

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Aplicação simultânea de macerado de carrapato em cultura de células, extração de DNA e RNA, para detecção de microrganismos

Ana Flávia Dutra Souza

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

Uberlândia – MG

Novembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Aplicação simultânea de macerado de carrapato em cultura de células, extração de DNA e RNA, para detecção de microrganismos

Ana Flávia Dutra Souza

Orientador: Jonny Yokosawa

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

Uberlândia – MG

Novembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Aplicação simultânea de macerado de carrapato em cultura de células, extração de DNA e RNA, para detecção de microrganismos

Ana Flávia Dutra Souza

Orientador: Jonny Yokosawa
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do
Curso de Biotecnologia em __/__/__

Coordenador: Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG
Novembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Aplicação simultânea de macerado de carrapato em cultura de células, extração de DNA e RNA, para detecção de microrganismos

Ana Flávia Dutra Souza

Aprovado pela Banca Examinadora em / / Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus por ter proporcionado ao longo de minha vida todas as oportunidades que me guiaram até o dia de hoje. Gostaria de agradecer a Ele por todas as pessoas que me deram apoio, incentivo e estiveram ao meu lado ao longo dessa jornada. Agradeço a minha família por seu amor e apoio incondicionais, aos meus amigos por sua lealdade e ao meu orientador Prof. Dr. Jonny Yokosawa por acreditar em mim como biotecnologista e também por me ensinar tanto. Por fim, sou grata por todas as experiências vivenciadas ao longo de minha graduação, que me permitiram crescer e me edificar emocionalmente e profissionalmente, fazendo de mim a pessoa da qual me orgulho hoje.

RESUMO

Carrapatos são ectoparasitas hematófagos pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acari e subordem Ixodida. Apresentam grande longevidade e carregam vírus e bactérias por um longo período de tempo. No Brasil, somente dois vírus em carrapatos foram relatados até o momento, o vírus Cacipacoré (CPCV) e o *Mogiana tick virus* (MGTV). Dessa forma, este trabalho teve como objetivo principal utilizar a cultura de células de linhagem Vero para a detecção de vírus que possam estar presentes em amostras de carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus* provenientes de hospedeiros bovinos. A metodologia aplicada visou otimizar um protocolo padrão para a utilização simultânea das amostras tanto em cultivo celular quanto em procedimentos de biologia molecular. A presença de efeito citopático (ECP) nos cultivos celulares foi observada, inferindo possível contaminação por vírus, e tal hipótese foi duplamente reforçada através de testes como extração de DNA positiva para o gene 16S e extração de RNA das células inoculadas indicando presença de segmentos de RNA ribossômico. O emprego dessa metodologia para detecção viral poderá ser vantajoso, uma vez que a detecção por métodos moleculares, como a RT-PCR, é específica para determinada (o) espécie ou gênero viral e essa especificidade demanda um conhecimento prévio que ainda é considerado precário ao se tratar de vírus presentes em carrapatos no país.

Palavras-chave: carrapatos, vírus, cultura de células

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Carrapatos	2
1.2. Vírus transmitidos por carrapatos	3
1.3. O grupo Jingmenvírus	4
1.4. Métodos de detecção	4
1.5. Justificativa	5
2. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivos Gerais	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. METODOLOGIA	6
3.1. Amostras de carrapatos	6
3.2. Maceração	8
3.3. Inoculação em Cultura Celular	8
3.4. Extração de RNA	9
3.4.1. Eletroforese	10
3.5. Extração de DNA	10
3.5.1. PCR e Eletroforese	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	11
4.1. Visualização de ECP	11
4.2. Resultados para a Extração de RNA	12
4.3. Resultados para a Extração de DNA	12
5. CONCLUSÕES	15
6. REFERÊNCIAS	16

1. Introdução

1.1. Carrapatos

Carrapatos são ectoparasitas pertencentes ao filo Arthropoda, classe Aracnida, ordem Acari e subordem Ixodida, que por sua vez compreende três famílias: Argasidae, Nuttalliellidae e Ixodidae (CAMARGO-MATHIAS, 2013). Todas as espécies de carrapatos requerem obrigatoriamente, em pelo menos uma de suas fases de vida, alimentação de sangue de vertebrados. Algumas espécies possuem ainda significativo grau de especificidade a um hospedeiro, enquanto outras infestam uma extensa variedade de hospedeiros, incluindo o homem.

