

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO

Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal

Íngredi Braz de Oliveira Manhães

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO *IN VITRO* DE *TRYPANOSOMA*
THEILERI E *TRYPANOSOMA THEILERI*-LIKE EM MONOCAMADA DE
CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*
(CANESTRINI) (ACARI:IXODIDAE)**

São Paulo

2019

Íngridi Braz de Oliveira Manhães

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO *IN VITRO* DE *TRYPANOSOMA*
THEILERI E *TRYPANOSOMA THEILERI*-LIKE EM
MONOCAMADA DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE
RHIPICEPHALUS MICROPLUS (CANESTRINI)
(ACARI:IXODIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da
Universidade Santo Amaro – UNISA,
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Medicina Veterinária
e Bem-Estar Animal.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili.

São Paulo

2019

Íngredi Braz de Oliveira Manhães

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO *IN VITRO* DE *TRYPANOSOMA*
THEILERI E *TRYPANOSOMA THEILERI*-LIKE EM
MONOCAMADA DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE
RHIPICEPHALUS MICROPLUS (CANESTRINI)
(ACARI:IXODIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili.

São Paulo, 08 de maio de 2019.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Jonas Moraes Filho

Prof^a. Dr^a. Fernanda Aparecida Nieri Bastos

Prof. Dr. Arlei Marcili

Conceito Final: _____

Agradecimento

Aos meus pais,
Carlos e Ivaneide,
que me ensinaram o valor de cada conquista,
que sempre me incentivaram, confiaram e estiveram ao meu lado;

A minha irmã,
Jéssica,
pelo carinho e compreensão ao longo dessa jornada, pela
amizade de irmã e por ser essa pessoa única que completa minha vida;

Ao meu orientador,
Prof ° Dr. Arlei Marcili,
pela confiança, orientação e exemplo;

Aos professores da UNISA pela convivência agradável e ensinamentos;
Ao laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina
Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ/USP por conceder o
desenvolvimento deste projeto;

A Profª. Drª. Darci Moraes Barros-Battesti da FCAV/UNESP,
por ceder as monocamadas de células embrionárias de carrapato.

Ao Profº. Dr. Pablo Henrique Nunes da UNILA,
pela colaboração no experimento com Microscopia Confocal.

Aos colegas do mestrado UNISA e VPS/USP pela constante troca de
informações e materiais;

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico (CNPq)

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a
realização deste trabalho,

Muito obrigada!

RESUMO

Os tripanossomatídeos apresentam uma grande diversidade de hospedeiros, infectando animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens. A espécie tipo do subgênero *Megatrypanum* é *Trypanosoma theileri*, que infecta bovídeos (domésticos e silvestres) e em búfalos, foi descrita a infecção por *T. theileri*-like. Têm como vetores naturais os tabanídeos voadores e hipoboscídeos. Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas, hematófagos altamente especializados em se alimentar de mamíferos, pássaros, répteis e anfíbios. A família dos carrapatos ixodídeos é a mais importante economicamente no âmbito médico e veterinário. *Rhipicephalus microplus* é uma espécie de carrapato monoxeno que possui o bovino como principal hospedeiro. Foi realizada a avaliação do crescimento e diferenciação de *T. theileri* (CBT 114) e *T. theileri*-like (CBT 253) em monocamada de células embrionárias de *R. microplus* e em meio axênico L15. As formas amastigotas foram avaliadas pela microscopia de fluorescência com marcação de DAPI e faloidina e na microscopia eletrônica de transmissão. O cultivo de *Trypanosoma theileri* e *T. theileri*-like com células embrionárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi bem-sucedido, embora este carrapato não seja o vetor específico destes protozoários. A fim de confirmar o papel de *R. (Boophilus) microplus* como agente vetorial desses hematozoários, se faz necessário estabelecer a capacidade do carrapato em suportar o crescimento e multiplicação de *Trypanosoma*. *Trypanosoma theileri* e *Trypanosoma theileri*-like invadiram e permaneceram ativos nas culturas, propondo que possa haver a transmissão destes pelo carrapato *R. microplus*. O resultado do estudo realizado sobre estes protozoários em carrapatos, pode se tornar uma ferramenta para avaliação da adaptabilidade do hospedeiro invertebrado, bem como apresentar informações da relação parasita-hospedeiro, indo além da denominação de hospedeiro paratênico.

Palavras-chave: *Trypanosoma theileri*. *Rhipicephalus microplus*. Células embrionárias.

ABSTRACT

Trypanosomatids present a large host diversity, infecting invertebrate and vertebrate animals of virtually all orders. The type species of the subgenus *Megatrypanum* is *Trypanosoma theileri*, which infects bovids (domestic and wild) and in buffaloes, infection was described by *T. theileri*-like. They have as natural vectors the flying tabanids and hypoboscids. Ticks are ectoparasite arthropods, haematophages highly specialized in feeding on mammals, birds, reptiles and amphibians. The ixodide tick family is the most economically important in the medical and veterinary field. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a species of monoxene tick that has the bovine as the main host. The growth and differentiation of *T. theileri* (CBT 114) and *T. theileri*-like (CBT 253) in monolayer of *R. microplus* embryonic cells and in axenic L15 medium were evaluated. The amastigote forms were evaluated by fluorescence microscopy with DAPI and phalloidin labeling and in the transmission electron microscopy. The cultivation of *Trypanosoma theileri* and *T. theileri*-like with embryonic cells of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* was successful, although this tick is not the specific vector of these protozoa. In order to confirm the role of *R. (Boophilus) microplus* as a vector agent of these hematozoa, it is necessary to establish the ability of the tick to support the growth and multiplication of *Trypanosoma*. *Trypanosoma theileri* and *Trypanosoma theileri*-like have invaded and remained active in the cultures, proposing that they can be transmitted by the *R. microplus* tick. The result of the study on these protozoa in ticks can become a tool to evaluate the adaptability of the invertebrate host, as well as to present information about the parasite-host relationship, going beyond the name of paratenic host.

Keywords: *Trypanosoma theileri*. *Rhipicephalus microplus*. Embryonic cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Taxonomia dos cinetoplastídeos	12
Figura 2 - Curva de crescimento em meio axênico L15 com <i>T. theileri</i> e <i>T. theileri-like</i>	26
Figura 3 - Coloração com DAPI e faloidina em monocamada de células embrionárias de <i>Rhipicephalus microplus</i> infectada com <i>Trypanosoma theileri</i> (CBT 114) após 24 horas de infecção	27
Figura 4 - Coloração com DAPI e faloidina em monocamada de células embrionárias de <i>Rhipicephalus microplus</i> infectada com <i>Trypanosoma theileri</i> (CBT 114) após 48 horas de infecção	28
Figura 5 - Coloração com DAPI e faloidina em monocamada de células embrionárias de <i>Rhipicephalus microplus</i> infectada com <i>Trypanosoma theileri</i> (CBT 114) após 72 horas de infecção	29
Figura 6 - Coloração com DAPI e faloidina em monocamada de células embrionárias de <i>Rhipicephalus microplus</i> infectada com <i>Trypanosoma theileri</i> (CBT 114) comparativo entre os diferentes tempos de infecção...	30

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	Subgênero <i>Megatrypanum</i>	13
1.2	Os carrapatos	15
1.3	Tripanossomatídeo em Ixodídeo	19
1.4	Tecnologia de cultura em células <i>in vitro</i>	19
2	JUSTIFICATIVA	21
3	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo geral	22
3.2	Objetivos específicos	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Cultivo e manutenção dos isolados de <i>Trypanosoma theileri</i> e <i>Trypanosoma theileri</i> -like	23
4.2	Origem e manutenção das células embrionárias de carrapatos	23
4.3	Infecção da monocamada de células embrionárias de carrapato com espécies de <i>Trypanosoma</i> e microscopia de fluorescência	24
4.4	Microscopia eletrônica	25
5	RESULTADOS	26
6	DISCUSSÃO	31
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

Os tripanossomatídeos apresentam uma grande diversidade de hospedeiros, infectando animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens. Estes organismos, depois dos nematódeos, são os eucariotos que possuem a maior variedade de hospedeiros e distribuição geográfica (VICKERMAN, 1976; 1994; STEVENS et al., 2001; SIMPSON et al., 2004, 2006).

Com relação ao ciclo biológico, os tripanossomatídeos podem ser classificados como parasitas monoxênicos ou heteroxênicos e, de acordo com as formas apresentadas durante o desenvolvimento, estão distribuídos em dezoito gêneros: quatorze gêneros compreendem protozoários monoxênicos parasitas de invertebrados (*Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Argomonas*, *Blechomonas*, *Jaenimonas*, *Kentomonas*, *Lafontella*, *Lotmaria*, *Paratrypanosoma*, *Sergeia*, *Strigomonas* e *Wallacemonas*); quatro gêneros albergam espécies heteroxênicas em cujos ciclos ocorre alternância entre hospedeiros invertebrados (geralmente artrópodes hematófagos) e vertebrados (*Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*) ou entre invertebrados, insetos fitófagos, e um hospedeiro vegetal (*Phytomonas*) (WALLACE, 1966; WALLACE et al., 1983; HOARE, 1972; VICKERMAN, 1976; CAMARGO, 1998; BULAT et al., 1999; SVOBODOVÁ et al., 2007; PODLIPAEV, 1990; BORGHESAN et al., 2012; MASLOV, et al., 2013; FLEGONTOV, et al., 2013; KOSTYGOV, et al., 2014; TEIXEIRA, et al., 2011; LUKEŠ, et al., 2014; VOTÝPKA, et al., 2013, 2014; YURCHENKO, et al., 2016). Os gêneros *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas* e *Herpetomonas* são polifiléticos e necessitam de revisões taxonômicas (MERZLYAK et al. 2001; HUGHES & PIONTKIVSKA 2003; PIONTKIVSKA & HUGHES 2005; HOLLAR & MASLOV, 1997).

O gênero *Trypanosoma* pertence à Família Trypanosomatidae, que compreende protozoários flagelados pertencentes à classe Kinetoplastea (HONIBGERG, 1963), os quais levam esse nome por dispor de uma única e longa mitocôndria que se diferencia em uma organela típica, abundante em

DNA, o cinetoplasto ou kDNA (VICKERMAN, 1976 e REY, 2001). Os cinetoplastídeos juntamente com os euglenóides (ordem Euglenida), que é o grupo de flagelados de vida livre sem cinetoplasto mais próximos dos tripanossomatídeos, formam o filo Euglenozoa, no infra-reino Euglenozoa, sub-reino Eozoa, reino Protozoa (CAVALIER-SMITH, 1981, 1993, 2010). Os organismos da classe Kinetoplastea foram divididos em duas subclasses: a) Prokinetoplastina, representada pela ordem Prokinetoplastida, que compreende um parasita de peixes (*Ichthyobodo necator*) e um endossimbionte de ameba (*Perkinsiella amoebae-like*); b) Metakinetoplastina, com quatro ordens: Neobodonida, Parabodonida e Eubodonida - que integram indivíduos de vida livre e parasitas (os bodonídeos) – e a ordem Trypanosomatida, que apresenta apenas a família Trypanosomatidae, cujos membros são todos parasitas obrigatórios (Figura 1) (SIMPSON et al. 2006; STEVENS, 2008; MOREIRA et al., 2004 e DESCHAMPS et al., 2011).

