

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Cultura celular aplicada à detecção e isolamento de vírus e riquetsia presentes em carrapatos.

Leandro da Rocha Silva

Prof. Dr. Jonny Yokosawa
Instituto de Ciências Biomédicas

Uberlândia – MG
Novembro/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Cultura celular aplicada à detecção e isolamento de vírus e riquetsia presentes em carrapatos.

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Novembro/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Cultura celular aplicada à detecção e isolamento de vírus e riquetsia presentes em carrapatos.

Leandro da Rocha Silva

Prof. Dr. Jonny Yokosawa
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em / /

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos
Coordenador do curso de Biotecnologia

Uberlândia – MG
Novembro/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Cultura celular aplicada à detecção e isolamento de vírus e riquetsia presentes em carrapatos.

Leandro da Rocha Silva

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota:

Uberlândia – MG
Novembro/2017

RESUMO

O trabalho em questão visa padronizar técnicas para a implementação da cultura celular no isolamento de vírus e riquetsias provenientes de carrapatos. O experimento foi realizado com células de linhagem Vero as quais foram inoculadas com macerados, filtrados dos macerados e saliva de carrapatos das espécies: *Amblyomma ovale*, *Amblyomma sculptum* e *Rhipicephalus sanguineus*. Após isso, as placas foram incubadas em temperaturas de 37°C e 28°C, para o isolamento de vírus e *Rickettsia*, respectivamente, sendo observadas por um período de até 10 dias para a identificação de possíveis efeitos citopáticos (CPE) nas placas incubadas a 37°C e a realização do método de coloração de Gimenez para as placas incubadas a 28°C. Com relação às amostras de macerados e de saliva inoculadas, não foram observadas alterações na morfologia celular e a presença de *Rickettsia*, com exceção das células inoculadas com o macerado de *Amblyomma ovale*, as quais possivelmente apresentaram *Rickettsia bellii*, uma vez que o carrapato utilizado apresentou este patógeno no teste de hemolinfa. Assim, provavelmente os carrapatos utilizados não apresentavam vírus e/ou riquetsias ou, se os apresentavam, as células eram refratárias a eles, ou ainda a replicação viral não causou efeito citopático. Em conclusão, a implementação de cultura celular para inoculação de macerados ou saliva de carrapatos foi realizada com sucesso. A filtração do macerado se mostrou importante, pois reduziu a formação de agregados celulares e mortalidade celular, enquanto que a saliva não produziu essas alterações, essa implementação será importante para o isolamento de vírus e riquetsia presentes em carrapatos.

Palavras-Chave: Cultura Celular – Flavivírus – *Rickettsia sp.* – Carrapatos - Saliva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Carrapatos e sua morfologia.....	1
1.2 Espécies alvo.....	3
1.3 Microrganismos carreados por carrapatos.....	5
2. OBJETIVOS.....	8
2.1 Objetivos Gerais.....	8
2.2 Objetivos Específicos.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 Carrapatos.....	9
3.2 Saliva.....	9
3.3 Manutenção Celular.....	10
3.4 Preparo do macerado.....	10
3.4.1 Sanitização e corte dos carrapatos.....	10
3.4.2 Maceração das metades de carrapatos.....	11
3.5 Inoculação do macerado de carrapatos em cultura de células.....	11
3.6 Inoculação da saliva de carrapatos em cultura de células.....	12
4. RESULTADOS.....	12
5. DISCUSSÃO.....	16
6. CONCLUSÃO.....	18
7. REFERÊNCIAS.....	19

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carrapatos e sua morfologia

Carrapatos são ectoparasitas os quais estão inclusos no filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acari e subordem Ixodida, sendo que esta é dividida em três famílias: Argasidae, Nuttallielidae e Ixodidae (MATHIAS, 2013). Características básicas da classe são a ausência de antenas e asas e presença de quelíceras, palpos, quatro pares de pernas e corpo dividido em cefalotórax e abdome (Figuras 1 e 2). As larvas de carrapatos se diferenciam por não possuírem o quarto par de pernas e as ninfas por não possuírem abertura genital e ornamentações nos escudos, diferentemente dos indivíduos adultos. Os ixodídeos possuem escudo dorsal e peças bucais projetadas à frente, além de serem considerados carrapatos de corpo duro, que os diferencia das outras famílias (ANDREOTTI; KOLLER; GARCIA, 2016).