Os carrapatos transmitem uma ampla gama de patógenos virais, bacterianos e protozoários, que em sua maioria podem estabelecer infecções persistentes e de longa duração no carrapato vetor e, em alguns casos, podem ainda ser transmitidos para a próxima geração. Muitas linhagens de carrapatos ixodídeos e argasídeos abrigam vírus endógenos dos quais ainda não há muitas informações presentes na literatura (BELL-SAKYI; ATTOUL, 2013)

A espécie *Rhipicephalus microplus* é comumente encontrada em áreas extensas de pastagens destinadas à pecuária bovina e, ao se fixarem nos hospedeiros, neles permanecem em média por 21 dias. Essa espécie de carrapato tem como característica ciclo de vida monoxeno, necessitando de um único hospedeiro para completar seu ciclo. (MASSARD; FONSECA, 2004).

No caso de agentes patogênicos para humanos ou para animais domésticos e silvestres, as principais doenças causadas por carrapatos são febre maculosa, babesiose, ehrlichiose, doença de *Lyme* e encefalite causada por vírus. Uma característica comum dessas doenças constitui-se no fato de mimetizarem um grande número de doenças infecciosas e parasitárias, dificultando substancialmente o diagnóstico específico e o tratamento. Tal dificuldade de diagnóstico impede que seja estabelecida a terapia apropriada no menor tempo possível, fato que corrobora para que a febre maculosa, por exemplo, seja uma doença possivelmente fatal, apresentando alta mortalidade no Brasil, quando comparado a outros países. Em geral, os sintomas clínicos comuns envolvem processo febril e anemia nos hospedeiros vertebrados (MASSARD; FONSECA, 2004; DEL FIOLE et al., 2010).

Os carrapatos possuem capacidade extraordinária como vetores de patógenos devido às seguintes características: hematofagismo, fixação profunda nos hospedeiros, ingurgitamento lento, adaptação a diferentes hospedeiros, longevidade dos diferentes

estágios de vida no ambiente e grande potencial biótico. A transmissão de patógenos pode ocorrer por meio da picada, excrementos, líquido coxal (em Argasidae) ou ingestão de carrapatos infectados (CUPP, 1991; SONESHINE; NICHOLSON; LANE, 2002).

1.2. Vírus transmitidos por carrapatos

Os vírus transmitidos por carrapatos formam um grupo variado, de duas ordens, nove famílias e pelo menos 12 gêneros (PAROLA; RAOULT, 2001), sendo que os membros da família *Flaviviridae* estão entre os mais comuns (MARUYAMA et al., 2014).

No Brasil, poucos são os relatos sobre a identificação de vírus em carrapatos. Figueiredo et al. (2017) isolaram o vírus Cacipacoré (CPCV), pertencente ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*, de *Amblyomma sculptum* (citado como *Amblyomma cajennense*) coletado de uma capivara doente em Matão, cidade do interior do estado de São Paulo, em 1997. E Maruyama et al. (2014) isolaram outro vírus, denominado *Mogiana tick virus* (MGTV), de *R. microplus* coletados de bovinos das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Posteriormente, o MGTV foi identificado como sendo membro de um grupo de vírus chamado Jingmenvírus geneticamente relacionado com vírus da família *Flaviviridae* (VILLA et al., 2017), que foi descrito em 2014, e detectado em carrapatos da mesma espécie em fazenda da região do Triângulo Mineiro (QIN et al., 2014; PASCOAL et al., 2019).