As espécies do gênero *Trypanosoma* parasitam vertebrados de todas as classes (mamíferos, peixes, anfíbios, répteis e aves) com ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados (STEVENS et al., 1999). A maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos, que podem pertencer a diversas ordens e famílias, como mosquitos e moscas (Diptera), triatomíneos (Hemiptera), pulgas (Siphonaptera) e carrapatos (Parasitiforme), enquanto os parasitas de anfíbios e peixes são transmitidos por sanguessugas e insetos (HAMILTON et al., 2007, HOARE 1972, SIMPSON et al. 2006).

Morfologicamente, as espécies da família Trypanosomatidae podem se apresentar em cinco formas: amastigota, epimastigota, promastigota, tripomastigota e opistomastigota que se diferenciam conforme a fase dos ciclos vitais nos hospedeiros e distinguem-se de acordo com a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante (WALLACE, 1966).

As espécies do gênero *Trypanosoma* parasitas de mamíferos foram separadas em secções: Salivaria e Stercoraria, de acordo com o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e, conseqüentemente, com a via de eliminação das formas infectantes pelo vetor (HAAG et al., 1998; VAN DEN

ABBEELE et al., 2010; VICKERMAN et al., 1998). Os tripanossomas da Secção Salivaria, que incluem *Trypanosoma vivax* (subgênero *Duttonella*), *T. congolense* (subgênero *Nannomonas*), *T. brucei* (subgênero *Trypanozoon*) e *T. evansi* (subgênero *Trypanozoon*), são transmitidos ao seu hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo de um inseto-vetor infectado por estes, no qual o desenvolvimento do parasita é finalizado nas glândulas salivares. A secção Stercoraria compreende os subgêneros *Schizotrypanum* (espécie-tipo *T. cruzi*), *Herpetosoma* (*T. lewisi*) e *Megatrypanum* (*T. theileri*) (HOARE 1972), os quais concluem seus estágios finais no trato digestivo inferior dos hospedeiros invertebrados e, portanto, essas espécies parasitas são transmitidas por contaminação com a eliminação das formas metacíclicas pelo excremento de insetos infectados (HAAG et al., 1998; VAN DEN ABBEELE et al., 2010; VICKERMAN et al., 1998). Apenas *Schizotrypanum* se mostrou um grupo monofilético, embora ainda com controvérsias. Os subgêneros *Herpetosoma* e *Megatrypanum* se revelaram polifiléticos, confirmando que os parâmetros taxonômicos tradicionais não são suficientes para classificar os tripanossomas em subgêneros (STEVENS et al. 2001, MAIA DA SILVA et al. 2004a,b; RODRIGUES et al. 2006).

Filo	Classe	Subclasse	Ordem	Gêneros
<u>Euglenozoa</u>	<u>Kinetoplastea</u>	Prokinetoplastina	Prokinetoplastida	<i>Ichthyobodo</i> , <i>Perkinsela</i>
		Metakinetoplastina	<u>Trypanosomatida</u>	<i>Angomonas</i> , <i>Blastocrithidia</i> , <i>Blechnomonas</i> , <i>Crithidia</i> , <i>Endotrypanum</i> , <i>Herpetomonas</i> , <i>Kentomonas</i> , <i>Leishmania</i> , <i>Leptomonas</i> , <i>Lotmeria</i> , <i>Paratrypanosoma</i> , <i>Phytomonas</i> , <i>Rhynchoidomonas</i> , <i>Sergeia</i> , <i>Strigomonas</i> , <i>Trypanosoma</i> , <i>Wallacemonas</i>
			Neobodonida	<i>Actuariola</i> , <i>Azumibodo</i> , <i>Cruzella</i> , <i>Dimastigella</i> , <i>Klosteria</i> , <i>Neobodo</i> , <i>Rhynchobodo</i> , <i>Rhynchomonas</i>
			Eubodonida	<i>Bodo</i>
	Euglenoidea		Parabodonida	<i>Cryptobia</i> , <i>Parabodo</i> , <i>Procryptobia</i> , <i>Trypanoplasma</i>
	Diplonemea			
	Symbiontida			

Figura 1: Taxonomia dos cinetoplastídeos (adaptado de D'AVILA-LEVY et al., 2015).

Os tripanossomas de mamíferos foram classificados em subgêneros e espécies com base em parâmetros taxonômicos clássicos: morfologia (principalmente das formas tripomastigotas sanguíneas) e ciclos de vida nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (formas e locais de reprodução e de diferenciação). As formas sanguíneas ingeridas pelos hospedeiros invertebrados sofrem inúmeras alterações morfológicas e bioquímicas, além de estágios de replicação e diferenciação em formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (tripomastigotas metacíclicas). A via de transmissão dos tripanossomas é determinada de acordo com o local de desenvolvimento e diferenciação das formas infectantes nos hospedeiros invertebrados, que pode ser no tubo digestivo ou as glândulas salivares (HOARE, 1972). A maioria dos tripanossomas utiliza apenas uma destas vias de transmissão, exceto *T. rangeli*, que apresenta formas metacíclicas nas glândulas salivares (principal mecanismo) e, aparentemente, também no tubo digestivo (D'ALESSANDRO e SARAIVA, 1999).

1.2 Subgênero *Megatrypanum*

O subgênero *Megatrypanum* se caracteriza pela grande diversidade de espécies de tripanossomas e de seus hospedeiros mamíferos e invertebrados (BRAUN et al.; 2002). Os tripanossomas deste subgênero infectam animais domésticos e silvestres, abrangendo praticamente todas as ordens de mamíferos, incluindo diversas espécies de animais silvestres das ordens Artiodactyla (espécies de Bovidae e Cervidae são os hospedeiros mais comuns), Rodentia, Didelphimorphia, Monotremata, Chiroptera, Xenarthra e Primata (HOARE, 1972; WELLS, 1976). A espécie tipo do subgênero *Megatrypanum* é *Trypanosoma theileri* Laveran, 1902 que infecta bovídeos (domésticos e silvestres) e possui grande diversidade gênica (RODRIGUES et al., 2003; 2006). Em búfalos, foi descrita a infecção por *T. theileri*-like que

pertence a uma linhagem exclusiva destes parasitas e não é conhecida a infecção cruzada entre *T. theileri* que infecta bois e *T. theileri*-like que infecta búfalos (RODRIGUES et al., 2003; 2006).

Segundo Mott e colaboradores (2011), experimentalmente, a infecção por *T. theileri* normalmente resulta em uma parasitemia baixa, pela qual dificulta a sua visualização, visto que esses hemoflagelados vivem na corrente sanguínea bovina sem demonstrar patogenicidade (MARTINS, 2008), persistindo por pelo menos 12 semanas e quase sempre é vitalício. Morfologicamente, *Trypanosoma theileri* apresenta de 60-70 µm, extremidade anterior longa e pontiaguda, cinetoplasto médio, membrana ondulante proeminente e um flagelo (HOYTE, 1972). Possui um período de incubação variável de 1 a 3 semanas, com o sangue do animal permanecendo infectante para outros animais por longo tempo. Este fato, sugere uma inter-relação parasita-hospedeiro muito antiga, pois conforme a resposta imunológica do hospedeiro irá determina o nível de parasitemia, como o escape imunológico do parasita frente a resposta imunológica do hospedeiro (WELLS, 1976).

Infecções laboratoriais demonstraram que a transmissão de *T. theileri* ocorre pela excreção das fezes de tabanídeos, com formas tripomastigotas metacíclicas, originadas a partir da diferenciação celular (metaciclogênese) de formas epimastigotas no intestino do inseto vetor, que penetram em um novo hospedeiro, pela lesão da picada do vetor ou por abrasões da pele. Há a possibilidade, inclusive, de infecção por ingestão das fezes ou do próprio vetor pelo hospedeiro (BÖSE et al., 1987, BÖSE & HEISTER, 1993).

Formas intracelulares desta espécie de parasita foram isoladas de linfonodos e células fagocíticas do baço de bovinos infectados (WHOO et al, 1997; MOULTON & KRAUSS 1972; WELLS, 1976). Além disso, diversas observações de *T. theileri* nos linfonodos, baço, rim e cérebro, sugerem que esses possam ter sítios de ligação extravascular (WELLS, 1976; TIZARD et al., 1980; SUDARTO et al., 1990; BRAUN et al., 2002).

Embora considerados não patogênicos, estes parasitas possuem uma patogenicidade em potencial para vacas prenhes, animais com infecção concomitante por outros hemoparasitas ou parasitas gastrointestinais,

hospedeiros submetidos a intenso estresse físico e nutricional, nos quais a parasitemia se torna elevada e as infecções podem resultar em aborto e/ou morte do recém-nascido, observando uma ampla distribuição do parasita em diversos órgãos, incluindo sistema nervoso central (MANSFIELD, 1977; WARD et al., 1984; SEIFI, 1995; BRAUN et al., 2002; VILLA et al., 2008; JAIMES-DUEÑEZ et al., 2017a).

Os tripanossomas presentes no subgênero *Megatrypanum* são espécie-específicas, as quais infectam somente hospedeiros mamíferos ungulados e ruminantes (LEE et al., 2013). Tentativa de infecções cruzadas e testes com marcadores bioquímicos e moleculares comprovaram que existe especificidade entre espécies de tripanossomas deste subgênero e seus hospedeiros vertebrados mamíferos. Atualmente, são conhecidos *T. theileri* em bovinos, *T. theileri-like* em bubalinos, *T. tragelaphi* e *T. cephalophi* em antílopes silvestres, *T. melophagium* em ovinos e *T. theodori* em caprinos (HOARE, 1972; WELLS, 1976; RODRIGUES et al., 2006).

Infecções experimentais por isolados de *T. theileri* obtidos de bovino foram realizadas em ovinos, mas não apresentaram infecção cruzada entre as espécies. Tentativas de infectar bezerros com isolados obtidos de cervos também não resultaram em infecção (HOARE, 1972; WELLS, 1976; KINGSTON, MORTON, 1975).

A espécie *T. theileri* é o parasita bovino mais prevalente no mundo (HOARE, 1972; WELLS, 1976; BÖSE et al., 1993; RODRIGUES et al., 2006, 2010a,b), com exceção da Antártida (RODRIGUES et al., 2003), que possui como vetores naturais os tabanídeos voadores e hipoboscídeos e, embora ainda não bem esclarecidos, os carrapatos da família Ixodidae (SHASTRI & DESHPANDE, 1981; BRAUN et al., 2002; RODRIGUES et al., 2003; LATIF et al., 2004).

