniciais de cultivo foram observadas formas de anéis de *B. bigemina*. Os parasitos permaneceram *in vitro* por mais de 99 dias.

Gough et al. (1998) estudaram o desenvolvimento do estágio sexual de *B. bigemina in vitro* pela adição de eritrócitos infectados no intestino de carrapatos *R. (B.) microplus* livres de *Babesia* sp. Os autores observaram por microscopia de luz e eletrônica de transmissão, duas populações de corpos raiados (gametas), uma alongada que pareceu não continuar desenvolvendo-se e outra polimórfica que iniciou a multiplicação ainda dentro do eritrócito continuando após de terem emergido.

**Quadro 3.** Resumo dos diferentes meios de cultivo utilizados para cultivo de *Babesia* spp. a partir de células eritrocíticas em atmosfera de CO<sub>2</sub>.

<b>Espécies de <i>Babesia</i> ou cepas</b>	<b>Meio de cultivo</b>	<b>Tipo de soro (Concentração [%])</b>	<b>Referências</b>
<i>Babesia bigemina</i>	199	Bovino (20 a 50%)	Vega et al. (1995)
<i>Babesia bigemina</i>	199	Bovino (40%)	Ghoug et al. (1998)
<i>Babesia bovis</i>	199	Bovino (50)	Erp et al. (1978 e 1980)
<i>Babesia bovis</i>	199	Bovino (40)	Levy; Ristic, 1980 e 1983
<i>Babesia bovis</i>	199	Fetal Bovino (40)	Rodriguez et al. (1983)
<i>Babesia caballi</i>	HL-1	Rico em lipídeos (4–6)	Zweygarth et al. (1999)
<i>Babesia divergens</i>	RPMI 1640	Humano (10)	Gorenflot et al. (1991) ; Grande et al. (1997)
<i>Babesia equi</i>	HL-1	Fetal Bovino (20)	Holman et al. (1994)
<i>Babesia gibsoni</i>	HL-1	Cão (20)	Zweygarth et al. (2000)
<i>Babesia microti</i>	RPMI 1640	Fetal Bovino (30–40)	Shikano et al. (1995)
<i>Babesia odocoilei</i>	199	Deer (20) or bovine (40)	Holman et al. (1999)
<i>Strain WA-1</i>	199	Fetal Bovino (40)	Thomford et al. (1994)

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de execução do trabalho

O trabalho experimental foi realizado no Setor de Cultivo Celular do Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). O diagnóstico molecular foi realizado no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia Animal, IV da UFRRJ. Enquanto os diagnósticos através de Citospin, foram realizados no laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

#### 3.2 Origem dos carrapatos *R. (B.) microplus* e das células de linhagem CTVM/BME2

Os carrapatos utilizados no preparado dos cultivos primários pertenciam a terceira geração de uma colônia de *R. (B.) microplus*, mantidos em bovinos livres de hemoparasitos, estabelecidos em baias do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), localizados no anexo do prédio do Projeto Sanidade Animal (PSA). Os ovos do 2º dia de postura das fêmeas de *R. (B.) microplus* foram pesados em balança analítica (Shimadzu AY 220<sup>®</sup>). Um total de 40mg para a infestação em coelhos e 250mg para infestação no bovino, foram acondicionadas em seringas descartáveis adaptadas, vedadas com algodão hidrófilo e foram incubadas na estufa para Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) à temperatura de 27±1°C e umidade relativa do ar de 80±5%. Após eclosão das larvas com 17 dias de incubação, foram preparadas para infestação nos animais.

As células de linhagem CTVM/BME2 derivaram de ovos embrionados do carrapato *R. (B.) microplus* (Bell Sakyi, 2003 – comunicação pessoal), e foram procedentes do “The Roslin Institute and Royal (Dick) School of Veterinary Studies, BIOBANK” University of Edinburgh – <http://tickcells.roslin.ac.uk/>. Esta linhagem foi oficialmente introduzida no Brasil por doação da Dra. Lesley Bell Sakyi e devidamente registrada no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

#### 3.3 Animais utilizados para obtenção e manutenção de carrapatos

Para realização dos experimentos foi utilizado um bezerro macho mestiço (Holandês x Zebu) com um mês de idade, proveniente da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (Pesagro-Rio). Quatro coelhos *Oryctolagus cuniculus* mestiços (Nova Zelândia x Califórnia), cedidos pelo Setor de Cunicultura, Instituto de Zootecnia (IZ) da UFRRJ. Todos os procedimentos realizados com os animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Bioética em Pesquisa Animal da UFRRJ sob protocolo de nº 146/2011.

#### 3.4 Delineamento experimental

1- Exame de hemolinfa do carrapato *R. (B.) microplus* por gota espessa e morfometria para identificar as formas evolutivas de *Babesia* spp. que sabidamente parasitam a hemolinfa do carrapato;

2- Cultivo primário de hemócitos e células embrionárias do carrapato *R. (B.) microplus* infectados naturalmente com esporocinetos de *Babesia bigemina*; Exames por Citospin e gota espessa; Criopreservação de esporocinetos de *B. bigemina* a partir do cultivo de hemócitos infectados naturalmente com o protozoário; Reação da cadeia de Polimerase (PCR) para caracterização e confirmação da espécie;

3- Reativação e cultivo de esporocinetos de *Babesia bigemina* em hemócitos de *R. (B.) microplus* recuperados de coelhos; Avaliação morfofométrica e contagem/frequência de esporocinetos de *B. bigemina* recuperados dos cultivos de hemócitos;

4- Reativação de esporocinetos criopreservados de *Babesia bigemina* nas células de linhagem CTVM/BME2.

O desenvolvimento das células cultivadas *in vitro* foi classificado segundo (YUNKER, 1987): Grau 1- Poucas células aderidas; Grau 2- Células adequadas sem confluência; Grau 3- Células confluentes sem agrupamentos e Grau 4- Células confluentes com agrupamento.

### **3.4.1 Experimento 1: Exame da hemolinfa de *R. (B.) microplus* e morfometria de esporocinetos de *Babesia bigemina*; Cultivo primário de hemócitos e células embrionárias de *R. (B.) microplus* infectados naturalmente com esporocinetos de *Babesia bigemina* e a criopreservação do protozoário**

Após sete dias de nascimento, o bezerro alimentado com colostro e parasitado naturalmente por carrapatos *R. (B.) microplus* infectados naturalmente por esporocinetos de *Babesia* spp. confirmado através do exame da hemolinfa. O animal foi mantido em uma baia individual do LDP, inicialmente foi alimentado com leite, oferecidos diariamente até um mês de idade, quando passou a ser alimentado com ração comercial peletizada, feno Coast Cross e água *ad libitum*. Diariamente foi realizada a limpeza da baia para remoção de sobras de ração, fezes e urina.

Para a infestação de larvas no bovino, foram utilizadas aproximadamente 5000 larvas, provenientes de 250mg de ovos, com 20 dias de eclodidas, foram distribuídas ao longo da linha do dorso-lombar do animal. Após 21 dias iniciou-se a queda natural das fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* e foi realizado o exame da hemolinfa de 5 fêmeas, através de gota espessa e coloração por Giemsa. Após identificou-se a presença da infecção de hemolinfa das fêmeas ingurgitadas com esporocinetos, a morfologia evidenciada por Giemsa sem cauda inclinada segundo Riek (1966) e a morfometria com auxílio de um microscópio (Olympus®), objetiva de imersão 100x e ocular micrométrica Ernst Leitz de ocular 10x, sugeriu ser *Babesia bigemina*.

As teleóginas foram submetidas a uma desinfecção superficial segundo Yunker (1987), com algumas modificações. As teleóginas foram inicialmente lavadas com álcool a 70%, hipoclorito de sódio a 1% e novamente com álcool a 70%. Em seguida, foram lavadas com água destilada esterilizada contendo anfotericina B, secas com gaze esterilizada, acondicionadas em placas de Petri estéreis e incubadas em estufa tipo BOD, à temperatura de  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $80\pm 5\%$  para realização de postura.

A partir do sexto dia de postura foram realizados exames de hemolinfa das fêmeas de *R. (B.) microplus* oriundas do bezerro, para confirmação da infecção natural.

**Meio de cultivo utilizado no experimento** - Foi utilizado o meio Leibovitz's L15 (Sigma®), suplementado com 10% de caldo triptose fosfato (CTF), 40% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico Gentamicina (50mg/mL). O meio suplementado, com pH 7,0 foi estocado à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Coleta de hemolinfa para o cultivo *in vitro***- As fêmeas de *R. (B.) microplus* foram imersas em álcool 70% e secas com gaze estéril. A extração de hemolinfa foi realizada a partir de secção dos primeiros pares de patas com auxílio de uma tesoura oftálmica ou através de perfuração superficial na região dorsal com auxílio de agulha de insulina, segundo Ângelo et al. (2010). Para a coleta da hemolinfa foi utilizada uma micropipeta de 100µl contendo meio

L15 suplementado. A hemolinfa coletada foi pipetada em um tubo falcon de 15mL contendo 2mL de meio L15 suplementado.

Conforme a disponibilidade dos carrapatos foram formados os grupos A, B e C (Tabela 1). Após o término da coleta da hemolinfa, as células naturalmente infectadas com esporocinetos de *Babesia* spp. foram transferidas para frascos de cultivo de 25cm<sup>2</sup> com 4 mL de meio e/ou tubos de cultivo 10cm<sup>2</sup> (TPP®) com 2 mL de meio L15 suplementado. As tampas dos recipientes foram hermeticamente fechadas e incubadas em estufa do tipo BOD à temperatura de 28°C, como demonstrado na Tabela 1.

Para a manutenção do cultivo de hemócitos com esporocinetos de *Babesia* spp. foram realizadas trocas semanais de 50% do meio L15. E exames da cultura foram realizados para observação do protozoário do 4º ao 25º dia de incubação: Citospin – Inicialmente 500µl das amostras de cultivo de hemócitos de *R. (B.) microplus* infectados naturalmente com esporocinetos de *B. bigemina* foram centrifugadas a 76x g por 5 minutos em uma centrifuga de mesa. Em seguida foram descartados 300µl do sobrenadante e o restante da suspensão celular foi adicionado nas lâminas de citocentrifuga (Fanem®), as quais foram centrifugadas a 70x g por 50 segundos; Gota Espessa – 1mL do sobrenadante das amostras do cultivo em suspensão foi centrifugado a 76x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e 20µl da suspensão celular das amostras foram colocados sobre uma lâmina de microscopia.

Após secas, as amostras provenientes de citospin e da gota espessa foram fixadas em metanol por 10 minutos, coradas no Giemsa por 35 minutos e examinadas em microscópio de luz em óleo de imersão à 100x. As estruturas foram fotografadas em câmara digital (Sony®).

**Microscopia de contraste de fase invertido** – Os cultivos de hemócitos infectados com esporocinetos de *B. bigemina* foram observados no microscópio de contraste de fase invertido (Boeco®), objetiva de 20x e 40x. Os cultivos foram fotografados, os esporocinetos móveis filmados através de câmara digital (Sony®) e as imagens capturadas no computador através do software Image Driving na dimensão 1024x768.

**Tabela 1.** Delineamento para o cultivo de hemócitos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus*, em meio L15 suplementado. Grupos, números de carrapato, início da coleta da hemolinfa e modo de incubação dos cultivos.

Grupos	N	Coleta de hemolinfa (dias*)	Modo de incubação
A	40	8º	2 frascos de 25cm <sup>2</sup> , Temperatura à 28°C
B	12	11º	2 frascos de 25cm <sup>2</sup> Temperatura à 28°C
C	20	13º	1 tubo 10cm <sup>2</sup> Temperatura à 28°C

N= nº de fêmeas de *R. (B.) microplus*;

\*Equivalente ao período de postura das fêmeas de *R. (B.) microplus*

Após o 6º dia de postura foi realizado exame dos ovos das fêmeas de *R. (B.) microplus*, para verificar a presença de esporocinetos de *Babesia* spp. Os ovos foram macerados sobre lâminas de microscopia com auxílio de um êmbolo de seringa de vidro e após a secagem, as lâminas foram fixadas em metanol por 3 minutos, coradas giemsa por 40

minutos e levadas ao microscópio de luz para observação de formas de esporocinetos em aumento de 100x.

Em uma capela de fluxo laminar, os ovos embrionados provenientes do 13º dia de postura de 20 fêmeas foram removidos para um béquer e submetidos a uma esterilização superficial. Os ovos foram lavados duas vezes com acetona e oito vezes com água destilada esterilizada. Em seguida foram adicionados 2mL de meio de cultura no béquer e com auxílio de um êmbolo de seringa hipodérmica de vidro, com capacidade de 20 mL, os ovos foram macerados. Posteriormente, o material em suspensão foi separado por processo de filtração com a utilização de um filtro de vidro, com porosidade 1. Após a filtração, o material foi centrifugado a 76x g por oito minutos em uma centrífuga de mesa (Fanem<sup>®</sup>). O pellet foi ressuspensão com 16mL de meio de cultura L15 suplementado e distribuído em volumes de 4mL em cada frascos, totalizando em 4 frascos de 25 cm<sup>2</sup> (TPP<sup>®</sup>). Os frascos foram incubados em estufa tipo BOD à temperatura de 28°C.

Para a manutenção das células embrionárias foi realizada troca semanal de aproximadamente 50% do meio L15. A criopreservação das células primárias embrionárias infectadas com esporocinetos foi realizada para posteriores exames por gota espessa. Após a formação da monocamada no 30º dia de incubação das células primárias embrionárias de *R. (B.) microplus* realizou-se o primeiro subcultivo das células. Os frascos de 25cm<sup>2</sup> contendo meio L15 foram acondicionados por três dias em estufa tipo BOD à temperatura de 28°C, para melhor aderência das células.