1.3. O grupo Jingmenvírus

Os vírus são considerados os agentes infecciosos mais abundantes em todos os domínios da vida, enquanto os invertebrados compreendem a maior parte do reino Animalia. Estudos metagenômicos mostraram que os invertebrados apresentam maior diversidade viral que os vertebrados, e os artrópodes são enormemente afetados. O *Jingmen tick virus* (JMTV) é um vírus recém descoberto e identificado em *R. microplus* (QIN et al., 2014). Sua organização viral é composta por quatro segmentos, dois deles relacionados com os genes que codificam proteínas não estruturais de vírus da família *Flaviridae*. Ao mesmo tempo, o MGTV, também detectado em *R. microplus*, compartilha com o JMTV cerca de 97% a 99% de identidade de seus nucleotídeos em todos os segmentos, sugerindo que podem ser da mesma espécie viral (VILLA et al., 2017). Tal

presença do grupo *Jingmenvírus* relatada em amostras de carrapato bovinos no Brasil foi de 14%, enquanto na China os primeiros relatos foram de apenas 3,44%. (QIN et al., 2018). O gênero *Jingmenvirus*, dentro da família *Flaviviridae*, foi proposto para esse grupo de vírus (LADNER et al., 2016).

1.4. Métodos de detecção viral

Os métodos mais utilizados para detecção de vírus em amostras provenientes de carrapatos incluem biologia molecular, de forma específica a extração de RNA seguida por RT-PCR. O uso da transcriptase reversa data de 1970, quando ocorreu sua descoberta em retrovírus e, desde então, vem sendo utilizada para elucidar a replicação viral e auxiliar na detecção e tratamento de doenças causadas por vírus (COFFIN et al., 2016). Entretanto, tais métodos de detecção necessitam do conhecimento prévio a respeito da sequência nucleotídica estudada e a amplificação da sequência alvo depende da formação de híbridos dessa sequência com os oligonucleotídeos utilizados.

Lançando mão de uma metodologia alternativa, Maruyama et al. (2014) utilizaram amostras de *R. microplus* e conseguiram observar a ocorrência de efeito citopático (ECP) em linhagens celulares inoculadas. A infecção pelo inóculo foi confirmada, posteriormente, por detecção molecular do vírus.

1.5. Justificativa

Existem poucos estudos publicados sobre vírus presentes em carrapatos no Brasil. A detecção de vírus de uma amostra é frequentemente realizada por meio da detecção de seu ácido nucleico, por reação em cadeia da polimerase convencional (PCR) ou por transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR). Essas metodologias, para serem aplicadas, requerem o conhecimento da sequência nucleotídica desse patógeno e a amplificação da sequência alvo depende da formação de híbridos dessa sequência com os oligonucleotídeos utilizados. Dessa forma, os testes envolvendo PCR/RT-PCR são específicos para detecção do ácido nucléico de uma espécie viral ou, em alguns casos, de vírus pertencentes ao mesmo gênero viral. Outra maneira de se detectar vírus é por meio de cultura celular. Com esta é possível observar a formação de efeito citopático durante a replicação viral e tal método de detecção independe do conhecimento de sua sequência

nucleotídica. Diante disso o uso da cultura celular é uma importante ferramenta para auxiliar na detecção viral, contribuindo assim para elucidação da presença de vírus em carrapatos.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Estabelecer uma metodologia para utilização simultânea do macerado de carrapatos na inoculação em cultura de células e na extração de DNA e RNA para detecção de microrganismos.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar o cultivo e a manutenção de células de linhagem Vero;
- Elaborar protocolo padrão para maceração de carrapatos;
- Inocular macerados de carrapatos da espécie *R. microplus*, coletados na Fazenda Experimental do Glória, *campus* Glória, espécie na qual o MGTV já foi detectado;
- Monitorar as células inoculadas por visualização em microscópio e verificar a formação de efeito citopático (ECP);
- No caso de ECP, coletar e armazenar a -80 °C o meio de cultura para a realização de um segundo inóculo posteriormente;
- Realizar extração de DNA e de RNA das amostras provenientes da maceração.

