

T 636.08369

B 327a

2005



Camila de Valgas e Bastos

**AVALIAÇÃO DE CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO E
CRIOPRESERVAÇÃO DO CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS IDE8.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientadora: Lygia Maria Friche Passos

Belo Horizonte
UFMG-EV
2005

B327a Bastos, Camila de Valgas e, 1979-

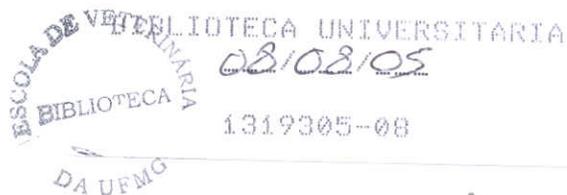
Avaliação de condições de manutenção e criopreservação do cultivo in vitro de células IDE8 / Camila de Valgas e Bastos Castro. – 2005.

40 p. :il.

**Orientadora: Lygia Maria Friche Passos
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia**

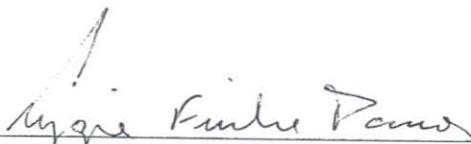
**1. Criopreservação de células – 2. Carrapato – Teses.
I. Passos, Lygia Maria Friche. II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Escola de Veterinária. III. Título**

CDD – 636.208 969 68

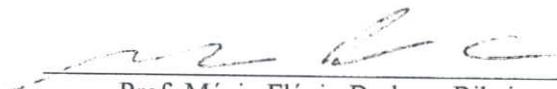


374109

Dissertação defendida e aprovada em 16/02/2005, pela Comissão Examinadora constituída por: DA UFMG



Profa. Lygia Maria Friche Passos
(Orientadora)



Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro



Prof. Paulo Roberto de Oliveira



Profa.. Joely Ferreira Figueiredo Bittar



Profa. Patrícia Macedo Gonçalves Ruiz

**Ao meu marido Homero,
aos meus pais Walter e
Ione e minhas avós Délia e
Maria Senhorinha.**

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela oportunidade de crescimento proporcionada em mais esta etapa;
- À Profa. Dra. Lygia Maria Friche Passos, pelo apoio, orientação e amizade;
- Ao Prof. Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, pelo apoio na redação final da dissertação;
- À querida Mercês pela dedicação e ensinamentos;
- À amiga Simone, pelos longos diálogos científicos e filosóficos;
- Aos companheiros e amigos do Laboratório de Protozooses da UFMG: Ricardo, Nayara, Ana Célia, Júlia, Ana Paula, Marcos, Alcina, Lívio e Mônica;
- Ao Homero, pela paciência, amor e apoio incondicionais em todos os momentos;
- Aos meus pais, Walter e Ione, pelo incentivo e por sempre acreditarem no meu potencial;
- Às minhas queridas irmãs Cassiana e Clarissa e cunhados Frederico e Rodrigo;
- À vovó Senhorinha e vovó Délia (*in memoriam*) pelo carinho;
- À tia Herzila pelo exemplo de carreira;
- Aos meus primos e tios pelo apoio;
- À Lourdes, Ulisses e Augusto pela torcida;
- Aos amigos mais que especiais: Fabrícia, Paula, Olívia, Bel, Karina, Amália, Bruno Divino, Dudu e Bruno Campos;
- Aos amigos que sempre deram força: Renatinha, Bruno, Gabi, Thiago, Lu, Ticiane, Ju Machado, Manoel e "meninas do CSA";
- Aos funcionários e amigos do Laboratório de Virologia: Doris, Eduardo, Ângela e Leandro;
- À Nádia, pela alegria e ajuda na formatação;
- Aos Professores da Escola de Veterinária pelas sugestões neste trabalho: Profa. Zélia, Prof. Jenner e Prof. Helton;
- À querida Professora Helenita pelos conselhos e informações iniciais da pesquisa;
- Às amigas do Colegiado de Pós-graduação: Nilda, Luciene, Heloísa, Eliane;
- À Nina, Ricky, Mel, Lolinha e outros animais sempre presentes e confiantes em nosso trabalho

"Faz-se ciência com fatos, como se faz uma casa com pedras. Mas um acúmulo de fatos não é ciência, assim como um acúmulo de pedras não é uma casa."

(Henri Poincaré, matemático francês, 1854-1912)

SUMÁRIO

| | Pág. |
|---|------|
| RESUMO | 09 |
| ABSTRACT | 10 |
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. LITERATURA CONSULTADA | 11 |
| 3. OBJETIVOS | 17 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 17 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 17 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 4.1 Linhagem IDE8 | 17 |
| 4.2 Avaliação das culturas de IDE8..... | 17 |
| 4.3 Experimento 1: Cultivo da IDE8 em sistemas fechado e aberto | 18 |
| 4.4 Experimento 2: Cultivo da IDE8 com suplementação de distintos soros | 18 |
| 4.5 Experimento 3: Cultivo da IDE8 após crescentes períodos de estocagem sob refrigeração a 4 °C..... | 18 |
| 4.6 Experimento 4: Cultivo da IDE8 após criopreservação em nitrogênio líquido | 18 |
| 4.7 Análise estatística..... | 19 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 21 |
| 5.1 Cultivo da IDE8 em sistemas fechado e aberto | 21 |
| 5.2 Cultivo da IDE8 com suplementação de distintos soros | 21 |
| 5.3 Cultivo da IDE8 após crescentes períodos de estocagem sob refrigeração a 4 °C..... | 26 |
| 5.4 Cultivo da IDE8 após criopreservação em nitrogênio líquido..... | 28 |
| 6. CONCLUSÕES | 30 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 30 |
| ANEXOS | 35 |
| Anexo 1. Preparação do Meio L-15 incompleto..... | 35 |
| Anexo 2. Preparação do Meio L-15 completo..... | 36 |
| Anexo 3. Preparação da Mistura de Congelamento com crioprotetor a 6%..... | 36 |
| Anexo 4. Preparação de Meio Pós-descongelamento (100 ml) | 36 |
| Anexo 5. Dados dos resultados | 37 |
| Anexo 6. Valores críticos de χ^2 segundo os graus de liberdade do estudo do nível de significância desejado (Probabilidade de erro tipo I) | 40 |
| LISTA DE TABELAS | |
| Tabela 1 Espécies de carrapatos dos quais se derivam linhagens contínuas estabelecidas e disponíveis atualmente | 13 |
| LISTA DE FIGURAS | |
| Figura 1. Representação esquemática dos experimentos realizados | 20 |
| Figura 2. Viabilidade <i>in vitro</i> de células IDE8 mantidas em diferentes recipientes de cultivo..... | 23 |

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 3. | Viabilidade <i>in vitro</i> de subculturas IDE8 mantidas em diferentes recipientes de cultivo | 23 |
| Figura 4. | Microfotografia de células IDE8 coradas com Giemsa | 24 |
| Figura 5. | Efeito de diferentes soros fetais bovinos (SFB) sobre a viabilidade <i>in vitro</i> de culturas de células IDE8 | 25 |
| Figura 6. | Efeito de diferentes soros fetais bovinos (SFB) sobre a viabilidade <i>in vitro</i> de subculturas de células IDE8 | 25 |
| Figura 7. | Efeito do resfriamento a 4°C sobre a viabilidade <i>in vitro</i> de células IDE8..... | 27 |
| Figura 8. | Efeito do resfriamento a 4°C sobre a viabilidade <i>in vitro</i> de subculturas IDE8..... | 27 |
| Figura 9. | Efeito do congelamento com diferentes crioprotetores sobre a viabilidade <i>in vitro</i> de células IDE8 | 29 |
| Figura 10. | Efeito do resfriamento e do congelamento em nitrogênio líquido sobre a viabilidade <i>in vitro</i> de células IDE8 | 29 |

RESUMO

O cultivo contínuo da linhagem de células IDE8, derivada de células embrionárias do carrapato *Ixodes scapularis*, representa uma ferramenta de pesquisa de grande importância no estudo de patógenos transmitidos por carrapatos aos humanos e animais. Apesar do êxito de seu uso em infecções *in vitro* de algumas espécies de riquetsias por outros grupos de pesquisa, pouco se conhece sobre a sua biologia, as melhores condições de manutenção e criopreservação. Considerando a inexistência dessa linhagem no Brasil, o presente estudo teve como objetivo definir as condições de cultivo, otimizando a manutenção, expansão e preservação da linhagem IDE8 nas condições brasileiras, visando a sua proposição como modelo *in vitro* para crescimento e multiplicação de amostras brasileiras de riquetsias e outros hemoparasitas. A partir de um frasco contendo células IDE8 em suspensão, foram cultivadas réplicas utilizando-se um sistema aberto (placas de 24 orifícios) e dois sistemas fechados (tubos de 2 ml e frascos de 25 cm²) e em um segundo experimento avaliou-se a suplementação de culturas de IDE8 com dois soros fetais bovinos (SFB) de origens distintas (nacional e importado). Em um terceiro experimento avaliou-se a estocagem sob refrigeração a 4°C por períodos de até 60 dias como método de preservação de culturas e finalmente foram avaliadas três técnicas de criopreservação em nitrogênio líquido utilizando-se dois crioprotetores (DMSO e glicerina). Em todos os experimentos os cultivos foram mantidos com trocas semanais do meio e repiques (subcultivos) a cada 15 dias e o desempenho das culturas e de seus respectivos repiques foi avaliado através do percentual de viabilidade e morfologia celular. Os resultados mostraram que células IDE8 se adaptam bem aos dois sistemas de cultivo (aberto e fechado) podendo ser cultivadas nos três tipos de recipientes (placas de 24 orifícios, tubos de 2 ml e frascos de 25 cm²). Quanto à suplementação de soro fetal bovino, os resultados indicam que o SFB nacional pode ser utilizado em substituição ao importado, já que não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as viabilidades dos cultivos. A estocagem sob refrigeração a 4°C mostrou ser um método eficaz de preservação das células IDE8 por pelo menos até 60 dias, resultando em cultivos com elevada viabilidade celular. A técnica de congelamento lento-gradual em nitrogênio líquido, utilizando o DMSO como crioprotetor, foi o único processo eficaz e confiável para a criopreservação de células IDE8. Concluiu-se que o cultivo da linhagem IDE8 é um sistema contínuo *in vitro* viável, confiável e perfeitamente adaptado às condições brasileiras, disponibilizando um modelo experimental para o estudo das várias hemoparasitoses animais e humanas em nosso país.

Palavras chave: cultivo *in vitro*, carrapato, manutenção, preservação.

ABSTRACT

The continuous cultivation of IDE-8 cell lines, derived from embryonic cells from *Ixodes scapularis* ticks, represents an important tool for the study of tick-borne pathogens transmitted to humans and animals. Although few research groups have succeeded to infect *in vitro* IDE-8 cell lines with some species of rickettsia, little is known about their biology and the best conditions for maintenance and cryopreservation of cells. Considering that this cell line has never been cultured in Brazil, the present study had the objective of defining the culture conditions, optimizing the maintenance, expansion and preservation of an IDE-8 cell line in Brazil, with the aim to propose its use as a model for *in vitro* infection and multiplication of Brazilian strains of rickettsia and other hemoparasites. A flask containing IDE-8 cell suspension was used to provide replicates that were cultured in an open system (24-well plates) and in two closed systems (2-ml tubes and 25-cm² flasks). In a second experiment, the supplementation of IDE-8 cells with two distinct fetal calf sera (a Brazilian and an imported) was evaluated. In a third experiment the storage of cultures under refrigeration at 4 °C was evaluated during periods up to 60 days. In addition, three techniques of cryopreservation in liquid nitrogen using two cryoprotectors (DMSO and glycerin) were tested. In all experiments, culture media were changed weekly and subcultures were carried out every 15 days. The development of cultures and subcultures was evaluated by the percentage of viability and cellular morphology. The results demonstrated that IDE-8 cells were able to adapt to the two culture systems (open and closed) and were equally cultivated in all three types of recipients (24-well plates, 2-ml flasks and 25 cm²-flasks). Regarding serum supplementation, the results indicate that the imported fetal calf serum can be replaced by the Brazilian calf serum, as no significant differences ($p < 0.05$) were seen among culture viabilities. The storage under refrigeration at 4 °C proved to be an efficient method for preservation of IDE-8 cells for up to 60 days, resulting in high cellular viability. The technique in which cryopreservation was slow and gradual in liquid nitrogen using DMSO as cryoprotector was the only efficient and reliable process for cryopreservation of IDE-8 cells. It was concluded that the cultivation of this IDE-8 cell line is a viable *in vitro* system, well adapted to the Brazilian conditions, with potential use as an experimental model for the study of several hemoparasites of humans and animals in Brazil.

Key words: cultivation *in vitro*, tick, maintenance, preservation.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de células e órgãos é uma técnica amplamente aplicada em diferentes disciplinas, desde as ciências básicas e biologia molecular até a biotecnologia (Freshney, 1986). Os sistemas de cultivo *in vitro* possibilitam a produção de antígenos em larga escala, o desenvolvimento de pesquisas sobre interação, infecção e ciclo biológico de microorganismos, testes de eficiência de drogas, dentre outras inúmeras aplicações.

O cultivo de células de carrapatos alcançou o estabelecimento da sua primeira linhagem 30 anos atrás (Varma et al., 1975) e, hoje, as linhagens estabelecidas são valiosas ferramentas, sendo utilizadas para a propagação de muitos patógenos. É importante ressaltar as limitações de se obter material antigênico de hemoparasitas. Normalmente são realizadas infecções experimentais sucessivas em animais susceptíveis. Estes procedimentos são acompanhados de um alto custo devido à manutenção de animais esplenectomizados e livres de agentes patogênicos (ecto e hemoparasitas, bactérias, vírus). Além disso, muitas vezes o material obtido apresenta riscos de contaminações por células animais e patógenos que comumente infectam estes animais (Kocan et al., 2001).