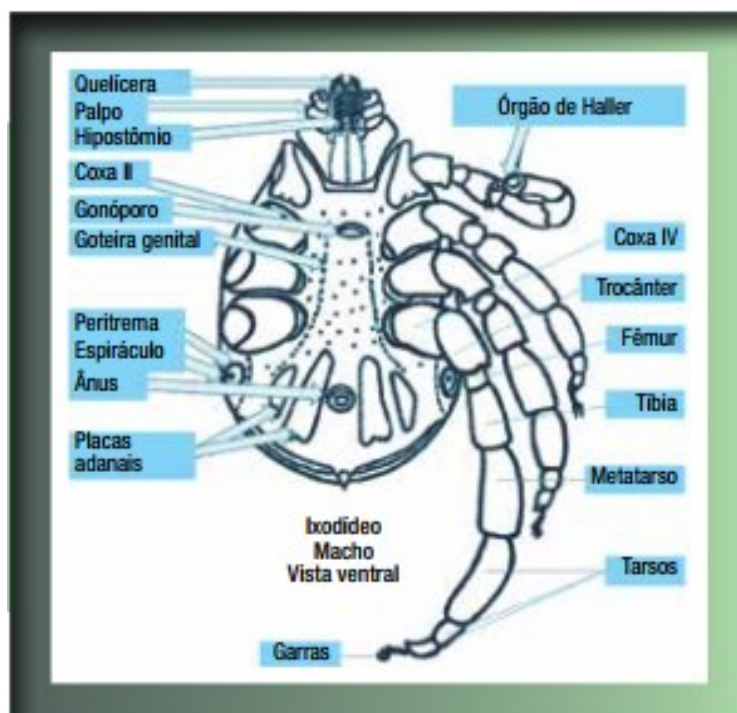


Figura 1 – Morfologia externa básica ventral de Ixodídeo adulto. Fonte: ANDREOTTI; KOLLER, 2016.

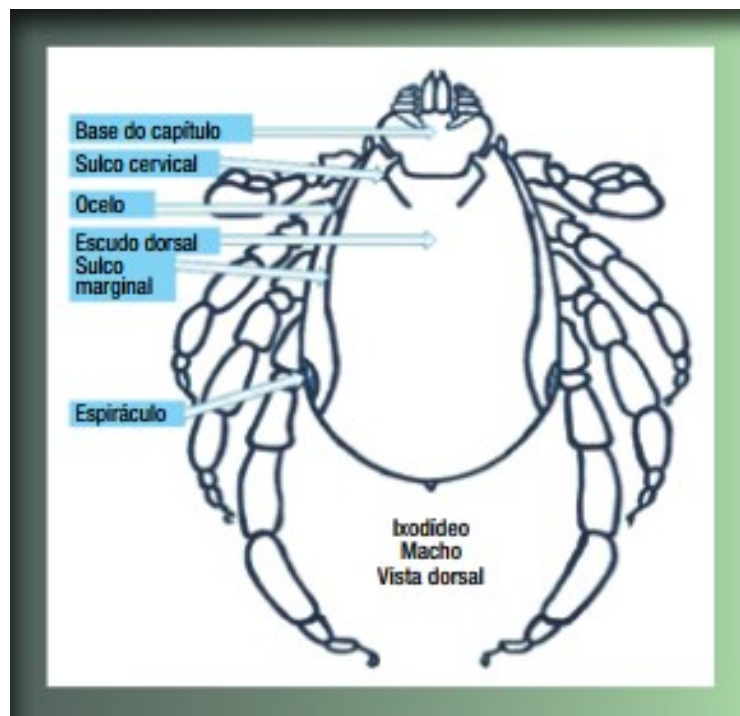


Figura 2 – Morfologia externa básica dorsal de Ixodídeo adulto. Fonte: ANDREOTTI; KOLLER, 2016.

Esses ectoparasitas, assim como outros, são hematófagos, isto é, alimentam-se exclusivamente de sangue. As glândulas salivares desses artrópodes são órgãos vitais para seu sucesso biológico e estão presentes em fêmeas e machos (MATHIAS, 2013). A saliva produzida por essas glândulas possui uma mistura complexa e atua como agente vasodilatador, anticoagulante, anti-inflamatório e imunossupressor (FAWCETT; BINNINGTON; VOIGHT, 1986). Como essa substância encontra-se em contato direto com o hospedeiro infere-se que agentes patogênicos possam ser transmitidos por meio dessa, incluindo vírus e bactérias como, por exemplo, a *Rickettsia rickettsii*, bactéria causadora da febre maculosa em humanos (SANGIONI, 2005).

1.2. Espécies alvo

Carrapatos foram os primeiros artrópodes a serem estabelecidos como vetores de patógenos e, atualmente, junto aos mosquitos, são considerados os principais transmissores de agentes infecciosos para humanos e animais (DANTAS-TORRES; CHOMEL; OTRANTO, 2012).

Muitos mamíferos selvagens como, por exemplo, capivaras são, muitas vezes, parasitados por carrapatos, e vivem em próximo contato com gado, equinos e animais domésticos, podendo compartilhar esses mesmos carrapatos, o que oferece um grande risco de transmissão de zoonoses ao homem (FIGUEIREDO et al., 1999). Carrapatos do gênero *Amblyomma* possuem uma grande distribuição pelo continente americano, incluindo, o Brasil, sendo que, em áreas periféricas urbanas é recorrente a presença de *Amblyomma spp.* (MASSARD; FONSECA, 2004).



Figura 3 - *Amblyomma sculptum*. Fonte: <https://www.flickr.com/photos/22824835@N07/33213228461/>.