1.3 Os carrapatos

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas, hematófagos altamente especializados em se alimentar de mamíferos, pássaros, répteis e anfíbios em

todas as regiões da Terra (ANDERSON & MAGNARELLI, 2008). São capazes de transmitir microrganismos patogênicos juntamente com a saliva, ocupando segundo lugar na posição de vetores com o maior número de patógenos transmitidos ao homem, sendo superados apenas pelos culicídeos (mosquitos e pernilongos) (BALASHOV, 1972).

Pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acarina, Ordem Ixodida (SANCHES, 2013; KRANTZ & WALTER, 2009), Superordem Parasitiforme e Superfamília Ixodoidea (NAVA et al., 2009). Todas as espécies Acari: Ixodida estão agrupados em três famílias: Ixodidae, que é a família mais numerosa, composta por 692 espécies, são carrapatos duros que têm um dorso totalmente ou parcialmente coberto por quitina; Argasidae – compreende os gêneros *Argas*, *Ornithodoros*, *Otobius*, *Antricola*, *Nothoaspis* e *Carios* (GUIMARÃES et al., 2001) - composta por 186 espécies, são carrapatos moles que têm dorso sem quitina; e Nuttalliellidae, uma família monotípica, com características estruturais intermediárias entre as famílias anteriores, pouco conhecida, representada pela *Nuttalliella namaqua* Bedford, 1931 (NAVA et al., 2009) e está restrita a África (LATIF et al., 2012). Há evidências que ambos os carrapatos ixodídeos e argasídeos existam desde meados da era Paleozóica até início da Mesozóica que foram evoluindo de parasitas externos de répteis (HOOGSTRAAL, 1981).

A família dos ixodídeos é a mais importante economicamente no âmbito médico e veterinário (HEYMAN, et al., 2010), possui 5 gêneros na região neotropical: *Amblyomma*, *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis* e *Dermacentor* (DANTAS-TORRES, 2009 e MORAES-FILHO, 2013).

Rhipicephalus microplus é uma espécie de carrapato originária da Ásia (WHARTON, 1974) que se expandiu a regiões tropicais e subtropicais (entre os paralelos 32° Norte e Sul) das Américas com a movimentação do rebanho bovino junto aos colonizadores europeus (ESTRADA-PEÑA et al., 2006), abrangendo pelo menos três continentes como América, África, Ásia e Oceania (MADDER et al., 2012). No Brasil, presume-se que a sua introdução deva ter ocorrido pelo Rio Grande do Sul, no início do século XVIII, com o comércio de gado oriundo do Chile (GONZALES, 1995). Desde então, este ectoparasita

permanece amplamente distribuído em nosso país pela sua associação a criação de bovinos e bubalinos (FAMADAS & FACCINI, 1989).

Baseado em estudos morfológicos, revisões taxonômicas foram realizadas na espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Primariamente nomeado como *Haemophysalis micropla* por Canestrini em 1888, posteriormente renomeado genericamente *Boophilus microplus*, no qual o termo *Boophilus* (Curtice, 1891), de origem grega, significa “amigo do boi” e *microplus*, de origem latina, “menor” (PEREIRA, 1982); e desde 2003, por meio de análises moleculares, reclassificado por Murrell & Barker como *Rhipicephalus microplus*, considerados gêneros parafilético (*Boophilus* e *Rhipicephalus*), inserindo-o no gênero *Rhipicephalus* e subgênero *Boophilus*. Conferindo ao *Rhipicephalus microplus* a seguinte classificação taxonômica: Reino - Animalia; Filo -Arthropoda; Classe - Arachnida; Subclasse - Acari; Ordem - Ixodida; Família - Ixodidae; Subfamília - Rhipicephalinae; Gênero - *Rhipicephalus*; Subgênero – *Boophilus*; Espécie - *Rhipicephalus microplus*. Entretanto, estudos recentes realizados por Labruna e colaboradores (2009) demonstraram diferenças na morfologia, em parâmetros reprodutivos e na formação gênica entre espécimes de *R. microplus* coletados de bovinos na América e África dos coletados na Austrália, apresentando evidências da presença de duas espécies díspares de *Rhipicephalus microplus* partilhando o mesmo nome. Assim, os carrapatos da Austrália, Indonésia, Nova Caledônia, Bornéu, Sumatra, Java, Nova Guiné, Camboja e Taiti foram renomeados como *Rhipicephalus (Boophilus) australis* (ESTRADA-PEÑA et al., 2012), enquanto que América, a África e o sudeste da Ásia permanecem com *R. microplus* (NAVA et al., 2017).

O bovino representa o principal hospedeiro do *Rhipicephalus microplus*, apesar de existir registros do mesmo em outros mamíferos, aves e anfíbio (PEREIRA et al., 2008). Sendo observado por Bechara e Pereira et al. (2000) e Rocha et al (1969) infestando frequentemente cervídeos e bubalinos, indicando este último, como um hospedeiro adequado.

Essa espécie de carrapato tem um ciclo biológico monoxeno e dividido em estádios parasitário e de vida livre. A fase parasitária compreende o

período em que a larva permanece fixada ao hospedeiro, normalmente, em locais como barbeta, peito, cauda e face posterior das coxas (ATHANASSOF, 1957), que dificultem a autolimpeza e/ou que possuam temperatura cutânea entre 31°C a 38°C (PEREIRA et al., 2008); este período dura por aproximadamente 23 dias (NUÑEZ et al., 1982) e finda-se com o seu desprendimento do hospedeiro (PEREIRA et al., 2008). A fase não parasitária dura em torno de 15 dias (em condições ótimas de temperatura e umidade do ambiente) que inclui desenvolvimento pré-postura e oviposição de fêmeas ingurgitadas, incubação e eclosão dos ovos e a busca das larvas pelo hospedeiro susceptível (GUGLIELMONE, 1992; 1995 e PEREIRA et al., 2008) que, por sua vez, é localizado pelo odor, pelas vibrações, pelo sombreamento, pelo estímulo visual e pela concentração de CO² (SONENSHINE, 1993). É nesta fase que encontramos o maior número da população de carrapatos, cerca de 95% de indivíduos no ambiente (PEREIRA et al., 2008). Fatores ambientais como clima e vegetação, são determinantes para a extensão do ciclo de vida, bem como para o número de gerações por ano de *R. microplus*. Desta forma, regiões em condições climáticas ótimas de temperatura (ao redor de 25°C), índices pluviométricos e umidade do ar (em torno de 80%) são fatores que determinam a presença e potencial biótico de *R. microplus*, podendo este completar de três a seis gerações anualmente, com uma postura de 2000 a 3000 ovos por teleógina (GUGLIELMONE, 1992 e 1995).

Desde o ponto de vista econômico, *R. microplus* provoca notáveis perdas aos rebanhos bovinos e ovinos (SUTHERST et al. 1983), não apenas pela anemia nos animais causada pela sucção do sangue, pois possuem a capacidade média de sugar de 2 a 3mL de sangue do seu hospedeiro (GONZALES, 1975), mas também pela transmissão de patógenos (GUERRERO, 2014) com destaque à Tristeza Parasitária Bovina, doença causada por protozoários do gênero *Babesia* e bactérias do gênero *Anaplasma*, nas Américas Central e do Sul (GUGLIELMONE, 1995; BOCK et al. 2004; PEREIRA et al., 2008 e KOCAN et al. 2010).

1.6 Tripanossomatídeo em Ixodídeo

Estudos descreveram formas epimastigotas de *T. theileri* em *Hyalomma anatolicum* (família Ixodidae) (BURGDORFER et al., 1973; SHASTRI & DESHPANDE, 1981; MORZARIA et al., 1986; LATIF et al., 2004) e em *Rhipicephalus microplus* na região sul do Brasil (MARTINS et al., 2008). Entretanto, as formas epimastigotas não são informativas para o diagnóstico de espécie, sendo somente a forma tripomastigota sanguínea a forma capaz de segregar as espécies do gênero. Assim, tais estudos não podem afirmar que as formas encontradas são da espécie *T. theileri*, mas a presença de formas epimastigotas demonstram desenvolvimento no carrapato.

1.7 Tecnologia de cultura em células *in vitro*

O cultivo celular foi uma técnica desenvolvida no início do século XX que, em ambiente controlado, possibilita o estudo do comportamento de células animal fora do organismo, sendo muito utilizada em pesquisas laboratoriais por todo o mundo (ALVES e GUIMARÃES, 2010).

A primeira pesquisa celular ocorreu em 1907, pelo pesquisador Harrison, realizada por meio de células nervosas de embrião de sapo; em seguida, Alexis Carrel (1912) utilizou células cardíacas de embrião de galinha. Em 1962, no Japão, foi elaborada a linhagem celular VERO por Nakamura e colaboradores, a partir do rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*), intitulada como excelente pela OMS (Organização Mundial de Saúde) para o desenvolvimento de vacinas (ALVES e GUIMARÃES, 2010).

Na década de 50, houve o primeiro estabelecimento de linhagem celular de carrapato ixodídeo (*Rhipicephalus bursa*) (WEYER et al., 1952). Posteriormente, em 1973, Pudney e colaboradores subcultivaram células de *R. microplus* que duraram até vinte dias. Essa técnica proporcionou mais uma

ferramenta laboratorial importante, facilitando o estudo sobre muitos aspectos como biologia, fisiologia, relação hospedeiro-vetor-patógeno, manutenção de microrganismos, agentes vacinais e controle de carrapatos (BELL-SAKYI et al., 2007), bem como a habilidade de algumas dessas linhagens em suportar o desenvolvimento de outros microrganismos transmitidos pelo carrapato (BELL-SAKYI, 2004), dentre eles, protozoários (BHAT et al. 1979).

As principais vantagens do cultivo *in vitro*, quando comparados à experimentos com animais *in vivo*, estão na economia, na homogeneidade das amostras e no controle do ambiente, indicando esta técnica como alternativa em estudos (ALVES e GUIMARÃES, 2010).