A produção de antígenos a partir de células cultivadas de carrapatos comparada à infecção experimental de animais susceptíveis é mais simples e demanda, em geral, menor custo de manutenção. Atualmente alguns sistemas de cultivos de células de carrapatos já possibilitam o cultivo de antígenos, livres de membranas animais ou patógenos, para serem utilizados em testes de diagnóstico (Saliki et al., 1998; Rodgers et al., 1998) e no desenvolvimento de vacinas (Blouin et al., 1998; Kocan et al., 2001; de la Fuente et al., 2002).

Apesar de algumas desvantagens do sistema, como o custo de materiais e reagentes, o cultivo *in vitro* apresenta

vantagens como o controle rigoroso do ambiente, a possibilidade de caracterização e homogeneização de amostras e questões éticas. Todas estas vantagens têm sido demonstradas em trabalhos desenvolvidos com as células IDE8 (Munderloh et al., 1994), uma linhagem embrionária de células do carrapato *Ixodes scapularis*, o que motiva novos estudos sobre a manutenção e a possibilidade de infecções da linhagem com amostras brasileiras de riquetsias.

Recentemente a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais obteve, através de um acordo interinstitucional com a University of Minnesota, uma amostra da linhagem de células IDE8. Este trabalho, portanto, é a primeira tentativa de cultivo desta linhagem no Brasil e representa a possibilidade de estabelecimento de vários agentes em cultivo *in vitro*, especialmente o *Anaplasma marginale*, a *Ehrlichia canis*, dentre outras riquetsias.

Apesar do êxito de infecções *in vitro* de algumas espécies de riquetsias em células IDE8 por outros grupos de pesquisa, pouco ainda se conhece sobre a biologia e melhores condições de manutenção e criopreservação dessa linhagem celular. Considerando que o conhecimento desses parâmetros é essencial para a proposição de uso da IDE8 como modelo *in vitro* para crescimento e multiplicação de amostras brasileiras de riquetsias, o presente trabalho tem como objetivo definir as condições de cultivo, otimizando a manutenção, expansão e preservação da linhagem IDE8 nas condições brasileiras.

2. LITERATURA CONSULTADA

Os carrapatos são vetores de diversos patógenos que acometem humanos e animais e, por esta razão, têm sido alvo de investigações visando expandir o conhecimento sobre a biologia, transmissão e ciclo de vida de microorganismos de que são vetores.

O interesse por patógenos transmitidos por carrapatos cresceu com a emergência da Doença de Lyme e mais recentemente com as erliquioses humanas e animais. Para facilitar as pesquisas sobre estas doenças durante a fase que envolve o vetor, novas linhagens de células de carrapatos geradas a partir da espécie *I. scapularis* foram desenvolvidas, contribuindo para a evolução das investigações *in vitro*. Muitas espécies de *Ixodes* são importantes vetores de patógenos de mamíferos em diferentes regiões do mundo (Munderloh et al., 1994). A encefalite viral, a doença de Lyme e protozoários como a *Babesia microti* são transmitidos por carrapatos *Ixodes* (Heinz e Kunz, 1980; Burgdorfer et al., 1982; Lane et al., 1991; Spielman et al., 1985), o que demonstra a importância deste gênero como vetor. Além disto, o conhecimento dos eventos do ciclo biológico de riquétsias nos carrapatos-vetores é de grande importância na transmissão de agentes infecciosos aos animais e também podem ter influência na patogenicidade frente ao hospedeiro vertebrado (Munderloh et al., 1999).

Dentre os principais organismos transmitidos pelos carrapatos estão os representantes da ordem Rickettsiales que são classificados em duas famílias: Anaplasmataceae e Rickettsiaceae baseado em análises genéticas de rRNA 16S, *groESL* e genes de proteínas de superfície (Dumler et al., 2001).

O gênero *Anaplasma* inclui agentes como *A. marginale*, causador da anaplasmose em ruminantes, e *A. phagocytophila* (reclassificação de *Ehrlichia phagocytophila*, *E. equi* e o agente da erliquiose granulocítica humana – HGE, semelhantes entre si), que afeta eqüinos e humanos produzindo a erliquiose granulocítica.

O gênero *Ehrlichia* inclui, dentre outras, a *E. ruminantium* (reclassificação de *Cowdria ruminantium*), o agente da cowdriose em ruminantes, e a *E. canis* e a *E. chaffeensis* que acometem principalmente canídeos e humanos, respectivamente, produzindo a

erliquiose monocítica ou infecções subclínicas (Dumler et al., 2001).

Devido à importância dessas riquétsias, trabalhos utilizando células de carrapatos têm sido realizados e demonstram a boa adaptação e crescimento de muitos destes patógenos de importância médica e veterinária (Bell-Sakyi, 2004a). Neste contexto, linhagens celulares de carrapatos são valiosas ferramentas de pesquisa e têm sido usadas em estudos de arbovírus, espiroplasmas e protozoários, oferecendo material conveniente para pesquisas em citogenética, citofisiologia, bioquímica e propriedades imunogênicas de carrapatos (Kurtti et al., 1982).

A primeira tentativa registrada de cultivo de tecidos de carrapatos ocorreu 53 anos atrás (Weyer, 1952), em que foram mantidos vários tecidos inespecíficos do *Rhipicephalus bursa* por aproximadamente oito dias. Novas tentativas foram realizadas com ninfas, observando que células sobreviveram por cinco meses (Martin e Vidler, 1962; Yunker e Cory, 1965). Em seguida, ovos de carrapatos passaram a ser material de estudos para tentativas de cultivos primários (Eide e Caldwell, 1973). Finalmente, a primeira linhagem foi estabelecida através de tecidos de carrapatos marrons africanos, *Rhipicephalus appendiculatus* (Varma et al., 1975). Os estabelecimentos das linhagens contínuas derivadas do *R. appendiculatus* (Varma et al., 1975), de embriões do *Dermacentor parumapertus* (Bhat e Yunker, 1977) e do *Boophilus microplus* (Pudney et al., 1979; Holman e Ronald, 1980) foram conseqüência do avanço dos métodos de cultivo de células de carrapatos, particularmente a introdução do meio L-15 (Leibovitz).

Hoje, segundo Bell-Sakyi (2004b) há aproximadamente 13 linhagens celulares estabelecidas de sete gêneros de carrapatos de importância médica e veterinária (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de carrapatos dos quais se derivam linhagens contínuas estabelecidas e disponíveis atualmente.

| Espécie de carrapato | Origem | Referência Bibliográfica |
|---------------------------------------|-----------------|--|
| <i>Amblyomma variegatum</i> | Larvas | Bell-Sakyi et al., 2000b |
| <i>Anocentor nitens</i> | Embriões | Kurtti et al., 1983 |
| <i>Boophilus decoloratus</i> | Embriões | Bell-Sakyi, 2004a |
| <i>B. microplus</i> | Embriões | Pudney et al., 1979; Holman e Ronald, 1980; Holman, 1981; Kurtti et al., 1988; Bell-Sakyi, 1992. |
| <i>Dermacentor albipictus</i> | Embriões | Munderloh et al., 1996a |
| <i>D. andersoni</i> | Embriões | Simser et al., 2001 |
| <i>D. parumapertus</i> | Embriões | Yunker et al., 1981 |
| <i>D. variabilis</i> | Embriões | Yunker et al., 1981 |
| <i>Hyalomma anatolicum anatolicum</i> | Embriões | Bell-Sakyi, 1992 |
| <i>Ixodes ricinus</i> | Embriões | U. Munderloh (não publicado); Bell-Sakyi, 2004a |
| <i>I. scapularis</i> | Embriões | Munderloh et al., 1994 |
| <i>Rhipicephalus appendiculatus</i> | Embriões/Ninfas | Kurtti et al., 1982; Bell, 1983; Varma et al., 1975; Bell-Sakyi, 1992. |
| <i>R. sanguineus</i> | Embriões | Yunker, 1987; Yunker et al., 1987; Kurtti et al., 1982 |

Fonte: Bell-Sakyi, 2004b (adaptada)

A IDE8 é uma linhagem contínua de células embrionárias originadas do carrapato *Ixodes scapularis*. Estabelecida em 1994, ela é mantida em meio L-15B (Leibovitz), com pH próximo de 7,2, suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB), 10% de Caldo de Triptose Fosfatada (CTF) e 0,1% de Lipoproteína Bovina Concentrada (LBC). Geralmente as monocamadas são propagadas em frascos com área de 25 cm². A temperatura de manutenção deve ser de 30 °C (± 2°C) (Munderloh et al., 1994), o meio trocado semanalmente e as células aderidas se multiplicam dobrando a população em 3-5 dias, com densidade de aproximadamente 5x10⁶ células/ml (Munderloh et al., 1996a).

Alguns estudos já foram realizados para a manutenção de patógenos em IDE8, dentre eles o *A. marginale*, que infecta eritrócitos bovinos (Blouin e Kocan, 1998). Aproximadamente vinte espécies de carrapatos podem estar envolvidas na transmissão da anaplasmose no mundo (Dikmans, 1950; Ewing, 1981). O *A. marginale* se multiplica em hemácias de bovinos (Ristic e Watrach, 1963) e em vários tecidos do seu vetor (Kocan et al., 1992), o que sugere que as células de

carrapatos são mais apropriadas para o cultivo *in vitro* deste agente (Munderloh et al., 1996a). A escolha da IDE8 para o cultivo do *A. marginale* se baseia nas características primitivas e fagocitárias da linhagem e propensão do agente em infectar diferentes tipos de tecidos do seu vetor natural.

Somente a IDE8 dentre quatro linhagens inicialmente testadas foi capaz de proporcionar o desenvolvimento do *A. marginale*, apesar de o *I. scapularis* não ser o vetor natural dessa bactéria (Munderloh, et al., 1996a). A adaptação do *A. marginale* a essa linhagem mostra que as células da IDE8 são capazes de promover um ambiente apropriado para crescimento e desenvolvimento de riquetsias (Blouin e Kocan, 1998). Observa-se uma semelhança morfológica entre o *A. marginale* cultivado em células IDE8 e encontrado em carrapatos naturalmente infectados, mantendo-se ainda similaridades no ciclo de desenvolvimento. Embora este desenvolvimento seja aparentemente dependente de fatores fisiológicos induzidos pela alimentação do vetor, o cultivo *in vitro* pode facilitar o entendimento do ciclo

biológico do *A. marginale* (Blouin e Kocan, 1998).

No Brasil, uma variação morfológica foi reportada entre *A. marginale* baseada na presença de um isolado com apêndice (Ribeiro et al., 1997). Estudos de transmissibilidade por ixodídeos e de microscopia eletrônica demonstraram que isolados sem apêndice se multiplicam em células epiteliais do carrapato *B. microplus*, vetor biológico da anaplasmose no Brasil (Ribeiro e Lima, 1996). Entretanto, o isolado com apêndice não foi capaz de infectar carrapatos (Gonçalves-Ruiz et al., 2005), podendo este isolado estar associado à transmissão mecânica da anaplasmose, através da picada de artrópodes ou fômites contaminados por sangue infectado. Estes relatos motivam uma investigação para se determinar a possibilidade de cultivo do isolado brasileiro de *A. marginale* com apêndice em células IDE8.

Outros patógenos já foram estabelecidos em IDE8 como a riquetsia *E. ruminantium* causadora de cowdriose ("Heartwater") que afeta ruminantes e é transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma* (Camus et al., 1996). As primeiras tentativas de cultivo de *E. ruminantium* em células destes artrópodos datam aproximadamente 30 anos (Andreasen, 1974), mas apenas após o sucesso do cultivo de outras riquetsias como a *E. canis* (Ewing et al., 1995; Kocan et al., 1998), *E. equi* (Munderloh et al., 1996b) e *A. marginale* (Munderloh et al., 1996a) em células do carrapato *I. scapularis*, que os cultivos de *E. ruminantium* obtiveram êxito também em IDE8 (Bell-Sakyi et al., 2000a, Bell-Sakyi et al., 2000b). Em 2002, realizou-se o primeiro cultivo com êxito de um isolado europeu de *A. phagocytophila* (reclassificação de *E. phagocytophila*) em duas linhagens contínuas de células derivadas do carrapato *I. scapularis*: IDE8 e ISE-6 (Woldehiwet et al., 2002). O *I. scapularis* é provavelmente o vetor natural da erliquiose equina causada pela *E. equi* (semelhante ao *A. phagocytophila* pela reclassificação genética) e um trabalho realizado cultivando-se o agente em IDE8 obteve sucesso (Munderloh et al., 1996b). Quanto à

E. canis, poucos estudos foram realizados até agora envolvendo cultivo do agente em células de carrapatos. Em busca de mais informações, pesquisadores testaram muitas linhagens, inclusive derivadas do vetor natural *R. sanguineus*, mas apenas a IDE8 demonstrou resultados positivos (Ewing et al., 1995; Kocan et al., 1998). Estes exemplos demonstram que a IDE8 é susceptível à infecção de riquetsias, sendo estas transmitidas ou não pelo *I. scapularis*.

Sabendo-se das dificuldades e limitações da produção de material antigênico de hemoparasitas através de infecções experimentais em animais susceptíveis, como o custo de manutenção destes animais e motivações éticas, os sistemas de cultivo em células de carrapato oferecem uma diversidade de materiais para análises moleculares de patógenos que dificilmente poderiam ser obtidos em quantidade suficiente em carrapatos intactos (Bell-Sakyi, 2004a). Por estas razões, a propagação de riquetsias em células de carrapatos tem sido alvo de muitos estudos, alcançando-se avanços na produção de antígenos para testes diagnósticos, vacinas e pesquisas sobre a biologia destes microorganismos.