A espécie *A. sculptum* (Figura 3) encontra-se amplamente distribuída no continente americano e no Brasil, em maior frequência nas regiões centro-oeste e sudeste. Os principais hospedeiros desta espécie no país são os equinos, os quais podem apresentar-se parasitados por mais de 50 mil larvas, 12 mil ninfas ou 2 mil adultos do ácaro, sem que a vida do hospedeiro esteja em risco (LABRUNA, 2000). O *A. ovale* (Figura 4) é uma espécie de hábitos silvestres no Brasil e, conseqüentemente, é raramente encontrado em regiões urbanas. Todavia, animais como cães, presentes em áreas rurais ou até mesmo em periferias, podem ser hospedeiros desta espécie, uma vez que essa espécie se alimenta exclusivamente de carnívoros (ARAGÃO; FONSECA, 1961).



Figura 4 - *Amblyomma ovale*. Fonte: <http://www.flickrriver.com/groups/ticks/pool/interesting/>.

R. sanguineus (Figura 5) é uma espécie também conhecida por carrapato marrom do cão ou carrapato do canil, sendo a de maior distribuição geográfica mundial dentre todas as outras. (DANTAS-TORRES, 2008). Em cães, tanto domésticos quanto os de rua, é bastante comum a infestação por *Rhipicephalus sanguineus* (MASSARD; FONSECA, 2004). Devido à sua ampla presença, o transporte desse ectoparasito é bastante facilitado e, apesar de seu

principal hospedeiro ser o cão doméstico, o carrapato pode ser encontrado em uma diversidade grande de animais silvestres e domésticos, quando esses animais mantêm estreita relação com os cães (WALKER; KEIRANS; HORAK, 2000). A grande preocupação encontra-se devido ao fato de também parasitarem humanos, em virtude de seu recorrente contato com os cães. (DANTAS-TORRES et al., 2006).



Figura 5 - *Rhipicephalus sanguineus*. Fonte: <http://labs.russell.wisc.edu/wisconsin-ticks/rhipicephalus-sanguineus/>

1.3. Microrganismos transmitidos por carrapatos

Os carrapatos podem transmitir vírus e bactérias por um longo período de tempo e, devido à sua grande longevidade, tais patógenos podem ser transmitidos para diferentes vertebrados, pois esses ectoparasitas possuem uma diversa gama de hospedeiros (LABUDA; NUTTALL, 2004). Sendo assim, patógenos veiculados por carrapatos causam inúmeros problemas para a saúde pública, uma vez que esses artrópodes possuem uma distribuição geográfica grande (WALKER, 1998).

Os microrganismos presentes em carrapatos são de uma variedade muito grande incluindo: bactérias do gênero *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi*, vírus e bactérias intracelulares

obrigatórias como, por exemplo, as do gênero *Rickettsia*, que inclui algumas espécies que podem causar a febre maculosa (PADDOCK et al., 2004). Carrapatos usualmente transmitem esses patógenos por meio de picadas, excrementos ou líquido coxal. A falta de informação sobre patógenos transmitidos por esses ectoparasitas pelos profissionais de saúde pode levar ao agravamento das doenças causadas por esses agentes (BRAVECTO).

O agente causador da febre maculosa no Brasil (FMB) é principalmente a *Rickettsia rickettsii* (Figura 6), única espécie, até o momento, isolada de humanos doentes (GALVÃO et al., 2005; LABRUNA et al., 2009). Até os anos 2000, apenas três espécies do gênero *Rickettsia* eram conhecidas na América do Sul: a *Rickettsia prowazekii*, a *Rickettsia typhi* e a *Rickettsia rickettsii*. Atualmente, já foram descritas pelo menos sete novas espécies, sendo essas: *R. parkeri*, *R. felis*, *R. massiliae*, *R. amblyommi*, *R. rhipicephali*, *R. bellii* e *R. andeanae* (SOUZA, 2011). As principais regiões afetadas por essa doença são os estados de Minas Gerais e São Paulo. A *Rickettsia* causadora da FMB é transmitida principalmente por carrapatos do gênero *Amblyomma* (GALVÃO et al., 2003; LEMOS, 2002).