3. Metodologia

3.1. Amostras de carrapatos

Os carrapatos utilizados foram coletados na Fazenda Experimental do Glória, *campus* Glória, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Ao todo, foram coletados 20 carrapatos fêmeas adultas semi-ingurgitadas da espécie *R. microplus*, provenientes de hospedeiros da espécie *Bos taurus*, que foram classificados através de chaves dicotômicas utilizadas pelo Laboratório de Ixodologia da UFU (LabIx), descrita na Tabela 1, e foram mantidos à -80 °C até seu processamento. Para realização do protocolo de maceração, os carrapatos foram agrupados em cinco *pools* conforme descritos na tabela 1, cada *pool* contendo quatro metades de carrapatos de um mesmo hospedeiro, exceto o MIX, que

continha quatro metades de carrapatos provenientes de quatro hospedeiros distintos. As metades restantes, que não foram utilizadas no protocolo de maceração, foram armazenadas à -80 °C.

Todos os procedimentos de coleta de carrapatos em bovinos foram aprovados pela Comissão de ética na utilização de animais (CEUA), da Universidade Federal de Uberlândia, protocolo nº 068/18.

Tabela 1. Amostras de carrapatos utilizadas no experimento, classificadas de acordo com as informações sobre a coleta: fazenda, data e hospedeiro.

	Amostras	Identificação dos carrapatos (em <i>pools</i>) (local e data de coleta _hospedeiro_carrapato)
Experimento 1	149	FGL20190313_H01_01 a 04
	156	FGL20190313_H02_01 a 04
	161	FGL20190313_H03_01 a 04
	173	FGL20190313_H04_01 a 04
	MIX	FGL20190313_H01 a H04
Experimento 2	149.2	Sobrenadantes dos respectivos poços do Experimento 1
	156.2	
	161.2	
	173.2	
	MIX.2	

3.2. Maceração

Após a marcação e identificação dos microtubos, os carrapatos foram desinfetados em álcool iodado por 15 min. Dentro do fluxo laminar, os carrapatos foram lavados com tampão fosfato salino (PBS) estéril até que todo o álcool iodado fosse removido. Após, os carrapatos foram cortados ao meio no sentido longitudinal e metades de cada carrapato foram inseridas em microtubos de 2 mL contendo 8 esferas de aço de 2,8 mm de diâmetro (Loccus), juntamente com 300 µL de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Os tubos foram agitados por 3 min em aparelho de disrupção celular (Analog Disruptor Genie

– Scientific Industries) e, em seguida, centrifugados por 5 min, à 4°C e 10.000 xg. Feito isso, um volume de 125 µL do sobrenadante foi utilizado para inoculação em cultura de células Vero, outro volume de 125 µL foi utilizado para extração de RNA e o restante do macerado foi utilizado para extração de DNA.

3.3. Inoculação em Cultura Celular

O cultivo celular foi realizado com células Vero (células de rim de macaco verde africano), que foram expandidas e mantidas com meio DMEM, variando na sua concentração de soro fetal bovino (SFB) de 1 a 10%, conforme necessidade. Para cada 10 mL de meio DMEM incompleto, adicionou-se 50 µL de penicilina (5.000 Units/mL), 50 µL de estreptomicina (5.000 µg/mL), 10 µL de gentamicina (10 mg/mL), 100 µL de HEPES (1M) e 100 µL de aminoácidos não essenciais (Thermo Fisher). Com o crescimento celular eficiente, as células foram mantidas em garrafas pequenas para manutenção, garrafas médias para congelamento com dimetilsulfóxido (DMSO) ou em placas de seis poços para a realização do inóculo.

Filtrou-se 125 µL de cada sobrenadante do macerado de carrapatos, diretamente no poço da placa de cultura, utilizando-se de filtros com poros de 0,22 µm, totalizando cinco amostras inoculadas e um poço como controle negativo. Para a realização do inóculo, as células já apresentavam confluência entre 50-70%. Adicionou-se também à seringa para filtração, 375 µL de DMEM 2% SFB. Em sequência, a placa foi incubada em estufa de CO₂ 5% à 37 °C e os inóculos foram observados diariamente. O experimento foi mantido ao longo de 7 dias.