A formação de uma monocamada de célula ou cultura primária consiste na proliferação de células aderidas à garrafa de cultivo, a partir de um tecido (vegetal ou animal) que sofreu degradação mecânica ou enzimática em ambiente controlado e com nutrientes que permitam sua sobrevivência por um determinado período de tempo (ALVES e GUIMARÃES, 2010; DO AMARAL, 2011). Em conjunto com a microscopia por varredura, que consiste na utilização de iluminação por varredura a laser, ponto a ponto, de estruturas ou moléculas geralmente marcadas com compostos fluorescentes, permitindo sua localização tridimensional (MORTARA et al., 2013), esta técnica vem sendo preconizada em pesquisas onde há a necessidade de estudar o comportamento de determinada célula *in vitro* devido à preservação de suas características genotípicas e fenotípicas (ALVES e GUIMARÃES, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

O estudo de desenvolvimento de *T. theileri* e *T. theileri*-like em monocamadas de células de uma das principais espécies de carrapatos que infestam bovinos e bubalinos no Brasil esclarecerá o papel deste ectoparasito como vetor biológico desta espécie de tripanossoma. Pois apenas a visualização das formas epimastigotas em hemolinfa de carrapato não possui caráter morfológico para segregar espécies de *Trypanosoma*. Além disto, a metodologia empregada representa um método rápido e preciso para obtenção de resultados e de baixo custo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliação da infecção por *Trypanosoma theileri* e *Trypanosoma theileri*-like em monocamada de células embrionárias de *Rhipicephalus microplus*.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a infecção através do crescimento de formas epimastigotas presentes nas células embrionárias de *Rhipicephalus microplus*;
2. Avaliar a infecção através da presença de formas amastigotas nas células embrionárias de *Rhipicephalus microplus*;
3. Comparar os resultados obtidos entre as espécies *Trypanosoma theileri* e *Trypanosoma theileri*-like nas células da espécie de carrapato *Rhipicephalus microplus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo e manutenção dos isolados de *Trypanosoma theileri* e *Trypanosoma theileri-like*

Neste estudo foram utilizados isolados depositados na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos locada no departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. O isolado de *T. theileri* (CBT 114) é proveniente do estado de Rondônia e isolado de bovino (*Bos taurus*) e *T. theileri-like* (CBT 253) de bubalino (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758) do estado do Pará.

Para a manutenção dos isolados os parasitas foram crescidos em fase sólida BAB (blood ágar acrescido de 15% sangue de carneiro desfibrinado) e fase líquida de meio LIT (liver infusion tryptose) líquido suplementado com 20% de soro fetal bovino a (28°C) (MARCILI et al., 2014). Após o crescimento em meio axênico, que consiste em cultivar apenas o protozoário referido em meio sem célula (SOUZA, 2013), as formas epimastigotas foram transferidos para monocamadas de células Vero.

4.2 Origem e manutenção das células embrionárias de carrapatos

As monocamadas de células foram padronizadas e cedidas pela Prof^a. Dr^a. Darci Moraes Barros-Battesti do departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP, Brasil.

As células foram mantidas com meio L-15 (Leibovitz's) acrescido de 20% de soro fetal bovino e mantidas a 28°C, durante 3 meses. Para controle em meio axênico L15, foi demonstrada a avaliação da curva de crescimento utilizando amostras CBT 114 e CBT 253 em triplicadas a partir da concentração de 2×10^5 no dia zero até dia 21, observadas a cada 72 horas.

4.3 Infecção da monocamada de células embrionárias de carrapato com as espécies de *Trypanosoma* e microscopia de fluorescência

Baseado em estudos anteriores com infecção experimental utilizando outras espécies de *Trypanosoma*, padronizou-se em 2×10^5 formas epimastigotas de *T. theileri* e *T. theileri*-like provenientes de monocamadas de célula Vero, para a infecção das monocamadas de células embrionárias de *R. microplus*, as quais foram avaliadas a cada 48 horas para a contagem do número de formas epimastigotas - utilizando-se de câmera de Neubauer sob microscópio de contraste de fase na objetiva 40x e com auxílio de um contador manual e raspadas para a preparação de lâminas para a avaliação da metaciclogênese durante 21 dias. Além disso, os isolados foram inoculados em meio L15 suplementados com 20% de soro fetal bovino para avaliação do crescimento em meio axênico (acelular). A infecção na monocamada foi acompanhada durante 30 dias.

Para a microscopia de fluorescência, as culturas em células embrionárias de *R. microplus* e infectadas com *T. theileri* e *T. theileri*-like foram lavadas com PBS (140mM de NaCl; 10mM de Na₂HPO₄; 1,76mM de KH₂PO₄; 2,68mM de KCl, pH 7,2) e fixadas em paraformaldeído 4%. Após este processo foram confeccionadas lâminas para a coloração com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) - marcação de ácido desoxirribonucleico - e faloidina (marcação de Actina-F) e as imagens foram obtidas pelo microscópio Nikon Eclipse TS100.

4.4 Microscopia eletrônica

Para a microscopia eletrônica de varredura, as culturas em células embrionárias de *R. microplus* e infectadas com *T. theileri* e *T. theileri*-like foram fixados em Karnovsky (v/v), em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,4) durante 2 horas, separadamente. Após esta etapa, foram fixados em 0,1% de poli-L'Lysine em lamelas e desidratados numa série ascendente de etanol e acetona (95%), e em seguida, num secador de ponto crítico (Balzers CPD 030). O material processado recebeu o recobrimento com ouro (usando Sputtrering Balzers SCD 050) e observado usando um HITACHI TM3000 escaneamento digital microscópio eletrônico.

Para a microscopia eletrônica de transmissão, após a fixação, o material foi pós-fixado em 1% v/v de tetróxido de ósmio no mesmo tampão e contrastada com acetato de uranila 0,5%, durante 12 h. A desidratação foi realizada utilizando acetona graduada e embutir usando resina EPON-araldite durante 12h a 60°C. Os cortes foram corados com acetato de uranila 1% e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) por 45 min e 10 min, respectivamente. Em seguida, eles foram observados em um equipamento Philips CM 100 TEM.

5 RESULTADOS

Os parasitas inicialmente se multiplicaram em formas epimastigotas de maneira intensa sobre o sobrenadante e aderido às células. Após 48 horas de infecção, o número de formas tripomastigotas era superior ao número de epimastigotas visualizados no sobrenadante e ocorreu diminuição gradativa do número de células embrionárias de carrapatos. A avaliação da metaciclogênese realizada no sobrenadante das células evidenciou 37,4% após 48 horas de infecção. Após 96 horas de infecção, a monocamada de células embrionárias apresentava-se lisada com apenas algumas células ainda preservadas.

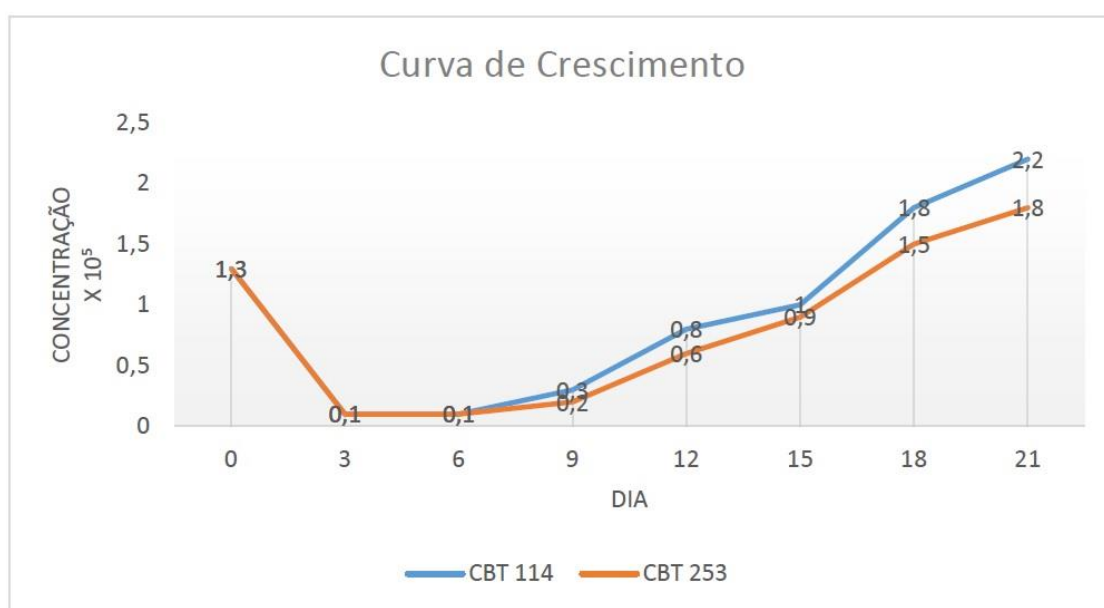


Figura 2. Curva de crescimento em meio axênico L15 com *T. theileri* (CBT 114; linha azul) e *T. theileri*-like (CBT 253; linha laranja).

A presença de formas amastigotas foi avaliada pela microscopia de fluorescência com marcação de DAPI e faloidina e na microscopia eletrônica de transmissão. Nas marcações com 24 horas de infecção verifica-se a presença de poucos amastigotas nas células (Figura 3), a presença de núcleos mais

alongados sugere a presença de tripomastigotas no interior da célula (Figura 3h) e formação de vacúolo parasitóforo (Figura 3d).

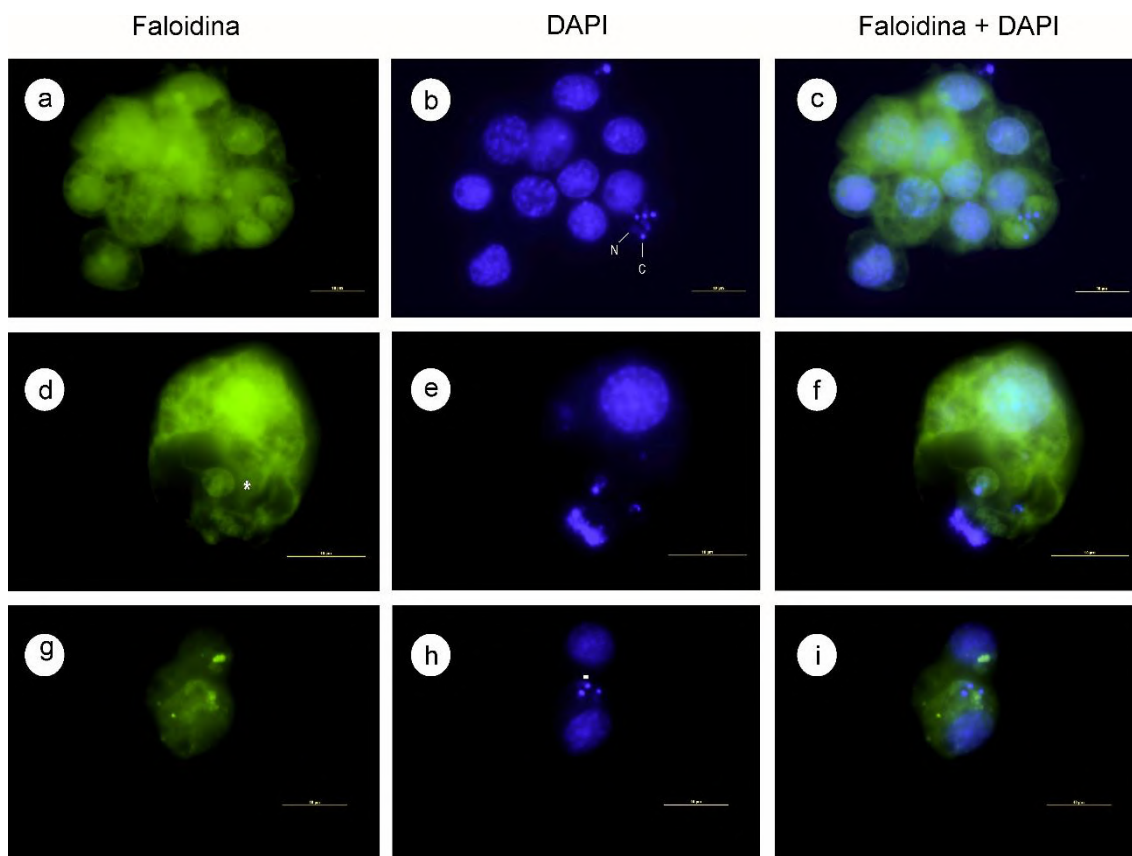


Figura 3: Coloração com DAPI e faloidina em monocamada de células embrionárias de *Rhipicephalus microplus* infectada com *Trypanosoma theileri* (CBT 114) após 24 horas de infecção. **a, d, g**, marcados com faloidina; *, indica o vacúolo parasitóforo; **b, e, h**, marcados com DAPI; □, indica a presença de forma tripomastigota; N, núcleo; C, cinetoplasto; **c**, sobreposição de **a** e **b** com ambas marcações (DAPI e faloidina); **f**, sobreposição de **d** e **e** com ambas marcações; **i**, sobreposição de **g** e **h** com DAPI e faloidina; Barras: 10 µm.