Subcultivo por tripsinização- as células embrionárias de *R. (B.) microplus* apresentaram uma monocamada de células de Grau 4 e, dois frascos foram tripsinizados, com a retirada de todo meio L15 e adição de 3mL de tripsina 0,25%(Sigma<sup>®</sup>). Os frascos foram incubados em estufa a temperatura de 37°C por 15 minutos. Em seguida 4mL da suspensão de células de cada frasco foram transferidos para dois tubos falcon com capacidade de 15mL e centrifugados a 73x g por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de cada tubo falcon ressuspensão com 8mL de meio L15. O material desta suspensão foi transferido para os frascos de 25cm<sup>2</sup>, resultando em quatro novos frascos, incubados na BOD à temperatura de 28°C.

Foi realizado o 2º subcultivo das células primárias embrionárias, após 62 dias após o 1º subcultivo, quando as células formaram uma monocamada de grau 4. As células de dois frascos de 25cm<sup>2</sup> foram tripsinizadas, com a retirada de todo meio L15 e adição de 3mL de tripsina 0,25% (Sigma<sup>®</sup>). Os frascos foram incubados em estufa à temperatura de 37°C por 15 minutos. Em seguida 4mL da suspensão de células de cada frasco foram transferidos para dois tubos falcon com capacidade de 15mL e centrifugados a 1000rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de cada tubo falcon ressuspensão com 8mL de meio L15. O material desta suspensão foi transferido para os frascos de 25cm<sup>2</sup>, resultando em 4 novos frascos, incubados na BOD à temperatura de 28°C. As amostras congeladas no nitrogênio ou estocadas à 4°C por uma semana foram direcionadas para realização de citospin e da gota espessa como descrito acima.

#### **Criopreservação de esporocinetos de *Babesia* spp.**

Para a criopreservação de esporocinetos cultivados foi utilizado o Dimetilsulfóxido-DMSO (Sigma<sup>®</sup>), diluído a 20% em água MiliQ. Foram utilizados na criopreservação 2,5mL do sobrenadante dos cultivos de hemócitos com esporocinetos e amostras de hemócitos descoladas dos frascos com scraper (TPP<sup>®</sup>). Este material foi transferido para tubos falcon de 15mL e centrifugado a 76x g por 5 minutos em uma centrífuga de mesa (Fanem<sup>®</sup>). Em seguida, o pellet de cada cultivo foi ressuspensão em 1200µl de meio L15, e adicionado 800µl de DMSO, após foram distribuído em alíquotas de 2mL para tubos criogênicos (IMEC<sup>®</sup>). As

amostras foram congeladas gradativamente com o vapor do nitrogênio líquido diretamente em um canister previamente refrigerado, em seguida, foram imersas no nitrogênio à temperatura de -196°C, segundo Munderloh et al. (1994) e Bastos et al. (2006) com modificações. Uma amostra do Grupo B foi mantida à temperatura de -20°C, sem a adição de DMSO, para realização do diagnóstico por Reação da Cadeia de Polimerase (PCR).

A criopreservação das amostras de todos os grupos foi realizada no 15º dia de incubação, com exceção do Grupo B, onde um frasco foi congelado no segundo dia e outro no 25º dia de incubação.

#### **Diagnóstico Molecular para *B. bigemina* e *B. bovis*, por meio da técnica de PCR**

A extração de DNA foi realizada das amostras congeladas do 2º dia de cultivo de esporocinetos com hemócitos e do soro do bezerro. Primeiramente as células foram centrifugadas a 73x g por 4 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas com 200µl de PBS e submetidas à extração de DNA segundo protocolo do kit QIAGEN® (DNeasy Blood & Tissue kit). Uma alíquota de 3 mL do soro descongelado foi centrifugada a 73x g por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado parcialmente, permanecendo 200µl da amostra e o pellet foi ressuspenso com 200µl de PBS, totalizando 400µl do volume final. Uma exceção ao protocolo do kit QIAGEN foi feita para ambas extrações de DNA, na etapa de eluição com 200µl da solução AE, que foi repetida por 3 vezes deixando na temperatura ambiente por 2 minutos até o passo de cada centrifugação.

Os controles positivos de *B. bigemina* e *B. bovis*, foram produzidos por inoculação de bovinos e foram gentilmente cedidos pelo Dr. Mucio Flávio Barbosa Ribeiro da UFMG.

PCR para *B. bigemina* e *B. bovis*: a PCR foi realizada segundo metodologia de Linhares et al. (2002) modificada por Corrêa (2011). Os dois pares de iniciadores selecionados foram desenhados para identificar o gene 18SrRNA de *B. bigemina* (GenBank n°X59604) e *B. bovis* (GenBank n° U06105) e possuem as seqüências abaixo.

*Babesia bigemina*:

GAU7 forward 5'- GTTGGGTCTTTTCGCTGGC-3' (18SrRNA posição 848 a 866)

GAU6 reverse 5'- CCACGCTTGAAGCACAGGA-3' (18SrRNA posição 1532 a 1515)

*Babesia bovis*:

GAU9 forward 5'- CTGTCGTACCGTTGGTTGAC-3' (18SrRNA posição 675 a 694)

GAU10 reverse 5'-CGCACGGACGGAGACCGA-3' (18SrRNA posição 1215 A 1198)

No mix da reação de PCR para estes agentes foram utilizadas as concentrações de 0,2µM de iniciadores (Invitrogen®), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,25U de Taq DNA Polimerase (Platinum®), 10mM de tampão Tris-HCL, 0,2 mM de dNTPs (Ludwig biotec®) e 2µl de DNA em um mix com 25µl de volume final.

As reações foram processadas em termociclador (Biometra Thermocycler Gradiente®) sob as seguintes condições:

*Babesia bigemina*: 94°C/5min para desnaturação inicial; 40 ciclos de desnaturação a 94°C/30seg, anelamento á temperatura 58°C por 30seg e extensão a 72°C/30seg e extensão final a 72°C/5min.

*Babesia bovis*: 94°C/5min para desnaturação inicial; 40 ciclos de desnaturação a 94°C/30seg, anelamento á temperatura 56°C por 30seg e extensão a 72°C/1min e extensão final a 72°C/5min.

Nas reações da PCR, foram utilizados um controle positivo e um negativo (mix puro). Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, com padrão de massa molecular Ladder 100pb (Invitrogen®). Em seguida foram corados com brometo de etídio (0,4µg/mL; Invitrogen®) e visualizados sob transluminador UV (BioRad).

### **3.4.2 Experimento 2- Reativação e cultivo de esporocinetos de *Babesia bigemina* em hemócitos *in vitro* de *R. (B.) microplus* livres de infecção; Morfometria e Contagem de *Babesia bigemina***

Para este experimento foram utilizados coelhos para infestação das larvas de *R. (B.) microplus*, livres de *Babesia* spp. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério do LDP, onde receberam ração comercial e água *ad libitum*. Antes da infestação experimental dos coelhos, os pêlos de uma parte da região dorsal foram tricomizados para a fixação de dispositivos de tecido de algodão, com auxílio de pasta una, confeccionada no LDP.

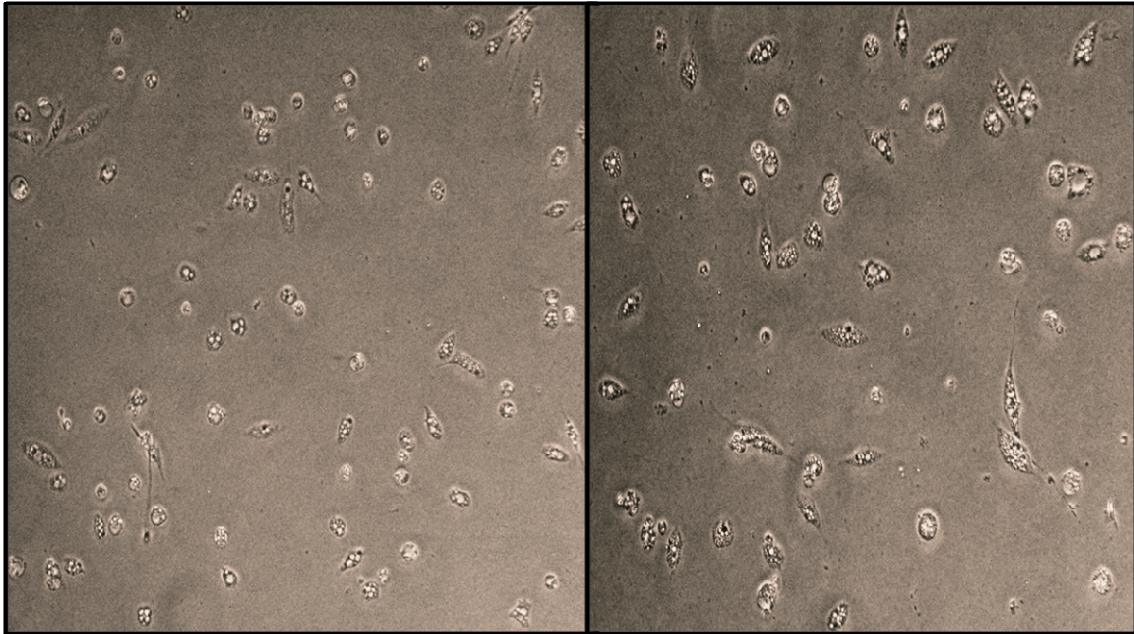
Cada coelho foi infestado com aproximadamente 800 larvas de *R. (B.) microplus* com 20 dias de eclosão, provenientes de 40mg de ovos. Vinte e quatro dias após a infestação, os dispositivos foram abertos diariamente para recuperação das fêmeas ingurgitadas. Após 24 dias da infestação iniciou-se a queda natural das fêmeas de *R. (B.) microplus*. Foi realizado exame da hemolinfa como descrito anteriormente e não identificou presença de formas evolutivas de *Babesia* spp.

Coleta da hemolinfa para cultivo *in vitro* - A coleta da hemolinfa de 20 fêmeas de *R. (B.) microplus*, foram realizadas no mesmo dia da recuperação nos coelhos. A metodologia foi a mesma utilizada no experimento 1. Após a coleta de hemolinfa as células foram transferidas para dois tubos de cultivo de 10cm<sup>2</sup> (TPP®) com tampas hermeticamente fechadas e incubados em 2mL de meio L15 em estufa do tipo BOD à temperatura de 28°C. Para manutenção das células foram realizadas trocas semanais de 50% do meio L15.

**Reativação de esporocinetos criopreservados:** amostras de esporocinetos de *Babesia Bigemina* provenientes do experimento 1 e criopreservadas por dois meses, em nitrogênio líquido à -196°C foram descongelados à 37°C em banho-maria. Em uma capela de fluxo laminar, as amostras foram transferidas para tubos falcon de 15mL, contendo 4mL de meio L15 suplementado com 40% de SFB e centrifugadas a 76x g por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo de 10cm<sup>2</sup> e o pellet ressuspenso com 2 mL de meio L15 em um tubo de 10cm<sup>2</sup>, ambos incubados a temperatura de 28°C para observação da viabilidade dos esporocinetos para o inoculo nos hemócitos livres. Após 24 horas da reativação, os esporocinetos de *Babesia bigemina* móveis foram inoculados no cultivo de hemócitos *in vitro* com sete dias de incubação (Figura 1).

Para a realização do inóculo foi retirado 1mL do meio L15 do cultivo de hemócitos de um tubo de 10cm<sup>2</sup> e adicionado 2mL do cultivo de esporocinetos de *Babesia* spp. Como tubos controle foram mantidos a cultura de hemócitos livres de esporocinetos e a cultura de esporocinetos de *Babesia bigemina* livre de células. Os cultivos foram incubados na BOD à temperatura de 28°C. Exames microscópicos foram realizados diariamente, além da confecção da gota espessa das amostras a fresco do 2° ao 21° dia de cultivo.





**Figura 1.** Exp 2- Hemócitos de *R. (B.) microplus* livres de hemoparasitos com sete dias de cultivo *in vitro*, incubados a 28°C. Contraste de fase invertido, objetiva de 20x.

#### **Avaliação Morfométrica de esporocinetos de *Babesia bigemina* a partir de hemolinfa de fêmeas de *R. (B.) microplus* e do cultivo *in vitro* em hemócitos**

A mensuração dos esporocinetos foi realizada a partir da preparação da gota espessa das amostras: 1) hemolinfa de cinco fêmeas de *R. (B.) microplus*, 2) cultivo de hemócitos no quarto dia de incubação e 3) cultivo de hemócitos reativados do nitrogênio líquido. Foram realizadas as mensurações de comprimento e largura de 50 esporocinetos de cada amostra para confirmação de semelhança da morfologia dos esporocinetos e da espécie. Foi realizada em microscópio (Olympus®), objetiva de imersão 100x e ocular micrométrica Ernst Leitz de ocular 10x.

Foram calculadas as médias, valores mínimos e máximos a partir das mensurações; os dados foram considerados normais, a partir do teste de Kolmogorov Smirnov (K-S teste); as médias foram comparadas a partir do teste de Tukey a nível de 5% de significância;

#### **Contagem de esporocinetos de *Babesia* spp. cultivados em hemócitos e os esporocinetos criopreservados e reativados**

A metodologia de contagem foi realizada para comparação de esporocinetos inicialmente cultivados com hemócitos e aqueles esporocinetos criopreservados e reativados nos hemócitos livres de infecção. Para contagem dos esporocinetos de *Babesia* spp. foi realizada gota espessa a partir de 20µl das amostras retirada diretamente dos cultivos, sendo preparada uma lâmina de cada amostra com 3 gotas espessas. Após, as lâminas foram secas, fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com Giemsa, por 35 minutos. Na objetiva de imersão 100x, foi feita contagem total de esporocinetos em cada gota espessa.