3.4. Extração de RNA

Em um novo microtubo, misturou-se 125 µL do sobrenadante do macerado com 375 µL de Trizol. As amostras foram submetidas à agitação em vortéx e, em seguida, adicionou-se 100 µL de clorofórmio à mistura. O tubo foi agitado 10 vezes por inversão e, posteriormente, as amostras foram incubadas por 3 min à temperatura ambiente e centrifugadas à 12.000 xg por 15 min à 4 °C.

A fase aquosa foi transferida para novos tubos e a esta foram adicionados 300 µL de isopropanol. O tubo foi agitado por inversão e incubado por 10 min à temperatura

ambiente. As amostras foram centrifugadas à 12.000 xg por 10 min à 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com 500 µL de etanol 75%, preparado com água tratada com DEPC (dicarbonato de dietila). Após isso, os tubos foram agitados por inversão e as amostras foram centrifugadas à 7.500 xg por 5 min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados abertos no interior do fluxo laminar por 5-10 min para secar o *pellet* e, após secagem, o RNA foi dissolvido com 20 µL de água tratada com DEPC. Em seguida, as amostras foram armazenadas à -80 °C.

3.4.1. Eletroforese

A Extração de RNA foi realizada para amostras de carrapatos provenientes da etapa de maceração e, em seguida, armazenou-se as amostras extraídas à -80 °C para utilização em outros projetos.

Realizou-se também a extração de RNA das células inoculadas, que foram tripsinizadas e armazenadas com Trizol ao fim do primeiro e do segundo experimentos. Para essas amostras, realizou-se eletroforese em gel de agarose 0,8% com 10 µL de cada amostra para verificar a presença de RNA ribossômico.

3.5. Extração de DNA

Ao tubo das esferas, que continha o restante do macerado, foram adicionados 100 µL de tampão TE modificado (Tris-HCl 10 mM, 0,1 mM EDTA, pH 8) e 450 µL de tampão GT, protocolo de Chomkzynski (1993) adaptado por Sangioni et al. (2005). As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas por 1 min em disruptor. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos. As amostras foram submetidas à agitação em vórtex intercalada com descanso por 2 minutos, e este procedimento foi repetido quatro vezes. Em seguida, adicionou-se 100 µL de clorofórmio aos tubos, estes foram agitados em vórtex e, posteriormente, as amostras foram centrifugadas à 12.000 xg por 5 min. Após centrifugação, 400 µL da fase aquosa foram transferidos para novo microtubo e misturados com 600 µL de isopropanol. As amostras foram incubadas à -20 °C por no mínimo 2 h. Em seguida, foram centrifugadas à 12.000 xg por 5 min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado, foram adicionados 800 µL de etanol 70% e uma nova centrifugação foi realizada à 12.000 xg por 10 min à 4 °C. Após isso, o sobrenadante foi

descartado, o *pellet* secou à temperatura ambiente e foi ressuspendido com 40 µL de tampão TE modificado. Por fim, os tubos foram homogeneizados com leves toques e incubados a 56 °C por 15 min. Após a extração, as amostras foram congeladas à -20 °C.

3.5.1. PCR e Eletroforese

Com as amostras provenientes da etapa de extração de DNA, realizou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de um segmento do gene que codifica o RNA ribossomal 16S, seguida de visualização em gel de agarose. O gene 16S trata-se de um gene bem conservado presente em todos os artrópodes, incluindo os carrapatos, o que justifica sua utilização para verificação de presença de DNA de carrapato nas amostras, confirmando a eficiência da extração.

4. Resultados e Discussões

4.1. Visualização de ECP

Os poços da cultura de células Vero inoculados com os macerados de carrapatos foram visualizados e comparados com o controle negativo utilizando-se de um microscópio EVOS, registrando-se imagens ao longo de uma semana. Com o passar dos dias, após o inóculo, as células aderidas e visivelmente delineadas começaram a apresentar muitas vesículas apoptóticas. Esse efeito continuou sendo observado durante os seis dias de experimento e manutenção, junto à visualização de efeito citopático e de desprendimento das células, indicando morte celular, conforme o esperado baseado no trabalho de Maruyama et al. (2014).

