

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Estudo da variabilidade genotípica de
***Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari,**
Ixodidae) de diferentes regiões geográficas do Brasil

Leonardo Burlini Soares

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTUDO DA VARIABILIDADE GENOTÍPICA DE
Rhipicephalus sanguineus (LATREILLE, 1806) (ACARI, IXODIDAE) DE
DIFERENTES REGIÕES GEOGRÁFICAS DO BRASIL**

LEONARDO BURLINI SOARES

Sob a Orientação da Professora
Kátia Maria Famadas

e Co-orientação da Professora
Kátia Regina dos Santos Teixeira

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2008

595.429081

S676e

T

Soares, Leonardo Burlini, 1981-

Estudo da variabilidade genotípica de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae) de diferentes regiões geográficas do Brasil / Leonardo Burlini Soares. - 2008.

35f. : il.

Orientador: Kátia Maria Famadas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 30-33.

1. Carrapato - Brasil - Teses. 2. *Rhipicephalus sanguineus* - Brasil - Teses. 3. *Rhipicephalus sanguineus* - Distribuição geográfica - Brasil - Teses. I. Famadas, Kátia Maria, 1961-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Veterinária. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

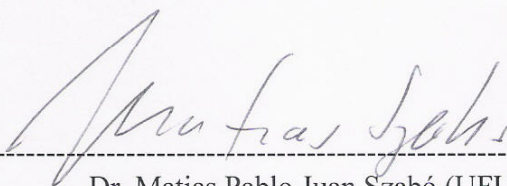
LEONARDO BURLINI SOARES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28 / 02 / 2008



Dra. Kátia Maria Famadas (UFRRJ)
(Orientador)



Dr. Matias Pablo Juan Szabó (UFU)



Dra. Franziska Huber (FAETEC – IST)

*Aos meus pais Jorge e Sheila.
A minha irmã Patrícia.
A minha avó Licéia.
Ao meu avô Victório, in memoriam.*

A minha namorada Daianna.

Aos amigos.

Aos carrapatos, por existirem.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela saúde física e mental, além da luz, força e serenidade concedidas, mais uma vez, para continuar e concluir mais esta etapa da minha vida.

À professora KÁTIA MARIA FAMADAS, pela oportunidade, incentivo, participação e orientação.

À professora KÁTIA REGINA DOS SANTOS TEIXEIRA, pela valiosa co-orientação, dedicação e auxílio durante o curso.

Aos pesquisadores ALESSANDRA SCOFIELD AMARAL, CARINA ELISEI, FÁBIO BARBIERI, ISABELLA MARTINS, LÍGIA BORGES, MATIAS PABLO JUAN SZABÓ, RENATA MADUREIRA e SILVIA MARIA MENDES AHID, pelo fornecimento do material biológico.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pelos ensinamentos.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade a apoio.

Aos meus pais, à minha irmã e à minha avó, pelo incentivo, apoio, confiança, compreensão e presença de sempre.

A minha querida namorada DAIANNA RAMOS MIQUELOTTI, pela paciência, carinho, companheirismo e Amor, e por me proporcionar alguns dos melhores momentos de minha vida.

Aos amigos CLARISSA PIMENTEL DE SOUZA e GUILHERME GOMES VEROCAI, pelo incentivo, apoio e ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos demais amigos, pela paciência e ajuda.

Aos colegas de turma da Pós-Graduação, pelo agradável e instrutivo convívio, e companheirismo na realização das atividades.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro durante a realização do curso.

E a todos aqueles que não foram citados nominalmente mas que foram indispensáveis para minha formação, e de alguma forma me ajudaram a seguir em frente e contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado !

BIOGRAFIA

Leonardo Burlini Soares, filho de Jorge Vieira Soares e Sheila Burlini Soares, nascido em 22 de outubro de 1981, na cidade do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro.

Cursou o primário na Escola de Primeiro e Segundo graus Fundação Bradesco e os ensinamentos fundamental e médio no Colégio Pedro II – Unidade Humaitá, ambos localizados na cidade do Rio de Janeiro.

No ano de 1997, ainda cursando o ensino médio, ingressou no Programa de Vocação Científica – Iniciação da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), onde permaneceu no período de agosto de 1997 a junho de 1998.

No ano de 1998, ainda cursando o ensino médio, ingressou como bolsista no Programa de Vocação Científica – Avançado da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), onde permaneceu no período de agosto de 1998 a dezembro de 1999.

No ano de 2000 ingressou no Curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, diplomando-se em outubro de 2005.

Foi estagiário na Área de Anatomia Animal desta Instituição no período de dezembro de 2000 a maio de 2001; no Programa de Extensão em Fazendas na Região Sul Fluminense, com o Programa Integrado de Orientação e Assistência Técnica aos Produtores de Leite, no período de outubro de 2001 a outubro de 2002; do Hospital Veterinário de Grandes Animais desta Instituição no período de dezembro de 2002 a março de 2003; e do Hospital Veterinário de Pequenos Animais desta Instituição no período de abril a outubro de 2003.

Foi bolsista do Programa de Estágio Curricular (PEC-FIOCRUZ), no período de agosto de 2003 a agosto de 2005.

Além disso, ainda fez estágio supervisionado na Clínica Veterinária Equina (Jockey Club Brasileiro) no período de outubro de 2001 a novembro de 2005 e estágio na área de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Foi aprovado no processo de seleção para o Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Veterinária, do Instituto de Veterinária desta instituição, ao nível de mestrado, onde ingressou em março de 2006, sob orientação da professora Dra. Kátia Maria Famadas. Foi bolsista de pós-graduação do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no período de março de 2006 a fevereiro de 2008.

RESUMO

BURLINI, Leonardo. **Estudo da variabilidade genotípica de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae) de diferentes regiões geográficas do Brasil.** 2008. 35p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

O posicionamento taxonômico de carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* é de difícil determinação por métodos fenotípicos e tem sido objeto de frequentes revisões e debates contínuos. A diferenciação das espécies dentro desse grupo é de importância clínica, especialmente em medicina veterinária, devido a transmissão de diferentes patógenos. O estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de *Rhipicephalus sanguineus* provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil e preencher algumas lacunas no estudo da espécie. Este trabalho foi realizado nos laboratórios de: Ixodologia da Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz, Biologia Molecular e Acarologia, pertencentes ao Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; e nos laboratórios de: Genética e Bioquímica, e Genoma da EMBRAPA – Agrobiologia (RJ). Foram comparados fragmentos de DNA mitocondrial (DNA-mt) de *R. sanguineus* do Espírito Santo (ES), Goiás (GO), Pará (PA), Rondônia (RO), Mato Grosso do Sul (MS), Rio de Janeiro (RJ) e Rio Grande do Norte (RN). Os resultados mostram que larvas em jejum, preservadas em etanol, das diferentes localidades apresentaram variabilidade genotípica considerando-se os genes 12S e 16S DNAr-mt. Para o gene 12S DNAr-mt, a amostra do Espírito Santo apresentou a maior diversidade genética em comparação às demais amostras brasileiras; já para o gene 16S DNAr-mt, o destaque pode ser dado à amostra do Rio de Janeiro, que apresentou os maiores valores de divergência em relação às demais seqüências. A variabilidade intraespecífica detectada entre os isolados variou de 0 a 6,6% em relação ao gene 12S DNAr-mt e de 0 a 2,7% em relação ao 16S DNAr-mt. Por outro lado, uma forte relação genética foi detectada entre os isolados brasileiros e *R. sanguineus* asiáticos (0-5,8% de variabilidade para 12S, e 0-1,3% para 16S DNAr-mt) e entre as amostras brasileiras e *Rhipicephalus turanicus* africanos (2,2-7,6% de diferença para 12S) enquanto populações de *R. sanguineus* da Argentina e Uruguai se relacionaram com *R. sanguineus* da França (seqüências de 12S idênticas); no tocante ao 16S, *R. sanguineus* de Israel apresentou moderada distância dos isolados brasileiros (3,6-5,8%). Esses resultados mostraram que as diferenças entre esses isolados brasileiros são grandes e até mesmo maiores do que poderia se esperar entre alguns deles, e que a sistemática de carrapatos *R. sanguineus*, tanto da América Latina quanto de países de outros continentes deve ser melhor e mais estudada. Amplas variações como estas podem justificar as diferenças mundiais relatadas para diversos parâmetros biológicos nessa espécie.

Palavras-chave: variabilidade genotípica, *Rhipicephalus sanguineus*, Brasil.

ABSTRACT

BURLINI, Leonardo. **Genotypic variability study of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae) from different geographic regions of Brazil.** 2008. 35p. Dissertation (Master Science in Veterinary Sciences, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

The taxonomic status of ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group is difficult to be determined by phenotypic methods and has been object of frequent revisions and ongoing debate. The differentiation of species within this group has clinical importance, especially in veterinary medicine due to transmission of different pathogens. The objective of this study was to evaluate the genetic variability of *Rhipicephalus sanguineus* from different geographic regions of Brazil and fill in some gaps in the species study. This work was conducted in the laboratories of: Ixodology of the W. O. Neitz station for parasitologic research, Molecular Biology and Acarology, of the Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; and in the laboratories of: Genetic and Biochemistry, and Genome of EMBRAPA – Agrobiologia (RJ). Mitochondrial DNA (mt-DNA) fragments of *R. sanguineus* from Espírito Santo (ES), Goiás (GO), Pará (PA), Rondônia (RO), Mato Grosso do Sul (MS), Rio de Janeiro (RJ) e Rio Grande do Norte (RN) were compared. The results showed that fasting larvae, preserved in ethanol, from the different localities presented genotypic variability considering the 12S and 16S mt-rDNA genes. To 12S, the Espírito Santo strain presented the highest genetic diversity in comparison with the other Brazilian strains; to 16S, the distinction can be given to the Rio de Janeiro strain, which presented the highest divergence values in regarding the other strains. The intraspecific variability detected between the isolates ranged from 0 to 6.6% regarding the 12S gene and from 0 to 2.7% regarding the 16S. On the other hand, a strong genetic relationship was detected between Brazilian isolates and Asian *R. sanguineus* (0-5.8% of variability for 12S, and 0-1.3% for 16S) and between the Brazilian strains and African *Rhipicephalus turanicus* (2.2-7.6% of difference to 12S) while *R. sanguineus* populations from Argentina and Uruguay appeared to be related to French *R. sanguineus* (identical 12S sequences); considering 16S, *R. sanguineus* from Israel presented moderate distance from the Brazilian isolates (3.6-5.8%). These results showed that the differences between these Brazilian isolates are great and to a certain extent greater than should be expected between some of them, and that the systematic of *R. sanguineus* ticks from Latin America as much as of countries of other continents should be better and more studied. Wide variations, such as these might account for the reported worldwide differences in several biological parameters in this species.

Key words: genotypic variability, *Rhipicephalus sanguineus*, Brazil.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Origem dos espécimes de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> do Brasil.	11
Tabela 2: Seqüências de DNAr-mt 12S e 16S e seus respectivos códigos de acesso no GenBank, e dados das publicações referentes a <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e <i>Rhipicephalus turanicus</i> .	14
Tabela 3: Comprimento dos fragmentos dos genes 12S e 16S RNAr de larvas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> de diferentes localidades do Brasil e respectivos códigos de depósito no GenBank.	17
Tabela 4: Matriz de diferenças absolutas de nucleotídeos (em negrito) e matriz de divergência de seqüências (em itálico), com comparações “pairwise” e uso do logaritmo Kimura-2-parâmetros, do gene 12S RNAr-mt dos 7 isolados de <i>R. sanguineus</i> de diferentes estados.	18
Tabela 5: Matriz de diferenças absolutas de nucleotídeos (em negrito) e matriz de divergência de seqüências (em itálico), com comparações “pairwise” e uso do logaritmo Kimura-2-parâmetros, do gene 16S RNAr-mt dos 7 isolados de <i>R. sanguineus</i> de diferentes estados.	19
Tabela 6: Matriz de diferenças absolutas de nucleotídeos (em negrito) e matriz de divergência de seqüências (em itálico), com comparações “pairwise” e uso do logaritmo Kimura-2-parâmetros, do gene 12S RNAr-mt de 24 isolados de <i>R. sanguineus</i> (R.s) e <i>R. turanicus</i> (R.t) de diferentes origens.	21
Tabela 7: Matriz de diferenças absolutas de nucleotídeos (em negrito) e matriz de divergência de seqüências (em itálico), com comparações “pairwise” e uso do logaritmo Kimura-2-parâmetros, do gene 16S RNAr-mt de 15 isolados de <i>R. sanguineus</i> (R.s) e <i>R. turanicus</i> (R.t.) de diferentes origens.	22

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Extratos de DNA total de larvas de *Rhipicephalus sanguineus*. M) Marcador de pares de bases – 1 Kb Ladder; N) controle negativo. Amostras analisadas de diferentes estados do Brasil: ES, GO, PA, RO, MS, RJ e RN. 15
- Figura 2: Produtos de amplificação de DNA de larvas de *Rhipicephalus sanguineus* com iniciadores do gene 12S RNAr. M) Marcador de pares de bases – 1 Kb Plus DNA Ladder; N) controle negativo da reação sem DNA. Amostras analisadas de diferentes estados do Brasil: ES, GO, PA, RO, MS, RJ e RN. 16
- Figura 3: Produtos de amplificação de DNA de larvas de *Rhipicephalus sanguineus* com iniciadores do gene 16S RNAr. M) Marcador de pares de bases – 1 Kb Plus DNA Ladder; N) controle negativo da reação sem DNA. Amostras analisadas de diferentes estados do Brasil: ES, GO, PA, RO, MS, RJ e RN. 16
- Figura 4: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos (5'- 3') do gene 12S RNAr de *R. sanguineus* de diferentes regiões do Brasil. Um *ponto* indica que a seqüência nesse ponto é idêntica à seqüência do topo. Um *hífen* indica um “gap” no alinhamento. 17
- Figura 5: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos (5'- 3') do gene 16S RNAr de *R. sanguineus* de diferentes regiões do Brasil. Um *ponto* indica que a seqüência nesse ponto é idêntica a seqüência do topo. Um *hífen* indica um “gap” no alinhamento. 18
- Figura 6: Árvore “neighbor-joining” (sem raíz) do gene 12S RNAr, usando distância Kimura-2-parâmetros. Os números representam a percentagem de suporte de “bootstrap”. 23
- Figura 7: Árvore “neighbor-joining” (sem raíz) do gene 16S RNAr usando distância Kimura-2-parâmetros. Os números representam a percentagem de suporte de “bootstrap”. 24
- Figura 8: Árvore baseada em análise de máxima parsimônia (sem raíz), do gene 12S RNAr. Os números representam a percentagem de 1000 réplicas “bootstrap”. 34
- Figura 9: Árvore baseada em análise de máxima parsimônia (sem raíz), do gene 16S RNAr. Os números representam a percentagem de 1000 réplicas “bootstrap”. 35