#### **3.4.3 Experimento 3- Linhagem de células embrionárias de *R. (B.) microplus* – CTVM/BME2 (BME2)**

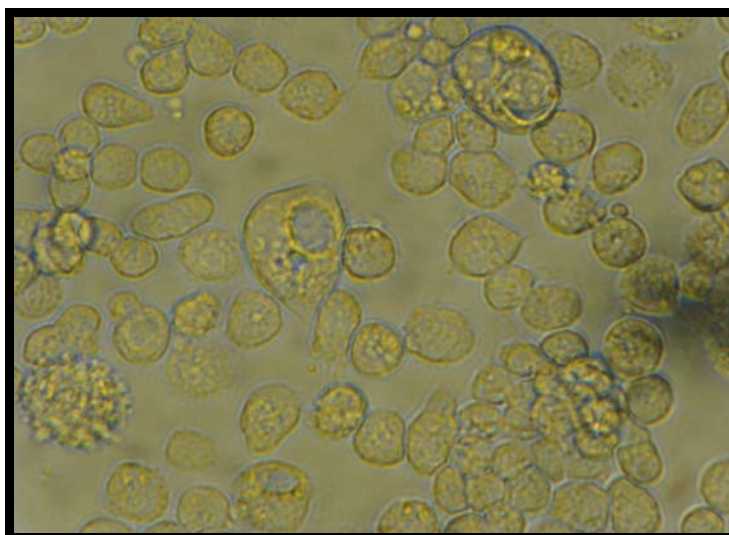
No Setor de Cultivo Celular do laboratório de Doenças Parasitárias, as células BME são mantidas em frascos de 25cm<sup>2</sup> (TPP®) e em tubos Flat 5,5cm<sup>2</sup> (Nunc®) contendo meio

Leibovitz's (L-15), suplementado com 10% de caldo triptose fosfato (CTF), 20% de soro fetal bovino (SFB), antibiótico penicilina/estreptomicina 100units/mL, pH 6.8 e incubadas à temperatura de 28 °C.

Para o experimento foi realizado o subcultivo das células BME2, após formação da monocamada de células (Grau 3). Em seguida, 1mL das células foi transferido para dois tubos de 10cm<sup>2</sup> e incubadas à 28°C. Um volume de 500µl da suspensão celular foi centrifugado por 1 minuto à 73x g e as células ressuspensas em 200µl de PBS. Para realização da contagem das células foi preparado uma solução de Azul de Trypan na concentração de 1:10. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio de contraste de fase invertido, em aumento de 40x. As trocas de 50% do meio L-15 das células BME2 foram realizadas semanalmente.

**Reativação de esporocinetos de *Babesia* spp. nas células BME2:** Amostras de esporocinetos de *Babesia* spp. criopreservados à -196°C no 2° dia de incubação foram descongelados a 37°C em banho-maria após cinco meses. Em seguida foram transferidas para tubo falcon de 15mL, contendo 4mL de meio L15, suplementado com 40% de SFB e centrifugados a 73x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubo de 10cm<sup>2</sup> (TPP<sup>®</sup>), o pellet ressuspenso com 2 mL de meio L-15 e transferido para tubo de 10cm<sup>2</sup>, ambos incubados à temperatura de 28°C.

No 4° dia de incubação e com motilidade, os esporocinetos de *B. bigemina* reativados foram inoculados nas células BME2 do 3° dia de subcultivo com uma camada de células de Grau 2 (Figura 2). Os cultivos, BME2 infectados com esporocinetos (BME2-I) e BME2 livre de esporocinetos (BME2-C) foram incubadas a 28°C mantidos em meio L15 suplementado com 40% de SFB. Foram realizadas observações em microscópio de contraste de fase invertido (Boeco<sup>®</sup>) em aumento de 20x e 40x. Os cultivos foram fotografados e os esporocinetos móveis foram filmados em câmara digital (Sony) e através de imagens capturadas no computador através do Software Image Driving na dimensão 1024x 768.



**Figura 2.** - Monocamada das células BME2 sem confluência, 3° dia de subcultivo. Contraste de fase invertido, objetiva 40x.

O 1° subcultivo das células BME2-I e BME2-C foi realizado após 24 dias de incubação, com uma monocamada de células de grau 4. Após a troca de 50% do meio L-15, as células BME foram descoladas com auxílio do scraper (TPP<sup>®</sup>), sendo transferidos 0,5mL da suspensão celular para dois tubos de 10cm<sup>2</sup> (TPP<sup>®</sup>), incubados a temperatura de 28°C. Um

volume de 500µl da suspensão celular foi centrifugado por 1 minuto à 73x g e as células ressuspensas em 200µl de PBS. Para realização da contagem das células foi preparado um solução de Azul de Trypan na concentração de 1:10. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio de contraste de fase invertido, em aumento de 40x. As trocas de 50% do meio L-15 das células BME2 foram realizadas semanalmente.

O 2º subcultivo das células BME2-I e BME2-C foi realizado após 18 dias de incubação, com uma monocamada de células de grau 3. Após a troca de 50% do meio L-15, as células BME foram descoladas com auxílio do scraper (TPP®). Um volume de 500µl da suspensão celular foi centrifugado por 1 minuto à 73x g e as células ressuspensas em 200µl de PBS. Para realização da contagem das células foi preparado um solução de Azul de Trypan na concentração de 1:10. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio de contraste de fase invertido, em aumento de 40x. Nesta fase o cultivo de BME2-I e BME2-C foi terminado.

Foi realizado o citospin e a gota espessa das amostras de cultivo de células BME2-I e BME2-C, a partir do 6º ao 20º dia, as amostras foram estocadas à temperatura de 4°C.

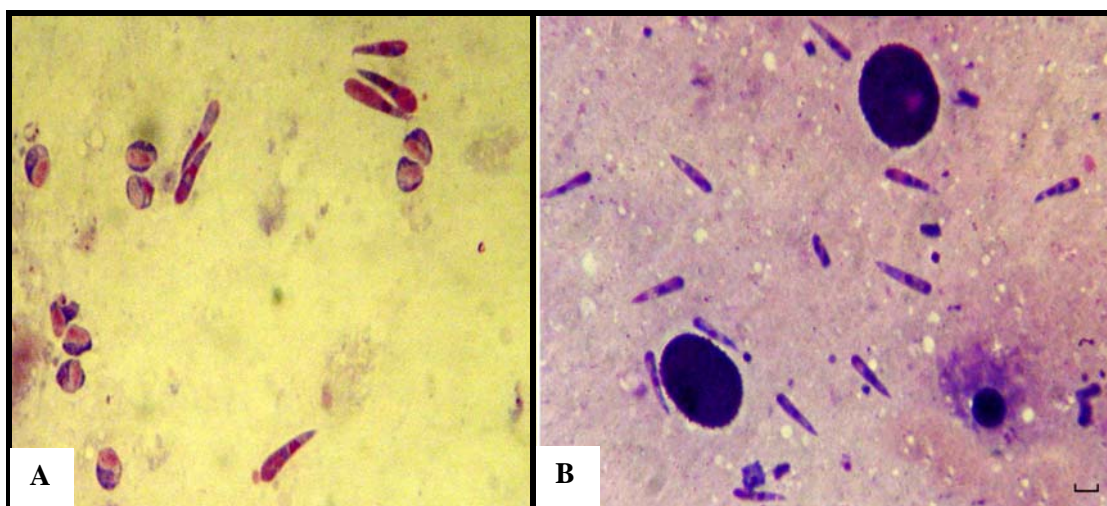
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Exame de esporocinetos na hemolinfa de *R. (B.) microplus*

Foram identificados esporocinetos de *B. bigemina*, com morfologia piriforme, em lâminas confeccionadas de gotas da hemolinfa de fêmeas a partir do 6° dia de postura (Figura 3).

Formas de esporocinetos imaturos de *Babesia bigemina*: além da morfologia piriforme, os esporocinetos apresentaram formas imaturas, com núcleo corado de vermelho escuro, localizado na extremidade posterior, citoplasma todo corado de azul claro incluindo o complexo apical com pequenos vacúolos, e pontos de cromatina corados de vermelho claro observados na região anterior.

Formas de esporocinetos maduros de *Babesia bigemina*: As formas maduras apresentaram núcleo corado de vermelho escuro localizado na região mediana, complexo apical corado fortemente de vermelho claro e citoplasma corado de azul-claro com pequenos vacúolos em toda sua extensão.



**Figura 3.** Esporocinetos de *Babesia bigemina* em hemolinfa de *Rhipicephalus microplus*: **A,** **B)** estruturas piriformes e arredondadas observadas no 6° dia postura. Giemsa, objetiva 100x. Barra 10µm.

### 4.2 Cultivo de esporocinetos de *Babesia bigemina* em hemócitos de *R. (B.) microplus*

De acordo com o período de postura das fêmeas de *R. (B.) microplus*, foi coletado a hemolinfa para cultivo *in vitro* de hemócitos infectados com esporocinetos de *Babesia bigemina*, seguindo os grupos de cultivo: Grupos A- 8dias, B-11dias, C-13dias.

Observou-se o desenvolvimento do esporocinetos de *B. bigemina* em microscópio de contraste de fase invertido, a partir do primeiro dia do cultivo. De uma forma geral, desde o início do cultivo, os esporocinetos de *Babesia bigemina*, nos Grupos A, B e C demonstraram o mesmo comportamento. Os protozoários apresentaram boa motilidade e capacidade de aderência do complexo apical nas células (Figuras 4 e 5). Desta aderência foram formados próximo da membrana celular vacúolos citoplasmáticos e no citoplasma das células observou-se formas redondas, móveis e com núcleo visível.

Nas amostras coradas do 3° e 17° dias do cultivo de esporocinetos de *Babesia bigemina* em hemócitos foram observadas formas íntegras piriformes de esporocinetos (Figura 6), imaturos e maduros, com núcleo corado de vermelho escuro, as vezes, centralizado



ou próximo do complexo apical. Na região anterior do esporocineto a cromatina ficou corada de vermelho escuro e na região central foi verificada a presença de vácuolos. Nas amostras do 17º dia de cultivo foram observados muitas formas redondas e ovais pequenas, supostamente esporocinetos imaturos, com núcleo corado de vermelho escuro.