Após 48 horas de infecção, o número de amastigotas no interior da célula é superior ao evidenciado no período de 24 horas de infecção (Figura 4). Nas marcações com 72 horas há a diminuição do número de amastigotas por células (Figura 5), bem como o número de células presentes na monocamada.

O comparativo nos diferentes tempos de infecção demonstra o aumento do número de amastigotas no interior das células (Figura 6) e corroboram as observações feitas por microscopia óptica e observação da monocamada de células embrionárias.

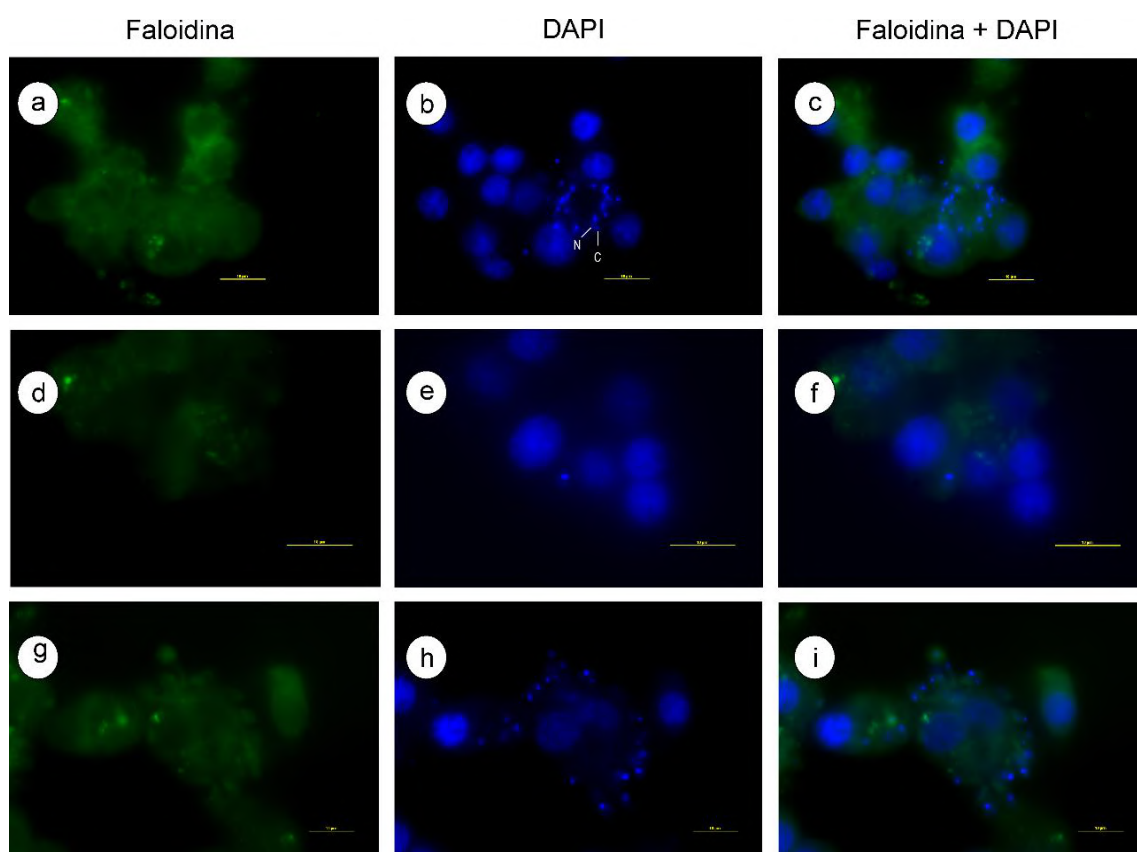


Figura 4: Coloração com DAPI e faloidina em monocamada de células embrionárias de *Rhipicephalus microplus* infectada com *Trypanosoma theileri* (CBT 114) após 48 horas de infecção. N, núcleo; C, cinetoplasto. **a, d, g**, marcados com faloidina; **b, e, h**, marcados com DAPI; **c**, sobreposição de **a** e **b** com ambas marcações (DAPI e faloidina); **f**, sobreposição de **d** e **e** com ambas marcações; **i**, sobreposição de **g** e **h** com DAPI e faloidina; Barras: 10 µm.

A curva de crescimento em meio axênico L15 realizada com *T. theileri* e *T. theileri*-like demonstrou baixo crescimento de formas epimastigotas e valores

de metaciclogênese menores (valor máximo foi de 12,3% no dia 15 da curva de crescimento) do que os apresentados na infecção na monocamada de células (Figura 2).

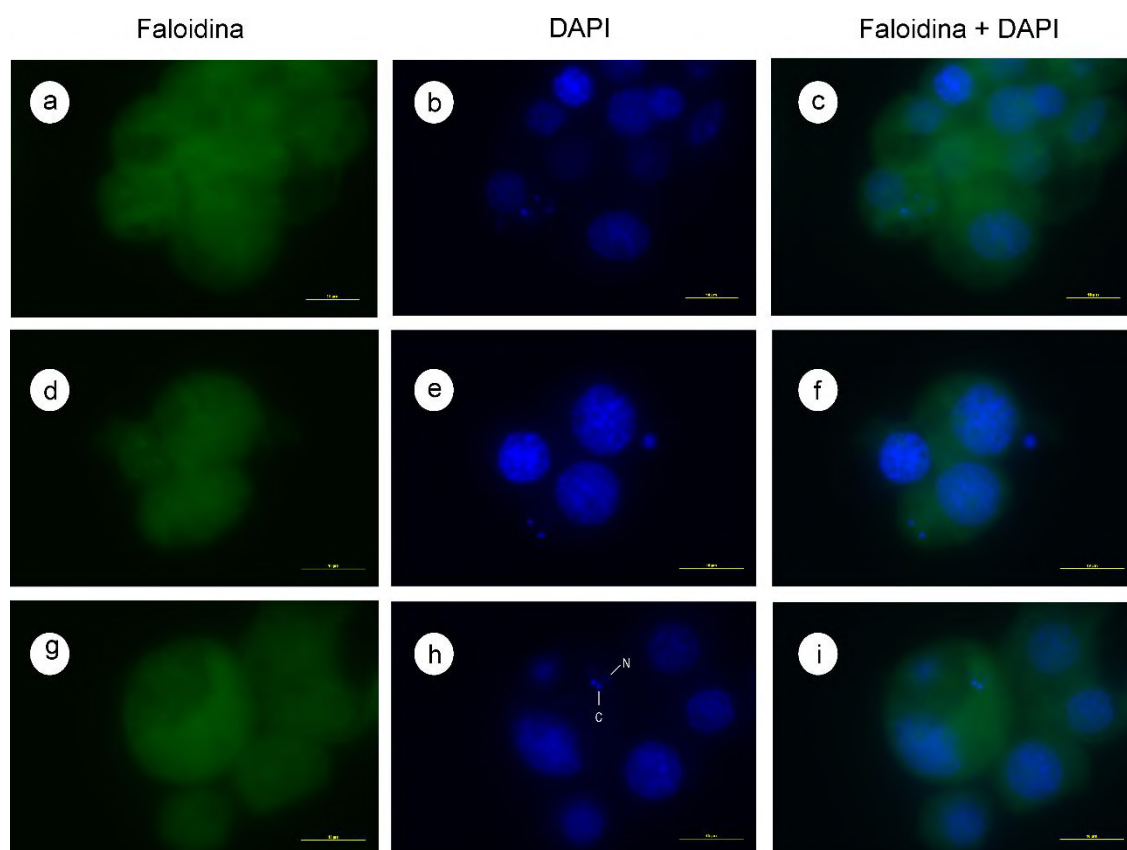


Figura 5: Coloração com DAPI e faloidina em monocamada de células embrionárias de *Rhipicephalus microplus* infectada com *Trypanosoma theileri* (CBT 114) após 72 horas de infecção. N, Núcleo; C, cinetoplasto. **a, d, g**, marcados com faloidina; **b, e, h**, marcados com DAPI; **c**, sobreposição de **a** e **b** com ambas marcações (DAPI e faloidina); **f**, sobreposição de **d** e **e** com ambas marcações; **i**, sobreposição de **g** e **h** com DAPI e faloidina; Barras: 10 µm.

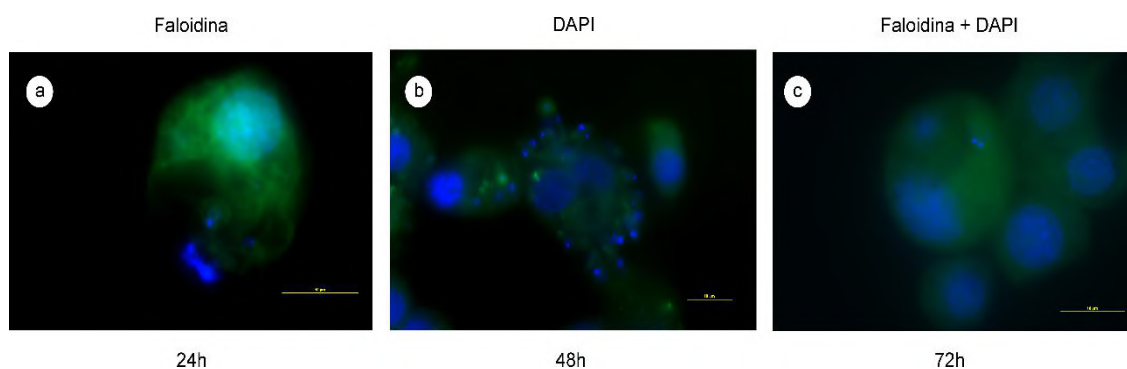


Figura 6: Coloração com DAPI e faloidina em monocamada de células embrionárias de *Rhipicephalus microplus* infectada com *Trypanosoma theileri* (CBT 114) comparativo entre os diferentes tempos de infecção.