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

AFLP	Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos Amplificados – “Amplified Fragment Length Polymorphism”
DALP	“Direct Amplification of Length Polymorphism”
DNA	Ácido desoxirribonucleico – “Deoxyribonucleic acid”
DNA-mt	DNA mitocondrial
DNAr	DNA ribossomal
DNAr-mt	DNA ribossomal mitocondrial
DNAr-n	DNA ribossomal nuclear
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
ES	Espírito Santo
GO	Goiás
ITS	espaço interno transcrito - “internal transcribed spacer”
ITS1	Primeiro espaço interno transcrito
ITS2	Segundo espaço interno transcrito
Kpb	Quilopar de bases
mA	Miliampères
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	Militro
mM	Milimolar
MS	Mato Grosso do Sul
ng	Nanogramas
PA	Pará
pb	pares de bases
PBS	solução salina de tampão fosfato
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia - “Polymerase Chain Reaction”
RJ	Rio de Janeiro
RAPD	Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso – “Random Amplification of Polymorphic DNA”
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição – “Restriction Fragment Length Polymorphism”
RN	Rio Grande do Norte
RNAr	RNA ribossomal
RNAr-mt	RNA ribossomal mitocondrial
RO	Rondônia
rpm	Rotações por minuto
SSCP	Polimorfismo de conformação de fita simples – “Single Strand Conformation Polymorphism”
UV	Ultravioleta
≈	Aproximadamente
μl	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Breve Consideração Sobre a Introdução de <i>R. sanguineus</i> na América do Sul e Brasil	4
2.2 Aspectos Taxonômicos Gerais do Grupo	4
2.3 Marcadores Moleculares	6
2.3.1 Genes mitocondriais	6
2.3.2 Genoma mitocondrial de carrapatos	7
2.4 Aplicação de Técnicas Moleculares para Estudos dos Ixodida	7
3 METODOLOGIA	11
3.1 Locais de Desenvolvimento da Pesquisa	11
3.2 Origem das Fêmeas e Obtenção das Larvas de <i>R. sanguineus</i>	11
3.2.1 Origem dos espécimes	11
3.2.2 Obtenção das larvas	11
3.3 Obtenção das Sequências de DNA Ribossomal Mitocondrial (DNAr-mt) 12S e 16S das Larvas de <i>R. sanguineus</i>	12
3.3.1 Extração do DNA	12
3.3.2 Amplificação do DNA	12
3.3.3 Seqüenciamento do DNA	13
3.3.4 Alinhamento das seqüências e inferências sobre variabilidade	13
4 RESULTADOS	15
4.1 Extração do DNA de Larvas de <i>R. sanguineus</i>	15
4.2 Amplificação do DNA de Larvas de <i>R. sanguineus</i>	15
4.3 Sequenciamento	16
4.4 Comparação das Sequências de 12S e 16S DNAr-mt dos Isolados de Carrapatos de Diferentes Localidades do Brasil	17
5 DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÕES	28
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXO	34
Árvores Baseadas em Análise de Máxima Parsimônia (MP)	34

1 INTRODUÇÃO

Das 35.000 descritas e cerca de 1.000.000 de espécies não descritas de ácaros, os carrapatos (Ixodida) compreendem um grupo de aproximadamente 899 espécies (BARKER e MURRELL, 2004), divididas em três famílias: Argasidae (carrapatos moles), Ixodidae (carrapatos duros) e Nutalliellidae. Destas, Ixodidae, a de maior diversidade de espécies, compreende dois grandes grupos: Prostriata e Metastriata, com 5 subfamílias e 13 gêneros (HOOGSTRAAL, 1985). Das 4 subfamílias que compõem os Metastriata, Rhipicephalinae Banks, 1908, onde encontramos *Rhipicephalus* Koch, 1844, possui aproximadamente 115 espécies em 7 gêneros. Com muitos problemas de classificação devido à plasticidade de caracteres, não há como precisar o número de espécies dentro de *Rhipicephalus*, mas Barker e Murrell (2004) listaram 79 espécies como válidas. Essas espécies estão distribuídas em subgêneros e agrupadas em complexos.

No chamado complexo ou grupo *Rhipicephalus sanguineus* encontramos *R. sanguineus* (Latreille, 1806) *sensu stricto*, *Rhipicephalus turanicus* Pomerantsev, 1936, *Rhipicephalus rossicus* Yakimov e Kol-Yakimova, 1911, *Rhipicephalus pumilio* Schluzer, 1935, *Rhipicephalus leporis* Pomerantsev, 1946, *Rhipicephalus schulzei* Olenov, 1929, *Rhipicephalus pussillus* Gil Collado, 1936, *Rhipicephalus sulcatus* Neumann, 1908, *Rhipicephalus guilhoni* Morel e Vassiliades, 1963, *Rhipicephalus moucheti* Morel, 1965, *Rhipicephalus bergeoni* Morel e Balis, 1976 e *Rhipicephalus camicasi* Morel, Mouchet e Rodhain, 1976 (*apud* ZÄHLER et al., 1997), e todos os representantes dessas espécies são endêmicos nas regiões tropical e subtropical (BERNASCONI et al., 2002).

Sabe-se que os carrapatos são vetores de uma variedade maior de microorganismos do que qualquer outro único táxon dentro de Arthropoda, incluindo mosquitos (OLIVER Jr, 1989), como resultado, eles detêm um dos maiores volumes de dados na literatura quando comparado a outros grupos dentro de Acari.

Doenças determinadas por microrganismos transmitidos por carrapatos em diversas espécies de hospedeiros variam de assintomáticas a fatais, dependendo das espécies envolvidas e suas interações. Nesse contexto, *Rhipicephalus* está entre os ixodídeos mais importantes, por algumas de suas espécies transmitirem agentes causadores de doenças aos animais e humanos.

Como único representante do gênero no Brasil, *R. sanguineus*, comumente chamado de “carrapato do canil” ou “carrapato marrom do cão”, é transmissor de agentes etiológicos como *Babesia canis* (Piana e Galli-Valério, 1895), *Ehrlichia* Moroshkowsky, 1945 e *Hepatozoon canis* (James, 1905) para caninos, e *Rickettsia* da Rocha Lima, 1916 para humanos. Em relação a este último, *R. sanguineus* tem ganhado bastante destaque no que concerne a sua presença nas áreas de foco de Febre Maculosa no Brasil. Seu papel na epidemiologia dessa Riquetsiose ainda não está bem esclarecido, mas pesquisas estão sendo desenvolvidas nesse sentido.

Os carrapatos são conhecidos como vetores competentes de numerosos patógenos para os animais e humanos. Além disso, há evidências de diferentes potenciais bióticos entre populações de carrapatos no que concerne a eficiência de vetoração de patógenos. Neste contexto, um esclarecimento da posição biosistemática e da relação filogenética entre seus membros não é somente um mero interesse acadêmico, pois é importante e fundamental que vetores artrópodes e os agentes que eles transmitem sejam identificados corretamente.

Tendo supostamente o continente africano como centro de origem, *R. sanguineus* se encontra amplamente distribuído pela África, América, Europa, Ásia e Austrália e é provavelmente a mais prevalente entre todas as espécies de ixodídeos. Sua linha de distribuição parece estar entre os paralelos 50° norte e 35° sul, e uma vez que se estabeleça em

uma localidade, rapidamente se propaga (PEGRAM et al., 1987 a, b).

Acredita-se que *R. sanguineus sensu stricto* é o único representante do gênero na América do Sul. No entanto, no Brasil, algumas importantes diferenças regionais foram inicialmente detectadas em meados dos anos 90, quando Ribeiro et al. (1996) observaram variações morfológicas entre *R. sanguineus* de vários estados no Brasil. Após um hiato a este respeito, mais recentemente, foram registradas variações morfológicas, biológicas e genéticas quando confrontaram uma amostra do Brasil com uma da Argentina. Tal fato gerou questionamentos, levando inclusive a suposição de que poderia haver outra espécie de *Rhipicephalus* na América do Sul.

Vale ressaltar que as prováveis diferenças existentes entre populações podem significar, além da presença de uma outra espécie, diferenças no potencial biológico dessas populações de *R. sanguineus* em transmitir agentes patogênicos para os animais e humanos e potencialidade para transmissão de outros bioagentes.

Rhipicephalus sanguineus compreende um complexo de espécies cujo “status” taxonômico é, na maioria dos casos, mal definido. Deve-se considerar, porém, que a determinação e diferenciação de espécies de carrapatos é tradicionalmente baseada em características morfológicas e ecológicas. Técnicas fenotípicas baseadas em tais características são substancialmente limitadas por variações intraespecíficas em caracteres diagnósticos.

As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, que são tecnicamente denominados “marcadores moleculares” e definidos como todo e qualquer fenótipo molecular ou dado genético oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma).

Hoje há disponibilidade de várias técnicas de biologia molecular para a detecção de variabilidade genética ao nível de sequência de DNA, ou melhor, de polimorfismo genético. Estas técnicas também permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo, os quais podem ser utilizados para as mais diversas aplicações.

O desenvolvimento na área de marcadores moleculares tem sido fascinante e extremamente rápido. A tecnologia de DNA recombinante e a amplificação dos segmentos de DNA via PCR (reação de polimerase em cadeia ou, em inglês, “Polymerase Chain Reaction”) abriram caminho para uma mudança no paradigma genético básico: da inferência do genótipo a partir do fenótipo, onde Mendel foi o pioneiro, para a análise genética direta da variação na sequência de DNA.

Tecnologias de análise molecular mais acessíveis e eficientes estão constantemente sendo aprimoradas. Métodos estatísticos tem acompanhado este desenvolvimento e permitido a manipulação de enormes quantidades de dados. Tudo isso tem sido e pode ser aplicado a estudos dos carrapatos, de forma geral, e tem produzido uma enorme quantidade de informações. É importante dizer que, embora de grande valia, mesmo com o uso das ferramentas moleculares não se tem conseguido sanar todas as dúvidas referentes a esse grupo.

Nesse contexto, deve-se aplicar métodos que distingam espécies e populações com precisão. Isto é essencial para gerar informações para complementar o conhecimento da epidemiologia e da biologia desses parasitos, em vista das dificuldades em aplicar técnicas morfológicas e ecológicas, bem como da inconclusividade de análises bioquímicas e dos problemas práticos em conduzir e interpretar experimentos de cruzamento, especialmente aqueles sem progenie (ZÄHLER et al., 1997).

Considerando-se diferenças já relatadas entre populações de *R. sanguineus*, sua importância, e o fato de que, de modo geral, nas espécies de ampla distribuição geográfica é

esperado que ocorra variação fenotípica e/ou genotípica ao longo de sua área de distribuição, é interessante uma avaliação mais acurada dessas variações. Isso pode ser realizado através da comparação de seqüências de fragmentos de DNA de genes como o 12S e 16S de RNA ribossomal mitocondrial (RNAr-mt). Tal conhecimento talvez possa contribuir para o entendimento de diferenças regionais na epidemiologia de doenças transmitidas por *R. sanguineus*, bem como diferentes níveis de susceptibilidade a acaricidas.

Em função de algumas hipóteses já aventadas sobre *R. sanguineus* no Brasil, como ocorrência de diversidade entre populações e possível presença de outra espécie do complexo *R. sanguineus* no país, é especialmente interessante comparar populações de diferentes áreas geográficas. Tal estudo permitiria determinar se essas populações possuem características genéticas intermediárias, e/ou ainda se estão posicionadas alopaticamente ou, eventualmente, em simpatria. A partir daí, será possível iniciar a verificação, aceitação ou não, de nossas hipóteses formuladas de que há divergência genética entre populações de *R. sanguineus* oriundas de diferentes regiões do Brasil e de que *R. sanguineus stricto sensu* pode não ser a única espécie do gênero presente no país.

Com objetivo de preencher algumas dessas lacunas, num aspecto geral, realizou-se o estudo de variabilidade genética de *R. sanguineus* provenientes de sete diferentes localidades e quatro regiões geográficas do Brasil, através da comparação de fragmentos dos genes 12S e 16S RNAr-mt, e ainda avaliou-se a divergência genética entre essas amostras e algumas seqüências de DNA de interesse depositadas no GenBank.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Breve Consideração Sobre a Introdução de *R. sanguineus* na América do Sul e Brasil

O carrapato *R. sanguineus* foi introduzido na América no Sul durante as colonizações, provavelmente junto com seu hospedeiro habitual, o cão. Conforme bem lembrado por Szabó et al. (2005), diferentes rotas estiveram envolvidas na colonização deste “subcontinente”.

A presença de *R. sanguineus* no Brasil foi registrada no início do século XX e, segundo Aragão (1936), em 1907 esta espécie era rara no Rio de Janeiro e não existia em São Paulo, em Minas Gerais e nos estados do Sul, mas já era conhecida nos estados do Norte e Nordeste, do Pará até a Bahia; de 1907 a 1936 tornou-se abundante no Rio de Janeiro, em Minas Gerais, em São Paulo e nos estados do sul do país, e espalhou-se por todos os demais Estados onde até então não era encontrado.