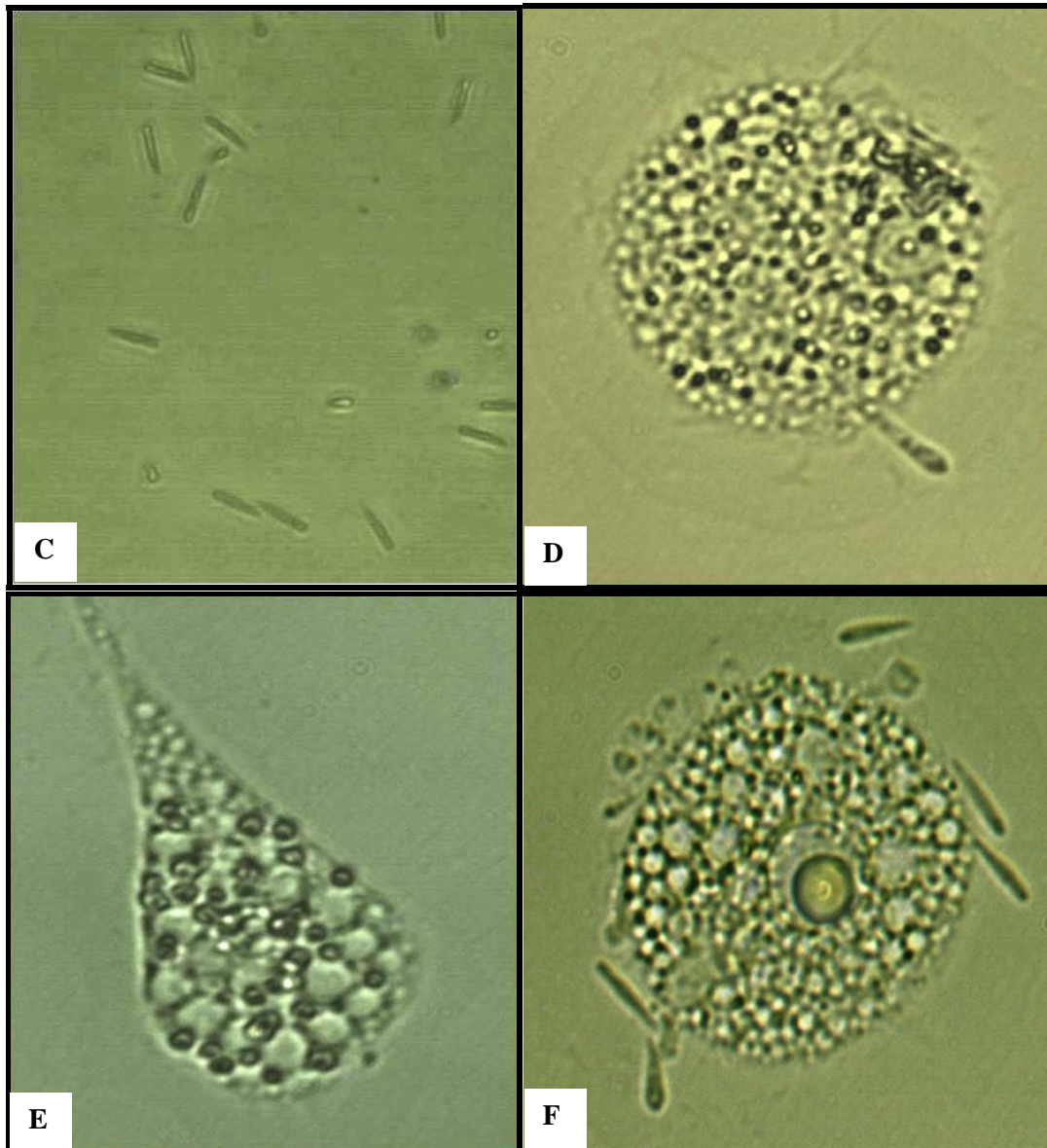
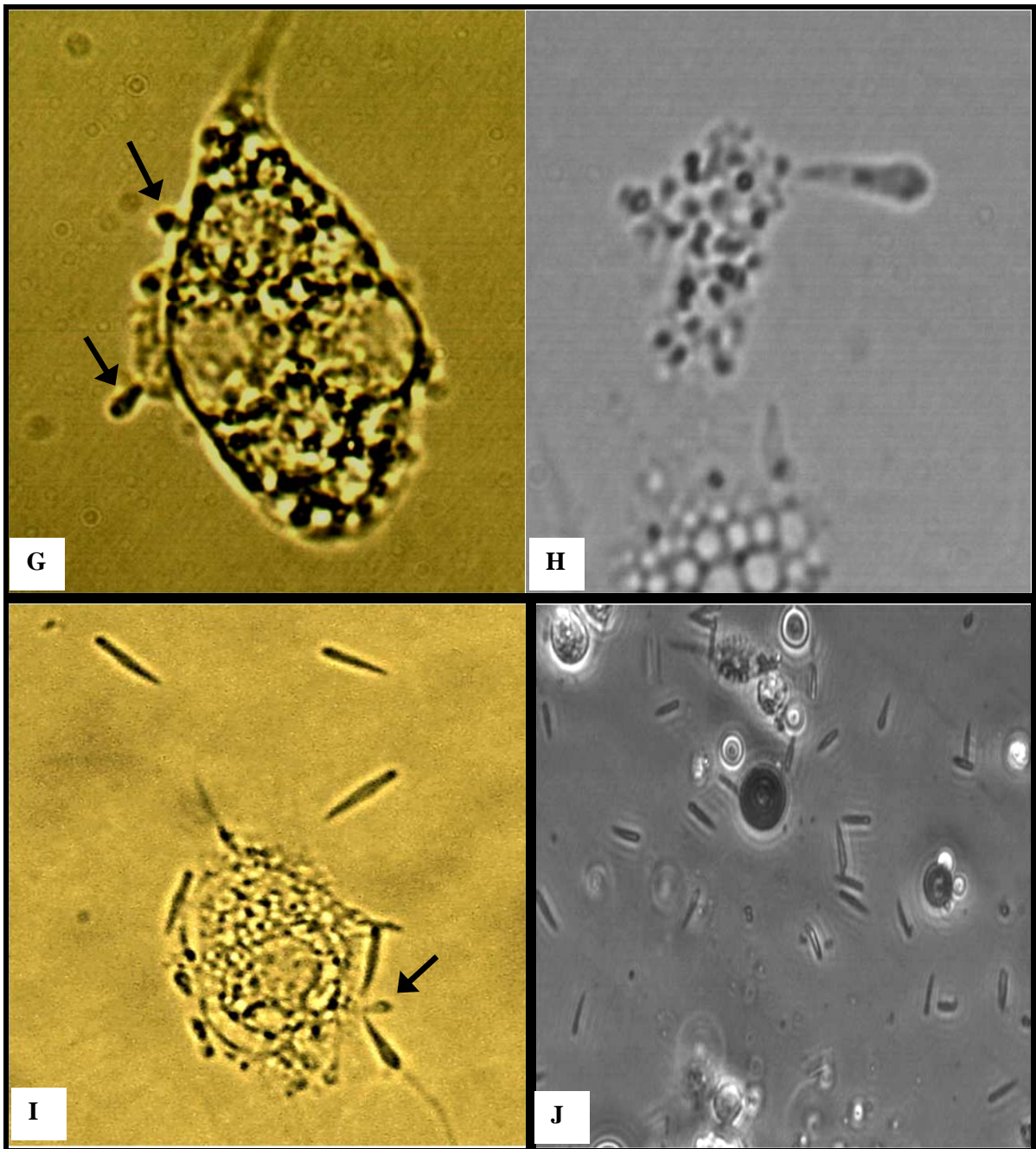


Figura 4. Esporocinetos de *Babesia bigemina* cultivados *in vitro* em hemócitos de *R. (B.) microplus*. Contraste de fase invertido. Grupo A- C) 4º dia de incubação, estruturas piriformes livres (20x). D, E) 10º dia de incubação, (40x). D) estruturas piriformes aderidas com a extremidade apical na membrana da célula epitelíóide; E) estruturas de esporocinetos arredondadas, epicelular na células fibroblastóide; Grupo B - F) 8º dia de incubação, estruturas de esporocinetos piriformes e arredondadas aderidos pela extremidade apical na membrana da célula epitelíóide e livres.



**Figura 5.** Grupo B- **G)** 22° dias de incubação, estruturas piriformes de esporocinetos de *Babesia bigemina*, aderido na célula fibroblastóides vacuolizada. Contraste de fase invertido (40x); Grupo C- **H, I, J)** 4° dia de incubação, Contraste de fase invertido (40x). **H, I)** Estruturas piriformes de esporocinetos aderidos na membrana da célula arredondadas e livres, **J)** Estruturas piriformes de esporocinetos livres.

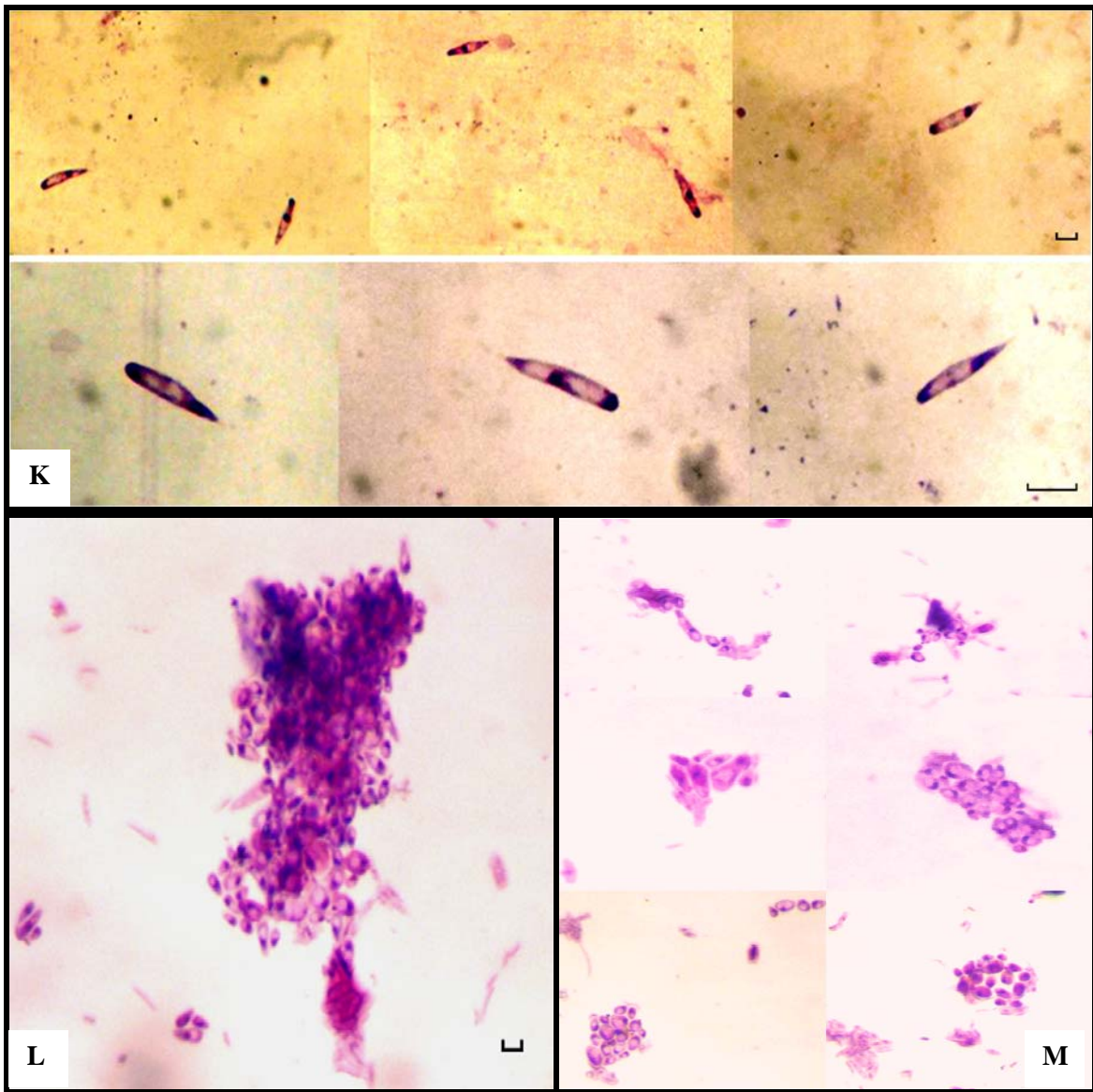


Figura 6. Grupo B. **K**) Estruturas piriformes de esporocinetos de *Babesia bigemina* com presença de núcleo e vacúolo, 4<sup>o</sup> dia de incubação. Giemsa (100x), **L, M**) 17<sup>o</sup> dia de incubação, colônia de estruturas arredondadas e piriformes imaturas e maduras de esporocinetos. Giemsa (100x). Barra de 10 $\mu$ m.



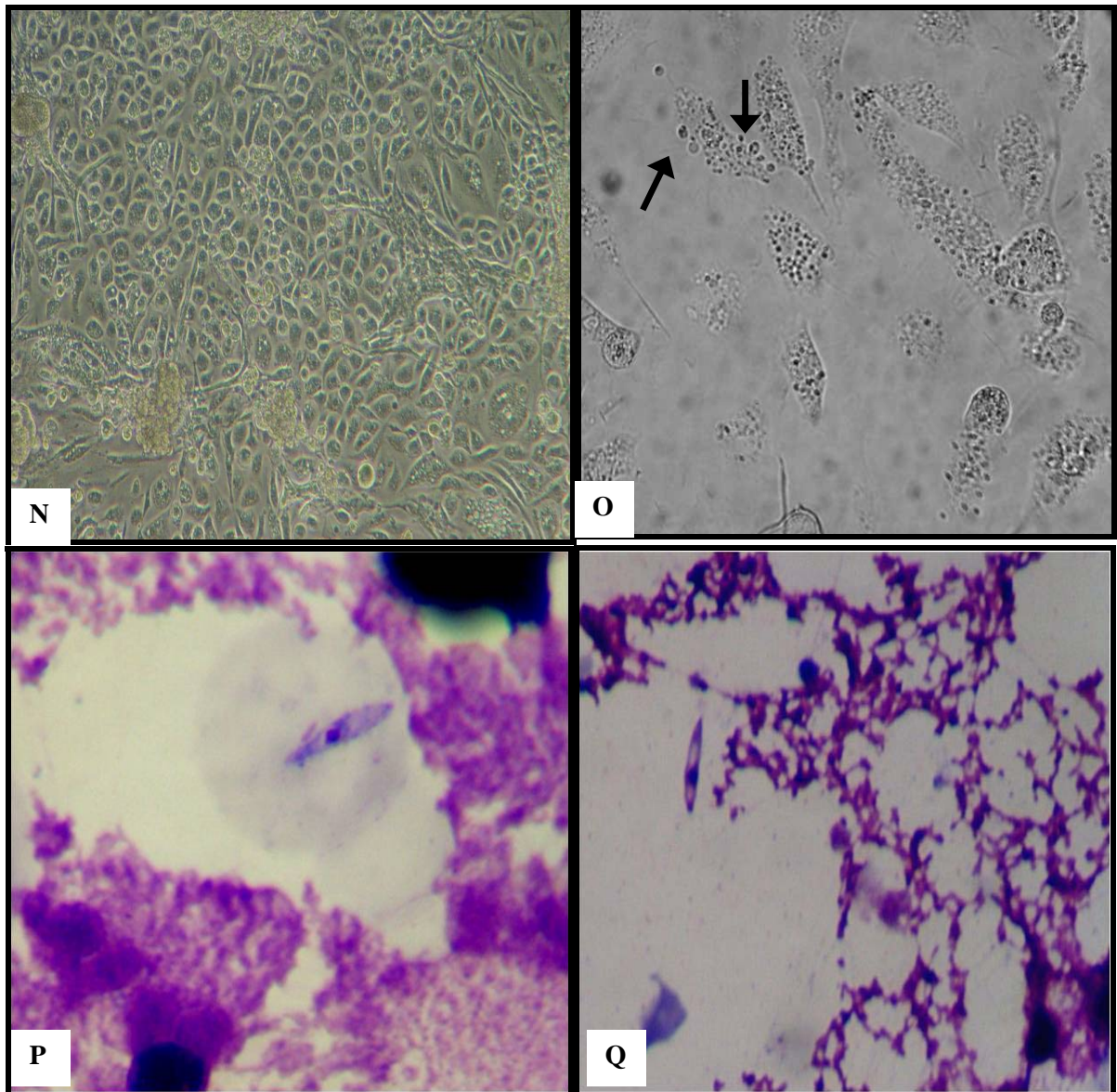
#### **4.3 Desenvolvimento das células primárias embrionárias do carrapato *R. (B.) microplus* cultivadas *in vitro***

Após aproximadamente 12 horas de cultivo foram observados em microscópio de contraste de fase invertido, objetiva de 40x, células aderidas, constituindo em sua maioria morfologia fibroblastóide, fusiforme, estreladas com presença de vacúolos e, as células epitelióides, algumas globosas com vacúolos. No 15º dia de cultivo, foi observada a formação de uma monocamada de células de Grau 3. As células tripsinizadas permaneceram viáveis por três meses, originando dois subcultivos.