Um exemplo de sucesso de cultivo em células de carrapatos é a propagação do *A. marginale* em IDE8. O crescimento do patógeno nestas células tem sido utilizado para produção de antígenos para ELISA (Saliki et al., 1998), preparações vivas ou inativadas para imunoenaios experimentais em bovinos (Blouin et al., 1998; Kocan et al., 2001), desenvolvimento de testes com drogas *in vitro* (Blouin et al., 2002b) e uma série de outros estudos sobre a expressão das proteínas principais de superfície (Blouin et al., 2003). A IDE8 provou ser um bom modelo para os estudos das interações entre o *A. marginale* e carrapatos. As informações obtidas através deste sistema de cultivo podem ser aplicadas a outros patógenos transmitidos por carrapatos que se propagam nesta linhagem celular (Blouin et al., 2002a).

O estabelecimento e manutenção de amostras de *A. marginale* em outros

sistemas *in vitro*, como células de mamíferos e invertebrados, incluindo células do carrapato *D. variabilis* (Marble e Hanks, 1972; Erp e Fahrney, 1975; Mazzola et al., 1976; Davis et al., 1978; McHolland e Trueblood, 1981; Swann et al., 1981; Samish et al., 1988) foi acompanhado de insucessos e limitações. Além disso, a inexistência de um sistema de cultivo de células de carrapatos adequado à multiplicação dessa riquétisia no Brasil, faz com que o estabelecimento e manutenção da IDE8 represente um enorme avanço possibilitando estudos de caracterização das várias amostras brasileiras já isoladas.

Originalmente, cultivo de tecidos era a denominação dada à cultura de expansão de fragmentos teciduais, quando estes mantinham, pelo menos parcialmente, a integridade histológica. Atualmente esse termo se tornou genérico e define tanto a cultura de órgãos, em que um fragmento ou um órgão embrionário inteiro é expandido, retendo a arquitetura tecidual, quanto à cultura de células, em que o tecido se dispersa mecânica ou enzimaticamente, ou ainda por migração espontânea, podendo se propagar como uma suspensão de células ou como monocamada formada. Enquanto o cultivo de órgãos apresenta diferenciações histológicas e algumas limitações quanto à sua propagação, o cultivo celular perde a estrutura arquitetônica e suas células possuem a capacidade de se propagar através de repiques idênticos, podendo ser caracterizadas e preservadas pelo congelamento (Freshney, 1986).

Após várias subculturas, uma linhagem celular pode morrer ou se transformar em uma linhagem celular contínua. As linhagens contínuas apresentam vantagens como ótimas médias de crescimento, baixa necessidade de soro e facilidade de cultivo em meio simples, além da capacidade de crescimento em suspensão. Como desvantagens observa-se a instabilidade cromossomal, divergência fenotípica do órgão original e perda dos marcadores teciduais específicos (Freshney, 1986).

Quando uma célula é removida de seu tecido original ou organismo e transferida para cultivo, o meio deve propiciar ambiente de condições favoráveis que esta célula teria *in vivo*. Apenas desta maneira a célula é capaz de sobreviver, proliferar e se diferenciar. Dentre os fluidos biológicos que determinam o sucesso de uma cultura de células fora de um organismo, o soro apresenta maior significância. A concentração ideal para garantir o crescimento ótimo de uma cultura pode variar de 5 a 20% de soro (Maurer, 1986).

O soro é composto de uma complexa mistura de pequenas e grandes biomoléculas com diferentes atividades de promoção e inibição de crescimento. A principal função do soro é fornecer fatores hormonais que estimulem o crescimento celular e suas funções, fatores de adesão e expansão e transporte de proteínas carregadoras de hormônios, minerais, lipídeos etc. Os fatores de crescimento presentes no soro podem ser específicos para células em estágios distintos de diferenciação. Dentre os hormônios, a insulina é essencial para o crescimento celular, enquanto que os glicocorticoides podem ser favoráveis ou inibitórios, dependendo do tipo de célula cultivada. Algumas células requerem outros hormônios esteróides (estradiol, testosterona, progesterona) ou hormônios da tireóide. O papel mais importante do soro está na promoção de adesão e expansão de uma linhagem através de fatores como o colágeno, fibronectina, dentre outros. O soro também fornece proteínas ligantes que carregam, por exemplo, vitaminas, lipídeos e hormônios. A riqueza de tipos variados de lipídeos do soro é essencial para a sobrevivência e particularmente para o crescimento da célula. Já os minerais podem agir como co-fatores de enzimas (Maurer, 1986).

Dentre as principais desvantagens do uso do soro em cultivo de células estão o aumento do risco de contaminação por vírus, fungos e micoplasmas e seu elevado custo, principalmente no caso do soro fetal bovino. Existem soros produzidos por várias empresas especializadas, mas apesar do

rigoroso controle, não se sabe se a utilização de soros de marcas diferentes pode afetar o desempenho de uma linhagem celular.

O substrato utilizado para o cultivo celular pode ser o plástico ou o vidro. Normalmente usa-se o plástico tratado adequadamente para aderência celular com poliestireno que proporciona uma rede de carga negativa na superfície. Existem diversos recipientes de variadas dimensões para o cultivo de células, como frascos, tubos, placas multiwells e placas de petri. Placas de 24 orifícios são recomendadas quando há necessidade de um maior número de repiques simultâneos, enquanto que os frascos e tubos são indicados para amostras que serão manuseadas em tempos diferentes. As placas de petri têm menor custo e facilitam processos de coloração e extração. Recipientes sem ventilação (sistemas fechados) são utilizados quando não há necessidade de incubação em umidade e CO₂, oferecendo também maior proteção contra contaminações (Freshney, 1986). A entrada de ar no recipiente pode alterar o pH do meio de cultura e, por esta razão, é importante que se defina se essa alteração é suficiente para diminuir o desempenho da cultura de IDE8, inviabilizando o uso de sistemas abertos.

Quanto à preservação das células, o congelamento em nitrogênio líquido é vantajoso por conservar as células por tempo quase que infinito. Quando se objetiva uma pequena parte de células em atividade, o estoque em nitrogênio líquido é essencial (Hay, 1986). Porém o congelamento de células de carrapatos na prática apresenta dificuldades, sendo que muitas vezes, as células descongeladas não são mais viáveis (Bell-Sakyi, 2003; Blouin, 2004 Comunicação Pessoal). Acredita-se que os danos celulares induzidos pelo congelamento e descongelamento sejam causados pela formação de cristais de gelo intracelulares e por efeitos osmóticos. A adição de agentes crioprotetores, como o dimetilsulfóxido (DMSO) e a glicerina e a escolha de técnicas de congelamento e descongelamento adequadas podem minimizar as injúrias celulares (Hay, 1986).

Crioprotetores exercem importante função de proteger as células enquanto armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) ou seu vapor (-120°C). O DMSO é um solvente químico dipolar, com rápida penetração através de membranas biológicas (Brayton, 1986). Ele possui mais de trinta efeitos farmacológicos, sendo o único elemento que pode substituir a molécula de água nos sistemas orgânicos, interagindo ou combinando com vários componentes (ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídeos) sem, contudo, alterar irreversivelmente a configuração molecular (Sojka et al., 1990). O efeito inibitório do DMSO sobre o crescimento de bactérias também foi documentado por pesquisadores (Alsup e DeBowes, 1984). Já a glicerina possui efeito crioprotetor no congelamento de células (Polge et al., 1949), sendo muito utilizada em congelamento de gametas e embriões. Rall e Polge (1984) demonstraram em experimento com embriões de ratos que a glicerina determina superior ou igual proteção contra efeitos prejudiciais do congelamento e descongelamento comparada ao DMSO.

O uso de técnicas inadequadas de congelamento de células originadas de carrapatos já acarretou em perdas de linhagens inteiras (Munderloh et al., 1994). Pelo fato do congelamento destas linhagens apresentar dificuldades e riscos, observa-se a necessidade do estabelecimento de técnicas de conservação por curtos períodos, sem que haja o uso do nitrogênio líquido.

A diversidade de linhagens de carrapatos, a variedade dos meios de cultura e das temperaturas de incubação suportados pelas células destes ixodídeos e a capacidade de transferência da infecção entre carrapatos e mamíferos oferecem muitas possibilidades de manipulação *in vitro* para investigação das relações celulares e moleculares entre patógenos brasileiros, seus vetores e seus hospedeiros vertebrados.

3. OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Avaliar condições de manutenção, expansão e preservação da linhagem IDE8 *in vitro*.

3.2- Objetivos específicos

1. Avaliar o uso de recipientes plásticos (placas, tubos e frascos) de sistemas aberto e fechado no cultivo de IDE8;
2. Avaliar o efeito de duas marcas de soro fetal bovino (importada e nacional) no cultivo de células IDE8;
3. Avaliar a refrigeração a 4°C como método de preservação de células IDE8 por curtos períodos (até 60 dias);
4. Avaliar três técnicas de congelamento em nitrogênio líquido (congelamento rápido, em etapas e lento-gradual), utilizando DMSO e Glicerina P.A. como crioprotetores na preservação de células IDE8.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Linhagem IDE8

A linhagem IDE8, originada de células embrionárias do carrapato *Ixodes scapularis*, foi gentilmente cedida pela Dra U.G. Munderloh (University of Minnesota, USA) na forma de células vivas em suspensão. O cultivo da linhagem foi realizado no Laboratório de Protozooses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (LP/DMVP) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. As células foram mantidas em tubos plásticos tratados com poliestireno contendo 2 ml de meio L-15 Completo (Sigma®) (Anexo 1 e 2), em pH próximo de 7,2, suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma®) inativado, 10% de Caldo de Triptose Fosfatada (CTF) (Sigma®), 0,1% de Lipoproteína Bovina Concentrada (LBC) (Sigma®), 0,1% de L-glutamina e 0,1% de antibiótico

(Penicilina/Estreptomicina). A temperatura de manutenção foi de 30°C (± 2 °C). O meio era trocado semanalmente e as subculturas feitas quinzenalmente.

4.2- Avaliação das culturas de IDE8

Viabilidade celular

Em todos os experimentos avaliou-se a viabilidade celular através do método de exclusão do Azul de Tripán. Esse método consiste no fato de que este corante, não sendo lipofílico, normalmente não entra nas células, o que passa a ocorrer no caso de ruptura da membrana plasmática, indicando, a morte celular. Portanto, as células que se coram de azul e apresentem limites irregulares estão rompidas e, conseqüentemente, mortas. As células vivas, entretanto, se apresentam incolores, com membrana refringente, limites definidos e forma arredondada.

De cada cultura de células, 50 μ l da suspensão obtida após desorganização da monocamada para a realização de subculturas foram colhidos e colocados em um tubo de hemólise contendo 450 μ l de Azul de Tripán 0,3% e em seguida homogeneizados. As células foram visualizadas em Câmara de Neubauer e o percentual de viabilidade calculado pelo resultado do número de células viáveis (vivas), dividido pelo número total de células contadas (vivas e mortas), multiplicado por 100x.

Morfologia celular

A morfologia celular foi avaliada através da observação das culturas pelo microscópio invertido (ausJENA®) e de impressões confeccionadas em lâminas de vidro a partir de uma amostra de cada cultura de IDE8 pela centrifugação de 50 μ l de suspensão das células a 67 x g por 1 minuto em Citospin® (Modelo 248 - FANEM). As lâminas foram fixadas em metanol P.A. (duas vezes por dez minutos), coradas em solução de Giemsa 8% por 30 minutos, lavadas, secas e examinadas em microscópio óptico (1000x).

4.3- Experimento 1: Cultivo da IDE8 em sistemas fechado e aberto

A manutenção da IDE8 foi testada neste trabalho em três diferentes recipientes plásticos próprios para cultivo, tratados com poliestireno, objetivando-se comparar o desempenho entre as culturas. Suspensões de células com concentração celular idêntica ($6,7 \times 10^6$ células/ml) foram distribuídas em frascos de 25 cm^2 (NUNC™), contendo 5 ml de meio completo, tubos "flat-sided" (NUNC™), com 2 ml de meio completo e placas de 24 orifícios, com 1 ml de meio completo em cada orifício (Cell Wells - Corning®). Os frascos de 25 cm^2 e os tubos "flat-sided" representam sistemas fechados de cultivo, enquanto que as placas de 24 orifícios são consideradas sistemas abertos por permitirem circulação de ar entre o meio externo e interno do recipiente. Para cada tipo de recipiente foram feitas duas réplicas. A manutenção das culturas foi realizada de maneira idêntica, sendo o meio completo suplementado com soro fetal bovino importado (Sigma®) trocado semanalmente e as subculturas realizadas quinzenalmente. O desempenho celular nos diferentes recipientes foi comparado por critérios de viabilidade e morfologia das células visualizadas pelo microscópio invertido e pela coloração de Giemsa, conforme item 4.2.

4.4- Experimento 2: Cultivo da IDE8 com suplementação de distintos soros

Duas marcas de Soro Fetal Bovino (SFB): uma importada (Sigma®) e outra nacional (Cultilab®) foram avaliadas quanto ao desempenho proporcionado às culturas de IDE8. As células foram cultivadas em placas de 24 orifícios (Cell Wells - Corning®) próprias para cultivo celular. Foram disponibilizados quatro orifícios com células (réplicas) contendo 1 ml de meio completo suplementado com SFB importado e mais quatro orifícios com meio completo suplementado com SFB nacional. Os meios suplementados com os dois tipos de SFB eram trocados semanalmente e as subculturas realizadas quinzenalmente. As avaliações de desempenho das culturas e

subculturas foram feitas através de teste de viabilidade e análise de morfologia celular por observação em microscópio invertido e por lâminas coradas, conforme item 4.2.