Na Argentina sua presença foi assinalada, na cidade de Buenos Aires, em 1938 (ROVEDA, 1954), e o primeiro registro no Chile ocorreu em Santiago em 1974 (TAGLE, 1976).

2.2 Aspectos Taxonômicos Gerais do Grupo

Entre os Ixodidae, a sistemática de *Rhipicephalus* é provavelmente uma das mais complexas. Cerca de 32 das, aproximadamente, 79 espécies de *Rhipicephalus* têm sido incluídas em 8 grupos ou complexos de espécies – grupo *R. simus*, grupo *R. sanguineus*, grupo *R. appendiculatus*, grupo *R. cliffordisenegalensis*, grupo *R. pravus*, grupo *R. evertsi*, grupo *R. kochi* e grupo *R. tricuspis* (MURRELL et al., 1999). O posicionamento de vários taxa dentro do complexo *R. sanguineus* tem estado entre as mais controversas e confusas questões nesse gênero, e nesse grupo ou complexo há vários questionamentos sobre a validade dos taxa (PEGRAM e WALKER, 1988 *apud* BEATI e KEIRANS, 2001). Por isso, esse complexo tem sido sujeitado a debate contínuo e freqüentes revisões.

Pegram et al. (1987a, b) revisaram criticamente a literatura sobre esse complexo, ilustraram a morfologia e distribuição geográfica, bem como forneceram listas de hospedeiros de seis das espécies de carrapatos do complexo, incluindo *R. sanguineus sensu stricto*. Segundo estes autores, *R. turanicus* se parece rigorosamente com *R. sanguineus*.

As espécies do complexo *R. sanguineus*, que tem *R. sanguineus sensu stricto* como espécie tipo, têm como características comuns entre os machos e as fêmeas os seguintes fenótipos descritos a seguir. Machos com processo coxal não visível dorsalmente; olhos planos, sem sulco, que podem ser circundados por poucos grandes pontos; sulcos laterais variáveis, mas geralmente marcados com pontos; sulcos marginais geralmente profundos e contendo pontos largos e profundos; sulcos posteromediais e paramediais largos, bastantes curtos, mas sempre distintos; quatro fileiras quase regulares de pontos largos, profundos e pilíferos, indo do nível dos olhos até os sulcos posteriores, geralmente distinguíveis; pontos intersticiais variáveis em tamanho e densidade; ventralmente, placas espiraculares variáveis (mas muito útil caracter diagnóstico); placas adanais geralmente em dois e amplas (mas muito variável intraespecificamente para ser de valor diagnóstico). Fêmeas com escudo geralmente mais longo do que largo; pontos escutais variáveis como no macho, a densidade total geralmente parece maior comparativamente; sulcos laterais geralmente pronunciados e contornados com pontos largos; área cervical mais densamente pontuada, mas raramente de superfície granular; ventralmente, sendo a abertura genital e placas espiraculares caracteres diagnóstico muito variáveis (PEGRAM et al., 1987b).

Walker et al. (2000) reforçaram que, devido a estas observações, *R. sanguineus* compreende um complexo de espécies cujo posicionamento taxonômico da maioria delas

ainda é muito difícil de ser determinado e que tal fato leva a identificações errôneas. Na Europa, por exemplo, onde *R. sanguineus* e *R. turanicus* são simpátricos, esses podem facilmente ser confundidos devido a características morfológicas similares, já que pertencem ao mesmo complexo. Entretanto estas espécies têm características próprias quanto aos seus hospedeiros preferenciais e distribuição, e na morfologia. *R. turanicus* possuem maior quantidade de pontuações no escudo e a abertura genital da fêmea é geralmente em forma de “U” mais estreito quando comparada com o formato em “U” mais largo dos representantes de *R. sanguineus*; ambos os sexos de *R. turanicus* têm placas espiraculares com caudas largas como o festão adjacente, enquanto em *R. sanguineus* são mais estreitas (WALKER et al., 2003).

Outra confusão taxonômica diz respeito a *R. pusillus*, que foi considerado por um longo tempo como uma pequena variedade de *R. sanguineus*, até sua aceitação como espécie válida por Pegram (1984) e Pegram et al. (1987a) (*apud* MANGOLD et al., 1998a).

Estudando índices numéricos de caracteres diagnósticos para diferenciação entre *R. sanguineus* e *R. turanicus*, Ioffe-Uspensky et al. (2005) comentaram sobre a possível presença de *R. camicasi* em Israel, visto que esta espécie habita países no entorno, e chamaram a atenção para o fato de que Beati (em comunicação pessoal) teria encontrado um espécime de *R. camicasi* ao analisar amostras de *R. turanicus* de Israel.

Some-se a toda esta complexidade de diferenciação entre espécies do complexo *R. sanguineus* o fato de que ainda há dúvidas sobre a validação de algumas das espécies pertencentes ao gênero *Rhipicephalus* (BARKER, 1998), em função de que algumas de suas espécies apresentam problemas de classificação pela dificuldade de serem determinadas por métodos fenotípicos, para termos uma visão bastante crítica e cautelosa durante os estudos taxonômicos e uso de índices de caracteres para diferenciação de indivíduos deste grupo de carrapatos, inclusive relacionados a marcadores moleculares disponíveis ou em estudo.

As maiores dificuldades de diagnóstico dentro do complexo *R. sanguineus* ocorrem, particularmente, entre *R. sanguineus* e *R. turanicus*, duas espécies bastante próximas, que habitam as mesmas áreas e os mesmos habitats, onde coexistem, e que podem ser encontradas nos mesmos hospedeiros. Essas dificuldades de distinção são tão marcantes que, conforme reportado por Zahler et al. (1997), *R. sanguineus* e *R. turanicus* já foram temporariamente sinonimizados por Zumpt. Além disso, experimentos de cruzamentos realizados por Paperna e Giladi (1974), entre indivíduos representativos destas espécies, sustentam a indicação de conspecificidade de *R. sanguineus* e *R. turanicus*, o que foi constatado por Zahler et al. (1997), através de dados moleculares, a partir de análise da ITS2 (“second internal transcribed spacer” ou segundo espaço interno transcrito).

Em relação a *R. sanguineus* no Brasil, Ribeiro et al. (1996) realizando estudo da morfologia dos adultos, detectaram, entre oito amostras estudadas, variações, tanto intra quanto inter-específicas, nas placas adanais e placas estigmáticas dos machos, nas placas estigmáticas de fêmeas, quanto a fileira de cerdas ventro-internas dos palpos e na abertura genital das fêmeas. Embora os autores tenham observado tais variações, essas ocorreram de forma aleatória de modo a não dar suporte a hipótese da presença de outra espécie do gênero no país.

Posteriormente, ao comparar dados já publicados, Szabó et al. (2005) observaram que fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* do Brasil pesavam cerca de 50% menos que fêmeas dos Estados Unidos e Japão. Em função dessas e outras observações, Szabó et al. (2005) e Oliveira et al. (2005) compararam uma população de *R. sanguineus* oriunda de Jaboticabal, São Paulo, Brasil com uma de Rafaela, Santa Fé, Argentina. Oliveira et al. (2005) observaram diferenças na morfologia externa de fêmeas semi-ingurgitadas (tamanho do corpo, forma do poro genital e estruturas sensoriais, por exemplo), através de microscopia eletrônica, enquanto Szabo et al. (2005), em trabalho mais complexo, destacaram diferenças biológicas,

genotípicas e morfológicas dando suporte mais consistente de que as duas populações poderiam pertencer a espécies diferentes.

2.3 Marcadores Moleculares

A aplicação de marcadores moleculares para o estudo de carrapatos tem produzido novas idéias dentro de estrutura de populações e relações taxonômicas. Carrapatos têm sido estudados ao nível individual, populacional e de espécies.

Variações populacionais também têm sido estudadas em outros artrópodes de importância e os métodos usados para estudar esses organismos têm muito em comum. Ao nível individual eles variam de proposições gerais, tais como polimorfismo de comprimento do fragmento amplificado (AFLP), RAPD ou “direct amplification of length polymorphism” (DALP), a análises de microsátélites altamente específicas. Embora esses marcadores também trabalhem ao nível de populações e espécies, análises adicionais de genes nucleares e mitocondriais específicos têm sido conduzidas também por RFLP e sequenciamento.

Aplicações moleculares têm tido sucesso particular em facilitar a identificação de espécies difíceis taxonomicamente, no entendimento de estruturas de populações e elucidando relações filogenéticas.

No fim do século 20, o advento das técnicas moleculares gerou o potencial para investigar o DNA no par de base individual. Essa é claramente uma forma muito mais direta de mensurar e quantificar a variação genética dentro e entre espécies.

Para resolver questões filogenéticas entre espécies e populações pode-se destacar o sequenciamento do DNAr-n, incluindo o ITS, e DNAr-mt. Como vantagens, o DNAr-n apresenta pequenas regiões entre genes conservados úteis para iniciadores (“primers”) de PCR e são altamente variáveis. Considerando o DNAr-mt, algumas das vantagens são a estrita herança materna, a ausência de recombinação e a possibilidade da estrutura populacional poder ser definida ao nível geográfico. Além disso, o genoma mitocondrial se desenvolve mais rapidamente do que o genoma nuclear tanto que frequentemente se detecta variação intraespecífica (SIMON et al., 1994; NORRIS et al., 1996). Sendo assim, o ideal é a utilização de ambos, DNAr-mt e DNAr-n, de forma complementar (NAVAJAS e FENTON, 2000).

2.3.1 Genes mitocondriais

O genoma mitocondrial (DNA-mt) é circular e têm 37 genes na maioria dos metazoa: 13 genes codificadores de proteína, 2 genes RNA ribossomais, 22 genes RNA de transferência e uma região não codificadora. É uma molécula de dupla fita de DNA, simples, que, na maioria dos metazoa, incluindo os carrapatos que já foram estudados, varia em tamanho de 14-16 kb (BARKER e MURRELL, 2004). Já em 1998 a maior parte ou todo o DNA-mt tinha sido sequenciado em mais de 50 metazoa (BLACK IV e ROEHRDANZ, 1998).

Genes mitocondriais têm sido amplamente utilizados em sistemática molecular. Devido ao elevado número de cópias, torna-se mais fácil trabalhar com esses genes do que com cópias simples de genes nucleares, além de sua estrita herança materna, já mencionada, particularmente útil ao nível intraespecífico.

Os genes mitocondriais se dividem em duas categorias principais: genes ribossomais e genes codificadores de proteínas. Os dois genes ribossomais são o 12S e o 16S DNAr, que não são separados por ITS. Esses genes já foram e continuam sendo usados em uma série de estudos de genética de populações (SIMON et al., 1994; NORRIS et al., 1996; SZABÓ et al., 2005).

Norris et al. (1999) consideram os genes 12S e 16S DNAr mais convenientes para resolver relações ao nível intraespecífico ou entre taxa mais próximos.

De acordo com Murrell et al. (1999), o 12S DNAr tem ajudado a resolver algumas relações dentro de Rhipicephalinae e dentro do gênero *Rhipicephalus*.

Segundo Mangold et al (1998a), o gene 16S parece ser um bom marcador para o estabelecimento de relação genética entre espécies próximas de carrapatos. Isso poderia ser devido ao alto nível de homoplasia encontrado em genes que se desenvolvem rapidamente como os do RNA mitocondrial.

2.3.2 Genoma mitocondrial de carrapatos

O genoma mitocondrial de onze espécies de carrapatos já foi seqüenciado inteiramente (os códigos de acesso no GenBank são dados entre parânteses): (1) *R. sanguineus* e *Ixodes hexagonus* (AF081829 e AF081828; BLACK IV e ROEHRDANZ, 1998); (2) *Haemaphysalis flava*, *Cario capensis* e *Ornithodoros moubata* (AB075954, AB075953 e AB073679; SHAO et al., 2004); (3) *I. persulcatus*, *I. holocyclus* e *I. uriae* (AB073725, AB075955 e AB087746; SHAO et al., 2005); (4) *Amblyomma triguttatum* (AB113317; FUKUNAGA, não publicado); (5) *Haemaphysalis flava* (AB075954; SHAO et al., 2004) e (6) *O. porcinus* (AB105451; MITANI et al., 2004). O genoma de *R. sanguineus* é rico em AT e contém 14.710 pb com uma composição de nucleotídeo de 37,6% de adenina, 9,9% de guanina, 12,1% de citosina e 40,3% de timina (BLACK IV e ROEHRDANZ, 1998).

Além disso, se sabe o arranjo de genes no genoma mitocondrial de *R. (Boophilus) microplus* (CAMPBELL e BARKER, 1998, 1999) e parte da organização desses genes em outras 51 espécies de carrapatos duros e moles (BLACK E ROEHRDANZ, 1998; CAMPBELL e BARKER, 1998; MURRELL et al., 2003; ROEHRDANZ et al., 2002).

A disponibilização dessas seqüências é de grande importância e muito pode contribuir para a definição e (re)validação de espécies de Ixodidae e de outros carrapatos.

2.4 Aplicação de Técnicas Moleculares para Estudos dos Ixodida

A biologia molecular tem fornecido instrumentos que muito têm auxiliado nos estudos taxonômicos de espécies e populações de carrapatos, como a eletroforese de proteína, análise de hidrocarboneto cuticular (MANGOLD et al., 1998a), estudo de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e sequenciamento do DNAr, por exemplo.

Em alguns estudos o DNAr é escolhido como alvo porque acumula mutações de uma maneira muito regular. Outra vantagem é a presença de regiões “spacer” que não codificam para RNAr e que se desenvolvem ainda mais rapidamente (ZHALER et al., 1997).

A análise da seqüência do DNA tem fornecido maiores e melhores informações para a caracterização de espécies e populações e sua aplicação tem provido dados importantes para estudos filogenéticos de carrapatos.

Como é sabido, a variação genética ao nível de nucleotídeos proporciona a mais alta resolução disponível para estudos da sistemática e análises filogenéticas (MANGOLD et al., 1998b).