No controle negativo, também foi possível verificar morte celular através da observação em microscópio, entretanto, a apresentação de indícios de apoptose foi tardia quando comparada aos demais poços, reforçando a hipótese de morte celular motivada por condições distintas, neste caso, infecção viral nos poços inoculados.

No sétimo dia após o inóculo, o sobrenadante de cada poço foi transferido para microtubos que foram centrifugados e, posteriormente, tanto o sobrenadante quanto o sedimento foram armazenados, separadamente, a -80 °C. Ao sedimento contendo as células mortas, adicionou-se 375 µL de Trizol.

O sobrenadante deste primeiro experimento foi utilizado como um segundo inóculo e o novo experimento também foi acompanhado ao longo de uma semana, como mostra a Figura 1. As amostras celulares, ao longo do segundo inóculo, também apresentaram ECP e resultado semelhante ao observado durante o primeiro inóculo.

4.2. Resultados para a Extração de RNA

Após a realização da extração, realizou-se o estudo de RNA ribossômico nas amostras contendo células tripsinizadas da placa inoculada e mantidas com Trizol, após a finalização do primeiro e do segundo inóculo. Foi possível observar os RNAs ribossômicos somente de duas amostras: 161.2 e MIX, como mostra a Figura 2.

4.3. Resultados para a Extração de DNA

Utilizaram-se dois controles previamente conhecidos como positivos para o gene 16S. Como observado na Figura 3, através da eletroforese em gel de agarose, a PCR realizada mostrou resultados positivos para as cinco amostras estudadas.