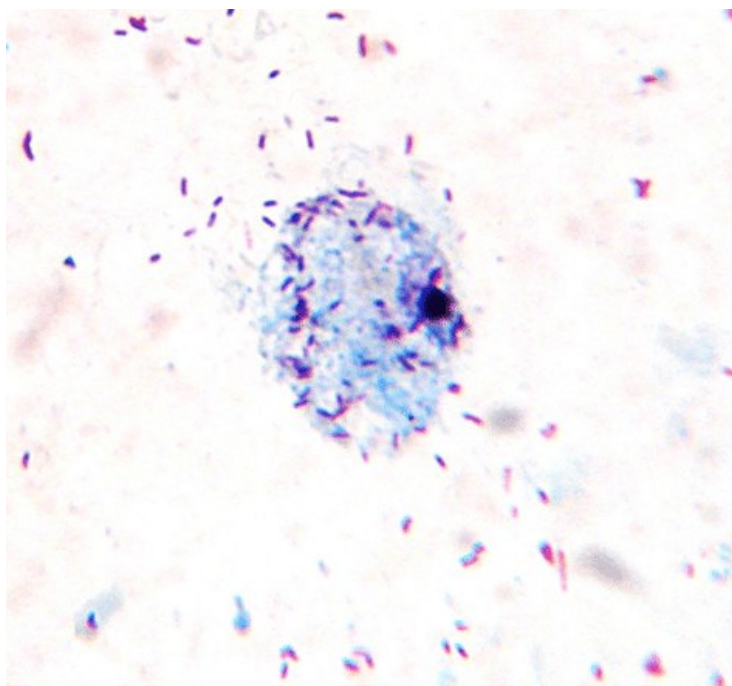


Figura 6 - *Rickettsia rickettsii* em cultura de células de linhagem Vero. Fonte: DANTAS-TORRES. 2008.

Estudos apontaram também que, dentre os vírus transmitidos por carrapatos, os membros da família *Flaviviridae*, possuem grande destaque, dado que doenças como, por exemplo, a encefalite e a febre hemorrágica podem ser causadas por esses patógenos. Somando-se a isso, existem registros relatando o isolamento de inúmeros flavivírus com patogenicidade humana ainda desconhecida (DOBLER, 2010).

O vírion de flavivírus possui aproximadamente 50 nm em diâmetro e é composto por uma fita simples positiva de RNA, empacotada em um capsídeo e por uma bicamada lipídica contendo proteínas. Esses vírus entram nas células hospedeiras por endocitose mediada por seus receptores (KUHN, et al., 2002).

As infecções causadas por esses vírus apresentam um amplo espectro clínico, podendo ser desde infecções assintomáticas a formas graves como febre hemorrágica ou encefalites (SÁNCHEZ-SECO et al., 2005). Além disso, os flavivírus podem causar doenças graves e economicamente significantes em animais domésticos e silvestres.

A maioria dos flavivírus é transmitida por mosquitos. Porém, mesmo não sendo muito conhecidos, os que são transmitidos por carrapatos também apresentam preocupação para a saúde pública, tanto em países desenvolvidos, quanto naqueles em desenvolvimento, que carecem de métodos sensíveis e confiáveis para detecção e diagnóstico das viroses causadas por esses agentes (SÁNCHEZ-SECO et al., 2005).

No Brasil, Figueiredo e colaboradores (1999) encontraram um flavivírus em *Amblyomma sculptum* coletado de uma capivara doente em Matão, SP. Segundo alguns estudos, devido ao aumento da população de capivaras em ambientes de lazer urbano, existe uma crescente preocupação no que se refere à saúde pública, devido à infestação de carrapatos nesses animais (SZABÓ; OLEGÁRIO; SANTOS, 2007; SZABÓ et al., 2008; SZABÓ et al., 2010; QUEIROGAS et al., 2010; QUEIROGAS, 2010; VERONEZ et al., 2010). De acordo com

alguns infectologistas da Faculdade de Medicina da UFU, várias pessoas que foram picadas por carrapatos em Uberlândia apresentaram sintomas semelhantes aos da doença de *Lyme*, causada pela bactéria *Borrelia burgdorferi*, patógeno que pode ser transmitido por carrapatos. No entanto, ainda não foi confirmado nenhum caso em humanos, no Brasil, dessa doença (SANTOS et al., 2010).

O isolamento de vírus em cultura celular é um método que pode facilitar a sua detecção, identificação, estudo e caracterização desses organismos, uma vez que permite a análise individual desses patógenos, já que são isolados, impedindo a interferência de outros microrganismos presentes no carrapato. Além disso, a quantidade desses patógenos em cultura pode ser bastante aumentada, facilitando assim a detecção desses por técnicas moleculares ou visualmente, por meio de alterações observáveis ao microscópio óptico que sua replicação pode provocar na morfologia das células (efeitos citopáticos).

Levando em consideração a grande quantidade de zoonoses associadas a carrapatos e a escassez de conhecimento de vírus presentes em carrapatos no Brasil, este trabalho possui como objetivo implementar a cultura celular para auxiliar na detecção e na caracterização de vírus e riquetsias potencialmente transmitidos por carrapatos por meio de isolamento em cultura celular. Essa implementação fornecerá subsídios para futuros estudos para isolamento de patógenos de carrapatos coletados de diferentes locais do país.

2. OBJETIVOS:

2.1 OBJETIVO GERAL:

Implementar a cultura celular para o isolamento de vírus e riquetsia de carrapatos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Padronizar técnicas de inoculação do macerado e da saliva de carrapatos em cultura celular;
- Padronizar técnicas de manutenção das células após a inoculação das amostras de carrapatos;
- Realizar a inoculação do macerado e da saliva de diversos carrapatos da coleção da UFU em cultura celular;
- Observar a cultura de células para possível identificação de efeitos citopáticos causados pela replicação viral;
- Realizar o método de coloração de Gimenez para a identificação de *Rickettsia sp.*

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1- Carrapatos

Os carrapatos utilizados no projeto pertenciam à outro trabalho e foram de três espécies: *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma ovale*. Os carrapatos foram coletados de diferentes cães e ambientes em Araguapaz-GO em 2014 e, após identificação da espécie por características morfológicas, armazenados a -80°C.

