

# CULTIVO DE ESPOROCINETOS DE *BABESIA BIGEMINA* EM HEMÓCITOS E CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*

Jania de Rezende<sup>1\*</sup>; Charles P. Rangel<sup>2</sup>; Adivaldo H. Fonseca<sup>2</sup>; Douglas McIntosh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Católica Dom Bosco – UCDB. \*jan\_rezende@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ.

Os hemoparasitos de bovinos, como a *Babesia bigemina*, são intensamente estudados, devido suas respectivas importâncias na economia pecuária mundial. Culturas de hemócitos e células embrionárias de carrapatos constituem excelentes substratos para o cultivo, isolamento e estudo da biologia de hemoparasitos patogênicos, incluindo a *B. bigemina*. O presente estudo teve como objetivos cultivar *in vitro*, esporocinetos de *B. bigemina* em hemócitos e em células embrionárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Após desinfecção superficial de fêmeas ingurgitadas, a hemolinfa infectada naturalmente com *B. bigemina*, foi coletada e transferida para frascos de cultura com 25 cm<sup>2</sup> e tubo de 10 cm<sup>2</sup> e incubados a 28 °C. Foram realizadas PCR para *B. bigemina* e *B. bovis*, utilizando dois pares de iniciadores para identificar o gene 18SrRNA para ambas as espécies e também foi realizada a morfometria dos esporocinetos para confirmação da espécie. Produtos de PCR foram tratados com IT-Exo-Sap (USB) e sequenciados em ambas as direções, produtos de reação foram analisados em um Prism 3700 automatizado, e as sequências foram realizadas utilizando *Sequencher* (Versão 4.10.1). Esporocinetos de *B. bigemina* criopreservados a partir da cultura de hemócitos, foram descongelados, reativados em hemócitos livres de infecção e em células de linhagem CTVM/BME2. Observou-se o desenvolvimento dos esporocinetos de *B. bigemina* a partir do primeiro dia do cultivo, após reativação nas células. Os protozoários apresentaram boa motilidade e capacidade de aderência na membrana celular pela extremidade apical. No citoplasma dos hemócitos foram observadas formas redondas, móveis e com núcleo visível de esporocinetos de *B. bigemina*. Nas amostras coradas do 3° e 17° dia do cultivo de esporocinetos de *B. bigemina* em hemócitos foram observadas formas íntegras piriformes de esporocinetos imaturos e maduros, com núcleo corado de vermelho escuro, às vezes, centralizado ou próximo da extremidade apical. Nas amostras do 17° dia de cultivo foram observadas muitas formas pequenas redondas e ovais, compatíveis com esporocinetos imaturos. Pela técnica PCR foi possível a amplificação do DNA para o gene 18SrRNA de *B. bigemina*, assim como pelo estudo comparativo das mensurações dos esporocinetos. Os hemócitos e células embrionárias de *R. (B.) microplus* foram substratos eficientes para cultivo *in vitro* de esporocinetos de *B. bigemina*, bem como a criopreservação de *B. bigemina* o que permitiu a manutenção do protozoário em laboratório. A análise da sequência comparativa revelou homologia das sequências de nucleótidos de 100%, com sequências depositadas no GenBank para *B. bigemina* (número de acesso Genbank FJ426361 e DQ785311).

Palavras-chave: Célula de carrapato; Criopreservação; *Babesia* spp.

Parcerias e/ou Apoio Financeiro: UFMG; Faperj; CNPq.