Seqüências de DNAr nuclear (DNAr-n) de espaços internos transcritos (“internal transcribed spacers”) (ITS1 e ITS2) foram usadas para investigar a validação de espécies de carrapatos. O DNAr-mt (12S e 16S) e o DNAr-n (18S e 28S) já foram e continuam sendo usados em estudos filogenéticos de carrapatos e em genéticas de população de espécies de *Ixodes* (WESSON et al., 1993; McLAIN et al., 1995; ZHALER et al., 1995, 1997; BLACK e PIESMAN, 1994; CRAMPTON et al., 1996; BLACK et al., 1997; MANGOLD et al., 1998a, b; RICH et al., 1995; NORRIS et al., 1999). Black e Piesman (1994) usaram seqüências de 16S DNAr-mt na primeira análise molecular de filogenia de carrapatos e proporcionaram o primeiro exame objetivo das classificações tradicionais de Ixodidae usando seqüências de 450

pares de bases (pb) da extremidade 3' do gene 16S RNAr-mt (MANGOLD et al., 1998a).

Norris et al. (1996) examinaram a variação da sequência nos genes 12S e 16S de DNAr-mt para determinar a relação genética entre coleções de *Ixodes scapularis* Say, 1821 de várias localidades dentro da sua área de distribuição nos Estados Unidos. Para isso, os autores utilizaram análise de polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) de 300 bp da molécula de 16S, identificaram 11 haplótipos diferentes e estimaram suas frequências relativas entre 198 carrapatos. Os diferentes haplótipos detectados foram sequenciados em alguns espécimes, em um total de 462 pb do gene 16S e 420 do 12S, para revelar sítios de informação.

Segundo Norris et al. (1996), referenciando Avise (1986), a análise do DNAr-mt se tornou uma poderosa ferramenta no estudo de populações de animais. No referido estudo, sugere-se que existe uma grande variação no DNAr-mt de *I. scapularis*. Análises filogenéticas evidenciaram que pelo menos 2 linhagens mitocondriais principais existem na população de *I. scapularis*. Análises do polimorfismo do fragmento de DNA amplificado ao acaso (RAPD) de amostras de PCR examinadas entre membros dos dois grupos sugeriram que *I. scapularis* surgiu no Sul dos Estados Unidos, mas uma grande separação geográfica deu origem a duas linhagens distintas. Essas linhagens agora reproduzem-se entre si e são parcialmente simpátricas. Além disso, variações genéticas estavam presentes entre carrapatos de diferentes populações mesmo dentro dos mesmos estados (por exemplo, Georgia, Carolina do Norte e Oklahoma) (OLIVER Jr., 1996).

Em estudo realizado por Zahler et al. (1997), buscando determinar quantitativamente as diferenças nos respectivos genótipos, e para usar essa informação para estabelecer sua relação filogenética, foi utilizada uma sequência alvo, de 250 a 274 pb, dentro do gene ITS2 de RNAr, de seis espécies pertencentes ao complexo *R. sanguineus*: *R. sanguineus sensu stricto*, *R. turanicus*, *R. rossicus*, *R. pumilio*, *R. pussilus* e *R. camicasi* e de *R. evertsi*, onde *R. sanguineus sensu stricto* e *R. turanicus* assim como *R. pumilio* e *R. rossicus* apresentaram íntima relação genética, compatível com conspecificidade. *R. sanguineus sensu stricto* (Azerbaijão e Burkina Faso) e *R. turanicus* (Turquemenistão) apresentaram seqüências idênticas (mesmo genótipo), assim como *R. pumilio* e *R. rossicus*, sugerindo serem, cada par, uma única espécie. Inversamente, *R. pussilus* apresentou a relação mais distante com as outras espécies. A seqüência utilizada por Zahler et al. (1997) corresponde a 22% do ITS2 de *R. evertsi* e provavelmente a uma porção similar desse gene para os outros membros do gênero, porque todas as espécies de Rhipicephalinae estudadas até aqui têm ITS2 de mais de 1Kpb (1000 pares de bases) (BARKER, 1998). Porém, esses resultados não estão de acordo com algumas publicações baseadas em morfologia, biologia e seqüências moleculares de *R. turanicus* e *R. sanguineus* coletados em Israel (BLACK e PIESMAN, 1994; IOFFE-USPENSKY et al., 1997, 2005; NORRIS et al., 1999), como pode ser visto a seguir.

Para as duas mesmas espécies (*R. sanguineus sensu stricto* e *R. turanicus*) em Israel, Norris et al. (1999) observaram 5,7% e 4,3% de divergência na seqüência dos genes 12S e 16S RNAr-mt, respectivamente (MANGOLD et al., 1998a).

Também utilizando o ITS2 da região codificadora para RNAr, Barker (1998) estudou 16 populações de carrapatos Rhipicephalinae para elucidar problemas de classificação e validação de espécies. Cada uma das 16 populações apresentou sua seqüência própria, mas a maior quantidade de variação dos nucleotídeos ocorreu entre espécies e gêneros. O ITS2 RNAr pôde ser usado para distinguir as populações e espécies de *R. (Boophilus)* e *Rhipicephalus* desse estudo.

No referido estudo, houve variação de 22 nucleotídeos de 1161 sítios (1,9%) em *B. microplus* (4 populações), 41 de 1161 sítios (3,5%) em *R. appendiculatus* (6 populações), e 10 de 686 sítios (1,5%) em *R. zambeziensis* (3 populações). A distância absoluta média entre populações foi de 1,0% (variando de 0,8 – 1,1%) para *R. (Boophilus) microplus*, 1,1% (0,6 –

1,5%) para *R. appendiculatus*, e 1,0% (0,7 – 1,2%) para *R. zambeziensis*. Para *Dermacentor reticulatus*, a distância absoluta média entre populações foi de 0,4% (3 populações), ao passo que essa figura foi de 1,3% (13 populações) para *I. scapularis*, i.e., *I. scapularis* mais *I. damini*, e 4,2% (4 populações) para *I. pacificus*.

Black e Piesmam (1994) encontraram 4-5 % de divergência entre *R. sanguineus* e *R. turanicus* de Israel usando uma porção do 16S DNAr como seqüência alvo.

Mangold et al. (1998a) baseado na seqüência genética de um fragmento de 16S de DNAr, observou uma alta porcentagem de similaridade (98,7%) entre as seqüências de *R. sanguineus* e *R. turanicus* da Espanha, sugerindo que essas espécies podem ter divergido recentemente dentro do gênero *Rhipicephalus*.

Segundo Szabó et al. (2005), que compararam o DNAr-mt de duas populações de *R. sanguineus* dentro da América do Sul, uma da cidade de Jaboticabal, São Paulo, Brasil e outra de Rafaela, Santa Fé, Argentina, existe uma alta divergência do 12S DNAr-mt de *R. sanguineus* do Brasil e da Argentina. Além disso, uma forte relação genética foi detectada entre populações de *R. sanguineus* da Europa e da Argentina, enquanto a população do Brasil pareceu estar mais relacionada a *R. turanicus* africano. Além do mais, o cruzamento de carrapatos desses países (Brasil e Argentina) originaram híbridos não férteis. A diferença absoluta de nucleotídeos entre as seqüências de *R. sanguineus* (Brasil e Argentina) foi de 27 (8%). As variações na seqüência entre populações de *R. sanguineus* e *R. turanicus* variaram entre 0 e 8,3%. As menores variações intraespecíficas foram observadas entre *R. sanguineus* da Argentina, França e Egito (variação, 0-0,6%) e entre *R. turanicus* de Israel e Turquia (0,3%). Por outro lado, a maior divergência intraespecífica foi detectada entre *R. sanguineus* do Brasil e de Israel (8,3%). No entanto, a variação na seqüência observada entre *R. sanguineus* do Brasil e *R. turanicus* do Zimbábue foi somente de 2,4%. Os resultados providenciaram um forte suporte (99%) para o grupo contendo *R. sanguineus* argentino e outros *R. sanguineus* mediterrâneos. Um alto valor de “bootstrap” (100%) apoiou a relação próxima entre *R. sanguineus* do Brasil e *R. turanicus* do Zimbábue. Esses resultados mostraram que diferenças entre as populações são maiores do que as assumidas previamente e que o status biosistemático de *R. sanguineus* da América Latina deve ser reavaliado (SZABÓ et al., 2005). Todas essas observações, morfológicas, moleculares e biológicas, juntas, segundo Oliveira et al. (2005), indicam que carrapatos *Rhipicephalus* do Brasil são exatamente *R. turanicus*.

Além disso, Bernasconi et al. (2002) já haviam observado uma forte relação entre a seqüência 12S DNAr-mt de um carrapato coletado de um cachorro em Costa Rica (classificado como *R. turanicus*) e a seqüência correspondente de *R. turanicus* do Zimbábue (AF150017), também utilizado no estudo de Szabó et al. (2005). Sendo assim, de alguma forma, segundo Szabó et al. (2005), parece haver pelo menos duas espécies do complexo *R. sanguineus* na América Latina, mas ainda é prematuro nomear tais espécies até que seja feita uma exaustiva revisão mundial sobre *R. sanguineus* e *R. turanicus* e sobre outras espécies relacionadas.

Também considerando o gene 12S DNAr, o nível de variabilidade intraespecífica de seqüências entre carrapatos *R. sanguineus* da Espanha, Portugal, França e Zimbábue pareceu ser extremamente baixo (BEATI e KEIRANS, 2001), enquanto Bernasconi et al. (2002) observaram variabilidade genética de 1,5% entre *R. sanguineus* de uma área relativamente pequena como Ticino (Suíça). Especificamente, todas as seqüências 12S DNAr de *R. sanguineus* analisadas por Beati e Keirans (2001) foram idênticas. No entanto, as seqüências de espécimes de *R. turanicus* da Grécia, Zimbábue, Israel e França foram caracterizadas por uma faixa de variabilidade que variou entre 1,5 e 7,7%. Interessantemente, a seqüência de *R. turanicus* francês diferiu somente em 2,4% da seqüência de *R. sanguineus* (BEATI e KEIRANS, 2001). Segundo os autores, *R. turanicus* de Israel, Grécia e Zimbábue

pertencem a um grupo (“clade”) distinto do grupo de *R. sanguineus* e *R. turanicus* franceses.

Desde que *R. sanguineus* tem sido considerado como único representante do gênero na América do Sul, houve, até agora, pouco incentivo para se procurar outras espécies. Tal tarefa parece ser complicada visto que a seqüência de DNAr 12S de espécies morfológicamente praticamente idênticas a *R. sanguineus*, como *R. turanicus*, são caracterizadas por um alto nível de variabilidade, indicando que a morfologia parecida com a de *R. turanicus* pode mascarar um espectro de espécies distintas (BEATI e KEIRANS, 2001).

As descobertas recentes de que algumas populações de *R. sanguineus* da América do Sul apresentam relação com *R. turanicus* e *R. sanguineus* de outros países (OLIVEIRA et al., 2005; SZABÓ et al., 2005) levantam mais intriga sobre esse problema obscuro. Isso significa que o “status” taxonômico de *R. sanguineus* nas Américas se tornou mais questionável desde que é possível que a linhagem que se estabeleceu tenha derivado de *R. turanicus* possivelmente introduzido nessas regiões com os cães (IOFFE-USPENSKY et al., 2005).

3 METODOLOGIA

3.1 Locais de Desenvolvimento da Pesquisa

Este trabalho de pesquisa foi desenvolvido nos seguintes laboratórios. Laboratório de Ixodologia (LABIXOD) da Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz, Laboratório de Biologia Molecular (LABMOL) e Laboratório de Acarologia, todos esses pertencentes ao Departamento de Parasitologia Animal (DPA), do Instituto de Veterinária (IV), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada na Rodovia BR 465, km 7, Rio de Janeiro – Brasil. Laboratório de Genética e Bioquímica e Laboratório de Genoma da EMBRAPA - Agrobiologia localizada no km 7 da Rodovia BR 465, Rio de Janeiro – Brasil.

3.2 Origem das Fêmeas e Obtenção das Larvas de *R. sanguineus*

3.2.1 Origem dos espécimes

Os espécimes, fêmeas ingurgitadas vivas ou larvas já preservadas em etanol 70% (no caso de Rondônia), foram gentilmente encaminhados por SEDEX por vários colegas pesquisadores de diferentes localidades do país (Tabela 1). As fêmeas ingurgitadas foram coletadas após se desprenderem naturalmente de cães domésticos (*Canis familiaris*), ou retiradas diretamente dos animais.

A identidade dos carrapatos foi confirmada morfológicamente seguindo-se as chaves dicotômicas de Rageau (1953), Gil-Collado et al. (1979) e Walker et al. (2000).

Tabela 1: Origem dos espécimes de *Rhipicephalus sanguineus* do Brasil.

ESTADO / REGIÃO	LOCALIDADE	COORDENADAS	COLETOR	DATA
Pará / Norte	Castanhal	1° 17' 49" S 47° 55' 19" W	Dra. Alessandra Scofield Amaral	22/03/07
Rio Grande do Norte / Nordeste	Mossoró	5° 11' 15" S 37° 20' 38" W	Dra. Silvia Maria Mendes Ahid	14/03/07
Rondônia / Norte	Porto Velho	8° 45' 34" S 63° 54' 24" W	Dr. Fábio Barbieri	27/03/07
Goiás / Centro-Oeste	Goiânia	16° 40' 46" S 49° 15' 18" W	Dra. Lígia Borges	20/03/07
Mato Grosso do Sul / Centro-Oeste	Campo Grande	20° 26' 40" S 54° 38' 51" W	Dra. Carina Elisei e Dra. Renata Madureira	16/02/07
Espírito Santo / Sudeste	Alegre	20° 45' 46" S 41° 32' 01" W	Dra. Isabela Martins	11/05/07
Rio de Janeiro / Sudeste	Rio de Janeiro	22° 53' 59" S 43° 34' W	Leonardo Burlini e Graziela Savastano	29/04/07

3.2.2 Obtenção das larvas

As fêmeas após terem sido lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 2%, e posteriormente em H₂O destilada corrente, e secas, foram acondicionadas em placas de Petri e mantidas em câmara climática tipo BOD a temperatura de 27±1°C e umidade relativa de 80±10% para efetuarem postura. As larvas, após 15 dias da eclosão, em jejum, foram fixadas e preservadas em frascos de vidro contendo etanol 70% onde permaneceram em temperatura ambiente. Foram utilizados 100 mg de larvas em jejum provenientes de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*.