Não houve diferenças na infecção por *T. theileri* ou *T. theileri*-like, os valores foram similares.

6 DISCUSSÃO

O cultivo de *Trypanosoma theileri* e *T. theileri*-like com células embrionárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi bem-sucedido, embora este carrapato não seja o vetor específico destes protozoários. Proliferação similar a este, foi demonstrada por Moraes (2015) utilizando células de *Amblyomma sculptum* para o crescimento de *T. theileri*, entre outros patógenos. O sucesso no desenvolvimento desses hematozoários *in vitro* em células de carrapato é mais uma evidência do potencial deste ectoparasita na transmissão de tripanossomíases animal.

Entre os artrópodes vetores de patógenos, o carrapato *R. (Boophilus) microplus* possui grande importância, devido a sua ampla capacidade de adaptação a ambientes modificados e hospedeiros (GIOVANA *et al.*, 2009). A exemplo disto, encontramos, na Índia, as espécies pertencentes aos gêneros *Hyalomma* (*Hyalomma anatolicum* e *Hyalomma marginatum isaaci*) e *Boophilus* (*B. microplus*) compreendendo 80% do total da população de carrapatos parasitando búfalos (MIRANPURI, 1988). Resultados obtidos por Manan e colaboradores (2007) indicaram o parasitismo de búfalos aquáticos, no Paquistão, de 53% pelo gênero *Boophilus* sp, 31% pelo gênero *Hyalomma* sp e 24% pelo *Rhipicephalus* sp; Enquanto que, no Brasil, a espécie *R. (B.) microplus* continua sendo uma das principais causadoras das perdas econômicas na pecuária (GIOVANA *et al.*, 2009), por carrearem patógenos de várias doenças (BROWN *et al.*, 2006; JONSSON, 2006; JONSSON *et al.*, 2008).

Fatores ligados as características biológicas do vetor, como a duração prolongada do processo de repasto sanguíneo durante o contato entre carrapato e hospedeiro vertebrado e a digestão lenta do carrapato, e alterações ambientais estão diretamente ligadas a transmissão do protozoário ao hospedeiro vertebrado. Desta forma, em sistema de produção extensivo, compartilhado entre búfalos e bovinos, torna a infecção natural de bovídeos e bubalinos favorecido, de acordo com a prevalência de ectoparasita e

protozoário (BENITEZ et al., 2012), ainda que haja características de rusticidade e adaptação presentes nos bubalinos (BASTIANETTO & BARBOSA, 2009).

Ribeiro e colaboradores (1988) encontraram formas flageladas de *Trypanosoma theileri* na hemolinfa de larvas de Ixodidae. Em *R. sanguineus* ingurgitadas foram encontradas estruturas flageladas sugestivas de organismos pertencentes à família Trypanosomatidae (SHERLOCK, 1964). Além destes, foi relatado por Balashov (1972) a ocorrência de flagelados de *Crithidia hyalommae* em ovos e hemolinfa de carrapatos *Hyalomma* e *Boophilus calcaratus*.

Experimentalmente e de forma eventual, Brumpt (1949) sugeriu que carrapatos ixodídeos poderiam mecanicamente transmitir tripanossomas da secção stercoraria (*Trypanosoma cruzi*) por meio de regurgitação após a ingestão de uma grande quantidade de flagelados (DIAS, 2011), ou pela ingestão acidental do artrópode infectado (PESSÔA & MARTINS, 1977).

Além deste, a observação de Camargo e colaboradores (2004) sugerindo carrapatos como vetores alternativos na transmissão de *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*, inclui a possibilidade desse artrópode (neste caso, o carrapato *Amblyomma cajennense*) estar envolvido na transmissão de *T. evansi* de capivaras para equinos (FIGUEIREDO et al. 1999). Lopez et al. (1979), por meio de transmissão experimental, pesquisaram a possibilidade de *Boophilus microplus* ser um potencial vetor de transmissão de *T. vivax*, porém isto não ficou bem estabelecido.

A indução da transformação de formas tripomastigotas em amastigotas por sua exposição ao pH ácido tem sido mimetizada *in vitro* como forma de obtenção de formas replicativas do parasito em meio axênico. Este processo é iniciado quando as formas tripomastigotas penetram na célula hospedeira, por meio do vacúolo parasitóforo, o qual acidifica o ambiente e estimula a migração do parasita para o citoplasma e com isso o início do processo de transformação. (ANDRADE & ANDREWS, 2005; YOSHIDA, 2006). A partir desse princípio, demonstramos que *Trypanosoma theileri* e *Trypanosoma theileri*-like invadiram e permaneceram ativos nas culturas, propondo que

possa haver a transmissão destes pelo carrapato *R. microplus*. Tal evidência foi visibilizada em experimento utilizando *Trypanosoma theileri* em células embrionárias de *Amblyomma sculptum* (MORAES, 2015). E experimentalmente, por Lee e colaboradores (2013), utilizando células de mamíferos BHK (célula renal de filhote de hamster) e H9c2 (mioblastos cardíacos de rato) entre outras, nas quais relataram que formas tripomastigotas metacíclicos e amastigotas extracelulares, liberadas prematuramente de células infectadas ou geradas pela diferenciação extracelular de *T. theileri*, foram capazes de invadir a célula hospedeira, cujo o processo é muito semelhante ao do *T. cruzi*.

A fim de confirmar o papel de *R. (Boophilus) microplus* como agente vetorial desses hematozoários, se faz necessário estabelecer a capacidade do carrapato em suportar o crescimento e multiplicação de *Trypanosoma*. *Trypanosoma theileri* e *Trypanosoma theileri*-like invadiram e permaneceram ativos nas culturas, propondo que possa haver a transmissão destes pelo carrapato *R. microplus*. O resultado do estudo realizado sobre estes protozoários em carrapatos, pode se tornar uma ferramenta para avaliação da adaptabilidade do hospedeiro invertebrado, bem como apresentar informações da relação parasita-hospedeiro, indo além da denominação de hospedeiro paratênico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. A; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E M; CAPUTO, L. F. G; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. v.2. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. p. 215-253.
- ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of ticks. Infect. Dis. Clin. North Am. 22(2), p.195–215, 2008.
- ANDRADE, L.O.; ANDREWS, N.W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. Nature Reviews Microbiology. 2005 Oct;3(10):819-23.
- ATHANASSOF, N. Manual do criador de bovinos: a fazenda de criar raças e tipos, alimentação, criação, engorda, produção de leite, trabalho, higiene e moléstias. 6. ed. rev. ampl. São Paulo: (Biblioteca Agronômica Melhoramentos), 1957, 818 p.
- BALASHOV, Y. S. A translation of bloodsucking ticks (Ixodoidea)-vectors of diseases of man and animals. Misc. Publicat. Entomol. Soc. Am., v.8, p.159-376, 1972.
- BARKER S. C., MURRELL, A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. Experimental and Applied Acarology v.28, p.55-68, 2002.
- BASTIANETTO, E. & BARBOSA, J. D. Diferenças Fisiológicas entre Bubalinos e Bovinos: Interferência na Produção. Revista Ciência Animal, Suppl1 (VIII Congresso Brasileiro de Buiatria), 2009.
- BECHARA, G. H.; MORELLI, J.; SZABO, M. P. J. Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. Tropical Veterinary Diseases, v. 916, p. 570-575, 2000.
- BELL-SAKYI, L. Ehrlichia ruminantium grows in cell lines from four ixodid tick genera. J. Comp. Pathol. 130, 285–293, 2004.
- BELL-SAKYI, L., ZWEYGARTH, E., BLOUIN, E.F., GOULD, E.A., JONGEJAN, F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. Trends Parasitol. 23, 450–457, 2007.
- BENITEZ, D.; CETRÁ, B. & FLORIN-CHRISTENSEN, M. *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus ticks can complete their life cycle on the water buffalo (*Bubalus bubalis*). Journal of Buffalo Science, 193–197, 2012.
- 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.
- BOCK, R.; JACKSON, L.; de VOS, A. & JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. Parasitol. v.129, p.247-269, 2004.

- BORGHESAN, T.C.; FERREIRA, R. C.; TAKATA, C. S. A.; CAMPANER, M.; BORDA, C. C.; PAIVA, F.; MILDRE, R. V.; TEIXEIRA, M. M. G.; CAMARGO, E. P. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. *Protist.* v.164, p.129-152; 2012.
- BÖSE, R., FRIEDHOFF, K.T., OLBRICH, S., BÜSCHER, G., DOMEYER, I. Transmission of *Trypanosoma theileri* to cattle by Tabanidae. *Parasitol. Res.* v.73, p.421–424, 1987.
- BÖSE, R., HEISTER, N.C. Development of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* in tabanids. *J. Eukaryot. Microbiol.* v.40, p.788–792, 1993.
- BÖSE, R., PETERSEN, K., POSPICHAL, H., BUCHANAN, N., TAIT, A. Characterization of *Megatrypanum* trypanosomes from European Cervidae. *Parasitology* v.107, p.55-61, 1993.
- BRAUN, U.; ROGG, E.; WALSER, M.; NEHRBASS, D.; GUSCETTI, F.; MATHIS, A.; DEPLAZES, P. *Trypanosoma theileri* in the cerebrospinal fluid and brain of a heifer with suppurative meningoencephalitis. *Vet Rec.* v.150, p.18-19, 2002.
- BROWN, W.C; NORIMINE, J; KNOWLES, D.P; GOFF, W.L. Immune control of *Babesia bovis* infection. *Vet Parasitol*,138, 75-87, 2006.
- BULAT, S. A.; MOKROUSOV, I. V.; PODLIPAEV, S. A. Classification of trypanosomatids from insects and plants by the UP-PCR (universally primed OCR) technique and cross dot blot hybridization of PCR products. *Europ J Protozool*, n. 35, p. 319-326, 1999.
- BURGDORFER, W., SCHIMIDT, M.L., HOOGSTRAAL, H. Detection of *Trypanosoma theileri* in Ethiopian cattle ticks. *Acta Trop.* 4, 340–346, 1973.
- CAMARGO, E. P. Phytomonas and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Advances Parasitology*, v. 42, p. 29-112, 1998.
- CAMARGO, R.E., UZCANGA, G.L. & BUBIS, J. Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that are partially responsible for its crossreactivity with *Trypanosoma vivax*. *Vet. Parasitol.* 123:67-81; 2004.
- CAVALIER-SMITH, T. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems*, v.14, p.461-81, 1981.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.*,v.57(4),p.953-94,1993.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol. Lett.* v.6, p.342–345; 2010.
- D'AVILA-LEVY, C.M.; BOUCINHA, C.; KOSTYGOV, A.; SANTOS, H.L.; MORELLI, K.A.; GRYBCHUK-IEREMENKO, A.; DUVAL, L.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V.; GRELLIER, P.; LUKEŠ, J. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid

- flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 110: 956–965, 2015.
- D'ALESSANDRO, A., SARAIVA, N.G. *Trypanossoma rangeli*. In: Gilles HM, editor. Parasitic Protozoal diseases. London: Arnold. p.398-412, 1999.
- DANTAS-TORRES, F. *Rhipicephalus sanguineus* e a epidemiologia da leishmaniose visceral canina no estado de Pernambuco. 2008. [Tese] Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.
- DESCHAMPS, P., LARA, E., MARANDE, W., LÓPEZ-GARCÍA, P., EKELUND, F., MOREIRA, D. Phylogenomic analysis of kinetoplastids supports that trypanosomatids arose from within bodonids. Mol. Biol. Evol. 28, 53–58; 2011.
- DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; & LUNA, E. J. A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. Rev Soc Bras Med Trop 44(3):375-379, mai-jun, 2011.
- DO AMARAL, J.B; REZENDE-TEIXEIRA, P.; FREITAS, V.M.; MACHADO-SANTELLI, G.M. MCF-7 Cells as a Three-Dimensional Model for the Study of Human Breast Cancer. Tissue Engineering Part C-Methods v.17, p.1097–1107, 2011.
- ESTRADA-PEÑA, A; BOUATTOUT, A; CAMICAS, J. L; GUGLIELMONE, A. A; HORAK, I; JONGEJAN, F. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. Exp Appl Acarol. v.38, p.219-235, 2006.
- FAMADAS, K.M.; FACCINI, J.L.H. Variação morfológica de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) no Brasil. Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, v.12, n.1-2, p.73-81, 1989.
- FIGUEIREDO, L.T.M.; BADRA, S.J.; PEREIRA, L.E. & SZABÓ, M.P.J. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. Revta Soc. Bras. Med. Trop. 32:613-619; 1999.
- FLEGONTOV, P., VOTÝPKA, J., SKALICKÝ, T., LOGACHEVA, M.D., PENIN, A.A., TANIFUJI, G., et al. Paratrypanosoma is a novel early-branching trypanosomatid. Curr Biol. v. 23, p. 1787–1793, 2013.
- GIOVANA, C; VOGEL, F.F; SANGIONI, L.A.; CADORE, G.C.; FERRARI, R. Eficiência *in vitro* de acaricidas sobre carrapato de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Cienc Rur, 39, 490-495; 2009.
- GONZALES, J.C. O controle do carrapato bovino. Porto Alegre: Sulina, 104p. 1975.

- GONZALES, J.C. O controle do carrapato do boi. 2. ed. Porto Alegre: Sulina, 1995; 235 p.
- GUERRERO, F.; ANDREOTTI, R.; BENDELE, K.; CUNHA, R.; MILLER, R.; YEATER, K.; PÉREZ DE LEÓN, A. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. *Parasites & Vectors*. v.7, n.1, p.1-12, 2014.
- GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* v.57, p.109-119, 1995.
- GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet Parasitol.* v.57, p.109-119, 1995.
- GUGLIELMONE, A. A. The level of infestation with the vector of cattle babesiosis in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v.87(Suppl. III):p.133-137, 1992.
- GUGLIELMONE, A.A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; NAVA, S.; VENZAL, J.M.; MANGOLD, A.J.; SZABÓ, M.P.; MARTINS, J.R.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; ESTRADA-PÉÑA, A.: Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp Appl Acarol.* 40: 83-100; 2006.
- GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ectoparasitas de Importância Veterinária. São Paulo: Editora Plêiade; 2001.
- HAAG, J., O'HUIGIN, C., OVERATH, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Mol.Biochem. Parasitol.* v.91, p.37-49, 1998.
- HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C.; STEVENS, J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Mol Phylogenet Evol*, n. 44, p. 15-25, 2007.
- HEYMAN, P.; COCHEZ, C.; HOFHUIS, A.; GIESSEN, J. V. D.; SPRONG, H.; PORTER, S. R.; LOSSON, B.; SAEGERMAN, C.; DONOSO-MANTKE, O.; NIEDRIG, M.; PAPA, A. A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. v. 8, n.1, p. 33-50, 2010.
- HOARE, C. A. The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph. Oxford: Blackwell, 1972.
- HOLLAR, L.; MASLOV, D. A. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. *Mol Biochem Parasitol*, n. 89, p. 295-299, 1997.
- HOOGSTRAAL, H. Changing patterns of tickborne diseases in modern society. *Annu. Rev. Entomol.* v.26, p.75-99, 1981.

- HOYTE, H. M. D. The morphology of *Trypanosoma theileri* in the blood of cattle, and the rediscovery of Theileria muam in England. Zeitschrift für Parasitenk. v.38, p.183-199, 1972.
- HUGHES, L.; PIONTKIVSKA, H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of Trypanosoma and six other genera. Mol Biol Evol, n. 20, p. 644-652, 2003.
- JAIMES-DUEÑEZ, J., TRIANA-CHÁVEZ, O., MEJÍA-JARAMILLO, A.M. Parasitological and molecular surveys reveal high rates of infection with vector-borne pathogens and clinical anemia signs associated with infection in cattle from two important livestock areas in Colombia. Ticks Tick Borne Dis. 8, 290–299; 2017a.
- JONSSON, N.N. The productive effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infection on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. Vet Parasitol, 137, 1-10, 2006.
- JONSSON, N.N; BOCK, R.E; JORGENSEN, W.K. Productive and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and effects of differing intensity of tick control in Australia. Vet Parasitol, 155, 1-9, 2008.
- KINGSTON, N.; MORTON, J.K. *Trypanosoma cervi* sp. n. from elk (*Cervus canadensis*) in Wyoming. J Parasitol. v. 61, p.17-23, 1975.
- KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F. & EWING, S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. Vet. Parasitol. v.167, p.95-107, 2010.
- KOSTYGOV, A.Y.; GRYBCHUK-IEREMENKO, A; MALYSHEVA, M.N; FROLOV, A.O; YURCHENKO, V. Molecular revision of the genus *Wallaceina*. Protist 165: 594–604; 2014.
- KRANTZ, G.W & WALTER, D.E. A manual of acarology. 3 ed. Lubbock: Texas Tech University Press; 2009.
- LATIF, A.A., BAKHEIT, M.A., MOHAMED, A.E., ZWEYGARTH, E. High infection rates of the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* with *Trypanosoma theileri*. Onderstepoort J. Vet. Res. 71, p.251–256, 2004.
- LATIF, A.A., PUTTERILL, J.F., DE KLERK, D.G., PIENAAR, R., MANS, B.J. *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae): first description of the male, immature stages and re-description of the female. PLOS ONE, 7, 2012.
- LEE, Y.-F.; CHENG, C.-C.; CHEN, J.-S.; LIN, N.-N.; HUNG, Y.-W.; Wang, J.-M.; Tu, W.-C.; Tung, K.-C.; Chiu, Y.-T. Evidence of intracellular stages in *Trypanosoma* (*Megatrypanum*)

- theileri* in non-phagocytic mammalian cells. *Veterinary Parasitology*. v.191, p.228– 239, 2013.
- LUKEŠ, J.; KUČHTA, R.; SCHOLZ, T.; POMAJBÍKOVÁ, K. (Self-) infections with parasites: re-interpretation for the present. *Trends Parasitol* v.30, p. 377–385, 2014.
- MADDER, M.; ADEHAN, S.; DE DEKEN, R., ADEHAN, R.; LOKOSSOU, R. New Foci of *Rhipicephalus microplus* in West Africa. *Experimental and Applied Acarology*. n.56, v.4, p.385-390, 2012.
- MAIA DA SILVA, F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A. C.; COURA, J. R.; AÑEZ, N.; SHAW, J. J.; STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*, n. 129, p. 549–561, 2004a.
- MAIA DA SILVA, F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A.C.; COURA, J.R.; AÑEZ, N. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. v. 129(5), p.549-61, 2004b.
- MANAN, A.; KHAN, Z.; AHMAD, B.; ABDULLA, H. Prevalence and identification of Ixodid Tick genera in Frontier region Peshawar. *J Agric Biol Sci*; 2(Suppl 1); 21-25; 2007.
- MANSFIELD, J. M. Nonpathogenic trypanosomes of mammals. In *Parasitic Protozoa, Taxonomy, Kinetoplastids, and Flagellates of Fish* (ed. Kreier, J. P.), Academic Press, New York. v.1, p. 297–327, 1977.
- MARCILI, A.; SPERANÇA, M. A.; DA COSTA, A. P.; MADEIRA, M. de F.; SOARES, H. S.; SANCHES, C. de O.; ACOSTA, Ida C.; GIROTTO, A.; MINERVINO, A. H.; HORTA, M. C.; SHAW, J. J.; GENNARI, S. M. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and GAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (L.) *infantum* *chagasi* in South America. *Infect Genet Evol.*, n. 25, p. 44-51, 2014.
- MARTINS, L.P.A., MARCILI, A., CASTANHO, R.E.P., THEREZO, A.L.S., OLIVEIRA, J.C.P., SUZUKI, R.B., TEIXEIRA, M.M.G., ROSA, J.A., SPERANCA, M.A. Rural *Triatoma rubrovaria* from Southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 427–434, 2008.

- MASLOV, D. A.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V.; LUKEŠ, J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends Parasitol.* v.1, p.43–52, 2013.
- MERZLYAK, E.; YURCHENKO, V.; KOLESNIKOV, A. A.; ALEXANDROV, K.; PODLIPAEV, S.; MASLOV, D. A. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: Polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *J. Eukaryot. Microbiol.* v. 48, n. 2, p. 161–169, 2001.
- MIRANPURI, G. S. Ticks parasitising the Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) and their possible role in disease transmission. *Vet. Parasitol.*, 27: 357-362; 1988.
- MORAES, A. C.: Estabelecimento e caracterização de células embrionárias de *Amblyomma sculptum* Berlese (Acari: Ixodidae). Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, São Paulo, 108 p., 2015.
- MORAES-FILHO, J. Competência vetorial de carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* do Brasil, Argentina e Uruguai para transmissão da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina. [Tese], 59f., (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- MOREIRA D, LÓPEZ-GARCIA P, VICKERMAN K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1861–1875, 2004.
- MORTARA, R. A.; BONFIM-MELO, A.; LIMA, B. R.; PESSOA, C. C.; TOQUEIRO, C. M. O.; BAHIA, D.; FERREIRA, E. R.; REAL, F.; FLORENTINO, P. V. Microscopia Confocal por Varredura a Laser: Fundamentos e Métodos. In: *Microscopia Confocal Aplicada às Ciências Biológicas Básicas*, São Paulo: Ed. Blücher S/A, 1ed, cap.8, p.221-247, 2013.
- MORZARIA, S.P., LATIF, A.A., JONGEJAN, J. & WALKER, A.R. Transmission of *Trypanosoma* sp. to cattle by the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Veterinary Parasitology.* v.19, p.13–21, 1986.
- MOTT, G.A; WILSON, R.; FERNANDO, A.; ROBINSON, A.; MACGREGOR, P.; KENNEDY, D.; SCHAAP, D.; MATTHEWS, J. B.; MATTHEWS, K. R. Targeting cattle-borne zoonoses and cattle pathogens using a novel trypanosomatid-based delivery system. *PLoS Pathog.* 7(10), 2011.