4.5- Experimento 3: Cultivo da IDE8 após crescentes períodos de estocagem sob refrigeração a 4°C

Com o objetivo de facilitar a preservação da linhagem por curtos períodos, 10 ml de uma suspensão com concentração conhecida de células ($3,8 \times 10^6$ células/ml) em meio L-15 completo suplementado com SFB Sigma® foi mantida refrigerada a 4°C em um tubo Falcon® de 15 ml por um período de até 60 dias. A cada 15 dias a suspensão era homogeneizada e alíquotas de 1 ml da mesma eram colocadas em tubos "flat-sided" (NUNC™) contendo mais 1 ml de meio completo suplementado com SFB Sigma®. A partir do primeiro subcultivo, as culturas originadas da suspensão de IDE8 sob refrigeração foram avaliadas quanto à viabilidade e morfologia, conforme item 4.2. Os subcultivos foram feitos aos 15, 30, 45 e 60 dias após a passagem para os tubos "flat-sided" próprios para cultivo. As condições de manutenção das culturas foram semelhantes às anteriormente descritas, com trocas de meio semanais e subculturas quinzenais.

4.6- Experimento 4: Cultivo da IDE8 após criopreservação em nitrogênio líquido

Foram avaliadas três técnicas para o congelamento da IDE8 em nitrogênio líquido utilizando-se dois crioprotetores distintos, o Dimetilsulfóxido (DMSO) e a Glicerina P.A.. Uma única cultura de IDE8 teve sua monocamada desorganizada, homogeneizada em seu meio completo e esta suspensão foi centrifugada a $250 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 9 ml de meio completo fresco suplementado com SFB Sigma®. Dezoito alíquotas de 0,5 ml foram preparadas a partir desta suspensão, sendo que metade destas alíquotas recebeu mais 0,5 ml (cada) de mistura de congelamento com crioprotetor DMSO e a outra metade mais 0,5 ml de uma segunda mistura de congelamento com crioprotetor glicerina

(P.A.) (Anexo 3). Compostos então os 18 tubos de congelamento, estes foram divididos em três grupos de acordo com a técnica de congelamento adotada. O primeiro grupo composto de três tubos de congelamento com DMSO e três com Glicerina P.A. foi congelado pela técnica de congelamento rápido, em que os tubos foram imersos imediatamente em nitrogênio líquido. No segundo grupo, também composto por três tubos de congelamento com DMSO e três com Glicerina P.A., empregou-se a técnica de congelamento em etapas em que os tubos foram mantidos durante 30 minutos a 4°C, seguidos de 30 minutos a -20 °C e, finalmente, imersos em nitrogênio líquido. O terceiro grupo, com composição semelhante ao primeiro e segundo grupos, foi congelado pela técnica de congelamento lento-gradual (Munderloh et al., 1994, com modificações: concentração do DMSO na mistura de congelamento - 6%, uso de glicerina 6% e material usado para a imersão dos tubos de congelamento no botijão de nitrogênio líquido) em que os tubos de congelamento se encaixaram em um suporte fixo na abertura do botijão de nitrogênio líquido, e através de um sistema de manivela, este suporte foi abaixado de forma que os tubos entraram em contato lentamente com o vapor e em seguida com a porção líquida do nitrogênio. Junto ao suporte, foi colocado um termômetro para garantir a queda de temperatura de -1°C por minuto. A temperatura inicial foi de 0°C, chegando a -30°C após 30 minutos, quando os tubos foram, por fim, imersos na porção líquida do nitrogênio.

Após oito dias estocados em nitrogênio líquido, os conteúdos de todos os tubos de congelamento sofreram descongelamento rápido em banho-maria a 37°C (Munderloh et al., 1994), foram centrifugados a 250 x g por 10 minutos a 4°C e, após desprezar o sobrenadante para retirada do crioprotetor, as células foram ressuspendidas em 1,5 ml de meio apropriado para o pós-descongelamento (Munderloh et al., 1994, com modificações: meio suplementado com 20% de SFB Sigma®) (Anexo 4) e colocados individualmente em uma placa de cultivo de 24 orifícios (Cell Wells -

Corning®). No dia seguinte, o meio pós-descongelamento foi trocado por meio pós-descongelamento fresco. A substituição deste meio especial pelo meio completo sem gentamicina e suplementado com apenas 5% de SFB Sigma® foi realizada apenas a partir do oitavo dia de cultivo. As culturas foram avaliadas pela viabilidade e morfologia das células. Subculturas feitas após 15 e 30 dias do descongelamento também foram avaliadas pelos mesmos critérios.

A Figura 1 apresenta a representação esquemática dos experimentos realizados.

4.7- Análise estatística

Os métodos estatísticos exigem independência entre as unidades experimentais para serem adequadamente aplicados. A IDE8 é uma linhagem de células proveniente de uma única cultura "mãe" estabelecida em 1994 por Munderloh e colaboradores. Mesmo considerando a provável variação entre as células da cultura inicial, a variabilidade esperada entre as atuais culturas então existentes é mínima e as amostras obtidas a partir delas podem ser consideradas réplicas.

Considerando-se a importância de estudos para obtenção de melhores condições de desenvolvimento da cultura, pode-se, neste caso, utilizar-se de meios estatísticos para comparar a viabilidade celular, utilizando o coeficiente de variação (CV) reduzido, provavelmente < 5%, com risco de haver uma diferenciação entre tratamentos não confirmada pela percepção crítica do pesquisador.

A comparação entre as viabilidades celulares das culturas com diferentes tratamentos foi realizada através do "Qui-Quadrado" (χ^2), baseado em Sampaio (2002). Em algumas comparações, obteve-se apenas 1 grau de liberdade, sendo, portanto, necessário realizar o cálculo do "qui-quadrado" ajustado ($\chi^2_{A.J.}$), proposto por Yates (1934) para esta situação. Valores da análise estatística dos experimentos estão descritos no Anexo 5 e os valores de \pm^2 tabelado foram extraídos da Tabela contida no Anexo 6.

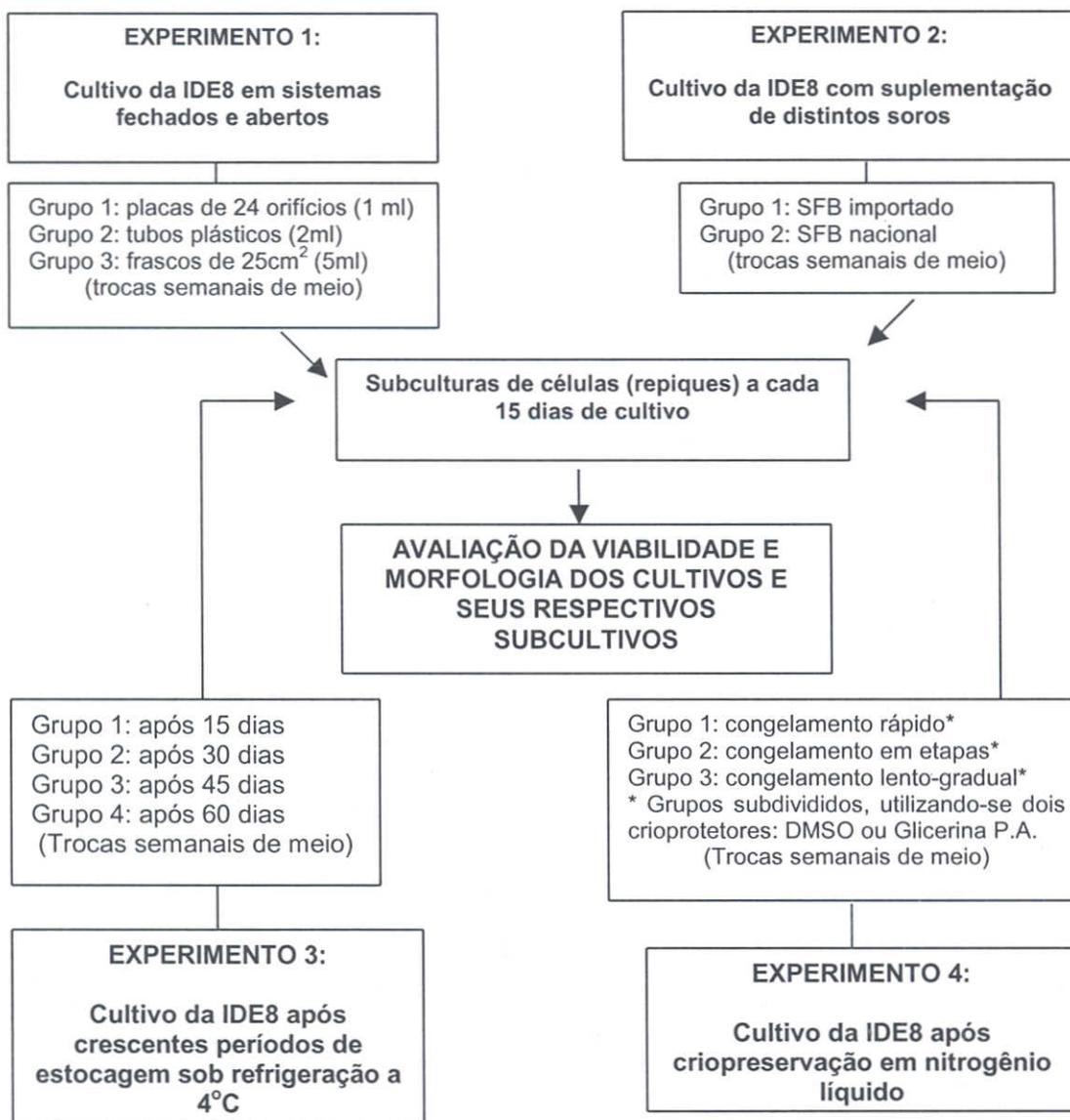


Figura 1: Representação esquemática dos experimentos realizados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultivo da IDE8 em sistemas fechado e aberto de cultivo celular

Os cultivos da IDE8 em sistema aberto (placas) ou em sistemas fechados (tubos ou frascos) mostraram resultados bem próximos quanto à viabilidade celular. Nos primeiros 15 dias de cultivo, culturas em tubos de 2 ml apresentaram melhor desempenho, com viabilidade celular de 97,77%, sendo significativamente superior aos demais recipientes testados ($p < 0,05$). As culturas em frascos de 25 cm² apresentaram 94,85% de viabilidade e as cultivadas em placas 95,61% neste mesmo período (Figura 2). Aos 30 e 45 dias de cultivo, as culturas mantidas nos três tipos de recipientes obtiveram desempenhos estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) (Figura 2). As viabilidades médias de cultivo das passagens (subculturas) originadas das culturas iniciais do experimento foram estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) desde os primeiros 15 dias de cultivo comparando-se os três tipos de recipientes (Figura 3).

Os cultivos mantidos em placas de 24 orifícios apresentaram boa viabilidade celular ao longo de 45 dias de cultivo e as características de sistema aberto das placas parecem não ter afetado o desempenho das células IDE8 em relação às culturas mantidas nos recipientes de sistema fechado.

Nesse e nos demais experimentos a avaliação morfológica feita em impressões coradas pelo Giemsa não revelou nenhuma anormalidade nas células IDE8, que apresentaram as mesmas características morfológicas da primeira cultura da linhagem recebida no laboratório (Figura 4).

A ausência de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) a partir dos 30 dias de cultivo entre as culturas mantidas em tubos de 2 ml, frascos de 25 cm² ou placas de 24 orifícios, sugere que todos esses recipientes podem ser utilizados sem

comprometimento do desempenho da IDE8. Entretanto, é importante ressaltar que frascos e tubos são indicados para amostras que são manuseadas em tempos diferentes, oferecendo ainda maior proteção contra contaminações por serem recipientes fechados (Freshney, 1986) e as placas (sistemas abertos) devem ser utilizadas quando há necessidade de um maior número de repiques simultâneos. O ideal é que se utilize a placa por períodos mais curtos já que ela está mais vulnerável a contaminações por não possuir vedação completa como tubos e frascos.

5.2 Cultivo da IDE8 com suplementação de distintos soros

O desempenho das culturas de IDE8 que tiveram meio suplementado com soro importado foi semelhante ao desempenho observado nas culturas mantidas com soro nacional durante os primeiros 45 dias de cultivo. Em ambas as condições de suplementação não foram detectadas contaminações durante o cultivo.

Nos primeiros 15 dias de cultivo, os dois grupos de culturas apresentaram uma pequena queda na percentagem de células viáveis, possivelmente pela adaptação inicial em placas, já que antes de se iniciar o experimento a cultura de IDE8 estava sendo mantida em tubos de 2 ml. Nos 30 dias seguintes, as curvas de desempenho das culturas com SFB nacional e importado continuaram paralelas e próximas em valores de percentagem de viabilidade sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (Figura 5). Comportamento semelhante foi observado em todas as subculturas feitas a partir das culturas que iniciaram o experimento, observando-se que estas passagens com soros importado e nacional continuaram com valores próximos de viabilidade (Figura 6). Portanto, o uso dos dois soros de distintas origens não resultou em diferenças estatisticamente significativas nas percentagens de viabilidade das culturas em passagens posteriores.