3.3 Obtenção das Sequências de DNA Ribossomal Mitocondrial (DNAr-mt) 12S e 16S das Larvas de *R. sanguineus*.

3.3.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído de uma amostra de 100 mg de larvas (\approx 500 larvas) de *R. sanguineus* de uma única fêmea por localidade. As amostras foram individualizadas em tubos de microcentrífuga tipo eppendorf de 1,5 ml e procederam-se duas lavagens por centrifugação a 1500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos com 500 μ l de solução salina de tampão fosfato (PBS) gelada (pH 7,2), em microcentrífuga (eppendorf, Centrifuge 5415D). Após a lavagem, a solução sobrenadante de PBS foi retirada do tubo por aspiração; posteriormente adicionou-se 180 μ l de tampão de lise (Buffer ATL) do kit de extração QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen). Posteriormente, as larvas foram maceradas dentro do tubo com auxílio de uma ponteira estéril de 1 ml com a ponta queimada, que serviu de pistilo, e nitrogênio líquido. Para isso, o tubo contendo as larvas em tampão de lise era tampado, rapidamente submerso em nitrogênio líquido e posteriormente o material congelado dentro do tubo era macerado com o “pistilo”. Este procedimento foi repetido até que o conteúdo do tubo se tornasse turvo e homogêneo, indicando a maceração da maioria das larvas. Em seguida adicionou-se 20 μ l de proteinase K aos tubos, para digestão proteolítica. Procedeu-se então rápida agitação em vortex e então as amostras foram incubadas a 56 °C “overnight”. A partir deste ponto, o DNA total foi isolado com o kit de extração QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen), seguindo-se as recomendações do fabricante. A extração de DNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 0,7% (durante aproximadamente 1 hora a 100 volts, 140 mA e 13 watts), utilizando-se 2 μ l de tampão de aplicação (“loading”) mais 3 μ l de 1 Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies, USA) (\approx 250 ng) ou 5 μ l de amostra de DNA. Os ácidos nucleicos foram corados com brometo de etídeo por 5 minutos e depois o gel foi deixado por 20 minutos em bandeja com H₂O destilada em agitador para descorar. O gel foi visualizado sob iluminação ultravioleta (UV) e fotografado (Gel Logic 100 Imaging System, Kodak 1D 3.6).

3.3.2 Amplificação do DNA

A amplificação do DNA pela reação de polimerase em cadeia (PCR) foi utilizada para amplificar regiões dos genes 12S e 16S DNAr-mt, utilizados como marcadores. Foram utilizados 2 iniciadores (“primers”) para cada gene (*F* forward, *R* reverse) e as posições descritas correspondem a sequência do DNA mitocondrial de *R. sanguineus* (AF081829/NC002074), que contém 14.710 pb (BLACK IV e ROEHRDANZ, 1998). Para o gene 12S DNAr-mt, os iniciadores utilizados para a amplificação de um fragmento, entre as posições 8089 e 8483 pares de bases (pb) do genoma mitocondrial, de aproximadamente 400 pb, o que representa aproximadamente 57% do tamanho total do gene que é de 686 pb, foram: *F*, 5'-AAA CTA GGA TTA GAT ACC CTA TTA TTT TAG-3'; *R*, 5'-CTA TGT AAC GAC TTA TCT TAA TAA AGA GTG-3' (SZABÓ et al., 2005). Para o gene 16S DNAr-mt, os iniciadores utilizados para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 340 pb, entre as posições 7333 e 7670, o que representa aproximadamente 28% do tamanho total do gene que é de 1189 pb, foram: *F*, 5'-CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC TGT GG-3'; *R*, 5'-TTA CGC TGT TAT CCC TAG AG-3' (BLACK IV e PIESMAN, 1994). Todas as reações de PCR foram processadas em um volume final de 50 μ l. O protocolo da PCR e as condições dos ciclos foram as seguintes. Cada 50 μ l de solução de reação continha 5 μ l de tampão 10X, 4 μ l de dNTP (representando 10 mM, 2,5 mM de cada dNTP), 1 μ l de cada iniciador (a 10 pmol/ μ l), 0,25 μ l de *Taq* DNA polimerase 5 U, e 5 μ l de DNA extraído de

carrapato, além de água de PCR, para ajustar até o volume final de reação, e $MgCl_2$ (25 mM). As amplificações foram processadas em tubos de reação de 0,5 ml usando o termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Uma fase inicial de desnaturação do DNA a $94^\circ C$ por 2 minutos foi seguida por 35 ciclos de 45 segundos a $94^\circ C$, 45 segundos, para anelamento dos iniciadores, a $55^\circ C$ e 45 segundos, para extensão dos iniciadores, a $72^\circ C$. Uma fase final de extensão de 7 minutos a $72^\circ C$ foi realizada ao final dos 35 ciclos. Controles negativos, sem DNA, sempre foram processados simultaneamente. Cinco microlitros da solução de reação foram examinados por eletroforese em gel de agarose a 1% (100 volts por 45 minutos) corado com brometo de etídeo. O marcador (1 Kb Plus DNA Ladder) e o tampão de corrida (“load”) foram utilizados da mesma forma (quantidade) como descrito no item Extração do DNA, assim como o gel foi corado, visualizado e fotografado.

3.3.3 Seqüenciamento do DNA

O DNA amplificado foi seqüenciado diretamente do produto da PCR após precipitação do mesmo pelo seguinte protocolo de purificação para seqüenciamento. Utilizou-se 32 μl do produto da PCR, 8 μl de NaCl (5M) e 40 μl de PEG 8000 (22%), em tubos de 1,5 ml, a solução foi homogeneizada suavemente através de movimentos de inversão do tubo e acondicionada em geladeira a $4^\circ C$ por uma noite. No dia seguinte, o material foi centrifugado a 13.200 rpm por 15 minutos a $4^\circ C$, descartou-se o sobrenadante e lavou-se os tubos com 500 μl de etanol 70%, eliminando-se o etanol ao final. Por fim, ressuspendeu-se o precipitado em 20 μl de H_2O para PCR e estocou-se a $-20^\circ C$.

Antes do seqüenciamento, 2 μl da ressuspensão referida acima foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, da mesma forma que para a PCR.

A seqüência de DNA foi determinada pelo seqüenciamento em seqüenciador Mega Bace 1000 com o kit de seqüenciamento DYEnamic TM ET Dye terminator (Pharmacia Biotech) usando os mesmos iniciadores da PCR (1 μl na concentração de 5 pmol/ μl).

3.3.4 Alinhamento das seqüências e inferências sobre variabilidade

Após o seqüenciamento dos fragmentos dos genes 12S e 16S RNAr, as seqüências obtidas (“forward” e “reverse”), para cada um dos genes, foram alinhadas a fim de obtermos uma seqüência consenso. As seqüências consenso foram obtidas através das análises diretas dos eletroferogramas pelo programa Phred phrap ou manualmente utilizando as seqüências disponibilizadas pelo seqüenciador Mega Bace 1000 usando o MEGA para montar o consenso.

As seqüências consenso obtidas das amostras em estudo, previamente depositadas em banco de dados públicos (GenBank) através da utilização do programa de computador Sequin Application (versão 7.90), e as seqüências de DNAr-mt 12S e 16S de outros ixodídeos disponíveis no GenBank que também foram usadas para análises comparativas (tabela 2) foram alinhadas usando-se Clustal W (THOMPSON et al., 1994).

As relações de semelhança foram analisadas usando-se métodos de distância (“neighbor-joining”) e máxima parsimônia. Todas as análises de distância foram realizadas com o programa de computador MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 4.0, TAMURA et al., 2007). Foram geradas árvores pelo método “neighbor-joining” (SAITOU e NEI, 1987) de medidas de distância de Kimura-2-parâmetros (KIMURA, 1980) também usando MEGA. O método Kimura-2-parâmetros foi usado seguindo-se as diretrizes de Jin e Nei (1990) e Kumar et al. (1993), que é recomendado quando $d < 0.30$, como aconteceu para todas as comparações das seqüências com “pairwise deletion”. Também foram

examinadas as topologias das árvores geradas por “neighbor-joining” usando distâncias Tamura-Nei (TAMURA e NEI, 1993) e correções gama ($\alpha = 0.5$) para a distância Tamura-Nei. O suporte para a topologia do “neighbor-joining” foi testado por “bootstrapping” sobre 1000 replicações (FELSENSTEIN, 1985) e uso do teste do erro padrão de comprimentos de ramo interior (RZHETSKY e NEI, 1992; KUMAR et al., 1993).

As análises de máxima parsimônia também foram realizadas, usando o programa de computador MEGA 4, apenas para confrontar com os dados gerados por “neighbor-joining” e confirmá-los.

Tabela 2: Seqüências de DNAr-mt 12S e 16S e seus respectivos códigos de acesso no GenBank, e dados das publicações referentes a *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus turanicus*.

ESPÉCIES	GENE	FONTE	ORIGEM GEOGRÁFICA	CÓDIGO DE ACESSO NO GENBANK	REFERÊNCIA	
<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	<i>Canis familiaris</i>	França	AF150020	Beati e Keirans, 2001	
<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	<i>Canis familiaris</i> /colônia	Jerusalem, Israel	U95915	Norris et al., 1999	
<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt		Argentina	AY559841	Szabó et al., 2005	
<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt		São Paulo, Brasil	AY559842	Szabó et al., 2005	
<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt		Colônia de laboratório	Cairo, Egito	AF133056	Murrell et al., 2000
<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt			Taiwan e Kinmen	DQ003004	Tsai, 2006
<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt		Tailândia	AY987377	Matsumoto et al., 2005	
<i>R. sanguineus</i>	12S DNAr-mt	Hospedeiro desconhecido	Uruguai	AY559843	Szabó et al., 2004	
<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt		Israel	AF150015	Beati e Keirans, 2001	
<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt	Hospedeiro desconhecido	Israel	AF150014	Beati e Keirans, 2001	
<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt	Hospedeiro desconhecido	Israel	AF150013	Beati e Keirans, 2001	
<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt	<i>Capra hircus</i>	Zimbabwe	AF150017	Beati e Keirans, 2001	
<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt	<i>Equus caballus</i>	França	AF150018	Beati e Keirans, 2001	
<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt	Colônia de laboratório	Jerusalem, Israel	U95916	Norris et al., 1999	
<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt		Konya, Turquia	AF133057	Murrell et al., 2000	
<i>R. turanicus</i>	12S DNAr-mt		Zâmbia	DQ849232	Mtambo et al., 2007	
<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt		Jerusalem, Israel	L34302	Norris et al., 1999	
<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt		Espanha	Z97884	Mangold et al., 1998 ^a	
<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt	Colônia de laboratório	Taiwan e Kinmen	AY883880	Tsai, 2005	
<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt		Taiwan e Kinmen	AY883863	Tsai, 2005	
<i>R. sanguineus</i>	16S DNAr-mt		Tailândia	DQ016293	Matsumoto et al., 2005	
<i>R. turanicus</i>	16S DNAr-mt	Colônia de laboratório	Jerusalem, Israel	L34303	Norris et al., 1999	
<i>R. turanicus</i>	16S DNAr-mt		Espanha	Z97885	Mangold et al., 1998 ^a	
<i>R. sanguineus</i>	DNAr-mt completo		Oklahoma, EUA	AF081829/NC002074	Black IV e Roehrdanz, 1998	

4 RESULTADOS

4.1 Extração do DNA de Larvas de *R. sanguineus*

A extração do DNA de larvas de *R. sanguineus* consistiu em uma das etapas fundamentais deste estudo, apesar dos conhecimentos disponíveis na literatura. A maioria dos estudos moleculares com carrapatos utiliza formas adultas e portanto descreve a metodologia considerando esse estágio de desenvolvimento do carrapato. Ao trabalhar com larvas, alguns dos procedimentos descritos na metodologia precisaram ser testados e padronizados para produzirem resultados satisfatórios, como a quantidade de larvas a ser utilizada e a questão da maceração das mesmas, por exemplo. O DNA total extraído a partir de amostras de larvas, apresentado na figura 1, foi observado para posterior realização da PCR.

Vale comentar que também recebemos amostra de larvas, já fixadas em etanol 70%, de Jaboticabal, São Paulo, enviada pelo Dr. Matias Pablo Juan Szabó; mas infelizmente, mesmo após diversos testes com diferentes protocolos de extração de DNA, não foi possível extraí-lo. Em função disso, resolvemos excluir a amostra do estudo.