#### **4.4 Infecção de esporocinetos em células primárias embrionárias de *R. (B.) microplus***

A partir do exame dos ovos macerados, corados com giemsa, foi confirmada a presença de esporocinetos de *Babesia bigemina*. Em microscópio de contraste de fase invertido foram observadas formas vermiculares de esporocinetos 24 horas após o início do cultivo. Os esporocinetos apresentaram motilidade, ocorrendo livres no meio celular ou aderidos nas células embrionárias (Figura 7). Através das amostras do 4º dia de cultivo, foi possível observar estruturas piriformes com núcleo corado de vermelho escuro e presença de vacúolos por toda extensão do citoplasma (Figura 7). Após o subcultivo das células, com 30 dias incubação, foram observadas estruturas móveis redondas e alongadas. Nas amostras do subcultivo das células coradas com giemsa, após três dias incubação, foram observadas estruturas arredondadas e em anéis, coradas. As formas piriformes de esporocinetos não foram mais observadas após o 10º dia de cultivo, permanecendo somente as estruturas arredondadas.





**Figura 7.** Exp. 1. Células primárias embrionárias de *R. (B.) microplus*, infectadas com esporocinetos de *Babesia bigemina*, **N**) 34° dia de incubação, monocamada de Grau 4, **O**) 58° dia de incubação, estruturas arredondadas de *Babesia bigemina* aderidos na célula fibroblastóide. Contraste de fase invertido (40x); **P**, **Q**) 4° dia de incubação, estruturas piriformes de *Babesia bigemina* cultivados em células primárias embrionárias de *R. (B.) microplus*. Giemsa (100x).

#### **4.5 Diagnóstico molecular de *B. bigemina* e *B. bovis* por meio da técnica de PCR**

O diagnóstico molecular com primer específico para as espécies, permitiu através da PCR a amplificação do gene 18SrRNA de *B. bigemina* (685pb) e a amostra resultou negativa para *B. bovis* (541pb) (Figura 8).



**Figura 8.** Eletroforese do produto da PCR no gel de agarose. PM: padrão de massa molecular 100pb; C-: controle negativo; Bi1: amostra de soro do bezerro positivo para *Babesia bigemina*; Bi2: amostra de esporocinetos em hemócitos *in vitro* de *R. (B.) microplus*, positivo para *B. bigemina*; BiC+: DNA controle positivo de *Babesia bigemina*, diluição de  $10^{-3}$ ; Bo1: amostra de soro do bezerro negativo para *B. bovis*; Bo2: Amostra de esporocinetos em hemócitos *in vitro*, de *R. (B.) microplus*, negativo para *B. bovis*; BoC+ DNA controle positivo de *B. bovis*, diluição de  $10^{-2}$ .

#### 4.6 Cultivo de hemócitos de *R. (B.) microplus* livres de infecção

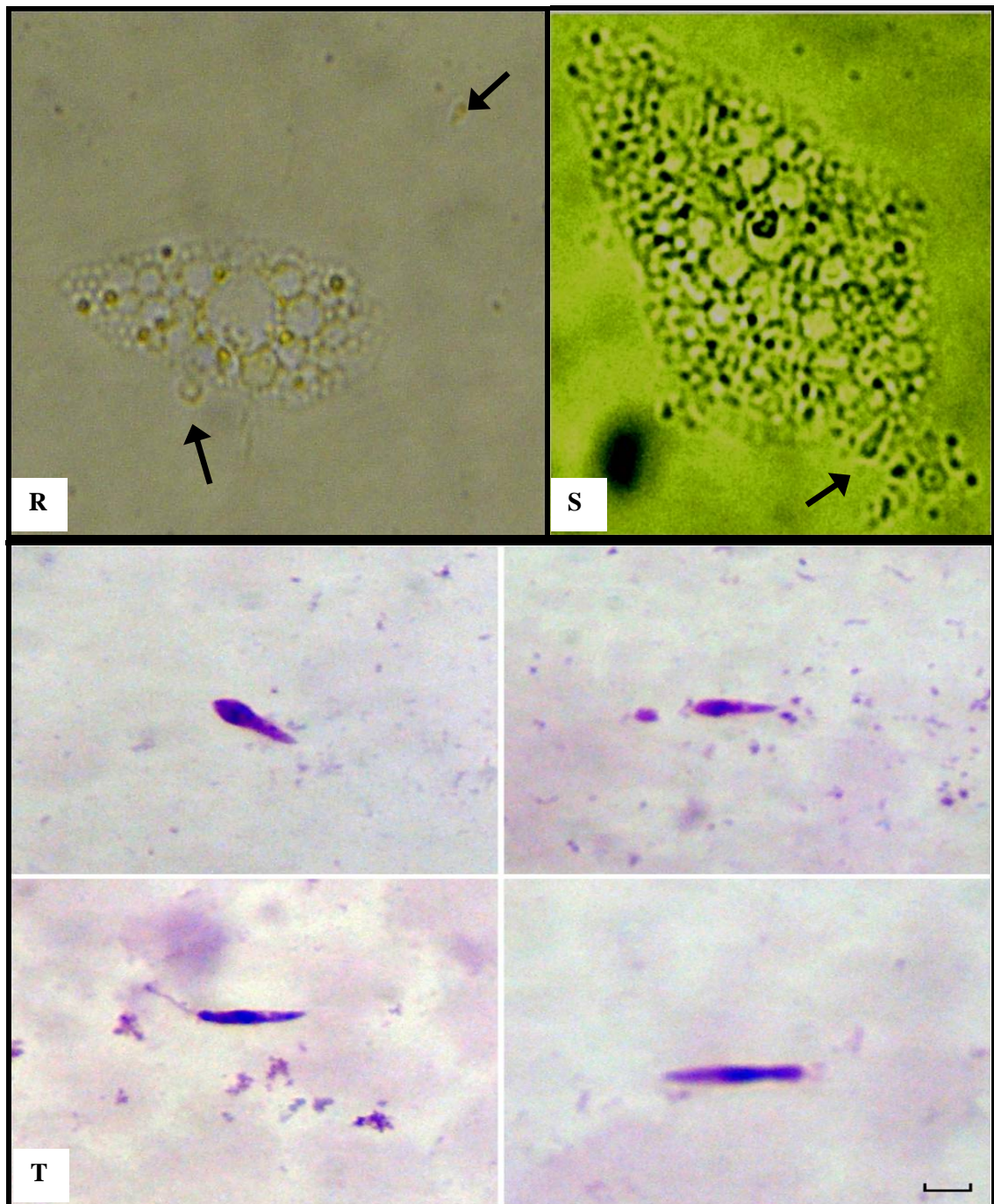
Duas horas após o cultivo observou-se a aderência dos hemócitos na superfície dos tubos de 10cm<sup>2</sup>. Inicialmente foram detectadas células troncos denominadas prohemócitos com formas redondas. Após o 5<sup>o</sup> dia de cultivo, as células começaram a se diferenciar tornando-se alongadas e fusiformes, também verificou-se os plasmatócitos, incluindo os granulócitos com presença de muitos vacúolos. Em sete dias de cultivo foi possível notar a multiplicação das células. As células do frasco controle, com características de grau 2, foram mantidas por aproximadamente 60 dias, estas células apresentaram-se vacuolizadas, mas não volumosas.

##### 4.6.1 Reativação de esporocinetos de *Babesia* spp em cultivo de hemócitos de carrapato *R. (B.) microplus* livres de infecção

Após dois meses de congelamento, os esporocinetos foram reativados e avaliados quanto a motilidade e integridade para inoculação nas células. Após 1 hora do inóculo de esporocinetos observou-se em microscópio contraste de fase invertido, objetiva 40x, sua motilidade. Após 24 horas foi possível verificar a aderência na membrana pela extremidade do extremidade apical dos esporocinetos, além de esporocinetos livres e em grupos. As formas piriformes encontravam-se íntegras, o núcleo bem escuro na região mediana e formas arredondadas, sendo observado a aderência nas células (Figura 9). Os esporocinetos permaneceram ativos, mas no 21<sup>o</sup> dia de incubação o cultivo foi finalizado devido ao alto



grau de degeneração dos hemócitos. Nas amostras coradas com giemsa, foram observadas e identificadas estruturas piriformes com morfologia íntegra de coloração vermelho claro e com presença de núcleo na região mediana (Figura 9).



**Figura 9.** Exp. 2: Esporocinetos de *Babesia bigemina* reativados nas células hemócitos livres de infecção. R) 7º dia de incubação, estruturas arredondadas de esporocinetos aderidos na membrana da célula fibroblastóides vacuolizada e volumosa e estruturas piriformes livres; S) 12º dia de incubação, estrutura piriforme invaginada na célula fibroblastóide vacuolizada e volumosa; T) 7º dia de incubação, estruturas piriformes livres. Giemsa 100x, Barra 10µm.

#### 4.6.2 Morfometria dos esporocinetos de *Babesia bigemina*

Os valores encontrados na morfometria, para os esporocinetos de formas piriformes, cultivados em hemócitos, variaram entre 13-32  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2-7 $\mu\text{m}$  de largura, e os esporocinetos criopreservados e reativados em hemócitos, 16 - 28 $\mu\text{m}$  de comprimento e 3 – 6  $\mu\text{m}$  de largura, esporocinetos da hemolinfa de fêmeas com 11 dias de postura, 21 – 30 $\mu\text{m}$  de comprimento e 3 – 6 $\mu\text{m}$  de largura. Os valores foram médios para o comprimento e a largura das formas vermiculares de *Babesia* spp estão apresentados na Tabela 2. A morfometria demonstrou que os esporocinetos cultivados *in vitro* mantiveram-se intactos preservando a sua morfologia.

**Tabela 2.** Comprimento e largura de esporocinetos de *Babesia bigemina* obtidos a partir da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas, do cultivo *in vitro* de hemócitos e da reativação após criopreservação -196°C.

Dimensões ( $\mu\text{m}$ )	Esporocinetos de <i>Babesia bigemina</i>		
	Hemolinfa (n=50)	Cultivo (n=50)	Reativados (n=50)
Comprimento	25,92 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	23,59 $\pm$ 4,2 <sup>b</sup>	22,10 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup>
Largura	4,60 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	4,76 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	4,04 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>

Médias seguidas por letras diferentes, nas linhas, indicaram diferença estatística no teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

#### 4.6.3 Contagem de esporocinetos de *Babesia bigemina*

A contagem em microscópio de luz das amostras coradas dos esporocinetos de *B. bigemina* que foram cultivados no experimento 1, foi de 2.2 esporocinetos/ $\mu\text{l}$ ; e a contagem dos esporocinetos criopreservados a partir do experimento 1 e reativados em hemócitos foi de 2.0 esporocinetos/ $\mu\text{l}$ .

#### 4.7 Desenvolvimento do subcultivo de células embrionárias de linhagem BME2

As células embrionárias BME2 subcultivadas foram contadas, sendo encontradas  $3,1 \times 10^7$  células/mL. Em 24 horas de cultivo, as células apresentaram aderência tanto na BME2-I com na BME2-C. Células com morfologia epitelióides foram predominantes porém outros tipos celulares foram encontrados, como as células fibroblastóides fusiformes.