- MOULTON, J. E.; KRAUSS, H.H. Ultrastructure of *Trypanosoma theileri* in bovine spleen culture Cornell. Vet. v.62, p. 124-137, 1972.
- MURRELL, A., BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). Systematic Parasitology, v. 56, p. 169-172, 2003.
- NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. An overview of systematics and evolution of ticks. Frontiers in Bioscience, Tampa-US, v. 14, n. 1, p. 2857-2877, 2009.
- NAVA, S.; VENZAL, J. M.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MARTINS, T. F.; GUGLIELMONE, A. A. Ticks of the southern cone of America: diagnosis, distribution, and hosts with taxonomy, ecology and sanitary importance. London, UK: Academic Press, Elsevier, p.348, 2017.
- NUÑEZ, J.L; MUÑOZ COBEÑAS, M; MOLTEDO, H. *Boophilus microplus*: la garrapata común del ganado vacuno. Buenos Aires: Hemisferio Sur; 1982.
- PEREIRA, M. C. *Boophilus microplus*: revisão taxonômica e morfológica. Rio de Janeiro: Químico Divisão Veterinária. p.167, 1982.
- PEREIRA, M.C, LABRUNA, M.B; SZABÓ, M.P.J; KLAFKE, G.M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, Controle e Resistência. MedVet. São Paulo: MedVet; 2008. 21-25 p.
- PEREIRA, M.C., SZABÓ, M.P.J., BECHARA, G.H., MATUSHIMA, E.R., DUARTE, J.M.B., RECHAV, Y., FIELDEN, L., KEIRANS, J.E. Ticks on wild animals from the Pantanal region of Brazil. J. Med. Entomol. v.37; p.979-983, 2000.
- PESSÔA, S.B; MARTINS, A.V. *Parasitologia Médica*, 10th ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1977.
- PIONTKIVSKA, H.; HUGHES, A. L. Environmental kinetoplastid-like 18S rRNA sequences and phylogenetic relationships among Trypanosomatidae: paraphyly of the genus *Trypanosoma*. Mol Biochem Parasitol, v. 144, p. 94-99, 2005.
- PODLIPAEV, S. A.; FROLOV, A. O.; KOLESNIKOV, A. A. *Proteomonas inconstans* n.gen. n.sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) - a parasite of the bug *Calocoris sexguttatus* (Hemiptera: Miridae). Parasitologija (St. Petersburg), v. 24, p. 339-345, 1990.
- PUDNEY, M., VARMA, M.G., LEAKE, C.J. Culture of embryonic cells from the tick *Boophilus microplus* (Ixodidae). J. Med. Entomol. 10, 493-496, 1973.
- REY, L. Parasitas e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. In: Parasitologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 856.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH the electron-opaque stain in na elétron microscopy. J. Cell Biol. 17, p. 208-212, 1963.

- ROCHA, U.F.; SERRA, O.P.; GROCK, R.; SERRA, R.G. Infestação natural de búfalos, *Bubalus bubalis* L., 1758 - dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil, por *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) e por *Anocentor nitens* (Neumann, 1897), Acari, Ixodidae. *Arq Inst Biol.* v.36, p.197-199, 1969.
- RODRIGUES, A. C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; TEIXEIRA, M. G. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*, n. 132, p. 215–224, 2006.
- RODRIGUES, A.C., GARCIA, H.A., BATISTA, J.S., MINERVINO, A.H., GÓES-CAVALCANTE, G., MAIA DA SILVA, F., FERREIRA, R.C., CAMPANER, M., PAIVA, F., TEIXEIRA, M.M.G. Characterization of spliced leader genes of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. *Parasitology* v.137, p.111–122, 2010a.
- RODRIGUES, A.C., GARCIA, H.A., ORTIZ, P.A., CORTEZ, A.P., MARTINKOVIC, F., PAIVA, F., BATISTA, J.S., MINERVINO, A.H., CAMPANER, M., PRAL, E.M., ALFIERI, S.C., TEIXEIRA, M.M.G. Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. *Parasitol. Int.* v.59, p.318–325, 2010b.
- RODRIGUES, A.C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.; DELL' PORTO, A.; MILDER, R.V.; TAKEDA, G.F.; TEIXEIRA, M.M.G. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. *Vet Parasitol.* v.116(3) p. 185-207, 2003.
- SANCHES, G. S. Comparação biológica, morfológica e molecular entre carrapatos do complexo *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2013.
- SEIFI, H. A. Clinical trypanosomosis due to *Trypanosoma theileri* in a cow in Iran. *Tropical Animal Health and Production* v. 27, n. 2, p. 93, 1995.
- SHASTRI, U.V. & DESHPANDE, P.D. *Hyalomma anatolicum anatolicum* (Koch, 1844) as possible vectors for transmission of *Trypanosoma theileri*, Lavern, 1902 in cattle. *Veterinary Parasitology.* v.9, p.151–155, 1981.

- SHERLOCK, I. A. Nota sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 16:19–26, 1964.
- SIMPSON, A.G, ROGER, A.J. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. *Mol Phylogenet Evol.* v.30, p.201–212, 2004.
- SIMPSON, A.G.B., STEVENS, J.R., LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* v.22(4), p.168-174, 2006.
- SONENSHINE, D. E. *Biologia of ticks*. New York: Oxford University Press, 1993. 316 p.
- SOUZA, W. Introdução à protozoologia. In: SOUZA, W. **Protozoologia médica**. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2013. Cap.1, p. 01-18.
- STEVENS, J. R. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite* 15, p. 226–232, 2008.
- STEVENS, J.R, NOYES, H.A, SCHOFIELD, C.J, GIBSON W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Advances in Parasitology*, 48, 1–56; 2001.
- STEVENS, J.R.; NOYES, H.A.; DOVER, G.A.; GIBSON, W.C. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology*. v.118, p.107-116, 1999.
- SUDARTO, M.W., TABEL, H., HAINES, D.M. Immunohistochemical demonstration of *Trypanosoma evansi* in tissues of experimentally infected rats and a naturally infected water buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Parasitol.* 76, 162–167, 1990.
- SUTHERST, R. W.; MAYWALD, G. F.; KERR, J. D.; SIEGEMAN, D. A. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Australian Journal of Agricultural Research*. v.34, p. 317-327, 1983.
- SVOBODOVÁ M, ŽÍDKOVÁ L, CEPICKA I, OBORNÍK M, LUKES J, VOTÝPKA J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *Int J Syst Evol Microbiol.* v.57(2), p.423 -432, 2007.
- TIZARD, R., MITTAL, K. R. AND NIELSEN, K. Depressed immunoconglutinin responses in calves experimentally infected with *Trypanosoma congolense*. *Research in Veterinary Science*, v.28, p.203-206, 1980.
- VAN DEN ABEELE, J., CALJON, G., DE RIDDER, K., DE BAETSELIER, P., COOSEMANS, M. *Trypanosoma brucei* modifies the tsetse salivary composition, altering the fly feeding behavior that favors parasite transmission. *PLoS Pathog.* 3 (6), 2010.
- VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden WHR, Evans DA, editors. *Biology of the kinetoplastida*. London: Academic Press. p. 1–34, 1976.

- VICKERMAN, K., TETLEY, L., HENDRY, K.A., TURNER, C.M. Biology of African trypanosomes in the tsetse fly. *Biol. Cell.* v.64, p.109–119, 1998.
- VICKERMAN, K.; PRESTON, T. M. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Eds.) *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London, New York, San Francisco, p. 35-130, 1976.
- VILLA, A.; GUTIERREZ, C.; GRACIA, E.; MORENO, B.; CHACÓN, G.; SANZ, P. V.; BÜSCHER, P. e TOURATIER, L. Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish Cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1149, p.352–354, 2008.
- VOTÝPKA, J, SUKOVÁ E, KRAEVA N, ISHEMGULOVA A, DUŽÍ I, LUKEŠ J, et al. Diversity of Trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) Parasitizing Fleas (Insecta: Siphonaptera) and Description of a New Genus *Blechomonas* gen. n. *Protist.* v. 164, p.763–781, 2013.
- VOTÝPKA, J., KOSTYGOV, A. Y., KRAEVA, N., GRYBCHUK-IEREMENKO, A., TESAROVA, M., GRYBCHUK, D., LUKES, J. & YURCHENKO, V. *Kentomonas* gen. n., a new genus of endosymbiont-containing Trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n. *Protist.* v.165, p.825–838, 2014.
- WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp Parasitol.*v.18, p.124-193, 1966.
- WALLACE, F. G.; CAMARGO, E. P.; MCGHEE, R. B.; ROITMAN, I. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. *J Protozool*, n. 30, p. 308-313, 1983.
- WARD, W. H., HILL, M. W. M., MAZLIN, I. D. and FOSTER, C. K. Anaemia associated with a high parasitaemia of *Trypanosoma theileri* in a dairy cow. *Australian Veterinary Journal*, v.61, p.324, 1984.
- WELLS, E. A. Subgenus *Megatrypanum*. In: *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London, v. 1, p. 25 7-275, 1976.
- WEYER, F. Explanation experiments on lice in connection with *Rickettsia* culture. *Zentralbl Bakteriol Orig.* v.159(1-2), p.13-22, 1952.
- WHARTON, R.H. Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. In: PAL, R.; WHARTON, R.H. (ed.). *Control of arthropods of medical and veterinary importance*. London:. Plenum Press, 1974.
- YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* Mar;78(1):87-111, 2006.

YURCHENKO, V., KOSTYGOV, A., HAVLOVA, J., GRYBCHUK-IEREMENKO, A., SEVCIKOVA', T., LUKES, J., SEVCIK, J., AND VOTYPKA, J. Diversity of trypanosomatids in cockroaches and the description of *Herpetomonas tarakana* sp. n. J. Eukaryot. Microbiol. v.63, p.198–209, 2016.