3.2- Saliva

A saliva utilizada em *pool* na inoculação foi proveniente dos carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, criados em colônias no Laboratório de Ixodologia da Universidade Federal de Uberlândia. Para a coleta de saliva foram realizadas infestações com três câmaras de alimentação por coelho, onde 25 fêmeas e 10 machos de carrapatos foram liberados por

câmaras. Após cerca de 7 dias, as fêmeas de carrapatos ingurgitadas foram recolhidas, limpas com uma solução de tampão fosfato bicarbonatado (PBS) e em seguida inoculadas subcuticularmente na hemocele com 10-20 µl de uma solução de dopamina a 0,2% em PBS, com o auxílio de uma agulha 12,5 x 0,33 mm. Os carrapatos foram fixados a uma fita crepe. Então, foi procedida a coleta da secreção salivar com uma pipeta automática, sendo a saliva mantida em banho de gelo. Em seguida, a saliva foi diluída 1:2 em RPMI-1640, centrifugada, filtrada (poro de 0,22 µm), aliquotizada e armazenada a -80°C até o uso.

3.3- Manutenção celular

Células de linhagem Vero (de rim de macaco verde africano) foram mantidas a 37°C e CO₂ 5% em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ou RPMI (Roswell Park Memorial Institute) contendo soro fetal bovino (SFB) 5%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml, anfotericina B 2,5 µg/ml.

3.4- Preparo do macerado

Todo o processo de preparo e inoculação do macerado foi realizado utilizando-se um protocolo adaptado especialmente para as condições do Laboratório de Virologia da UFU.

3.4.1- Sanitização e corte dos carrapatos:

Os carrapatos foram colocados em um microtubo, sanitizados com 500 µL de álcool-iodado, preparado com 8 ml de lugol, 300 ml de água destilada e 692 ml de álcool etílico 70%, e depois lavados com PBS 1x (phosphate-buffered saline). Os carrapatos foram cortados ao meio no sentido longitudinal e, com uma metade, foram realizados cortes transversais, enquanto a outra fora estocada a -80°C.

3.4.2- Maceração das metades de carrapatos:

As metades de carrapatos foram combinadas em *pools* de cinco metades e maceradas em 20 μ L de meio celular incompleto (DMEM ou RPMI), utilizando-se um pistilo. Em seguida, foram adicionados mais 180 μ L de meio incompleto ao macerado, que foi homogeneizado e inoculado em cultura de células Vero. Alternativamente, o macerado foi centrifugado a 10000 rpm por 5s à temperatura ambiente e o sobrenadante foi inoculado em cultura de células no primeiro lote celular utilizado, ou ainda o sobrenadante foi filtrado com filtro 0,45 μ m estéril antes da inoculação, no segundo lote celular utilizado.

3.5- Inoculação do macerado de carrapatos em cultura de células:

Para o isolamento dos patógenos, as células foram cultivadas em placas de 24 poços até atingirem cerca de 70% de confluência e inoculadas com o macerado de *pool* de carrapatos (Tabelas 1 e 2), utilizando o mesmo meio descrito acima, entretanto, diminuindo-se a concentração de SFB para 1%, para manutenção da placa e, para as placas de identificação de riquetsias, ausente de antibióticos.

As células inoculadas com os macerados foram incubadas por um intervalo de 1 a 3 h a 37°C (vírus) ou 28°C (riquetsia), para permitir a infecção das células por possíveis patógenos presentes nos macerados e, após esse período, os inóculos foram removidos e substituídos por meio de cultura específico para vírus ou riquetsia. Durante 10 dias de incubação, as células da placa foram observadas em microscópio óptico para a identificação de possíveis efeitos citopáticos, sendo realizada a troca do meio presente em cada poço a cada três dias. Para os cultivos em que esses efeitos fossem observados, o meio de cultura e as células seriam estocados a -80°C para detecção e identificação do vírus por meio de RT-PCR (plano de trabalho de outro/a estudante). Em adição, também foi realizada a coloração de

amostras de células pelo método de Gimenez (PINTER; LABRUNA, 2006) para identificação de riquetsias.

3.6- Inoculação da saliva de carrapatos em cultura de células:

A inoculação com saliva ocorreu de forma similar à do macerado de carrapatos, foram utilizados diferentes volumes para cada poço contendo células Vero em 70% de confluência. O protocolo de observação das placas também foi o mesmo, sendo essas monitoradas durante 10 dias para a observação de possíveis efeitos citopáticos.