Dentre os fluidos biológicos que determinam o sucesso de uma cultura de células *in vitro*, o soro apresenta maior significância (Maurer, 1986). Há desvantagens no uso do soro em cultivo de células como o aumento do risco de contaminação por vírus, fungos e micoplasmas e seu elevado custo, principalmente no caso de soro fetal bovino. Pelo elevado padrão de controle de qualidade, os soros produzidos por empresas internacionais ganharam credibilidade, embora tenham custos extremamente altos, quando comparados aos nacionais. Muitos sistemas de cultivos não se adaptam à suplementação com SFB nacionais, tornando inviável a manutenção de certas linhagens, já que o soro fetal bovino importado constitui o componente

mais caro do sistema. Além disso, deve-se ressaltar que muitas vezes existem limitações de importação de produtos de origem animal, a exemplo do que ocorre atualmente em relação à proibição de importação de componentes biológicos oriundos de ruminantes de países com registros de casos de Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) ou de outros países considerados de risco pela Secretaria de Defesa Agropecuária (BRASIL, 2004). No presente trabalho, o sucesso da suplementação da IDE8 com SFB nacional possibilita, portanto, sua manutenção *in vitro* nas condições brasileiras com custos muito menores e com facilidades práticas.

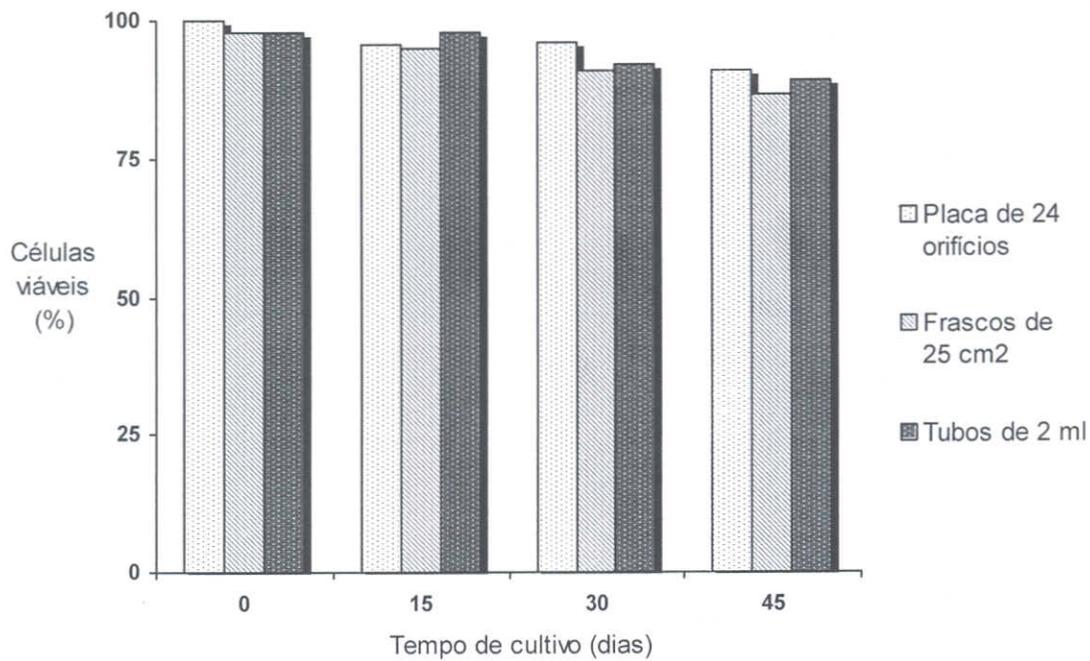


Figura 2: Viabilidade *in vitro* de células IDE8 mantidas em diferentes recipientes de cultivo.

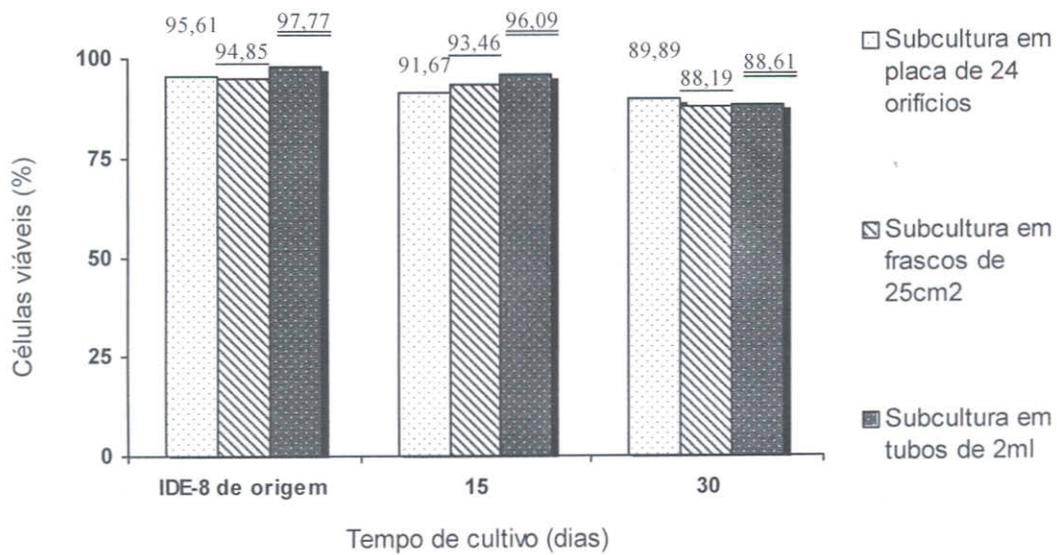


Figura 3: Viabilidade *in vitro* de subculturas de IDE8 mantidas em diferentes recipientes de cultivo.

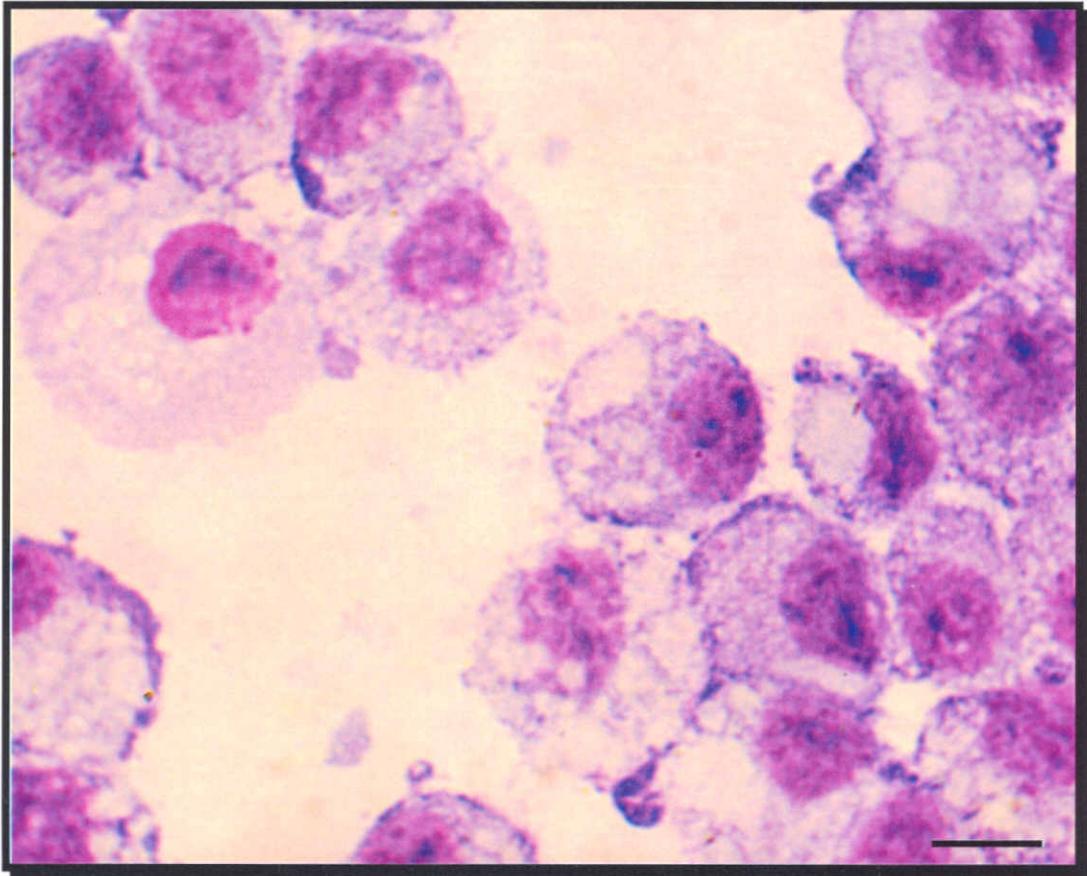


Figura 4: Microfotografia de células IDE8 coradas com Giemsa, Bar. 10 μ m

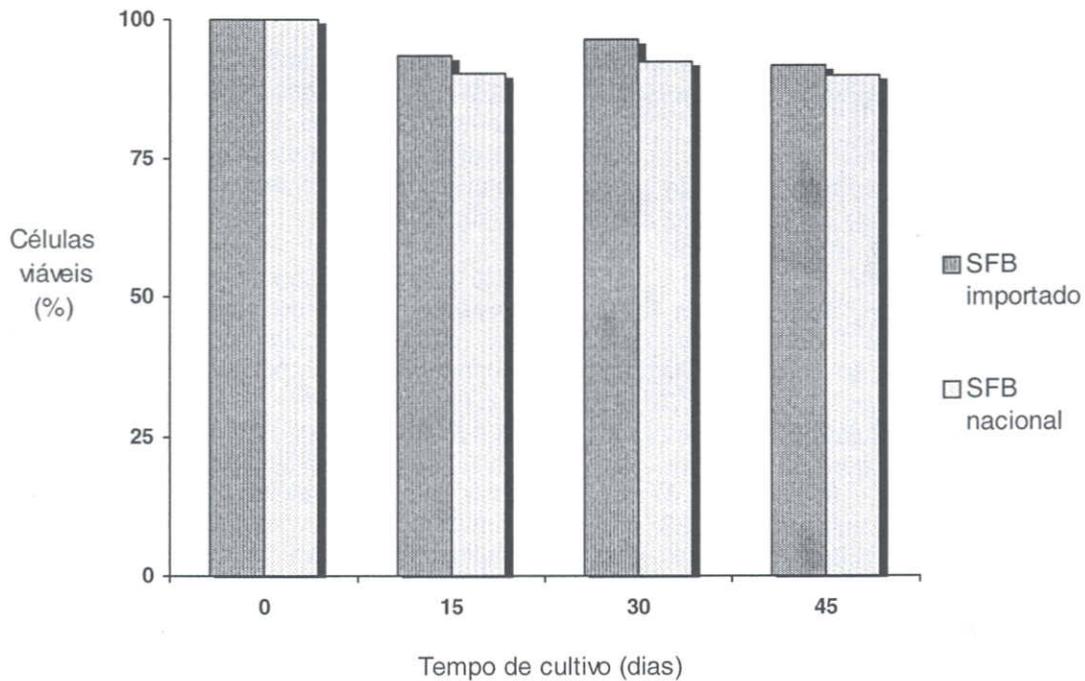


Figura 5: Efeito de diferentes soros fetais bovinos (SFB) sobre a viabilidade *in vitro* de culturas de células IDE8.

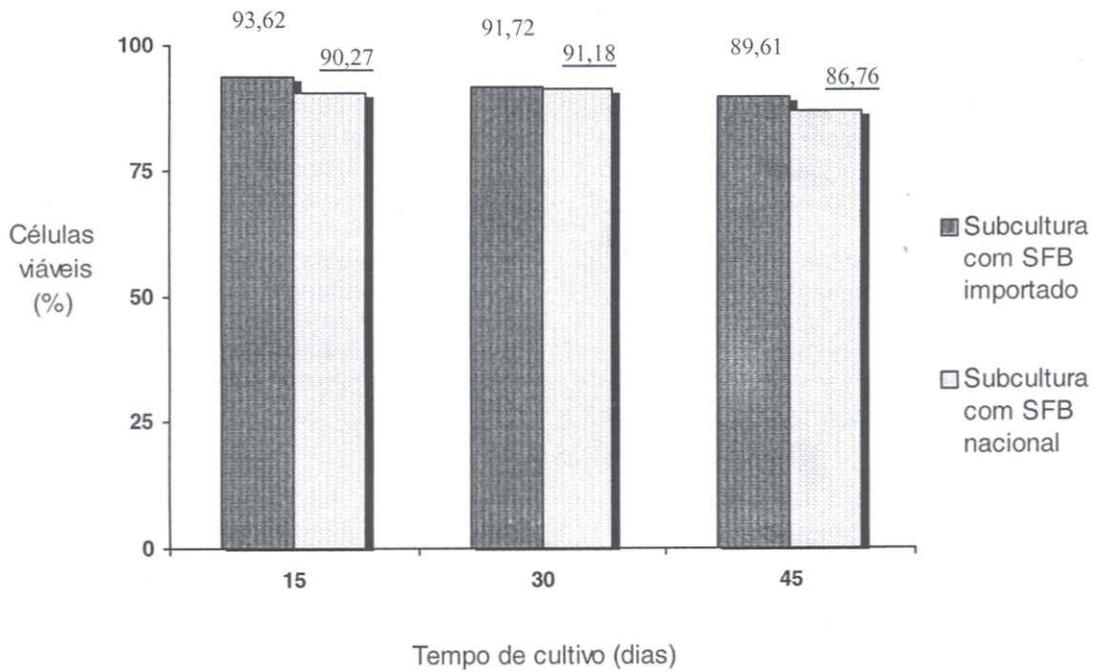


Figura 6: Efeito de diferentes soros fetais bovinos (SFB) sobre a viabilidade *in vitro* de subculturas de células IDE8

5.3 Cultivo da IDE8 após crescentes períodos de estocagem sob refrigeração a 4 °C

Observou-se que a IDE8 mantida sob refrigeração a 4°C pode ser recultivada após 15, 30, 45 ou 60 dias mantendo alta viabilidade celular. As células que permaneceram por 15 dias a 4°C demonstraram alta percentagem de viabilidade (96,53%) ao serem recultivadas em condições padrão (30°C ± 2°C). As viabilidades das células que deixaram a refrigeração a 4 °C com 30, 45 e 60 dias foram de 92,22%, 91,88% e 87,5%, respectivamente. A cultura de IDE8 que permaneceu por menor período sob refrigeração a 4°C (15 dias) apresentou melhor desempenho estatisticamente significativo até os 30 dias de cultivo ($p < 0,05$). Entretanto, após 45 dias de recultivo em condições padrão, as quatro culturas que permaneceram por 15, 30, 45 e 60 dias sob refrigeração apresentaram viabilidades celulares equivalentes, sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (Figura 7). Isto demonstra que houve recuperação das culturas que permaneceram sob refrigeração por mais de 15 dias, atingindo valores de viabilidade próximos aos da cultura que permaneceu por apenas 15 dias estocada a 4°C.