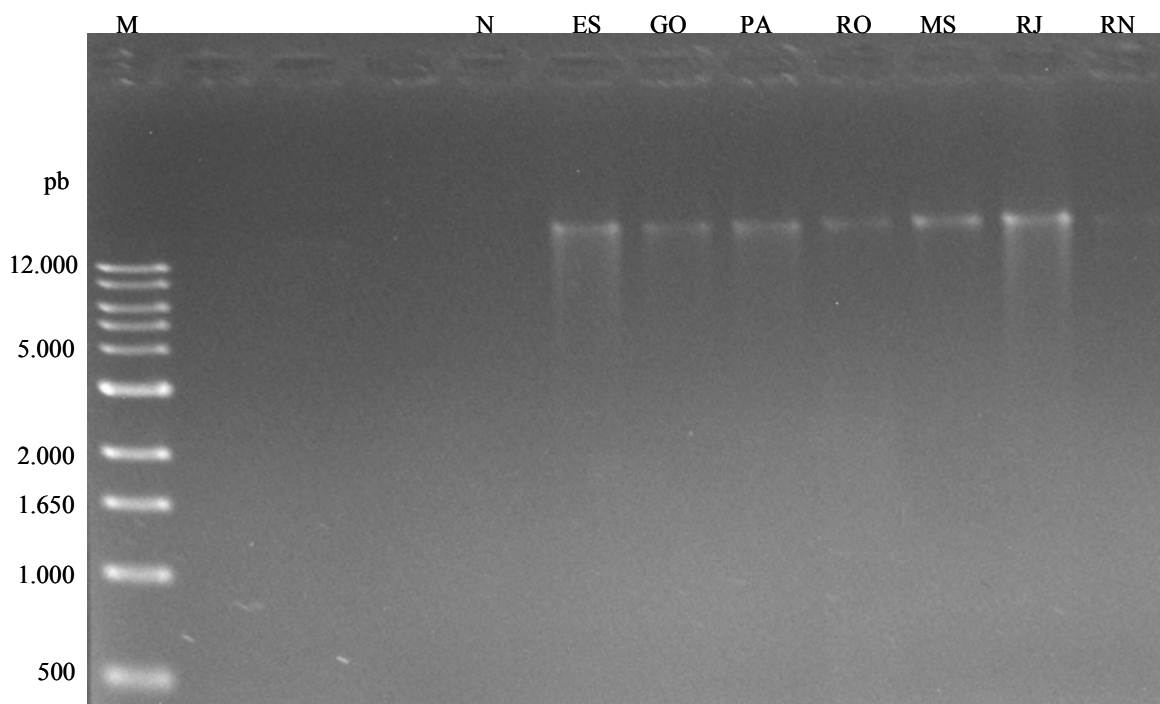


Figura 1: Extratos de DNA total de larvas de *Rhipicephalus sanguineus*. **M)** Marcador de pares de bases – 1 Kb Ladder; **N)** controle negativo. Amostras analisadas de diferentes estados do Brasil: **ES, GO, PA, RO, MS, RJ** e **RN**.

4.2 Amplificação do DNA de Larvas de *R. sanguineus*

O DNA extraído de todas as amostras de larvas de *R. sanguineus* foi amplificado com sucesso na presença dos iniciadores.

A análise dos produtos de amplificação por eletroforese mostrou a presença de bandas de aproximadamente 390 pb para o gene 12S (figura 2) e 331 pb para o gene 16S (figura 3).

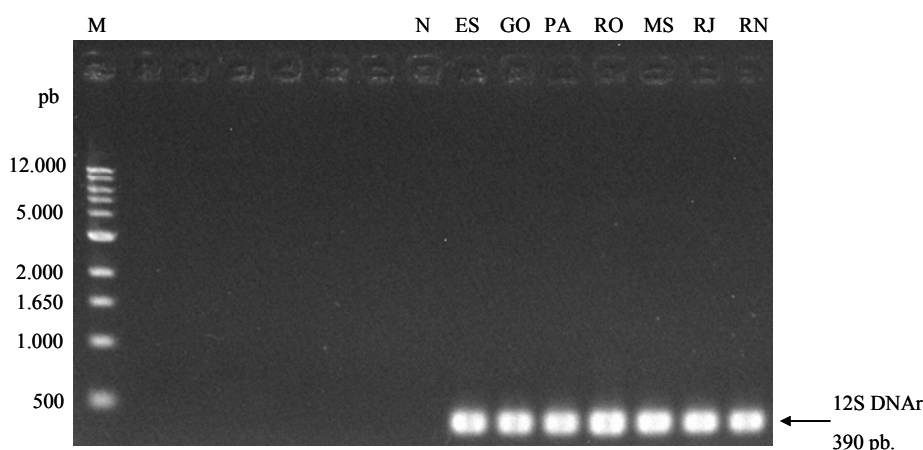


Figura 2: Produtos de amplificação de DNA de larvas de *Rhipicephalus sanguineus* com iniciadores do gene 12S RNAr. **M)** Marcador de pares de bases – 1 Kb Plus DNA Ladder; **N)** controle negativo da reação sem DNA. Amostras analisadas de diferentes estados do Brasil: **ES, GO, PA, RO, MS, RJ e RN.**

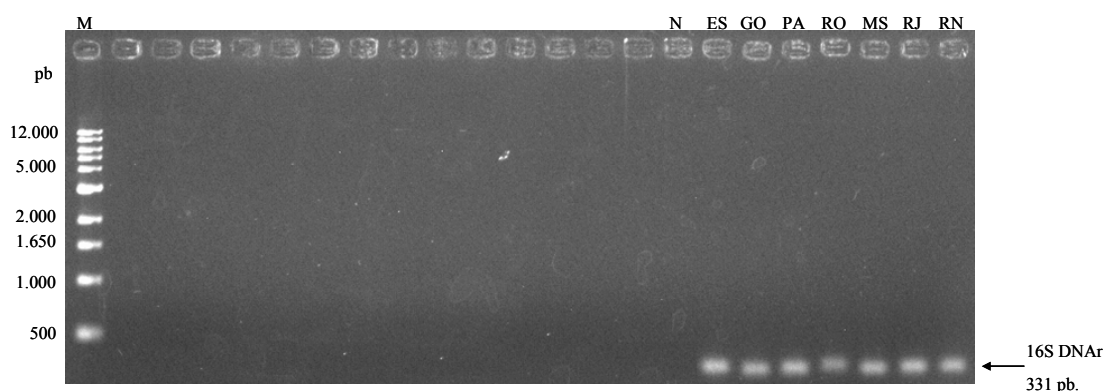


Figura 3: Produtos de amplificação de DNA de larvas de *Rhipicephalus sanguineus* com iniciadores do gene 16S RNAr. **M)** Marcador de pares de bases – 1 Kb Plus DNA Ladder; **N)** controle negativo da reação sem DNA. Amostras analisadas de diferentes estados do Brasil: **ES, GO, PA, RO, MS, RJ e RN.**

4.3 Sequenciamento

Após o seqüenciamento dos fragmentos dos genes 12S e 16S RNAr, foram obtidas quatro seqüências (duas “forward” e duas “reverse”) para cada um dos genes, que deram origem a uma seqüência consenso.

De todas as sete amostras de *R. sanguineus* do Brasil que amplificaram anteriormente, foi possível a obtenção de seqüências de DNA para ambos os genes amplificados. O comprimento médio das seqüências consenso foi de 348,7 pb para o gene 12S RNAr e 287,6 pb para o gene 16S RNAr. O comprimento das seqüências obtidas no presente estudo está compatível com o daquelas relatadas por outros autores (NORRIS et al., 1996, 1999; BERNASCONI et al., 2002; SZABÓ et al., 2005).

Na tabela 3 podem ser vistos os tamanhos em número de bases das seqüências obtidas no presente estudo e os códigos de depósito no GenBank.

Tabela 3: Comprimento dos fragmentos dos genes 12S e 16S RNAr de larvas de *Rhipicephalus sanguineus* de diferentes localidades do Brasil e respectivos códigos de depósito no GenBank.

ORIGEM	GENE	PARES DE BASES	CÓDIGO DE DEPÓSITO NO GENBANK
Espírito Santo	12S RNAr	324 pb	EU346676
	16S RNAr	300 pb	EU346683
Goiás	12S RNAr	390 pb	EU346681
	16S RNAr	331 pb	EU346688
Mato Grosso do Sul	12S RNAr	332 pb	EU346677
	16S RNAr	227 pb	EU346684
Pará	12S RNAr	383 pb	EU346679
	16S RNAr	328 pb	EU346686
Rio de Janeiro	12S RNAr	322 pb	EU346680
	16S RNAr	242 pb	EU346687
Rio Grande do Norte	12S RNAr	352 pb	EU346678
	16S RNAr	269 pb	EU346685
Rondônia	12S RNAr	338 pb	EU346675
	16S RNAr	316 pb	EU346682

4.4 Comparação das Seqüências de 12S e 16S DNAr-mt dos Isolados de Carrapatos de Diferentes Localidades do Brasil

As seqüências consensos de parte dos genes 12S e 16S DNAr-mt estão apresentadas nas figuras 4 e 5.

R. sanguineus (RO)	ATT ATG AAA GCC AAA AAT TAT GGC GGT ATT TTA AGC TTT TCA GAG GAA TTT GCT CTT TAA TGG ATA AAA CA- -CC AAA	[78]
R. sanguineus (ES)GGG CTC T.G ... G.. - -	[78]
R. sanguineus (MS)A - - - - - -	[78]
R. sanguineus (RN)A - - - - - -	[78]
R. sanguineus (PA)A - - - - - -	[78]
R. sanguineus (RJ)A - - - - - -	[78]
R. sanguineus (GO)A - - - - - -	[78]
R. sanguineus (RO)	ATC TTA CTT AGA TTT GTG ATT TCA ATT TGT ATA CCA CTA TTA A-A ACA ATT TAT AAC TTT AAT TGT TTA AAT TTA CAA	[156]
R. sanguineus (ES)G A..G..G..G..G..	[156]
R. sanguineus (MS)G A..G..G..G..G..	[156]
R. sanguineus (RN)G A..G..G..G..G..	[156]
R. sanguineus (PA)G A..G..G..G..G..	[156]
R. sanguineus (RJ)G A..G..G..G..G..	[156]
R. sanguineus (GO)G A..G..G..G..G..	[156]
R. sanguineus (RO)	AAC TAA AAT ATA TTA AGT CAA GGG TGC -AG TAA AAA TTT AAG G-A TGA AGT GAA TTA CAT TAC TTT TTA GTG AGA TAA	[234]
R. sanguineus (ES)G TCC A.. - - - - - -	[234]
R. sanguineus (MS)A.. - - - - - -	[234]
R. sanguineus (RN)C. A.. - - - - - -	[234]
R. sanguineus (PA)A.. - - - - - -	[234]
R. sanguineus (RJ)A.. - - - - - -	[234]
R. sanguineus (GO)A.. - - - - - -	[234]
R. sanguineus (RO)	GTT TAT AAC AAT ATT TAG GAT TTG AAA GTA AAA TTA AAA TAG GAT GT	[281]
R. sanguineus (ES)	A.. - - - - - -	[281]
R. sanguineus (MS)	A.. - - - - - -	[281]
R. sanguineus (RN)	A.. - - - - - -	[281]
R. sanguineus (PA)	A.. - - - - - -	[281]
R. sanguineus (RJ)	A.. - - - - - -	[281]
R. sanguineus (GO)	A.. - - - - - -	[281]

Figura 4: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos (5`- 3`) do gene 12S RNAr de *R. sanguineus* de diferentes regiões do Brasil. Um *ponto* indica que a seqüência nesse ponto é idêntica à seqüência do topo. Um *hifen* indica um “gap” no alinhamento.

```

R.sanguineus(RO) GGT ATT GAA ATA AGA TTT TAA TTG AAT GCT AAG AGA ATG GAA GTC --C AGG AAA AAA AC- -TT TTT TTA AAT TAA AAA [ 78]
R.sanguineus(ES) ... .. [ 78]
R.sanguineus(MS) ... .. [ 78]
R.sanguineus(RN) ... .. [ 78]
R.sanguineus(PA) ... .. [ 78]
R.sanguineus(RJ) ... .. GC .A. . . . .G G. . . . . [ 78]
R.sanguineus(GO) ... .. .A. . . . .A . . . . . [ 78]

R.sanguineus(RO) T-T GAA GTT TTT TTA ATT GGT GCA GAA A-C AAT TAT TTA TAT TAA AGA CAA GAA GAC C-C TAT GAA TTT ATT AAA TTT [156]
R.sanguineus(ES) -. . . . . T. . . . .A. . . . . [156]
R.sanguineus(MS) -. . . . . T. . . . . [156]
R.sanguineus(RN) -. . . . . T. . . . . [156]
R.sanguineus(PA) .C. . . . . T. . . . . [156]
R.sanguineus(RJ) -. . . . . AG. .A. . . . . [156]
R.sanguineus(GO) .C. . . . . T. . . . . [156]

R.sanguineus(RO) TTA TTT AAT ATG TAA TTA CTA TTA GAA AAA TTT TGG CTG GGG -CG GCT AGA AAA -TA TTA TGA ACT TTT T-A AAA ATA [234]
R.sanguineus(ES) ... .. [234]
R.sanguineus(MS) ... .. [234]
R.sanguineus(RN) ... .. [234]
R.sanguineus(PA) ... .. [234]
R.sanguineus(RJ) ... .. G. . . . .G. . . . .A. . . . .T. . . . . [234]
R.sanguineus(GO) ... .. [234]

R.sanguineus(RO) AA [236]
R.sanguineus(ES) .. [236]
R.sanguineus(MS) .. [236]
R.sanguineus(RN) .. [236]
R.sanguineus(PA) .. [236]
R.sanguineus(RJ) .. [236]
R.sanguineus(GO) .. [236]

```

Figura 5: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos (5`- 3`) do gene 16S RNAr de *R. sanguineus* de diferentes regiões do Brasil. Um *ponto* indica que a seqüência nesse ponto é idêntica a seqüência do topo. Um *hifen* indica um “gap” no alinhamento.

As diferenças entre as seqüências consenso de 12S RNAr de *R. sanguineus* das diferentes regiões podem ser observadas na tabela 4; vale destacar que a amostra de *R. sanguineus* oriunda do Espírito Santo apresentou maior diversidade genética, de 5,5 a 6,6% (correspondente a variação de 15 a 18 nucleotídeos) em comparação às demais amostras brasileiras.

As diferenças entre as seqüências consenso de 16S RNAr de *R. sanguineus* das diferentes regiões estão na tabela 5.

Quando utilizado o gene 16S RNAr, a amostra do Espírito Santo apresentou menor divergência em relação as demais localidades (Tabela 5). Neste gene, o destaque pode ser dado à amostra do Rio de Janeiro que apresentou os maiores valores para diferenças absolutas de nucleotídeos (4-6) em relação às demais seqüências. O número de seqüências com identidade de 100% foi maior que o obtido com o gene 12S RNAr, conforme pode ser visto na tabela 5.

Vale destacar que em ambas as análises as amostras do Rio Grande do Norte e do Pará apresentaram 100% de similaridade entre si.