4. RESULTADOS

Nessa primeira fase do experimento foram utilizados 40 carrapatos combinados em *pools* de acordo com o descrito na Tabela 1 e cada *pool* foi inoculado em dois poços de placas diferentes, uma incubada a 37°C, para isolamento de vírus, e outra a 28°C, para isolamento de riquetsia. As células inoculadas com os *pools* de macerado A a C passaram a se multiplicar de maneira lenta, havendo formação de grumos de células mortas, nenhum dos poços ultrapassou o tempo de 10 dias. Foi realizada a coloração de Gimenez com células da placa incubada a 28°C nos intervalos de 3, 6 e 9 dias e nada foi encontrado.

Tabela 1: Informações do 1º Lote de inoculação com macerados de carrapatos

Identificação dos <i>pools</i> ou amostra	Quantidade de metades de carrapatos utilizados em cada <i>pool</i>	Espécie	Hospedeiro ou de vida livre	Local
A	5	<i>R. sanguineus</i>	Cadela 'Mimi'	
B	3	<i>A. sculptum</i>	Vida livre	

C	3			Araguapaz-GO
D	4	<i>A. sculptum</i>	Cão ‘Magrão’	
E	4	<i>R. sanguineus</i>	Cadela ‘Lili’	
F	1	<i>A. ovale</i>	Cão ‘Magrão’	
G	4	<i>A. sculptum</i>	Vida livre	
H	4	<i>A. sculptum</i>	Vida livre	
I	4	<i>A. sculptum</i>	Vida livre	
J	3	<i>A. sculptum</i>	Vida livre	
K	3	<i>A. sculptum</i>	Vida livre	
L	2	<i>A. sculptum</i>	Vida livre	

Com os *pools* D e E, as células apresentaram comportamento semelhante, com formação de grumos e não sobreviveram mais que 10 dias, nenhum efeito além desses foi observado. A amostra F continha macerado da metade de um único carrapato da espécie *A. ovale*, cuja hemolinfa apresentou bactéria, possivelmente *R. bellii*. Neste caso, houve o desenvolvimento de bactérias, mesmo com a utilização de antibióticos, e as células Vero se mantiveram vivas, porém, com multiplicação alterada. Foi realizada a coloração de Gimenez com as células desse poço e o teste se mostrou positivo, possivelmente por *Rickettsia bellii*. A formação de grumos manteve-se semelhante aos inóculos anteriores, assim como a mortalidade celular.

As células inoculadas com *pools* de G a I apresentaram alteração no crescimento das células e formação de grumos, em comparação ao controle, poucas células continuaram vivas no decorrer dos 10 dias de observação. Foi realizada a coloração de Gimenez com as células da placa incubada a 28°C e nada foi encontrado.

Células inoculadas com os *pools* de J a L foram incubadas somente a 37°C. Porém, diferentemente dos outros casos, as células apresentaram uma taxa normal de multiplicação, nenhuma modificação visível e não houve formação de grumos, provavelmente devido ao fato

do inóculo ter sido previamente centrifugado e também pelas células terem sido inoculadas com uma menor quantidade de metades de carrapatos. A placa foi acompanhada durante 10 dias e depois descartada.

2º Experimento-

Os sete macerados seguintes, de M a S, os *pools* foram filtrados antes de serem inoculados em cultura celular e, com esta medida, os fragmentos de carrapatos foram removidos. As células foram incubadas somente a 37° e apresentaram pouca mudança em seu comportamento, o ritmo de multiplicação continuou normal, com a necessidade de se diminuir a concentração de SFB no meio para as células inoculadas com *pools* de P a S, não houve formação de grumos ou efeitos citopáticos e, a partir do sexto dia de observação, o número de células mortas aumentou para os *pools* de M a O.

Tabela 2: Informações do 2º lote de inoculação com macerados de carrapatos:

Identificação dos <i>pools</i>	Quantidade de metades de carrapatos utilizados em cada <i>pool</i>	Espécies	Hospedeiro ou de vida livre	Local
M	3	<i>A. sculptum</i>	Vida livre	Araguapaz-GO
N	3	<i>A. sculptum</i>	Vida livre	
O	3	<i>A. sculptum</i>	Vida livre	
P	4	<i>A. sculptum</i>	Vida livre	
Q	4	<i>A. sculptum</i>	Vida livre	
R	4	<i>A. sculptum</i>	Vida livre	
S	3	<i>A. sculptum</i>	Vida livre	

3º Experimento-

Nesta etapa, o inóculo usado foi um *pool* de saliva proveniente de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* criados em colônias no Laboratório de Ixodologia da UFU. Foram utilizadas culturas de células em placas de 6 poços e cada poço foi inoculado com um volume diferente de saliva, de acordo com a Tabela 3. Para a placa com inóculos de I a V, o tempo de incubação foi de 24 horas. A outra placa foi incubada com os inóculo por 3 dias. Em nenhuma das placas as células apresentaram modificação em relação ao controle, ou seja, o crescimento continuou constante e nenhum efeito pôde ser observado. Não houve diferença notável entre os períodos de incubação com saliva entre a primeira e a segunda placa.