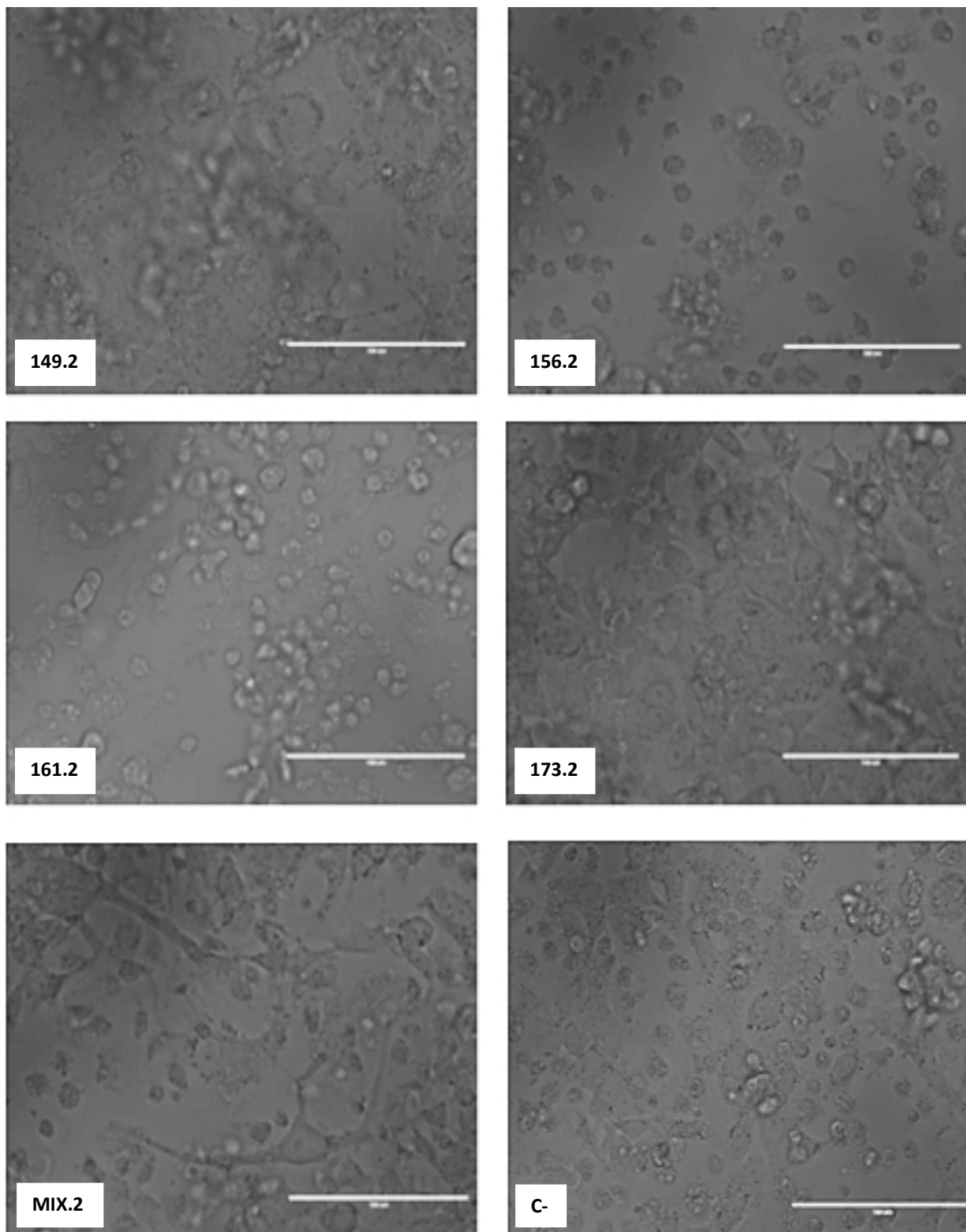


Figura 1. Amostras 149.2, 156.2, 161.2, 173.2, MIX.2 e C-, provenientes do Experimento 2, realizado com inoculação do sobrenadante da cultura de células do primeiro experimento. As imagens foram registradas utilizando-se de microscópio EVOS e aumento de 40x, uma semana após a realização do inóculo.



Figura 2. Eletroforese em gel de agarose com amostras de RNA de células inoculadas com macerados de carrapatos ou com sobrenadante da cultura de células do primeiro experimento. As setas indicam a presença de RNA ribossômico nas amostras 161.2 e MIX.

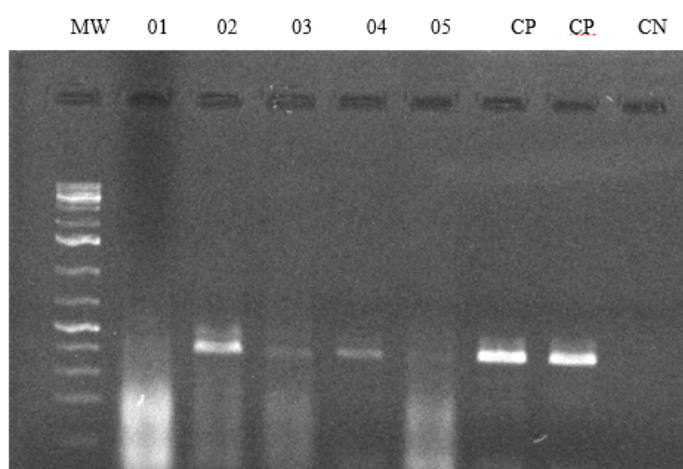


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose com produtos de PCR para o gene 16S utilizando as amostras de DNA extraídas de macerados de carrapatos. As canaletas 01, 02, 03, 04, 05, CP, CN representam, respectivamente, produtos de PCR com as amostras 149, 156, 161, 173, MIX, Controles Positivos (dois), e Controle Negativo. MW: marcador molecular 1Kb. O tamanho esperado do amplicon era de 401 pb.