Tabela 4: Matriz de diferenças absolutas de nucleotídeos (em negrito) e matriz de divergência de seqüências (em itálico), com comparações “pairwise” e uso do logaritmo Kimura-2-parâmetros, do gene 12S RNAr-mt dos 7 isolados de *R. sanguineus* de diferentes estados.

Amostras de 12S RNAr de <i>R. sanguineus</i> oriundos de diferentes Estados	ES	GO	PA	RO	MS	RJ	RN
Espírito Santo (ES)		<i>0.065</i>	<i>0.055</i>	<i>0.065</i>	<i>0.066</i>	<i>0.055</i>	<i>0.055</i>
Goiás (GO)	18		<i>0.007</i>	<i>0.011</i>	<i>0.022</i>	<i>0.011</i>	<i>0.011</i>
Pará (PA)	15	2		<i>0.011</i>	<i>0.015</i>	<i>0.004</i>	<i>0.000</i>
Rondônia (RO)	18	3	3		<i>0.018</i>	<i>0.007</i>	<i>0.015</i>
Mato Grosso do Sul (MS)	18	6	4	5		<i>0.011</i>	<i>0.015</i>
Rio de Janeiro (RJ)	15	3	1	2	3		<i>0.004</i>
Rio Grande do Norte (RN)	15	3	0	4	4	1	

Note-se que as seqüências 12S oriundas do Pará e do Rio Grande do Norte não apresentam divergência na análise realizada, já a amostra do Espírito Santo é a com maior divergência em comparação a todas as demais.

Tabela 5: Matriz de diferenças absolutas de nucleotídeos (em negrito) e matriz de divergência de seqüências (em itálico), com comparações “pairwise” e uso do logaritmo Kimura-2-parâmetros, do gene 16S RNAr-mt dos 7 isolados de *R. sanguineus* de diferentes estados.

Amostras de 16S RNAr de <i>R. sanguineus</i> oriundos de diferentes Estados	RJ	RO	MS	PA	ES	GO	RN
Rio de Janeiro (RJ)		<i>0,018</i>	<i>0,022</i>	<i>0,027</i>	<i>0,022</i>	<i>0,027</i>	<i>0,027</i>
Rondônia (RO)	4		<i>0,004</i>	<i>0,009</i>	<i>0,009</i>	<i>0,013</i>	<i>0,009</i>
Mato Grosso do Sul (MS)	5	1		<i>0,004</i>	<i>0,004</i>	<i>0,009</i>	<i>0,004</i>
Pará (PA)	6	2	1		<i>0,000</i>	<i>0,004</i>	<i>0,000</i>
Espírito Santo (ES)	5	2	1	0		<i>0,000</i>	<i>0,000</i>
Goiás (GO)	6	3	2	1	0		<i>0,004</i>
Rio Grande do Norte (RN)	6	2	1	0	0	1	

Quando as seqüências das amostras de diferentes localidades do Brasil foram comparadas com algumas de *R. sanguineus* e *R. turanicus* depositadas no GenBank, foi notado, de uma forma geral, que as variações entre as seqüências 12S DNAr e 16S DNAr dos isolados de *R. sanguineus* e *R. turanicus* de diversos países variaram entre 0 e 15,9% (tabela 6) e 0 e 9,8% (tabela 7), respectivamente.

Em relação ao gene 12S, não houve variação entre as seqüências de *R. sanguineus* do Rio de Janeiro, São Paulo, Tailândia e Taiwan (0%) e entre as populações do Uruguai, França e Argentina (0%), sendo em valores percentuais as menores variações intraespecíficas registradas entre as amostras do Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro, São Paulo, Tailândia e Taiwan (0,4%).

No que se refere às amostras de *R. turanicus*, através da comparação do gene 12S, também não houve diferença entre aquelas do Zâmbia e Zimbábwe (0%), sendo observado o valor de 0,4 % entre os isolados de Israel e Turquia.

Quando as variações interespecíficas foram analisadas em função do gene 12S, verificou-se um valor de 2,2% entre uma amostra de *R. sanguineus* do Brasil, Rio Grande do Norte, e os isolados de *R. turanicus* africanos (Zâmbia e Zimbábwe) (tabela 6). Vale ressaltar que a maior divergência intraespecífica observada foi de 15,9% entre *R. sanguineus* do Espírito Santo e a seqüência de Israel. Note-se também, através da tabela 6, que as seqüências de *R. sanguineus* oriundas de Taiwan, Tailândia, São Paulo e Rio de Janeiro; as de *R. turanicus* de Zâmbia e Zimbábwe; e aquelas oriundas de *R. sanguineus* da França, Argentina e Uruguai não apresentam divergência na análise realizada entre estes. Por outro lado, *R. sanguineus* de Israel e do Espírito Santo apresentaram a maior divergência em comparação a todas as demais.

As análises por “neighbor-joining” para o gene 12S produziram a árvore mostrada na figura 6. Também foram feitas análises baseadas em máxima parsimônia produzindo árvore com topologia e suporte para as ramificações interiores similares ao encontrado na árvore produzida por “neighbor-joining” (figura 8, Anexo).

Considerando o gene 16S, as menores variações intraespecíficas foram observadas entre as seqüências de *R. sanguineus* do Rio Grande do Norte e Espírito Santo, Pará e Goiás (0,5%); Pará e Espírito Santo (0,4%); Rio Grande do Norte e Mato Grosso do Sul, Tailândia e Taiwan (0,4%). Não foram observadas diferenças entre as seqüências de Goiás e Espírito

Santo; entre a de Mato Grosso do Sul, Tailândia e Taiwan; entre a de Tailândia e Taiwan; e entre a dos Estados Unidos e Espanha.

A maior divergência intraespecífica detectada foi entre *R. sanguineus* do Rio de Janeiro e as seqüências dos Estados Unidos e Espanha (9%). Vale ressaltar que variações entre seqüências interespecíficas, como por exemplo, entre *R. sanguineus* do Rio Grande do Norte e *R. turanicus* espanhol (7,7%), obtiveram valores inferiores (tabela 7). As análises por “neighbor-joining” considerando o gene 16S produziram a árvore mostrada na figura 7. Também foram feitas análises baseadas em máxima parsimônia produzindo árvore com topologia e suporte para as ramificações interiores similares ao encontrado na árvore produzida por “neighbor-joining” (figura 9, Anexo).

Tabela 7: Matriz de diferenças absolutas de nucleotídeos (em negrito) e matriz de divergência de seqüências (em itálico), com comparações “pairwise” e uso do logaritmo Kimura-2-parâmetros, do gene 16S RNAr-*mt* de 15 isolados de *R. sanguineus* (R.s) e *R. turanicus* (R.t.) de diferentes origens.

ORIGEM DOS ISOLADOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. R. s. (RJ)		<i>0,009</i>	<i>0,013</i>	<i>0,013</i>	<i>0,013</i>	<i>0,013</i>	<i>0,018</i>	<i>0,022</i>	<i>0,027</i>	<i>0,018</i>	<i>0,058</i>	<i>0,090</i>	<i>0,090</i>	<i>0,094</i>	<i>0,098</i>
2. R. s. (RO)	2		<i>0,009</i>	<i>0,009</i>	<i>0,009</i>	<i>0,009</i>	<i>0,009</i>	<i>0,013</i>	<i>0,018</i>	<i>0,013</i>	<i>0,049</i>	<i>0,086</i>	<i>0,086</i>	<i>0,090</i>	<i>0,094</i>
3. R. s. Tailândia	3	2		<i>0,000</i>	<i>0,000</i>	<i>0,000</i>	<i>0,009</i>	<i>0,009</i>	<i>0,009</i>	<i>0,004</i>	<i>0,040</i>	<i>0,076</i>	<i>0,077</i>	<i>0,081</i>	<i>0,085</i>
4. R. s. Taiwan/Kinmem	3	2	0		<i>0,000</i>	<i>0,000</i>	<i>0,009</i>	<i>0,009</i>	<i>0,009</i>	<i>0,004</i>	<i>0,040</i>	<i>0,076</i>	<i>0,077</i>	<i>0,081</i>	<i>0,085</i>
5. R. s. Taiwan/Kinmem	3	2	0	0		<i>0,000</i>	<i>0,009</i>	<i>0,009</i>	<i>0,009</i>	<i>0,004</i>	<i>0,040</i>	<i>0,077</i>	<i>0,077</i>	<i>0,081</i>	<i>0,085</i>
6. R. s. (MS)	3	2	0	0	0		<i>0,009</i>	<i>0,009</i>	<i>0,009</i>	<i>0,004</i>	<i>0,040</i>	<i>0,076</i>	<i>0,077</i>	<i>0,081</i>	<i>0,085</i>
7. R. s. (PA)	4	2	2	2	2	2		<i>0,004</i>	<i>0,009</i>	<i>0,005</i>	<i>0,041</i>	<i>0,077</i>	<i>0,077</i>	<i>0,081</i>	<i>0,086</i>
8. R. s. (ES)	5	3	2	2	2	2	1		<i>0,000</i>	<i>0,005</i>	<i>0,041</i>	<i>0,077</i>	<i>0,078</i>	<i>0,082</i>	<i>0,086</i>
9. R. s. (GO)	6	4	2	2	2	2	2	0		<i>0,005</i>	<i>0,045</i>	<i>0,077</i>	<i>0,078</i>	<i>0,082</i>	<i>0,086</i>
10. R. s. (RN)	4	3	1	1	1	1	1	1	1		<i>0,036</i>	<i>0,072</i>	<i>0,072</i>	<i>0,077</i>	<i>0,081</i>
11. R. s. Israel	13	11	9	9	9	9	9	9	10	8		<i>0,054</i>	<i>0,054</i>	<i>0,058</i>	<i>0,063</i>
12. R. s. Espanha	20	19	17	17	17	17	17	17	17	16	12		<i>0,000</i>	<i>0,022</i>	<i>0,081</i>
13. R. s. EUA-Oklahoma	20	19	17	17	17	17	17	17	17	16	12	0		<i>0,023</i>	<i>0,077</i>
14. R. t. Espanha	21	20	18	18	18	18	18	18	18	17	13	5	5		<i>0,072</i>
15. R. t. Israel	22	21	19	19	19	19	19	19	19	18	14	18	17	16	

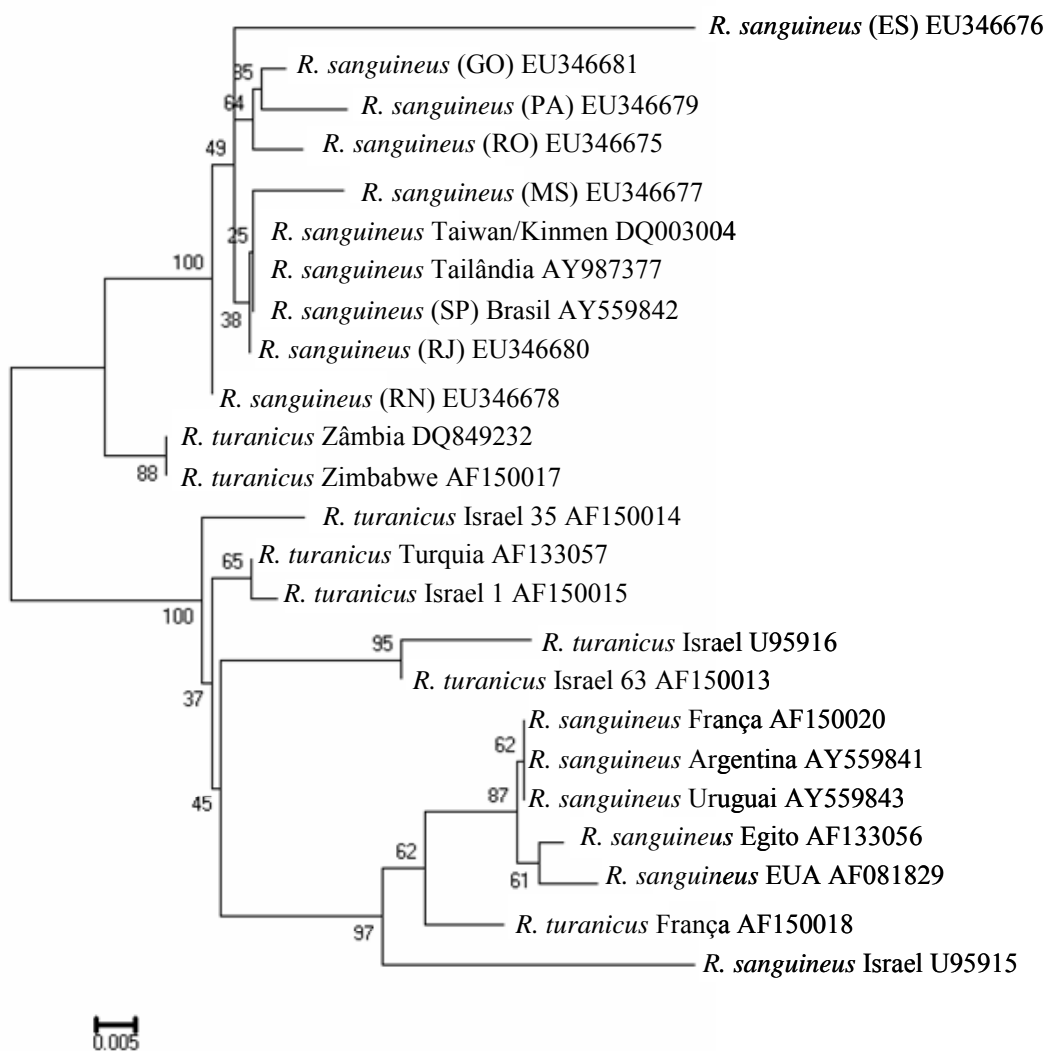


Figura 6: Árvore “neighbor-joining” (sem raiz) do gene 12S RNAr, usando distância Kimura-2-parâmetros. Os números representam a percentagem de suporte de “bootstrap”.