Tabela 3: Informações do 3º lote de inoculação com saliva de carrapatos

Identificação dos poços	Volume (µL) de saliva inoculado por poço	Espécie	Hospedeiro	Data de coleta
I	25	<i>R. sanguineus</i>	Vida livre	2016
II	50			
III	100			
IV	150			
V	200			
VI	100			
VII	100			
VIII	200			
IX	200			
X	40			

5. DISCUSSÃO

Após a incubação com macerados de carrapatos (ou saliva), apesar de se diminuir a concentração de soro fetal bovino para 1% com o intuito de reduzir a multiplicação celular, observou-se a formação de grumos, a qual foi comum em grande parte das placas analisadas. É provável que tal ocorrência não esteja associada à proliferação de vírus ou riquetsia, mas à presença de substâncias dos carrapatos nos macerados.

A filtração prévia do macerado (2º experimento) resultou em melhora no cultivo celular, com praticamente nenhuma formação de grumos. Também foi possível notar uma maior taxa de crescimento celular do segundo lote em comparação ao primeiro lote, provavelmente devido à filtração. Algumas placas tiveram células que duraram um período maior que 10 dias. Não foi observado nenhum tipo de alteração nas células quando comparadas ao controle.

O tempo de cultivo de alguns flavivírus, como o vírus da dengue, para o aparecimento de efeito citopático é de cerca de sete dias. Nos experimentos descritos aqui, as células inoculadas com macerados ou saliva de carrapatos foram incubadas por períodos de até 10 dias e esse efeito não foi observado. Assim, é possível que os carrapatos utilizados não apresentassem vírus ou, se os apresentavam, as células eram refratárias a eles, ou ainda a replicação viral não causou efeito citopático (MARUYAMA et. al. 2014).

Com relação às células incubadas a 28°C para a identificação de *Rickettsia*, não foi possível detectar, em nenhuma das placas, por meio do método de coloração de Gimenez, a presença desses patógenos. A única exceção foi com macerado de *A. ovale*. Neste, foi possível identificar a presença de bactéria, provavelmente *Rickettsia bellii*, embora o poço apresentasse uma grande quantidade de microrganismos, o que se leva a suspeitar que uma contaminação com outra bactéria ou fungo possa ter ocorrido por manuseio e não pela inoculação do macerado propriamente dita ou ainda por bactérias presentes na microbiota do artrópode.

Existem poucos estudos os quais procuraram implementar a cultura de células no isolamento de vírus provenientes de carrapatos no Brasil. Maruyama et. al. (2014) realizaram a inoculação de macerados de carrapatos coletados de bovinos em células de linhagem Vero, C6/36, BME 26 e BHK. Após cinco dias de observação, foi possível detectar efeitos citopáticos mínimos nas células Vero, os quais desapareceram após a primeira passagem. Nenhuma das outras linhagens apresentou qualquer tipo de CPE. Roiz et. al. (2012) observaram efeitos citopáticos ao inocular macerados de mosquitos *Aedes* em células de linhagem C6/36 e, por meio de um microscópio eletrônico de transmissão, identificou partículas virais nessas, após um período de 5-7 dias da inoculação.

Com relação ao isolamento de *Rickettsia*, Szábó et al. (2013) realizaram o isolamento de duas cepas, *Rickettsia* sp. (cepa Mata Atlântica) e *Rickettsia bellii*, provenientes de *A. ovale* coletados na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, em células de linhagem Vero inoculadas com macerado desses carrapatos. As células foram monitoradas utilizando-se o método de coloração de Gimenez e, após isso, as amostras foram submetidas a PCR, sequenciadas e alinhadas por meio da análise BLAST. Em dois carrapatos foram identificadas *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, em um terceiro carrapato, detectou-se a presença de *Rickettsia bellii* e, por fim, um quarto carrapato apresentou ambas as espécies mencionadas (cepa Mata Atlântica e *R. bellii*).

A não observação de CPE neste estudo pode dever-se à ausência de vírus nos carrapatos utilizados. Todavia, analisando trabalhos pertinentes ao assunto, observa-se que a presença de efeitos citopáticos durante a replicação viral de flavivírus provenientes de carrapatos aparenta ser branda e de difícil observação (MARUYAMA et. al., 2014; ROIZ, 2012). É possível, ainda, que as células Vero sejam refratárias à replicação de muitos vírus presentes em carrapatos. Em relação à detecção de *Rickettsia*, foi possível observar em outros estudos a presença de *Rickettsia bellii*, a qual foi, possivelmente, a única espécie identificada neste

trabalho, o que pode indicar a existência dessa bactéria nos carrapatos utilizados, da espécie *Amblyomma ovale*, os quais foram provenientes de um cachorro doméstico presente no município de Araguapaz-GO.