5. Conclusões

Através da inoculação de macerados de carrapatos em cultura de células, foi possível observar efeitos citopáticos no cultivo, causados por possível infecção por MGTV. No entanto, a presença específica do MGTV nas amostras ocorrerá em projetos paralelos, onde a pesquisa ocorre através da aplicação da técnica de RT-PCR. Apesar de pequena quantidade, foi possível observar RNA extraído das células inoculadas e, como amostras de RNA dos macerados dos carrapatos foram extraídas paralelamente, a detecção do RNA do MGTV por RT-PCR poderá ser feita com tais amostras. Com relação às amostras de DNA obtidas, como se apresentaram com qualidade para detecção molecular, essas amostras poderão ser utilizadas para detecção de outros microrganismos também transmitidos por carrapatos.

Desta forma, foi possível otimizar um protocolo para utilização de amostras de carrapatos tanto em cultura de células quanto em testes biomoleculares. O manejo das amostras estudadas mostrou-se eficiente, garantindo a qualidade das mesmas e o sucesso dos experimentos conseguintes.

6. Referências

BELL-SAKYI, L.; ATTOUI, H. Endogenous tick viruses and modulation of tick-borne pathogen growth. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. JUL, p. 1–10, 2013.

CAMARGO-MATHIAS, M.I.S.C. **Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos**. Editora UNESP, 1 ed., p.1-121, 2013.

CHOMKZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 15:532–7, 1993.

COFFIN, J. M.; FAN, H. The discovery of reverse transcriptase. **Annual Review of Virology**. V. 3:29-51, 2016.

CUPP, E.W. Biology of ticks. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 21(1):1-25, 1991.

DEL FIOL, F. S.; JUNQUEIRA, F. M.; ROCHA, M. C. P.; TOLEDO, M. I.; BARBERATO FILHO S. A febre maculosa no Brasil. **Rev Panam Salud Publica**, 27(6): 461-6, 2010.

FIGUEIREDO, G. G. DE; AMARILLA, A. A.; SOUZA, W. M. DE; FUMAGALLI, M. J.; FIGUEIREDO, M. L. G. DE; SZABÓ, M. P. J.; BADRA, S. J.; SETOH, Y. X.; KHROMYKH, A. A.; AQUINO, V. H.; FIGUEIREDO, L. T. M. Genetic characterization of Cacipacoré virus from ticks collected in São Paulo State, Brazil. **Archives of Virology**, v. 162, n. 6, p. 1783–1786, 2017.

GONZALES, J. C.; SILVA, N. R.; FRANCO, N. **A vida livre do Boophilus microplus**. Arq. Fac. Vet. UFRGS. RG. 3: 21-28, 1974.

LADNER, J. T.; WILEY, M. R.; BEITZEL, B.; AUGUSTE, A. J.; et al. A multicomponent animal virus isolated from mosquitoes. **Cell host & microbe**, 20 (3), 357-367, 2016.

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

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

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 6, p. 897–928, 2001.

PASCOAL, J. DE O.; SIQUEIRA, S. M. DE; MAIA, R. DA C.; JUAN SZABÓ, M. P.; YOKOSAWA, J. Detection and molecular characterization of Mogiana tick virus (MGTV) in *Rhipicephalus microplus* collected from cattle in a savannah area, Uberlândia, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 1, p. 162–165, 2019.

QIN, X. C. *et al.* A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 18, p. 6744–6749, 2014.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. **Rickettsial Infection in Animals and Brazilian Spotted Fever Endemicity**. 2005.

SONESHINE, D.E; NICHOLSON, W.L.; LANE, R.S. Ticks (Ixodida). In: Mullen G, Durden L, editors. **Medical and veterinary entomology**. 1st ed. Amsterdã: Academic Press Elsevier Science; p. 517-558, 2002.

SOUZA, W. M. DE *et al.* Viral diversity of *Rhipicephalus microplus* parasitizing cattle in southern Brazil. **Nature**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

VILLA, E. C.; MARUYAMA, S. R.; MIRANDA-SANTOS, I. K. F. DE; PALACIOS, G.; LADNER, J. T. Complete coding genome Sequence for mogiana tick virus, a jingmenvirus isolated from ticks in Brazil. **Genome Announcements**, v. 5, n. 18, p. 17–18, 2017.