As subculturas originadas da cultura que permaneceu por apenas 15 dias sob refrigeração também se apresentaram com melhor desempenho em relação às outras culturas nos primeiros 15 dias de cultivo em condições padrão. Porém, já aos 30 dias de

cultivo, desde as subculturas originadas da IDE8 que permaneceu apenas 15 dias a 4°C até àquelas originadas de IDE8 mantida por 60 dias a 4°C apresentaram desempenhos estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) (Figura 8).

Este é um importante resultado que pode inovar o método de preservação da IDE8 por curtos períodos de tempo. Até o momento, as células IDE8 eram preservadas através do congelamento em nitrogênio líquido, porém com muitas limitações. Pesquisadores que cultivam essa linhagem celular são unânimes em afirmar que o congelamento não é totalmente confiável já que várias culturas não mantêm viabilidade após a criopreservação (Bell-Sakyi, 2003, comunicação pessoal; Blouin, 2004, comunicação pessoal) e os laboratórios que cultivam a IDE8 mantêm em geral os cultivos contínuos ao longo de vários anos por não confiarem nos processos de congelamento (Bell-Sakyi, 2003, comunicação pessoal). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a linhagem de IDE8 pode ser estocada a 4 °C por até 60 dias sem maiores perdas, podendo voltar a ser cultivada a 30°C (± 2°C) sem prejuízos à sua expansão. Esse sistema de estocagem pode ser extremamente útil em períodos que se torna necessária a paralização dos cultivos por ocasião, por exemplo, de férias de pessoal técnico, reformas em laboratórios ou mesmo visando a redução de gastos com reagentes para manutenção dos cultivos.

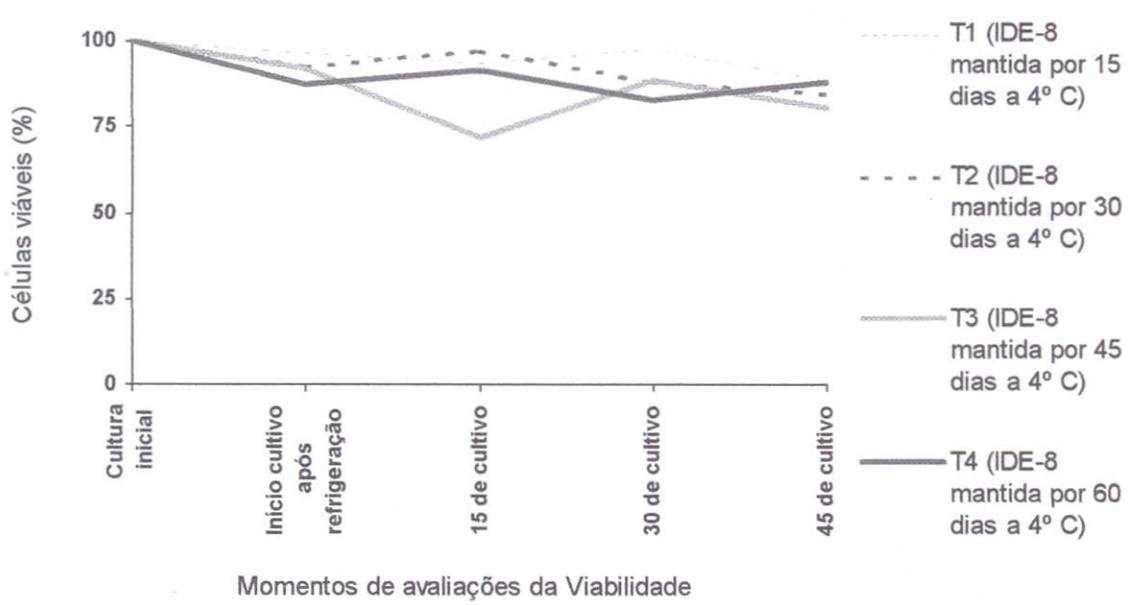


Figura 7: Efeito do resfriamento a 4°C sobre a viabilidade *in vitro* de células IDE8

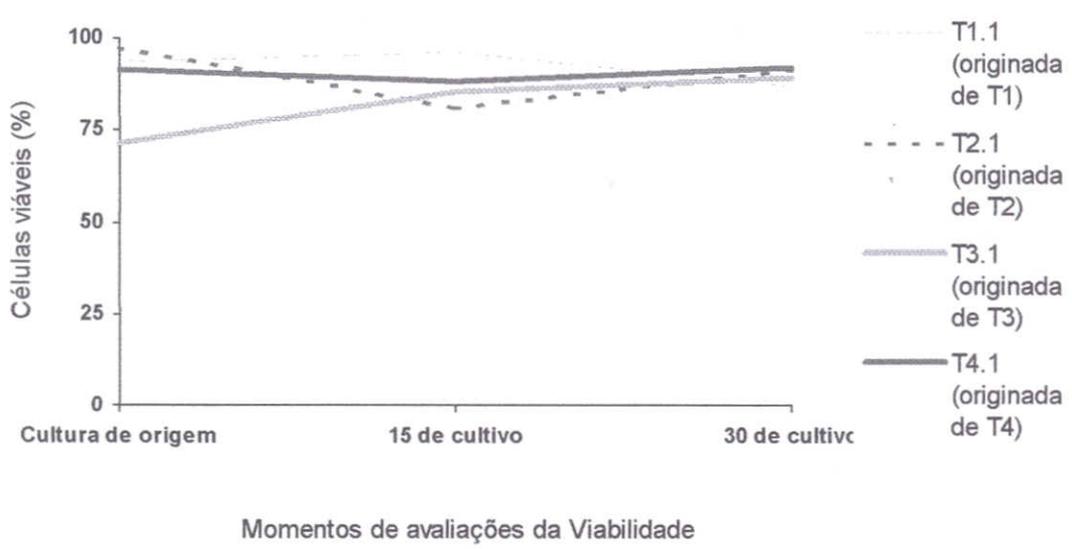


Figura 8: Efeito do resfriamento a 4°C sobre a viabilidade *in vitro* de subculturas de células IDE8

5.4 Cultivo da IDE8 após criopreservação em nitrogênio líquido

As culturas criopreservadas pela técnica de congelamento rápido, em que os tubos foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido, apresentaram baixa viabilidade com os dois crioprotetores utilizados. O mesmo ocorreu com a técnica de congelamento em etapas. Em ambas as técnicas, a viabilidade média das células logo após o descongelamento, não ultrapassou 7%.

Já a técnica de congelamento lento-gradual (Munderloh et al., 1994 - modificada) apresentou melhores resultados em relação à viabilidade celular com grandes diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação às outras técnicas testadas. Cultivos criopreservados com DMSO apresentaram o maior percentual de viabilidade após o descongelamento (74,96%). Já os cultivos criopreservados com glicerina através do congelamento lento-gradual apresentaram percentual de viabilidade baixo (23,04%) (Figura 9). Esse percentual de viabilidade, ainda que tenha sido o maior valor atingido com o uso da glicerina, não indica a glicerina como bom crioprotetor para células IDE8.

Evitar a perda acidental de uma linhagem, diminuir custos e acabar com a necessidade de cultivo constante são motivos de se congelar linhagens de células em nitrogênio

líquido. Apesar das dificuldades na prática de congelamento e descongelamento da IDE8, o congelamento lento-gradual, utilizando-se o DMSO, constituiu-se a melhor técnica de preservação desta linhagem em nitrogênio líquido, sendo realizado com sucesso através da técnica descrita por Munderloh e colaboradores (1994) com algumas modificações.

Observando-se que os resultados de viabilidade celular de IDE8 mantida a 4°C por até 60 dias (Experimento 3) foram superiores aos de células descongeladas do nitrogênio líquido (Experimento 4), pode-se reafirmar que a manutenção da IDE8 a 4°C pode ser eficiente como preservação da linhagem por até 60 dias, evitando-se os riscos e os gastos elevados de preservação em nitrogênio líquido (Figura 10).

Os resultados obtidos no presente estudo indicam claramente que o DMSO utilizado em um processo lento-gradual é adequado para preservação das células IDE8, fornecendo uma contribuição substancial para superar as dificuldades de preservação dessa linhagem celular. Por outro lado, pelo fato do congelamento em nitrogênio líquido apresentar ainda algumas limitações, especialmente relacionadas aos custos e à sua manipulação, a manutenção de culturas sob refrigeração pode ter ampla aplicação na preservação de células IDE8 por curtos períodos.

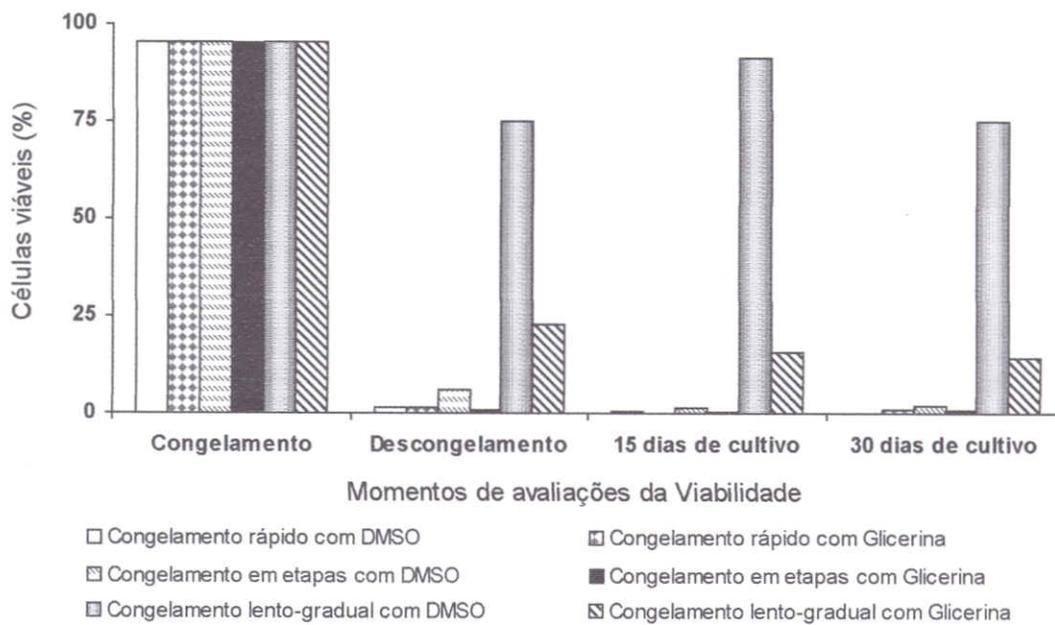


Figura 9: Efeito do congelamento com diferentes crioprotetores sobre a viabilidade *in vitro* de células IDE8.

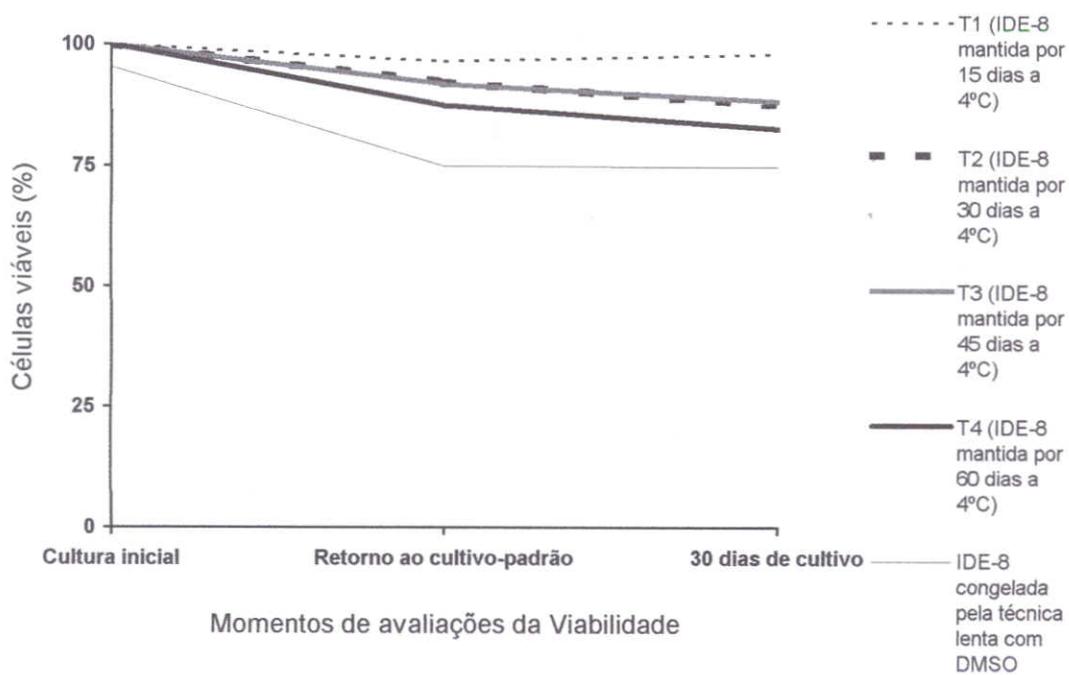


Figura 10: Efeito do resfriamento e do congelamento em nitrogênio líquido sobre a viabilidade *in vitro* de células IDE8.