##### 4.7.1 Desenvolvimento dos esporocinetos de *Babesia bigemina* nas células embrionárias de linhagem BME2

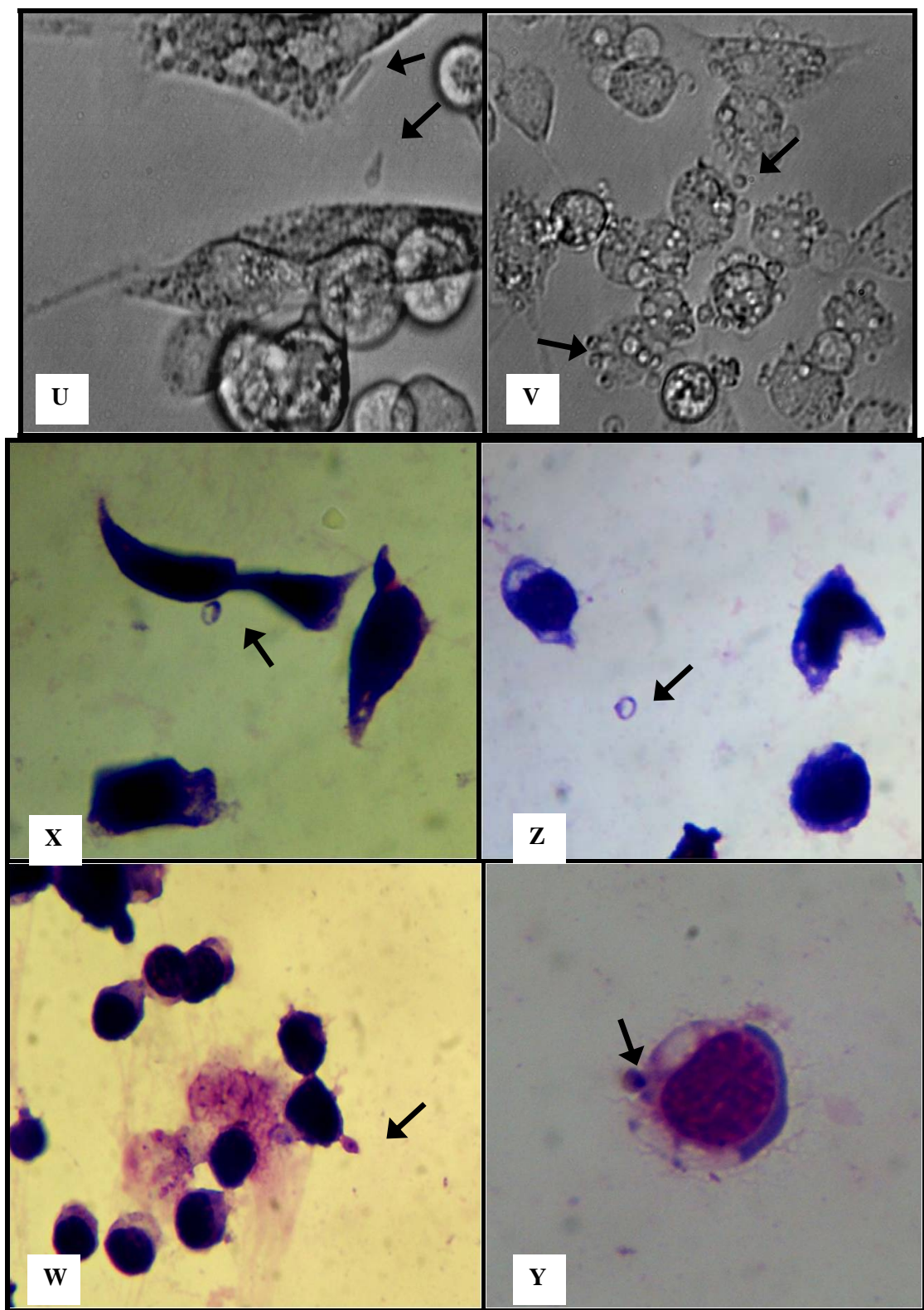
Após o inóculo dos esporocinetos de *B. bigemina* nas células BME2, observou-se em microscópio contraste de fase invertido, a atividade e motilidade destes parasitos. Em 24 horas de inóculo foi possível observar esporocinetos livres no meio celular e aderindo nas células BME2 (Figura 10). Inicialmente foram observadas as formas piriformes de esporocinetos os quais apresentavam o extremidade apical e região anterior morfologicamente íntegros. Após sete dias de cultivo observou-se formas arredondadas com núcleo visível, livres com motilidades e aderidas nas células (Figura 10).

**1º Subcultivo das células BME2 inoculadas com esporocinetos de *Babesia* spp** - O subcultivo foi realizado após o 24º dia de cultivo, quando as células apresentaram uma monocamada de grau 4, dificultando a observação *in vitro*. Nas células BME2I foram contadas  $2,9 \times 10^7$  células/mL e na BME2C  $2,31 \times 10^7$  células/mL. Após o subcultivo muitas estruturas redondas móveis foram observadas. No 7º dia de cultivo foram observados muitos

vacúolos nas células BME2I. Nas amostras coradas foram observadas estruturas redondas com núcleo corado de vermelho escuro.

**2° Subcultivo das células BME2 inoculadas com esporocinetos de *Babesia* spp -** No 18° dia foi realizado o segundo subcultivo das células BME2-I e BME2-C. Nas células BME2-I foram contadas  $3 \times 10^6$  células/mL e na BM2E-C  $1,7 \times 10^6$  células/mL. Nesta etapa foi finalizado o cultivo e nas lâminas coradas foram observadas formas de esporocinetos redondas coradas com núcleo vermelho escuro.

**Citospin:** Foram observadas formas em anéis e arredondadas com núcleo corado de vermelho escuro que se encontravam aderidas às células, além de formas intracitoplasmáticas (Figura 10).



**Figura 10.** Esporocinetos de *Babesia bigemina* reativados nas células de linhagem BME2: **U)** 2º dia de incubação, estruturas piriformes de esporocinetos próximo à célula embrionária; **V)** 6º dia de incubação, estruturas arredondadas epicelular e aderidos na células. Contraste de fase invertido (40x); **X, Z,W)** 6º dia de incubação; **X,Z)** estruturas em anéis de esporocinetos livres; **Y)** 17º dia de incubação; **W,Y)** estruturas arredondas de esporocinetos aderidos na células. Giemsa 100x.

#### **4.8 Esporocinetos de *Babesia bigemina* cultivados livres de células**

Esporocinetos cultivados livres de células foi para controle no experimento 2 e 3, e situações semelhantes foram observadas. A partir do 1º dia de cultivo foram observados esporocinetos móveis e morfolgicamente integros. Após aproximadamente 10 dias de cultivo, observou-se o agrupamento de esporocinetos, que estavam móveis. Estruturas de formas vermiculares e finas foram observadas, sendo encontrado poucas formas redondas. O cultivo permaneceu até o 10º e 17º dia, respectivamente, com poucas estruturas ainda móveis, porém a maioria apresentavam degenerada no extremidade apical, estas observações foram feitas tanto em contraste de fase invertido como nas amostras coradas.



## 5 DISCUSSÃO

Grande parte dos hemócitos de carrapatos são células vacuolizadas, sendo alguns responsáveis por fagocitar bactérias e protozoários, servindo desta forma como células hospedeiras de uma ampla variedade de microrganismos que se desenvolvem em carrapatos (SONENSHINE, 1991). Řeháček (1963) realizou tentativa de cultivo de hemócitos a partir do carrapato *Hyalomma asiaticum*, mas as células não se multiplicaram. Cory e Yunker (1971) a partir do cultivo da hemolinfa de *Dermacentor andersoni* estudaram o desenvolvimento de vírus do gênero *Orbivirus* responsável pela febre de carrapato do Colorado. Sidorov et al. (1979) ao cultivarem hemócitos *in vitro* de carrapatos argasídeos para estudo da fagocitose de bactérias mantiveram as células por poucos dias.

O plasma da hemolinfa é uma solução complexa contendo além de água, numerosas proteínas, lipídeos, aminoácidos, carboidratos e vários sais inorgânicos (SONENSHINE, 1991). Em um esforço para melhorar o crescimento das células foram feitas análises de aminoácidos, açúcares e sais na hemolinfa de carrapatos *Boophilus microplus* e um meio preparado com base nessas substâncias foi testado em culturas de células de carrapato (ŘEHÁČEK; BRZOSTOWSKI, 1969).

No presente estudo, o substrato com as células da hemolinfa e a suplementação do meio L15 constituído de 40% de SFB, podem ter contribuído para o desenvolvimento e longevidade do protozoário nas células. Formas piriformes de esporocinetos sobreviveram e desenvolveram-se nos hemócitos cultivados *in vitro* por um período de 25 dias. Este período de incubação possibilitou a observação de formas piriformes e arredondadas de esporocinetos aderidas nas células através da extremidade apical, formação de vacúolo na membrana das células e a motilidade de estruturas arredondadas intracelulares. Foi possível também observar estruturas alongadas, móveis e esporocinetos livres. Nas células embrionárias os esporocinetos cultivados se desenvolveram com longevidade, sendo observadas formas piriformes e arredondadas aderidas à membrana celular, formas arredondadas intracelulares e formas piriformes e arredondadas livres. Estudo realizado por Ribeiro et al. (2009), com cultivo de esporocinetos de *B. bigemina* em células IDE8, foi observado o desenvolvimento do processo de esquizogonia dentro das células, produzindo alguns esporocinetos com morfologias distintas, inclusive as formas arredondadas observadas no início da multiplicação

No presente estudo, o desenvolvimento de esporocinetos de *Babesia bigemina in vitro* nas células-hemócitos e embrionárias foi semelhante ao relatado na literatura em estudos sobre o ciclo de merozoítas em eritrócitos. Inicialmente os merozoítas orientam-se na superfície da célula hospedeira e aderem na membrana por sua extremidade apical, onde as roptrias e as micronemas estão localizadas. A liberação de organelas, roptrias e micronemas e a ação de receptores parecem ser necessários para que os merozoítas iniciem a invaginação na membrana do eritrócito e a formação de um vacúolo parasitóforo. Imediatamente após a invasão, cada parasito é encontrado dentro de um vacúolo parasitóforo que, em seguida, é disperso. Em todas as fases subseqüentes, dos estágios, o parasito é revestido por uma membrana plasmática única e o parasito está em contato direto com o citoplasma dos eritrócitos. A ausência de uma membrana do vacúolo parasitóforo pode dar flexibilidade a *Babesia* durante o seu desenvolvimento, resultando uma variedade de formas do parasito, como piriforme, oval, arredondada, alongada, torcida ou dobrada (MEHLHORN; SCHEIN, 1984; IGARASHI et al., 1988).



Estudos *in vitro* demonstraram que cepas virulentas de *B. bovis* induziram mais protrusões estreladas na membrana de eritrócitos do que cepas de *B. bovis* não virulentas. Isto indica que o número de protrusões na membrana dos eritrócitos infectados, bem como a taxa de crescimento do parasita, poderiam ser critérios para estimar a virulência de *B. bovis*. Em relação a *B. bigemina* foi constatado que os eritrócitos parasitados são maiores do que os não infectados. Desenvolvimento de critérios para a virulência é muito importante no estudo de parasitas para o desenvolvimento de vacinas (WRIGHT, 1973; AIKAWA et al., 1985). No presente estudo, diferenças morfológicas foram observadas entre as células de hemócitos infectadas com esporocinetos de *Babesia bigemina* e com as células livres de infecção. As células infectadas apresentaram-se volumosas, vacuolizadas e, em seguida, degeneraram.

No grupo controle onde os esporocinetos foram cultivados na ausência de células, as formas piriformes foram observadas em grupos, com muita frequência, diferentes dos esporocinetos cultivados com as células. Isto pode demonstrar que estes parasitos podem ser dependentes de estruturas hospedeiras para sua reprodução. Outra importância desse grupo controle foi ter possibilitado avaliar a longevidade da atividade dos esporocinetos e comparar com os cultivados em células. A contagem à fresco de esporocinetos de *Babesia in vitro* foi inviável, inicialmente foram observados muitos esporocinetos piriformes. No 10º dia de cultivo, observou-se estruturas arredondadas e as formas piriformes encontravam-se mais aderidas a células do que livres no meio. Portanto a manipulação dos frascos foi evitada para não interferir na interação do parasito com a célula, embora tenha sido possível a contagem das amostras do sobrenadante coradas no início da troca de meio de cultura. A metodologia aplicada para contagem possibilitou somente a comparação de frequências dos esporocinetos inicialmente cultivados 2.2 esporocinetos/ $\mu$ l com aqueles que foram reativados 2.0 esporocinetos/ $\mu$ l. Isso demonstrou que não houve perda de esporocinetos após a criopreservação.

Colônias imaturas de esporocinetos coradas foram observadas e apresentaram morfologias arredondadas e piriformes, demonstrando a reprodução *in vitro* do parasito. Os receptores celulares e componentes derivados do hospedeiro, tais como soro ou extratos de tecidos, respectivamente desempenham um papel na capacidade de protozoários aderirem e infectarem células *in vitro* (KURTTI et al., 1983). As estruturas piriformes, arredondadas e em anéis, encontradas tanto em cultura de hemócitos como nas células embrionárias, com presença de cromatina conferem com as observadas para as espécies de *Babesia* spp. em carrapatos (RIEK, 1964; BARREIRA et al., 2005a). As formas em anéis coradas, observadas no presente estudo, provavelmente poderiam ser as estruturas arredondadas com vacúolos observadas no contraste de fase invertido, aderidas e livres. Igarashi et al. (1988) sugeriram que parasitos do gênero *Babesia* possuem uma variedades de formas, incluindo as estruturas dobradas, semelhantes a um anel.

O cultivo das células de carrapato como um sistema para estudo de *Babesia* spp. *in vitro*, promove expectativas para melhor entendimento dos aspectos biológicos e moleculares deste protozoário, além de diminuir a utilização de hospedeiros vertebrados (MOSQUEDA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2009). Estudos *in vivo* com *Babesia* spp. têm demonstrado que os esporocinetos podem infectar diferentes tipos de células e causar uma variedade de condições patológicas no carrapato (KURTTI et al., 1983). Além de técnicas moleculares, o estabelecimento de cultivos podem ser de grande valor diagnóstico e mais barato do que outras técnicas (ECKERT, 1997).

Neste estudo as células de carrapato constituíram substrato eficiente para o estudo da interação deste protozoário com as células do vetor. Além disso, o sucesso da reativação dos

esporocinetos de *Babesia bigemina* nas células, após sua criopreservação possibilitou condições para a manutenção deste parasito em laboratório, sem a necessidade de inóculo em animais, conferindo praticidade e a reprodutibilidade desta metodologia. Na literatura são observados registros da criopreservação de merozoítas de *Babesia* spp. a partir de eritrócitos de bovinos infectados experimentalmente (PALMER et al., 1982; VEGA et al., 1985), como alternativas viáveis na produção de antígenos, embora não seja livre de anticorpos do hospedeiro. A criopreservação de estágios do parasita pode contribuir consideravelmente para a redução do número de animais experimentais necessários para a manutenção de rotina de parasitas por passagens seriadas em laboratórios (ECKERT, 1997). A infecção de carrapatos em bovinos inoculados com *Babesia* spp. é outra forma de isolamento de cepas destes protozoários. Entretanto, após sucessivas inoculações as formas infectantes para o carrapato, conhecidas como gametócitos, são perdidas (FRIEDOFF, 1988).