6. CONCLUSÃO

A partir da análise dos experimentos realizados, foi possível observar que o cultivo de células Vero para a inoculação de macerados e de saliva de carrapatos foi implementado com sucesso. Com relação ao macerado de carrapatos, a filtração do seu sobrenadante antes da inoculação foi uma medida importante, pois eliminou a formação de agregados celulares e reduziu a mortalidade celular, possivelmente causados por efeitos tóxicos dos fragmentos dos ectoparasitos. Ademais, a saliva de carrapatos se mostrou uma amostra biológica com potencial para isolamento de vírus e riquetsias, uma vez que é uma substância a qual tem contato direto com o hospedeiro do ectoparasita, é uma maneira de se evitar possíveis efeitos tóxicos causados por substâncias e microrganismos presentes em outras regiões do carrapato e não provocou mudanças no comportamento celular ao ser inoculada. Como carrapatos têm grande importância na transmissão de patógenos, demandam-se maiores esforços para detecção e identificação de vírus e *Rickettsia* em carrapatos, assim como avaliar o potencial risco de sua transmissão para a espécie humana e outros animais. A cultura celular pode apresentar-se como meio facilitador do isolamento desses patógenos para sua posterior caracterização e estudo.

7. REFERÊNCIAS:

ANDREOTTI, Renato.; KOLLER, Wilson.; GARCIA, Marcos. **CARRAPATOS: Protocolos e técnicas para estudo**. Brasília: Embrapa, 2016.

ARAGAO, Henrique. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 4, p. 759-843, 1936.

ARAGAO, Henrique; FONSECA, Flávio da. Notas de ixodologia: IX. O complexo ovale do gênero *Amblyomma*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 2, p. 131-148, jul. 1961.

BRAVECTO. **Compreendendo a Transmissão de Patógenos por Carrapatos Vetores**. Disponível em: https://www.bravecto.com.br/sou_vet/SEPARATA_TECNICA.pdf

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

DANTAS-TORRES, Filipe. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v.1:25, 2008.

DANTAS-TORRES, Filipe et al. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in parasitology**, v.19, 2013.

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

DOBLER, Gerhard. Zoonotic tick-borne flaviviruses. **Veterinary microbiology**, v.140, 2010.

FAWCETT, Don W.; BINNINGTON, Keith; VOIGT, Wolf P. The cell biology of the ixodid tick salivary gland. 1986.

FIGUEIREDO, Luiz et al. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, 1999.

GALVÃO, Márcio et al. Spotted fever rickettsiosis in Coronel Fabriciano, Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.36, p. 479-481, 2003.

GALVÃO, Márcio et al. Rickettsial diseases in Brazil and Portugal: occurrence, distribution and diagnosis. **Rev Saúde Pública**, v.39, n.5, p.1-6, 2005.

KUHN, Richard et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, Pasadena, v.108, 2002.

LABRUNA, Marcelo et al. Rocky Mountain spotted fever in dogs, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v.15, n.3, p.458-460, 2009.

LABUDA, Milan et al. Tick-borne viruses. **Parasitology**, v.29, p. S221-245, 2004.

LEMOS, Elba. Rickettsial diseases in Brazil. **Virus Reviews and Research**, Rio de Janeiro, v.7, p. 7-16, 2002.

MARUYAMA, Sandra Regina et al. Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in *Rhipicephalus microplus* ticks from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 38-50, 2014.

MASSARD, Carlos; FONSECA, Adivaldo. Carrapatos e doenças transmitidas, comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v.137, p.15-23, 2004

MATHIAS, Maria Izabel. **Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos**, UNESP, 2013.

MUKHOPADHYAY, Suchetana; KUHN, Richard; ROSSMANN, Michael. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, 2005, 3.1: 13-22.

PADDOCK, Christopher et al. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clin Infect Dis**, v.38, p.812-813, 2004.

ROIZ, David et al. Detection of a new insect flavivirus and isolation of *Aedes* flavivirus in Northern Italy. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 223, 2012.

PINTER, Adriano; LABRUNA, Marcelo. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1078, 2006.

SÁNCHEZ-SECO, Paz et al. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. **J Virol Methods**, v.126, p.101-109, 2005.

SANGIONI, Luis A. et al. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 2, p. 265, 2005.

SANTOS, Monica et al. Borreliose de Lyme. **Anais Bras Dermatol**, v.85, p.930-938, 2010.

SOUZA, Luis Gustavo Antunes et al. Pesquisa de anticorpos anti-Rickettsia SPP em cães e equinos na região de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Universidade Federal de Uberlândia**, 2011.

SZABÓ, Matias et al. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. **Experimental and Applied Acarology**, v.43, p.73-84, 2007.

SZABÓ, Matias et al. Brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) parasitizing the bird *Coereba flaveola* Passeriformes: *Coerebidae* Brazilian Cerrado. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.543-545, 2008.

SZABÓ, Matias et al. Ticks (Acari: Ixodidae) on Dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.57, p.72-74, 2010.

SZABÓ, Matias et al. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest Rickettsia, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 140, n. 6, p. 719-728, 2013.

WALKER, David. Tick-transmitted infectious diseases in the United States. **Annual review of public health**, v.19, 1998.

WALKER, Jane; KEIRANS, James; HORAK, Ivan. The genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): A guide to the brown ticks of the world. Cambridge: **Cambridge University Press**, 2000. 655p.