6. CONCLUSÕES

1. Células IDE8 podem ser cultivadas em sistema aberto (placas) com viabilidade celular comparável à de cultivos mantidos em sistemas fechados (frascos de 25cm² e tubos de 2 ml), permitindo a realização de experimentos com réplicas bem padronizadas e minimizando os gastos com reagentes;
2. A linhagem IDE8 pode ser mantida em cultivos contínuos sendo suplementada com SFB de marca nacional de boa procedência em substituição à suplementação com SFB importado, sem comprometimento da viabilidade celular;
3. O congelamento lento-gradual em nitrogênio líquido utilizando o DMSO como crioprotetor constitui um processo eficaz para a preservação de células IDE8 por longos períodos;
4. A estocagem sob refrigeração a 4°C constitui um método eficaz e confiável de preservação das células IDE8 por até 60 dias, resultando cultivos com elevada viabilidade celular, sendo preferível ao congelamento em nitrogênio líquido para curtos períodos de preservação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSUP, E.M.; DeBOWES, R.M. Dimethyl sulfoxide. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.185, n. 9, p. 1011-1014, 1984.

ANDREASEN, M.P. Multiplication of *Cowdria ruminantium* in monolayer of tick cells. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, v. 82, n. 3, p. 455-456, 1974.

BELL, L.J. *Development of Theileria in tick tissue culture*. 1983. 236 f. Tese - University of Edinburgh.

BELL-SAKYI, L. *Ehrlichia ruminantium* grows in cell lines from four Ixodid tick genera. *J. Comp. Pathol.*, v. 130, n. 4, p. 285-293, 2004a.

BELL-SAKYI, L. *Epidemiology of heartwater in Ghana and growth of Ehrlichia ruminantium in tick cell lines*. 2004b. 205 f. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária, Utrecht University.

BELL-SAKYI, L. Tick tissue culture and *Theileria*. In: EEC, 2, 1992, Anand, Proc. Anand: National Dairy Development Board, 1992. p. 76-81.

BELL-SAKYI, L.; PAXTON, E.A.; MUNDERLOH, U.G. et al. Growth of *Cowdria ruminantium*, the causative agent of heartwater, in tick cell line. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, n.3, p. 1238-1240, 2000a.

BELL-SAKYI, L.; PAXTON, E.A.; MUNDERLOH, U.G. et al. Morphology of *Cowdria ruminantium* growth in two tick cell lines. In: INTERNATIONAL CONFERENCE "TICK AND TICK-BORNE PATHOGENS: INTO THE 21ST CENTURY", 3, 2000. Proc. 2000b. p. 131-137.

BHAT, U.K.M.; YUNKER, C.E. Establishment and characterization of a diploid cell line from the tick, *Dermacentor parumapertus* Neumann (Acarina: Ixodidae). *J. Parasitol.*, v. 63, n. 6, p. 1092-1098, 1977.

BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in cultured *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) cells. *J. Med. Entomol.*, v. 35, n.5, 788-797, 1998.

BLOUIN, E.F.; SALIKI, J.T.; KOCAN, K.M. et al. Evaluation of *Anaplasma marginale* from tick cell culture as an immunogen for cattle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 849, p. 253-258, 1998.

BLOUIN, E.F.; BARBET, A.F.; YI, J. et al. Establishment and characterization of an Oklahoma isolate of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells. *Vet. Parasitol.*, v. 87, n. 4, p. 301-313, 2000.

- BLOUIN, E.F.; de la FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C. et al. Applications of a cell culture system for studying the interaction of *Anaplasma marginale* with tick cells. *Anim. Health Res. Rev.*, v. 3, n. 2, p. 57-68, 2002a.
- BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M.; de la FUENTE, J. et al. Effect of tetracycline on development of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells. *Vet. Parasitol.*, v. 107, n. 1-2, p. 115-126, 2002b.
- BLOUIN, E.F.; SALIKI, J.T.; de la FUENTE, J. et al. Antibodies to *Anaplasma marginale* major surface proteins 1a and 1b inhibit infectivity for cultured tick cells. *Vet. Parasitol.*, v. 111, n. 2-3, p. 247-260, 2003.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 7 de 17 de março de 2004. Faz proibições quanto à importação de ruminantes e produtos derivados de países com registros de casos de Encefalopatia Espongiforme Bovina. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, *Diário Oficial da União*, 18 de março de 2004, seção 1, p. 3.
- BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet.*, v. 76, n. 1, p. 61-90, 1986.
- BURGDORFER, W.; BARBOUR, A.G.; HAYES, S.F. et al. Lyme disease – a tick-borne spirochetosis? *Science*, v. 216, n. 4552, p. 1317-1319, 1982.
- CAMUS, E.; BARRE, N.; MARTINEZ, D. et al. Heartwater (cowdriosis) a review. 2. ed. OIE, 1996. p. 177.
- DAVIS, W.C.; TALMADGE, J.E.; PARISH, S.M. et al. Synthesis of DNA and protein by *Anaplasma marginale* in bovine erythrocytes during short term culture. *Infect. Immun.*, v. 22, n. 2, p. 597-602, 1978.
- DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M.; GARCIA-GARCIA, J.C. et al. Vaccination of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks. *Vet. Microbiol.* v. 89, n. 2-3, p. 239-251, 2002.
- DIKMANS, G. The transmission of anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 38, p. 5-16, 1950.
- DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmaceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 51, n. 6, p. 2145-65, 2001.
- EIDE, P.E.; CALDWELL, J.M. A method for obtaining primary cultures of dispersed embryonic tissue from the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v.66, p. 891-893, 1973.
- ERP, E.E.; FAHRNEY, D. Exit of *Anaplasma marginale* from bovine red blood cells. *Am. J. Res.*, v. 36, p. 707-709, 1975.
- EWING, S.A. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In: NATIONAL ANAPLASMOSIS CONFERENCE, 7, 1981, Mississippi State University, MS. *Proc. Mississippi State University*: 1981. p. 395-423.
- EWING, S.A.; MUNDERLOH, U.G.; BLOUIN, E.F. et al. *Ehrlichia canis* in tick cell culture. In: CONFERENCE OF RESEARCH WORKERS IN ANIMAL DISEASES, 76, 1995, Chicago, USA. *Proc. Chicago*: 1995.
- FRESHNEY, R.I. *Animal cell culture: a practical approach*. Oxford: IRL PRESS, 1986. P. 248.
- GONÇALVES-RUIZ, P.M.; PASSOS, L.M.F.; RIBEIRO, M.F.B. Lack of infectivity of a brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. *Vet. Parasitol.* v. 128, n. 3-4, p. 325-331, 2005.

- HAY, R.J. Preservation and characterisation. In: FRESHNEY, R.I. *Animal cell culture: a practical approach*. Oxford: IRL PRESS, 1986. cap. 4, p. 71-111.
- HEINZ, F.X.; KUNZ, C. Isolation of dimeric glycoprotein subunits from tick-borne encephalitis virus. *Interviol.*, v. 13, n. 3, p. 169-177, 1980.
- HOLMAN, P.J. Partial characterization of a unique female diploid cell strain from the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, v. 18, n. 1, p. 84-88, 1981.
- HOLMAN, P.J.; RONALD, N.C. A new tick cell line derived from *Boophilus microplus*. *Res. Vet. Sci.*, v. 29, n. 3, p. 383-387, 1980.
- KOCAN, K.M.; STILLER, D.; GOFF, W.L. et al. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.53, n. 4, p.499-507, 1992.
- KOCAN, K.M.; MUNDERLOH, U.G.; EWING, S.A. Development of the Ebony isolate of *Ehrlichia canis* in cultured *Ixodes scapularis* cells. In: CONFERENCE OF RESEARCH WORKERS IN ANIMAL DISEASES, 79, 1998, Chicago. *Proc. Chicago*, 1998 (resumo 95).
- KOCAN, K.M.; HALBUR, T.; BLOUIN, E.F. et al. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Vet. Parasitol.*, v.102, n. 1-2, p. 151-161, 2001.
- KURTTI, T.J.; MUNDERLOH, U.G.; SAMISH, M. Effect of medium supplements on tick cells in culture. *J. Parasitol.*, v.68, n. 5, p. 930-935, 1982.
- KURTTI, T.J.; MUNDERLOH, U.G.; STILLER, D. The interaction of *Babesia caballi* kinetes with tick cells. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 42, n. 3, p. 334-343, 1983.
- KURTTI, T.J.; MUNDERLOH, U.G.; AHLSTRAND, G.G. et al. *Borrelia burgdorferi* in tick cell culture: grown and cellular adherence. *J. Med. Entomol.*, v. 25, n. 4, p. 256-261, 1988.
- LANE, R.S.; PIESMAN, J.; BURGDORFER, W. Lyme borreliosis: relation of causative agente to its vectors and hosts in North America and Europe. *Ann. Rev. Entomol.*, v. 36, p. 587-609, 1991.
- MARBLE, D.W.; HANKS, M.A. A tissue culture method for *Anaplasma marginale*. *Cornell Vet.*, v. 62, n. 2, p. 196-205, 1972.
- MARTIN, H.M.; VIDLER, B.O. *In vitro* growth of tick tissues (*Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901). *Exp. Parasitol.*, v. 12, p. 192-203, 1962.
- MAURER, H.R. Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture. In: FRESHNEY, R.I. *Animal cell culture: a practical approach*. Oxford: IRL PRESS, 1986. cap. 2, p. 13-30.
- MAZZOLA, V.; AMERAULT, T.E.; ROBY, T.O. Survival of *Anaplasma marginale* in *Aedes albopictus* cells. *Am. J. Vet. Res.*, v. 37, n. 8, p. 987-989, 1976.
- McHOLLAND, L.E.; TRUEBLOOD, M.S. Cultivation of *Anaplasma marginale*: eight year report. In: NATIONAL ANAPLASMA CONFERENCE, 7, 1981, Mississippi State. *Proc. Mississippi State University Press*: HIDALGO, R.J. and JONES, E.W. (eds.), 1981. p. 167-184.
- MUNDERLOH, U.G.; KURTTI, T.J. Formulation of medium for tick cell culture. *Exp. Appl. Acarol.*, v. 7, n. 3, p. 219-222, 1989.
- MUNDERLOH, U.G.; LIU, Y. WANG, M. et al. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J. Parasitol.*, v. 80, n. 4, p. 533-543, 1994.
- MUNDERLOH, U.G.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. et al. Establishment of the tick (Acari: Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. *J. Med. Entomol.*, v. 33, n. 4, p. 656-664, 1996a.

MUNDERLOH, U.G.; MADIGAN, J.E.M.; DUMLER, J.S. et al. Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34, n. 3, p. 664-670, 1996b.

MUNDERLOH, U.G.; JAURON, S.D.; FINGERLE, V. et al. Invasion and intracellular development of human granulocytic ehrlichiosis agent in tick cell culture. *J. Clin. Microbiol.*, v. 37, n. 8, p. 2518-2524, 1999.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKER, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v. 164, p. 666, 1949.

PUDNEY, M.; VARMA, M.G.R.; LEAKE, C.J. Establishment of cell lines from ixodid ticks. *TCA Manual* v. 5, p. 1003-1007, 1979.

RALL, W.F.; POLGE, C. Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. *J. Reprod. Fertil.*, v. 70, n. 1, p. 285-292, 1984.

RIBEIRO, M.F.; LIMA, J.D. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.*, v. 61, n. 1-2, p. 31-39, 1996.

RIBEIRO, M.F.B.; PASSOS, L.M.F.; GUIMARÃES, A.M. Ultrastructure of *Anaplasma marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 70, n. 4, p. 271-277, 1997.

RISTIC, M.; WATRACH, A.M. Anaplasmosis. VI. Studies and a hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. *Am. J. Vet. Res.*, v. 24, p. 267-276, 1963.

RODGERS, S.J.; SALIKI, J.T.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. The development of a semi-automated latex agglutination test for the detection of antibodies to *Anaplasma marginale* using a cell culture-derived antigen. *Ann N Y Acad Sci.*, v. 849, p. 282-292, 1998.

SALIKI, J.T.; BLOUIN, E.F.; RODGERS, S.J. et al. Use of tick cell culture-derived *Anaplasma marginale* antigen in a competitive ELISA for serodiagnosis of anaplasmosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 849, p. 273-281, 1998.

SAMISH, M.; PIPANO, E.; HANA, B. Cultivation of *Anaplasma marginale* from cattle in *Dermacentor* cell line. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, n. 2, p. 254-256, 1988.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.

SIMSER, J.A.; PALMER, A.T.; MUNDERLOH, U.G. et al. Isolation of a spotted fever group rickettsia, *Rickettsia peacockii*, in a Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*, cell line. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, n. 2, p. 546-552, 2001.

SOJKA, E.J.; KIMMICK, S.V.B.; CARISON, G.P. et al. Dimethyl sulfoxide update – New applications and dosing methods. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, v.36, p. 683-690, 1990.

SPIELMAN, A.; WILSON, M.L.; LEVINE, J.F. et al. Ecology of *Ixodes dammini*-borne human babesiosis and Lyme disease. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 30, p. 439-460, 1985.