No presente estudo, foi possível o isolamento do parasito diretamente do carrapato *R. (B.) microplus* obtido de um bezerro naturalmente infectado com *Babesia*. A utilização da técnica molecular foi necessária para confirmação do diagnóstico microscópico. A extração de DNA foi realizada através do soro do bezerro, pois embora *Babesia* spp. seja intraeritrocítica (FAJARDO, 1901; KUTTLER, 1988; KESSLER; SCHENK, 1988) é provável que durante as centrifugações os eritrócitos romperam-se e os parasitos dispersaram-se para o soro e/ou plasma. Além disso, no ciclo normal do parasito, após o rompimento das células, os merozoítas são encontrados no meio extracelular para reiniciar a penetração e o ciclo em outras células.

A amplificação do DNA para o gene 18SrRNA de *Babesia bigemina* através do primer GAU 7 e GAU 6 foi semelhante tanto para as amostras oriundas do bezerro, quanto para as do cultivo. No Brasil, a babesiose causada por *B. bigemina* e *B. bovis* são endêmicas na maior parte do território onde se criam bovinos. Devido às condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento do carrapato, durante todo ano, a situação é de estabilidade endêmica, os bezerros são infectados pelos agentes da Tristeza parasitária bovina durante os primeiros dias de vida quando possuem imunidade passiva, transmitida pelas vacas através do colostro (KESSLER; SCHENK, 1988).

Independente da origem das amostras, apesar de não ter sido realizado teste estatístico para comparar com os dados encontrados na literatura, foi possível verificar que a morfometria apresentada no presente estudo são semelhantes com as variações de mensuração de esporocinetos de *B. bigemina* de órgãos e tecidos de carrapatos e também de cultivo em células de carrapatos encontrados na literatura (BARREIRA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009). As variações de mensurações para *B. bovis* verificadas na literatura podem ser diferentes e/ou até semelhantes às apresentadas para *B. bigemina*, embora não tenha sido encontrado relato de esporocinetos de *B. bovis* acima de 20µm (RIEK, 1966; STEWART, 1978; GUGLIELMONE, 1996).

Na comparação da morfometria dos esporocinetos, a diferença estatística observada entre os esporocinetos oriundos do exame direto da hemolinfa e dos cultivados e reativados *in vitro*, não invalidou caracterizá-los como uma mesma espécie, bem como, excluir a semelhança morfológica. Isso foi confirmado pela observação das características de integridade da complexo apical e da região anterior dos esporocinetos corados. A mensuração dos esporocinetos de *Babesia* spp. foi utilizada durante muitos anos como a única forma de confirmação das espécies deste parasito (RIEK, 1964; BUSCHER, 1988; STEWART, 1986; GUGLIELMONE et al., 1996). Atualmente técnicas diagnósticas mais sensíveis, como a biologia molecular, tem substituído a morfometria, embora no presente

estudo ela foi necessária e eficiente, não só para identificar a espécie mas também para comparar a integridade entre os esporocinetos de cada grupo.

Este foi o primeiro relato do cultivo de hemócitos infectados com esporocinetos de *Babesia* spp em meio L15 suplementado com 40% de SFB na ausência de CO<sub>2</sub>, sendo identificada atividade do protozoário por até 25 dias. Outra inovação foi a reativação de esporocinetos nos hemócitos e células embrionárias cultivados *in vitro*, após criopreservação à -196°C. Eventos similares foram observados no cultivo de *Babesia* spp. em células embrionárias de carrapatos. Kurtti et al. (1983) reportaram o primeiro cultivo de *Babesia caballi* em cultura primária a partir de ovos infectados do carrapato *Dermacentor nitens*. Estes autores verificaram os protozoários por três a cinco dias em microscopia de luz e após uma semana não foram mais observados no cultivo *in vitro*. Mosqueda et al. (2003) inocularam esporocinetos de *B. bigemina* oriundos da hemolinfa do carrapato *R. (B.) microplus* em células primárias desta mesma espécie de carrapato. Detectaram através de imunofluorescência indireta e utilizando anticorpos policlonais os parasitos dentro das células embrionárias após 48 horas de incubação, os quais permaneceram viáveis por até 10 dias. Ribeiro et al. (2009) observaram formas intracelulares de esporocinetos de *B. bigemina* em cultivo nas células de linhagem IDE8, reportando a multiplicação do protozoário dentro das células por oito dias.

No presente estudo foram demonstradas alternativas para a manutenção *in vitro* de esporocinetos de *Babesia bigemina* em laboratório, contribuindo para estudos biológicos e moleculares de interesse para a pesquisa científica.

## 6 CONCLUSÕES

As análises morfométricas e moleculares comprovaram que os esporocinetos isolados em hemolinfa de carrapato e cultivados em laboratório foram de *Babesia bigemina*.

Os hemócitos constituíram em eficientes substratos para cultivo *in vitro* de esporocinetos de *Babesia bigemina* e mantiveram-se vivos até o 25º dia de cultivo.

O desenvolvimento de esporocinetos de *Babesia bigemina* foi mais eficiente em hemócitos *in vitro* do que em células primárias embrionárias de *R. (B.) microplus*.

Os esporocinetos de *Babesia bigemina* cultivados em meio Leibovitz's livre de células, não conservaram sua morfologia.

Foi possível a criopreservação de esporocinetos de *Babesia bigemina* em nitrogênio líquido e a sua reativação em cultura de hemócitos de *R. (B.) microplus* e em células da linhagem BME2.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A. WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 3 ed. Porto Alegre:Artes Médicas, 1997, 1294p.

ANGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; KLUCK, G.E.G.; FOLLY E.; BITTENCOURT V.R.E. P.,. Haemolymph Protein and Lipid Profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Infected by Fungi. **Transboundary Emerging Disease**, v.57, p. 79-83. 2010.

AIKAWA, M.; RABBEGE, J. UNI, S. RISTIC, M.; MILLER, L. H. Structural alteration of the membrane of erythrocytes infected with *Babesia bovis*. **American Journal Tropical Medical Hygiene**, v. 34, p.45,1985.

ALVES, L. C. Características humorais da hemolinfa do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), provenientes de bovinos infestados naturalmente. 1991,62f. **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BARREIRA, J. D. Caracterização morfológica, aspectos biológicos e patogenia das formas evolutivas de *Babesia bovis* (Babés, 1888) e *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) (protozoa: Babesiidae) em *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). 1988,125f. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BARREIRA, J. D. Efeitos da infecção de *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) e *Babesia bovis* (Babés, 1888) sobre os parâmetros biológicos do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) 2001, 166f. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BARREIRA, J. D.; ROSSI, M. I. D.; SILVA, G. V. O.; PIRES, F. A.; MASSARD, C. L. Caracterização morfológica e aspectos biológicos das formas evolutivas de *Babesia bigemina* (Smith; Kilborne, 1893) (PROTOZOA: BABESIIDAE) em *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2005a.

BARREIRA, J. D.; ROSSI, M. I. D.; PIRES, F. A.; SILVA, G. V. O.; MASSARD, C. L. Dinâmica da infecção de *Babesia bovis* (Babés, 1888, Starcovici, 1893) em fêmeas ingurgitadas e ovos de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1131-1135, 2005b.

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

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

- BASTOS, C., VASCONCELOS, M.M.C., RIBEIRO, M.F.B., PASSOS, L.M.F.,. Use of refrigeration as a practical means to preserve viability of *in vitro*-cultured IDE8 tick cells. **Experimental Appl. Acarology**, v.39, p.347-352, 2006.
- BELL-SAKYI, L.; ZWEYGARTH, E.; BLOUIN, E. F.; GOULD, E. A. JONGEJAN, f. Tick cell lines: tolls for tick and tick-borne disease research. **Trends in Parasitology**, v. 23, n.9, p. 450-457,2007.
- BELL-SAKYI, L.Continuous cell lines from the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Journal Parasitology**, v. 77, p.1006-1008, 1991.
- 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.
- BLOUIN, E.F.; DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.; 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 Research Review**. v. 3, p.57-68, 2002.
- BUSCHER, G. The infection of various tick species with *Babesia bigemina*, its transmission and identification. **Parasitology Research**, v.74, 324-330,1988.
- CARNEIRO, M. E. Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas, ninfas e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (latreille, 1806) (ixodoidea: ixodidae) em diferentes estados nutricionais. 1995,99f. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- CORRÊA, F, N. Estudo Epidemiológico de *B. burgdorferi*, *B. bovis* , *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em bufálos (*Bubalus bubalus*) do Estado do Rio de Janeiro. 2001,115f. **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- CORY, J.; YUNKER, C. E. Primary Cultures of tick Hemocytes for Arbovirus Growth. **Annals of the Entomology Society of America**. v.64, n. 6, p.1249-1254, 1971.
- DENNIS, E.W. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne) of Texas cattle fever in the tick *Margaropus annulatus* (Say).**University of California Publications in Zoology**, v. 36, p. 263-298, 1932.
- ECKERT, J. Alternatives to animal experimentation in parasitology.**Veterinary Parasitology**. v.71, 99-120. 1997.
- ERP, E. E.; GRAVELY, S. M.; SMITH, R. D.; RISTIC, M.; OSORNO, B. M.; CARSON C. A. Growth of *Babesia bovis* in bovine erythrocyte cultures. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 27, p.1061–1064, 1978.
- ERP, E. E.; SMITH, R. D.; RISTIC, M.; OSORNO, B. M. Continuous *in vitro* cultivation of *Babesia bovis*. **American Journal Veterinary Research**, v. 41, p.1141–1142, 1980.

EWING, S.A.; MUNDERLOH, U.G.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M.; KURTTI, T.J. *Ehrlichia canis* in tick cell culture. In **“Proceedings of the 76th Conference of research Workers in Animal Diseases”**, Chicago, USA, 13-14 November 1995. Iowa State University Press, Ames, Iowa, abstract no. 165, 1995.

FAJARDO, F. A piroplasmose bovina no Rio de Janeiro. **Revista Médica São Paulo**. 4: 315-319. 1901.

FRESHNEY, J. R. **Culture of Animal Cells- Manual de Técnica Básica**. 5 ed. Estados Unidos: Wiley-liss, 2005, 642p.

FRIEDHOF, K. T.; SCHOLTYSCCK, E. Feinstrukturen der merozoiten von *Babesia bigemina* im Ovar von *Boophilus microplus* und *Boophilus decoloratus*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 32, p.266-283, 1969.

FRIEDHOFF, K.T., SMITH, R.D. Transmission of *Babesia* by ticks. In: Ristic, M., Kreir, J.P (Eds). In **Babesioses**. Academic Press, New York, p. 267. 1981.

FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia*. In: Ristic, M. **Babesioses of Domestic Animals and Man**. Boca Raton, Illinois, pp. 23, 1988.

GOMES, A. O carrapato-do-boi *Boophilus microplus*: ciclo, biologia, epidemiologia, patogenia e controle. In: KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M: **Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos**. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1998, 157p.

GONZALES, J. C. **O controle do carrapato dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 1975, 103p.

GORENFLOT, A.; BRASSEUR, P.; PRECIGOUT, E.; L’HOSTIS, M.; MARCHAND, A.; SCHREVEL J. Cytological and immunological responses to *Babesia divergens* in different hosts: ox, gerbil, man. **Parasitology Research**, v. 77, p.3–12, 1991.

GOUGH, J. M.; JORGENSEN, W. K.; KEMP, D. H. Development of tick gut forms of *Babesia bigemina* *in vitro*. **Journal Eukariotic Microbiology**., v. 45, n. 3, p. 298-306, 1998.

GUGLIELMONE, A. A.; GAIDO, A. B.; MANGOLD, A. J. Light microscopy diagnosis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* kinetes in the haemolymph of artificially infected *Boophilus microplus* engorged female ticks. **Veterinary Parasitology**. 61, 15-20. 1996.

GURU, P.Y.; DHANDA, V.; GUPTA, N. P. Cell cultures derived from the developing adults of three species of ticks, by a simplified technique. **Indian Journal Medical Research**, v. 64, p. 1041-1045, 1976.

GRANDE, N.; PRECIGOUT, E.; ANCELIN, M. L.; MOUBRI, K.; CARCY, B.; LEMESRE, J. L. VIAL, H; GORENFLOT, A. Continuous *in vitro* culture of *Babesia divergens* in a serum-free medium. **Parasitology**, v.115, p.81–89, 1997.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico

das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

HINES, S. A.; PALMER, G. H.; JASMER, D. P.; GOFF, W. L.; MCELWAIN, T. F. Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 349-352, 1995.

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

HOLMAN, P. J.; CHIEVES, L W.; FRERICHS, M.; OLSON, D.; WAGNER, G. G. *Babesia equi* erythrocytic stage continuously cultured in an enriched medium. **Journal Parasitology**, v. 80, p.232-236, 1994.

HOLMAN, P. J.; WALDRUP, K. A.; WAGNER, G. C. *In vitro* cultivation of a *Babesia* isolated from a white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Journal Parasitology**, v. 74, p.111-115, 1988.

HOYTE, H.M.D. Initial development of infections with *Babesia bigemina*. **Journal Protozoology**, v.8, p. 462-466, 1961.