SWANN, A.I.; HART, L.T.; OHRBERG, O. et al. *Anaplasma marginale* in rabbit bone marrow culture. In: NATIONAL ANAPLASMA CONFERENCE, 7, 1981, Mississippi State. *Proc. Mississippi State University Press*: HIDALGO, R.J. and JONES, E.W. (eds.), 1981. p. 185-196.

VARMA, M.G.R.; PUDNEY, M.; LEAKY, C.J. The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) and their infection with some arbovirus. *J. Med. Entomol.*, v.11, n. 6, p. 698-706, 1975.

WEYER, F. Explantationsversuche bei Lusen in Verbindung mit der Kultur von Rickettsien. *Zblatt Bakt. Parasitenk. Infektionskr.*, v. 159, n. 1-2, p. 13-22, 1952.

WOLDEHIWET, Z.; HORROCKS, B.K.; SCAIFE, H. et al. Cultivation of ovine strain of *Ehrlichia phagocytophila* in tick cell cultures. *J. Comp. Pathol.*, v. 127, n. 2-3, p. 142-149, 2002.

YATES, F. Contingency tables involving small numbers and χ^2 test. *J. Roy. Statist. Soc. Suppl.*, v. 1, p. 217-235, 1934.

YUNKER, C.E. Preparation and maintenance of arthropod cell cultures: Acari,

with emphasis on ticks. In: YUNKER, C.E. (ed.) *Arbovirus in arthropods cells*. Boca Raton: CRC PRESS, 1987. v. 1, p. 35-51.

YUNKER, C.E.; CORY, J. Effectiveness of refrigerated nymphs in tick tissue culture experiments. *J. Parasitol.*, v. 51, p. 686, 1965.

YUNKER, C.E.; CORY, J.; MEIBOS, H. Continuous cell lines from embryonic tissues of ticks (Acari: Ixodidae). *In Vitro*, v. 17, n. 2, p. 139-142, 1981.

YUNKER, C.E.; TULLY, J.G.; CORY, J. Arthropod cell lines in the isolation and propagation of tickborne spiroplasmas. *Curr. Microbiol.*, v. 15, p. 45-50, 1987.

ANEXOS

Anexo 1. Preparação do Meio L-15 incompleto (Munderloh e Kurtti, 1989):

1) Preparação de soluções minerais e vitamínicas

| Ingredientes | Peso (mg/100ml) |
|--------------------------------------|-----------------|
| SOLUÇÃO A | |
| CoCl 6H ₂ O | 20 |
| CuSO ₄ 5H ₂ O | 20 |
| MnSO ₄ H ₂ O | 160 |
| ZnSO ₄ 7H ₂ O | 200 |
| SOLUÇÃO B | |
| NaMoO ₄ 2H ₂ O | 20 |
| SOLUÇÃO C | |
| Na ₂ SeO ₃ | 20 |
| SOLUÇÃO D | |
| Glutatione (reduzida) | 1000 |
| Ácido ascórbico | 1000 |
| FeSO ₄ 7H ₂ O | 50 |
| Solução A | 1 ml |
| Solução B | 1 ml |
| Solução C | 1 ml |

Vitaminas

| | |
|-------------------------------------|-------|
| Ácido p-aminobenzóico | 100mg |
| Cobalamina Vitamina B ₁₂ | 50 |
| D-biotina | 10 |

Obs: Os ingredientes das soluções devem ser dissolvidos em água destilada na ordem em que foram listadas e o volume de cada solução deve ser completado para 100 ml.

O estoque da solução D e de vitaminas deve ser feito através de alíquotas de 1 ml a -20°C. Já as soluções A, B e C podem ser estocadas em frascos maiores a -20°C.

2) Dissolver conteúdo L-15 (Sigma®) (para 1 litro de meio) a 900 ml de água destilada e em seguida adicionar:

| | |
|-------------------------------|--------|
| Ácido aspártico | 299mg |
| Ácido glutamínico | 500mg |
| Prolina | 300mg |
| Ácido α -cetoglutâmico | 299mg |
| D-Glicose | 2239mg |
| Solução D | 1 ml |
| Vitaminas | 1 ml |

3) Completar volume para 1 litro e filtrar em membrana de 0.22 μ m. Estocar por até 2 meses a 4°C ou por maior tempo a -20°C.

Anexo 2. Preparação do Meio L-15 completo:

5. Para preparar 100 ml de meio L-15 completo:

| | |
|--|-------------------------------|
| Meio L-15 incompleto | 85 ml |
| Caldo de Triptose Fosfatada (Sigma®) | 10 ml |
| Soro Fetal Bovino inativado (Sigma®) | 5 ml |
| Lipoproteína Bovina Concentrada (Sigma®) | 1 ml (10% da solução de L-15) |
| L-glutamina 200mM | 1 ml |
| Penicilina (10.000 unidades)/Estreptomicina (10.000µg) | 1 ml |

6. O meio completo deve ser mantido a 4°C e o pH pode ser ajustado com Hidróxido de Sódio estéril 1N

Anexo 3. Preparação da Mistura de Congelamento com crioprotetor a 6%:

| Volume Final | 10 ml | 15 ml | 20 ml |
|--------------------------------------|--------|---------|---------|
| Meio L-15 incompleto | 6,3 ml | 9,45 ml | 12,6 ml |
| Soro Fetal Bovino inativado (Sigma®) | 2,0 ml | 3,0 ml | 4,0 ml |
| Sacarose 2M | 0,5 ml | 0,75 ml | 1,0 ml |
| Crioprotetor: DMSO ou Glicerina | 1,2 ml | 1,8 ml | 2,4 ml |

1) A solução final é composta da mistura de congelamento acrescentando volume igual de suspensão das células a serem congeladas.

Anexo 4. Preparação de Meio Pós-descongelamento (100 ml)

| | |
|--|--------------------------------|
| Meio L-15 incompleto | 70 ml |
| Caldo de Triptose Fosfatada (Sigma®) | 10 ml (10% da solução de L-15) |
| Soro Fetal Bovino inativado (Sigma®) | 20 ml (20% da solução de L-15) |
| Lipoproteína Bovina Concentrada (Sigma®) | 1 ml (10% da solução de L-15) |
| L-glutamina 200mM | 1 ml |
| Gentamicina | 50µl/ml |

Anexo 5. Tabela de resultados:

Experimento 1: Cultivo da IDE8 em sistemas fechado e aberto de cultivo celular

| 15 dias | % Viabilidade | Médias |
|------------------------------|---------------|---|
| Tubos | 97,77 | Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) |
| Frascos | 94,85 | |
| Placas | 95,61 | |
| 30 dias | | |
| Tubos | 91,92 | Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) |
| Frascos | 90,96 | |
| Placas | 95,93 | |
| | | Média: 91,88% |
| 45 dias | | |
| Tubos | 89,13 | Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) |
| Frascos | 86,54 | |
| Placas | 90,91 | |
| | | Média: 87,97% |
| 15 dias (subculturas) | | |
| Tubos | 96,09 | Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) |
| Frascos | 93,46 | |
| Placas | 91,67 | |
| | | Média: 94,51% |
| 30 dias (subculturas) | | |
| Tubos | 88,61 | Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) |
| Frascos | 88,19 | |
| Placas | 89,89 | |
| | | Média: 88,51% |

Experimento 2: Cultivo da IDE8 com suplementação de distintos soros

| 15 dias | % Viabilidade | Médias |
|-----------------------------|---------------|---|
| Sigma | 93,62 | Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) |
| Cultilab | 90,27 | |
| | | Média: 91,97% |
| 30 dias | | |
| % Viabilidade | | |
| Sigma | 96,26 | Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) |
| Cultilab | 92,47 | |
| | | Média: 95,11% |
| 45 dias | | |
| % Viabilidade | | |
| Sigma | 91,71 | Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) |
| Cultilab | 90,00 | |
| | | Média: 91,42% |
| 15 dias (subcultura) | | |
| % Viabilidade | | |
| Sigma | 91,72 | Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) |
| Cultilab | 91,18 | |
| | | Média: 91,46% |
| 30 dias (subcultura) | | |
| % Viabilidade | | |
| Sigma | 89,61 | Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) |
| Cultilab | 86,76 | |
| | | Média: 88,74% |

Experimento 3: Cultivo da IDE8 após crescentes períodos de estocagem sob refrigeração a 4°C.

| Retorno ao cultivo 30 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$) | % Viabilidade | Médias |
|--|---------------|---|
| T1 | 96,53 | Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) |
| T2 | 92,22 | |
| T3 | 91,88 | |
| T4 | 87,50 | |
| 15 dias | | |
| T1 | 93,65 | Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) |
| T2 | 97,18 | |
| T3 | 71,43 | |
| T4 | 91,36 | |
| 30 dias | | |
| T1 | 97,96 | Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) |
| T2 | 87,64 | |
| T3 | 88,24 | |
| T4 | 82,57 | |
| 45 dias | | |
| T1 | 88,24 | Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) Média: 83,53% |
| T2 | 84,21 | |
| T3 | 80,26 | |
| T4 | 87,67 | |
| 15 dias (subculturas) | | |
| T1 | 96,15 | Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) |
| T2 | 80,91 | |
| T3 | 85,51 | |
| T4 | 88,37 | |
| 30 dias (subculturas) | | |
| T1 | 86,79 | Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) Média: 89,39% |
| T2 | 91,51 | |
| T3 | 88,97 | |
| T4 | 91,67 | |

Experimento 4: Cultivo da IDE8 com suplementação de distintos soros

| Descongelamento | % Viabilidade | Médias |
|-----------------|---------------|---|
| CRD | 1,39 | Houve diferença estatisticamente significativa (p<0,05) |
| CRG | 1,37 | |
| CMD | 6,22 | |
| CMG | 0,78 | |
| CLD | 74,96 | |
| CLG | 23,04 | |
| 15 dias | % Viabilidade | |
| CRD | 0,35 | Houve diferença estatisticamente significativa (p<0,05) |
| CRG | 0,0 | |
| CMD | 1,66 | |
| CMG | 0,65 | |
| CLD | 91,34 | |
| CLG | 15,90 | |
| 30 dias | % Viabilidade | |
| CRD | 0,0 | Houve diferença estatisticamente significativa (p<0,05) |
| CRG | 1,22 | |
| CMD | 1,83 | |
| CMG | 0,93 | |
| CLD | 74,85 | |
| CLG | 14,29 | |

Anexo 6. Valores críticos de χ^2 segundo os graus de liberdade do estudo do nível de significância desejado (Probabilidade de erro tipo I):

| Graus de liberdade | Probabilidade de encontrar valores maiores (erro tipo I) | | | | | |
|--------------------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | 0,20 | 0,10 | 0,05 | 0,02 | 0,01 | 0,001 |
| 1. | 1,64 | 2,71 | 3,84 | 5,41 | 6,64 | 10,33 |
| 2. | 3,22 | 4,60 | 5,99 | 7,82 | 9,21 | 13,82 |
| 3. | 4,64 | 6,25 | 7,82 | 9,84 | 11,34 | 16,27 |
| 4. | 5,99 | 7,78 | 9,49 | 11,67 | 13,28 | 18,46 |
| 5. | 7,29 | 9,24 | 11,07 | 13,39 | 15,09 | 20,52 |
| 6. | 8,56 | 10,64 | 12,59 | 15,03 | 16,31 | 22,46 |
| 7. | 9,80 | 12,02 | 14,07 | 16,62 | 18,48 | 24,32 |
| 8. | 11,03 | 13,36 | 15,51 | 18,17 | 20,09 | 26,12 |
| 9. | 12,24 | 14,68 | 16,92 | 19,68 | 21,67 | 27,88 |
| 10. | 13,44 | 15,99 | 18,31 | 21,16 | 23,21 | 29,59 |
| 11. | 14,63 | 17,68 | 19,68 | 22,62 | 24,72 | 31,26 |
| 12. | 15,81 | 18,55 | 21,03 | 24,05 | 26,22 | 32,91 |
| 13. | 16,98 | 19,81 | 22,36 | 25,47 | 27,69 | 34,53 |
| 14. | 18,15 | 21,06 | 23,68 | 26,87 | 29,14 | 36,12 |
| 15. | 19,31 | 22,31 | 25,00 | 28,26 | 30,58 | 37,70 |
| 16. | 20,46 | 23,54 | 26,30 | 29,63 | 32,00 | 39,25 |
| 17. | 21,62 | 24,77 | 27,59 | 31,00 | 33,41 | 40,79 |
| 18. | 22,76 | 25,99 | 28,87 | 32,35 | 34,80 | 42,31 |
| 19. | 23,90 | 27,20 | 30,14 | 33,69 | 36,19 | 43,82 |
| 20. | 25,04 | 28,41 | 31,41 | 35,02 | 37,57 | 45,32 |
| 21. | 26,17 | 29,62 | 32,67 | 36,34 | 38,93 | 46,80 |
| 22. | 27,30 | 30,81 | 33,92 | 37,66 | 40,29 | 48,27 |
| 23. | 28,43 | 32,01 | 35,17 | 38,97 | 41,64 | 49,73 |
| 24. | 29,55 | 33,20 | 36,42 | 40,27 | 42,98 | 51,18 |
| 25. | 30,68 | 34,38 | 37,65 | 41,57 | 44,31 | 52,62 |
| 26. | 31,80 | 35,56 | 38,88 | 42,86 | 45,64 | 54,05 |
| 27. | 32,91 | 36,74 | 40,11 | 44,14 | 46,96 | 55,48 |
| 28. | 34,03 | 37,93 | 41,34 | 45,42 | 48,28 | 56,89 |
| 29. | 35,14 | 39,09 | 42,56 | 46,69 | 49,59 | 58,30 |
| 30. | 36,25 | 40,26 | 43,77 | 47,96 | 50,89 | 59,70 |

Fonte: Sampaio, 2002.