IGARASHI, I.; AIKAWA, M.; KREIER, J. P. Host cell-parasite interaction in Babesiosis. In: **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton, Flórida. 53-69p. 1988.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. 1, p. S3-S14, 2004.

JOHNSTON, L.A.Y. Epidemiology of bovine babesiosis in northern. Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v.43, p.427-432,1967.

KESSLER, R. H.; SHENK, M. A. M. **Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos**. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1998, 157p.

KOCAN, K. M.; HALBUR, T.; BLOUIN, E. F.; ONET, V. LA FUENTE, J. GARCIA-GARCIA, J. C.; SALIKI, J. T. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 151-161, 2001.

KOCH, R. Beitrag zur entwicklungsgerchichte der piroplasmen. **Zeitschrift Hygiene Infektions Krankheiten**, v. 54, p. 1-9. 1906.

KUHN, K.H.,. Mitotic activity of the hemocytes in the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 82, p.511-517, 1996.

KURTTI, T.J.; MUNDERLOH, U.G. Tick cell culture: characteristics, growth requirements and applications to parasitology. In: **Invertebrate Cell Culture Applications** (Maramorosch and Mitsuhashi, eds). Academic Press, New York, p.195-232, 1982.



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

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U.G.; AHLSTRAND, G. G.; JOHNSON, R. C. *B. burgdorferi* in tick cell culture: growth and cellular adherence. **Journal Medical Entomology**, v. 25, n.4, p. 256-261, 1988.

LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ JR. I. S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 1, p. 1-11, 2003.

LEVY, M. G.; RISTIC, M. *Babesia bovis*: continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. **Science**, v. 207, p.1218–1220, 1980.

LEVY, M. G.; RISTIC, M. Cultivation and *in vitro* studies of *Babesia*, p. 221–241, 1983. In J. B. Jensen (ed.), ***In vitro* cultivation of protozoan parasites**. CRC Press, Boca Raton, Fla.

LINHARES, G. F. C.; SANTANA, A. P.; LAUEMAN, L. H.; MADRUGA, C. R. Assessment of primers designed from the small Ribosomal Subunit Rna for specific discrimination between *Babesiabigemina* and *Babesia Bovis* by PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v.3, n.2, p. 26-32, 2002.

MADRUGA, C. R.; LEAL, C.R.B.; FERREIRA, A.M.T.; ARAÚJO, F. R.; BONATO, A. L.V.; KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M.; SOARES, C. O. Genetic and antigenic analysis of *Babesia bigemina* isolates from five geographical regions of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, p.153-160, 2002.

MAHONEY, D. F.; MIRRE, G. B., Bovine babesiosis: estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 65, n. 3, 1971.

MAHONEY, D. F.; MIRRE, D. G. B. *Babesia Argentina*: The infection of splenectomized calves with extracts of larval ticks (*Boophilus microplus*). **Research Veterinary Science**. v.16, p.112-114, 1974.

MCCOSKER, P. J. The global importance of babesiosis, p. 1-24, 1981. In: Ristic M. e Krier J.P. (ed.) *Babesiosis*. Academic Press, New York.

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

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, v. 23, p 37-103, 1984.

MOSQUEDA, J., RAMOS, J.A., SALTO, M. AND COSSIO-BAYUGAR, R. In vitro infection of *Babesia bigemina* kinetes to *Boophilus microplus* embryonic cells. Proc. **V International Seminary Animmal Parasitology**. Oct 1-3 2003, Merida, Mexico, p240-247,2003.

MOSQUEDA, J., Ramos, J. A.; Falcon, A.; Alvarez, J. A.; Aragon, V.; Figueroa, J. V. *Babesia bigemina* sporozoite isolation from *Boophilus microplus* nymphs and initial immunomolecular. **Annals New York Academy Science**, v.1026, p.222-231, 2004.

MUNDERLOH, U.G.; LIU Y.; WANG, M.; CHEN, C.; KURTTI, T.J.. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. **Journal Parasitology**, v. 80, p.533-543, 1994.

MUNDERLOH, U, G.; KURTTI, T. J. Cellular and Molecular Interrelationships Between Tick-Borne Pathogens. Minesota. **Annual Reviews Entomology**, v. 40, p. 221-243, 1995.

MUNDERLOH UG, MADIGAN JE, DUMLER JS, GOODMAN JL, HAYES SF, BARLOUGH JE, NELSON CM, KURTTI TJ. Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture. **Journal Clinical Microbiology**, v. 34, n.3, p.664–670,1996.

MUREL, A. BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). Quesland/Austrália. **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 169-172, 2003.

NUÑEZ, J.L.; MUÑOZ, M. E.; MOLTEDO, H.L. *Boophilus microplus* la carrapata comum del ganado vacuno. Buenos Aires: 1982,184p.

NIJHOF A.M.; PENZHORN, B. L.; LYNEN G.; MOLLEL, J. O.; MORTEL, P.; BEKKER, C. P. J.; JONGEJAN, F. *Babesia bicornis* sp. nov. and *Theileria bicornis* sp. nov.: Tick-Borne Parasites Associated with Mortality in the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*). **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n. 5, p. 2249–2254, 2003.

PALMER, D.A., BUENING, G.M., CARSON, C.A. Cryopreservation of *Babesia bovis* for *in vitro* cultivation. **Parasitology**, v.84, p.567-572, 1982.

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**, v. 1 (Yunker, ed), p 87-101, CRC Press, Boca Raton. 1987.

PRUETT, J. H.; OLAFSON, P. U.; DAVEY, R. B. Serologically defined *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* larval antigens in BmLF3, a partially pure Sephacryl S-300 fraction of crude larval proteins. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 3-4, p. 264-272, 2008.

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

ŘEHÁČEK, J. Tick tissue culture and arboviruses. In: **Invertebrate tissue culture**. Academic Press, New York e London, p. 21-33, 1976.

REHACEK, J. Preliminary report on tick tissue cultures. **Acta Virology**, v. 2, p.253-254. 1958.

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

REZENDE, J.; CARDOSO, K. M.; FONSECA, A. H. Cultivo de hemócitos *in vitro* do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: **XXXVI Semana Capixaba do Médico Veterinário e IV Encontro Regional de Buiatria**,2009, Guarapari/ES.

REZENDE, J.; RANGEL, C. P.; CUNHA, N. C.; FONSECA, A. H. “Primary embryonic cells of *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma cajennense* ticks as a substrate for the development of *Borrelia burgdorferi* (strain G39/40)”. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72.3, Data prevista para publicação: agosto de 2012.

REZENDE, J.; FONSECA, A. H.; RIBEIRO, M. F. B. Ocorrência e isolamento de *Trypanosoma* sp. em hemócitos de *Rhipicephalus microplus* cultivados *in vitro*. In: **XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010, Campo Grande/ MS**. Cdrom: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Campo Grande/ MS, 2010.

REZENDE, J.; RANGEL, C. P.; SILVEIRA, J. A. G.; FONSECA, A. H. Diagnóstico por *nested-pcr* de *Anaplasma* sp. a partir da raspagem de lâminas coradas dos hemócitos de *Rhipicephalus microplus* cultivados *in vitro*, In: **XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010, Campo Grande/ MS**. Cdrom: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Campo Grande/ MS, 2010.

RIBEIRO, M. F. B.; BASTOS, C. V.; VASCONCELOS, M. M. C.; PASSOS, L. M. F. *Babesia bigemina*: *In vitro* multiplication of sporokinetes in *Ixodes scapularis* (IDE8) cells. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 1, p. 192-195, 2009.

RIEK, R. F. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal Agricultural Research**, v. 15, n. 1, p. 802-821, 1964.

RIEK, R.F. The life of *Babesia argentina* (Lignières, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus* (canestrini). **Australian Journal Agricultural Research**, v. 17, p. 247-254. 1966.

RISTIC, M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. CRC Press, Inc, Boca Raton. 1988. 253p.

RISTIC, M.; SMITH, R. D.; KAKOMA, I. Characterization of *Babesia* antigens derived from cell cultures and ticks. In: **Babesioses**, Ristic, M.; Kreir, J. P. Ed. Academic Press, New York,1981, 337p.

RISTIC, M.; SMITH, R. D.; KAKOMA, I. Characterization of *Babesia* antigens derived from cell cultures and ticks. In: **Babesioses**, Ristic, M.; Kreir, J. P. Ed. Academic Press, New York, 1981, 337p.

RISTIC, M.; JAMES, S. M. Immunization against Babesia. In RISTIC, M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. CRC Press, Inc, Boca Raton. 1988. 163-189p.

RODRIGUEZ, S. D.; BUENING, G. M.; GREEN, T. J.; CARSON, C. A. cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. **Infection and Immunity**, v. 42, n. 1 p. 15-18, 1983.

ROMOSER, W.S. **The Science of entomology**. Mac Millan Publishers Co. inc. New York, 1973, 449 p.

RUDZINSKA, M. A; SPIELMAN, A.; LEWENGRUB, S.; TRAGER, W.; PIESMAN't, J. Sexuality in piroplasms as revealed by electron microscopy in *Babesia microti* (syngamy). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, p. 2966-2970, 1983.

SIDOROV, V.E.; KOKORIN, I.N.; MISKAROVA, E. D. Functional and morphological characteristics of primary culture of hemocytes of the argasid tick *Alveonassus lahorensis* (Argasidae). **Parazitologiya**. v.13, n.2, p.129-133, 1979.

SCHUSTER, F.L. Cultivation of Babesia and Babesia-Like Blood Parasites: Agents of an Emerging Zoonotic Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n. 3, p. 365–373, 2002.

SHIKANO, S.; NAKADA, K.; HASHIGUCHI, R.. SHIMADA, T.; ONO, K. A short term *in vitro* cultivation of *Babesia rodhaini* and *Babesia microti*. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 57, p.955–957, 1995.

SMITH, R. D.; JAMES, M. A.; RISTIC, M.; AIKAWA, M.; VEGA, C. A. Bovine babesiosis: protection of cattle with culture-derived soluble *Babesia bovis* antigen. **Science**, v.212, p.335,1981.

STEWART, N.P.; DALGLIESH, R.J.; DE VOS, A.J. Effect of different methods of maintenance on the development and morphology of *Babesia bigemina* in the gut of *Boophilus microplus*. **Research Veterinary Science**, v.40, p. 94-98, 1986.

STEWART, N.P.; Differences in the life cycles between a vaccine strain and an unmodified strain of *Babesia bovis* (Babes, 1889) in the tick *Boophilus microplus* (Canestrini), **Journal Protozoology**, v. 25, p.497-501, 1978.

SONENSHINE, D. E. **Biology of Ticks**. Publisher Oxford University Press, New York, 1991, v. 1, p. 159-185.

THOMFORD, J. W.; CONRAD, P. A.; TELFORD BI S. R.; MATHIESEN, D.; BOWMAN, B. H.; SPIELMAN, A.; EBERHARD, M. L.; HERWALDT, B. L.; QUICK, R. E.; PERSING, D. H. Cultivation and phylogenetic characterization of a newly recognized human pathogenic protozoan. **Journal Infectology Disease**, v.169, v.1050–1056, 1994.

- UILENBERG, Q. Highlights in recent research on tick-borne diseases of domestic animals. **Journal Parasitology**, v.74, n.4, p.485-491, 1986.
- 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 Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p.1163-1169, 2007.
- VANZINI, V.R.; RAMIREZ, L.M. Babesiosis y anaplasmosis bovina – diagnóstico, epidemiología y control. **Veterinaria Argentina**, n.25, v.3,p.137-190, 1995.
- 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.
- VEGA, C. A.; BUENIG, G. M.; GREEN, T. J.; CARSON, C. A. *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. **American Journal Veterinary Research**, v. 46, n. 2, p. 416-420, 1985.
- WHARTON, R. H. RETROSPECT: Entomology and Animals. IN: **Changing Patterns in Entomology**, Queensland /Australia, 1974, 18-26 p.
- WEYER, F. Explantationsversuche bei Lausen in Verbindung mit der Kultur von Rickettsien. Cblatt Bakt. **Parasitenk. Infektionskr**, v. 159, p.13-22, 1952.
- WRIGHT, I, G., Osmotic fragility of erythrocytes in acute *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infections in splenectomized Bos Taurus calves, **Research Veterinary Science**, v. 15, p.299, 1973.
- YOUNG, A. S.; MORZARIA, S. P. Biology of *Babesia*. **Parasitology Today**, v. 2, n. 8, p. 211-219, 1986.
- YUNKER, C.E., 1987. Preparation and maintenance of arthropod cell cultures: Acari, with emphasis on ticks. In: Yunker, C.E. Arboviruses in arthropod cells *in vitro*. Boca Raton, Florida. pp. 35-51.
- YUNKER C. E, CORY J, MEIBOS H. Tick tissue and cell culture; applications to research inmedical and veterinary acarology and vector-borne disease- In: **Acarology VI**, v. 2., p. 1082-1088, 1984.
- YUNKER, C. E., CORY, J.; MEIBOS, M. Continuous cell lines from embryonic tissues ticks (acari:Ixodidae). **In vitro**, v. 17, p. 139-42, 1981.
- ZWEYGARTH, E.; VAN NIEKERK, C. J.; WAAL, DE T. Continuous *in vitro* cultivation of *Babesia caballi* in serum-free medium. **Parasitology Research**,v.85, p.413–416, 1999.
- ZWEYGARTH, E.; LOPEZ-REBOLLAR, L. M. Continuous *in vitro* cultivation of *Babesia gibsoni*. **Parasitology Research**, v.86, p.905–907, 2000.