As análises através dos parâmetros utilizados para construção da árvore apresentada na figura 6 proporcionaram uma forte sustentação (97%) para o grupamento (“cluster”) contendo *R. sanguineus* argentino, uruguaio, francês, americano e outros *R. sanguineus* mediterrâneos. Um alto valor de “bootstrap” (100%) sustentou a relação próxima entre *R. sanguineus* brasileiros e *R. sanguineus* da Tailândia e Taiwan e confirmou a proximidade dos isolados brasileiros com *R. turanicus* africanos. Além disso, há dois grupos formados por seqüências obtidas de quatro diferentes populações de *R. turanicus* de Israel e uma da Turquia. É notável também a formação de quatro agrupamentos distintos dos isolados brasileiros, sendo as seqüências de Goiás, Pará e Rondônia pertencentes a um grupo; Mato Grosso do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro mais as amostras asiáticas de *R. sanguineus*, outro grupo; enquanto que seqüências oriundas do Espírito Santo e Rio Grande do Norte mantiveram-se cada uma em um ramo isolado.

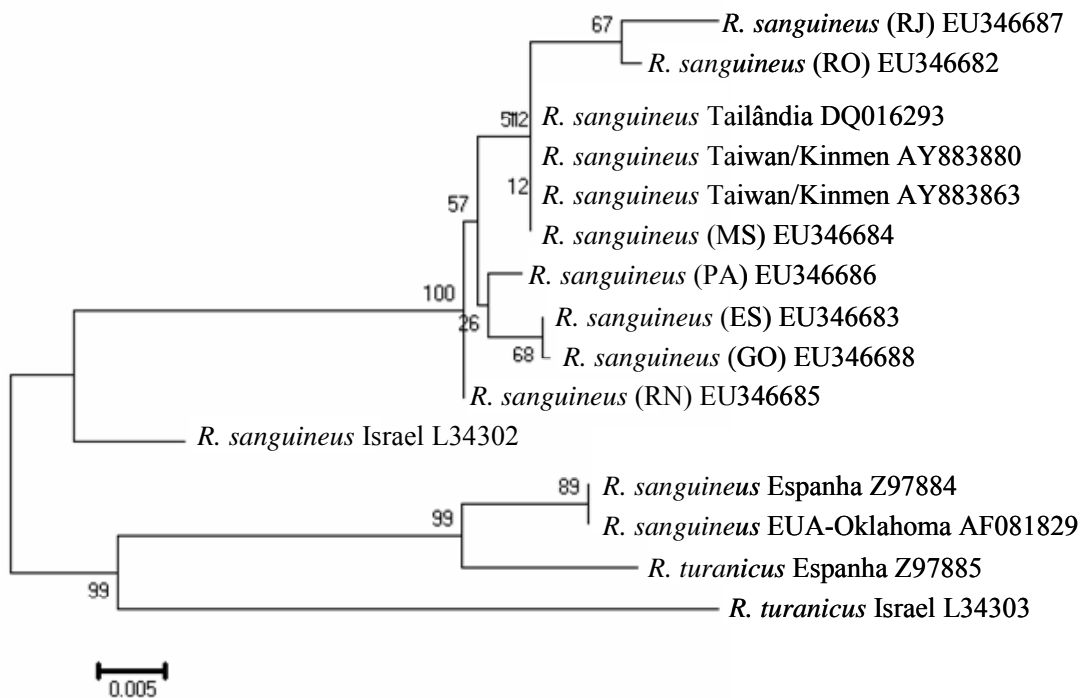


Figura 7: Árvore “neighbor-joining” (sem raiz) do gene 16S RNAr usando distância Kimura-2-parâmetros. Os números representam a percentagem de suporte de “bootstrap”.

Na análise usando o gene 16S, os resultados proporcionaram uma forte sustentação (100%) para o agrupamento (“cluster”) contendo *R. sanguineus* oriundos do Brasil junto com aqueles de origem asiática, e evidenciaram uma proximidade de *R. sanguineus* e *R. turanicus* de origem espanhola.

Deve ser notado que a seqüência oriunda do Rio Grande do Norte, quando analisada em relação a ambos os genes (12S e 16S), manteve-se isolada das demais seqüências do Brasil, bem como das de outros países.

5 DISCUSSÃO

Em relação ao gene 12S DNAr-mt, a variabilidade genética entre *R. sanguineus* de algumas regiões do Brasil e em especial entre regiões relativamente próximas do Rio de Janeiro e Espírito Santo (5,5%) parece ser alta e, de algum modo, surpreendente quando comparada com o nível de variabilidade intraespecífica das seqüências de *R. sanguineus* da Espanha, Portugal, França e Zimbábwe (0%), como observado no trabalho de Beati e Keirans (2001). Essas observações podem ser interpretadas como uma indicação que carrapatos de diferentes origens geográficas foram introduzidos em diferentes momentos nessas regiões, e que esses espécimes foram capazes de se adaptar aos diferentes ambientes.

De acordo com Beati e Keirans (2001), considerando o gene 12S, a divergência genética limítrofe para aceitação de variações no nível intraespecífico é de 7,8%, valores superiores indicam relações de caráter interespecífico. Nesse contexto, todos os isolados brasileiros comparados entre si apresentaram variações menores que 7,8%, podendo ser então, de acordo com Beati e Keirans (2001), considerados da mesma espécie. Como exemplo, a diferença entre *R. sanguineus* do Espírito Santo e Mato Grosso do Sul (6,6%) foi a maior entre os isolados brasileiros, e de forma comparativa é tão grande quanto a diferença entre isolados de *R. sanguineus* de países vizinhos como Egito e Israel (5,4%).

A comparação da diversidade genética entre *R. sanguineus* brasileiros (0 a 7%) e entre *R. sanguineus* de Ticino, Suíça (0 a 1,5%) (BERNASCONI et al., 2002), por Tamura-3-parâmetros e considerando o gene 12S DNAr, mostra que no Brasil não há uma homogeneidade genética tão evidente entre as diferentes localidades quanto aquela observada em Ticino. Essa maior variabilidade de certa forma já era esperada considerando-se a escala geográfica do Brasil e a grande diversidade de ecossistemas; no entanto, esses resultados se contrapõem ao que foi observado por Beati e Keirans (2001), ou seja, as populações dos quatro países estudados eram homogêneas. Uma possível explicação para o fato seria a origem comum das populações de *R. sanguineus* estudadas por Beati e Keirans (2001), já que os fragmentos de gene amplificados pelos autores possuem aproximadamente os mesmos comprimentos que os amplificados por nós e correspondem a uma porção com características semelhantes.

Quando analisadas em função do gene 16S RNAr, as amostras de *R. sanguineus* brasileiras não apresentam mais tão marcada distância como em relação ao gene 12S RNAr, possivelmente pelo menor tamanho dos fragmentos amplificados, alinhados e comparados do gene 16S RNAr, que corresponderam a apenas aproximadamente 28% do tamanho total do gene, enquanto os fragmentos do gene 12S RNAr corresponderam a aproximadamente 57% do tamanho total do gene. Também são escassos os depósitos ou publicações de seqüências 16S RNAr de populações de espécies do complexo *R. sanguineus*, não permitindo portanto maiores discussões.

Considerando isolados de *R. turanicus*, além dos isolados de *R. sanguineus* do Brasil, vale atentar para alguns pontos. Para *R. sanguineus* e *R. turanicus*, oriundos de Jerusalém (Israel), a divergência de 5,7% entre seqüências do gene 12S RNAr-mt observados por Black e Piesmam (1994) e Norris et al. (1999) são bem inferiores aos 14,1% observados entre *R. sanguineus* do Espírito Santo (Brasil) e *R. turanicus* de Jerusalém (Israel), por exemplo, o que ressalta a distância geográfica como possível fator determinante para essa diferença. Também é importante considerar que a diversidade genética entre *R. sanguineus* e *R. turanicus* de Ticino (BERNASCONI et al., 2002) é menor do que a diversidade observada entre os isolados de *R. sanguineus* de diferentes localidades do Brasil, o que é um contra-senso.

A alta porcentagem de similaridade (98,7%), para o gene 16S RNAr, observada entre *R. sanguineus* e *R. turanicus* da Espanha por Mangold et al. (1998a), não foi observada quando *R. sanguineus* brasileiros e asiáticos foram comparados com *R. turanicus* espanhol e israelense. No entanto, uma alta porcentagem de similaridade (97,7%) pode ser observada entre *R. turanicus* espanhol e *R. sanguineus* de Oklahoma (EUA).

Comparando com Black e Piesmam (1994) e Norris et al. (1999), que observaram 4,3% de divergência entre seqüências do gene 16S RNAr-mt de *R. sanguineus* e *R. turanicus* de Jerusalém (Israel), podemos observar um valor maior na porcentagem de divergência (9,8%) entre *R. sanguineus* do Rio de Janeiro (Brasil) e *R. turanicus* de Jerusalém (Israel), possivelmente em função da geografia.

Alta divergência intraespecífica de 12S DNAr-mt foi detectada entre isolados de *R. sanguineus* do Brasil e isolados da Argentina e Uruguai (GenBank). Por outro lado, uma forte relação genética foi detectada entre o isolado francês de *R. sanguineus* e os isolados argentino e uruguaio, enquanto os isolados brasileiros apareceram mais relacionados com *R. sanguineus* asiáticos e *R. turanicus* africano. Estes resultados corroboram com as observações relatadas por Szabó et al. (2005), quando trabalharam com isolados de São Paulo e Argentina, e as complementa. Essa relação genética entre as populações francesa, argentina e uruguaia pode indicar uma origem comum européia, segundo o autor.

Novamente considerando 7,8% como limítrofe para variações no nível intraespecífico, estabelecido por Beati e Keirans (2001), considerando o gene 12S, vale enfatizar que *R. turanicus* de Zâmbia e Zimbábue também apresentaram variações menores que 7,8% quando comparados com *R. sanguineus* brasileiros, indicando grande proximidade, inclusive compatível com variação intraespecífica. Por exemplo, a diferença entre a seqüência do Rio Grande do Norte a as seqüências africanas de *R. turanicus* há pouco citadas é de apenas 2,2%, fazendo-os parecerem ser de uma única espécie. Já níveis de variabilidade maior que 7,8% ocorreram, por exemplo, entre isolados do Brasil e de *R. turanicus* de Israel (U95916) e França; entre o isolado do Espírito Santo e *R. turanicus* da Turquia; entre o isolado do Espírito Santo e *R. turanicus* de Israel (AF150015, AF150014 e U95916 mais marcadamente com 14,1%); e entre isolados de Rondônia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Pará e *R. turanicus* de Israel (AF150013). Esses níveis também ocorreram entre isolados previamente identificados como sendo representantes de *R. sanguineus* e a diferença entre as seqüências (12S rDNA) do Espírito Santo e Israel foi de 15,9%, a maior observada entre todos os isolados deste estudo.

Vale ainda lembrar e comentar que Zahler et al. (1997) encontraram íntima relação genética entre *R. sanguineus* e *R. turanicus*, compatível com conspecificidade, e diferença de somente 3 mutações entre espécies bem distintas dentro do complexo *R. sanguineus*, indicando que apenas poucas mutações já podem representar barreira de espécies dentro do complexo *R. sanguineus*, genotipicamente. Se considerarmos esta afirmação, alguns de nossos isolados podem ser considerados de espécies diferentes. No entanto, Zahler et al. (1997) utilizaram um fragmento de gene diferente do que usamos, impossibilitando maior comparação entre seus dados e os nossos. Porém, o fragmento de gene por ele utilizado (ITS2) parece ser menos conservado que os que nós utilizamos (12S e 16S), devendo apresentar maior variabilidade entre isolados.

Segundo Beati e Keirans (2001), todas essas observações, e a já sabida complexidade para caracterização de espécies dentro do complexo *R. sanguineus*, sugerem que muitas espécies crípticas (incluindo *R. sanguineus*) podem possuir morfologia similar a de *R. turanicus* e vice-versa. Sendo assim, a extensão da variabilidade genética e morfológica dessas linhagens relativamente recentemente desenvolvidas merece ser melhor e mais estudada, de forma especial e bem cuidadosa na América do Sul, e complementada por estudos biológicos.

Como já abordado anteriormente, diferenças na colonização de países e regiões podem ter levado a introdução de carrapatos do complexo *R. sanguineus* de origens diferentes em cada um(a) deles(as). Por outro lado, condições climáticas e ambientais de cada país e/ou região podem ter favorecido a sobrevivência de carrapatos de diferentes origens geográficas. Por último, mas não menos importante, a América do Sul pode ser favorável para especiação com uma divergência sobre o tempo nas populações introduzidas com a colonização (SZABÓ et al., 2005).

Os fatos apresentados, junto com uma ampla divergência nas seqüências 12S DNAr indicam que alguns isolados, previamente identificados como *R. sanguineus* podem pertencer a *R. turanicus* ou vice-versa e essa confirmação se torna bastante difícil uma vez que, em geral, espécies de *Rhipicephalus* não apresentam grande quantidade de caracteres discriminatórios, principalmente essas duas em foco (BEATI e KEIRANS, 2001).

As diferenças entre *R. sanguineus* e *R. turanicus*, a princípio identificados como tal, de várias partes do mundo indicam que existe uma considerável confusão para uma definição precisa de ambas as espécies. Além do mais, simpatria de *R. sanguineus* e *R. turanicus* é provável ocorrer, como foi descrito no sul da Suíça por Bernasconi et al. (2002).

É possível que certa quantidade de carrapatos esteja sendo introduzida, circulando, se reproduzindo e se adaptando a viver em áreas onde antes não eram encontrados, como consequência da mobilidade aumentada tanto de pessoas quanto de seus animais de estimação, em particular cães, pelo mundo, e mudanças climáticas (BERNASCONI et al., 2002); podendo levar a essa confusão taxonômica e diversidade genética.

Por fim, as diferenças observadas entre os isolados de *R. sanguineus* do Brasil e isolados de *R. sanguineus* e *R. turanicus* de outros países são algumas vezes maiores e outras menores do que poderiam previamente ser assumidas e sustentam que o “status” biossistemático de *R. sanguineus*, especialmente na América Latina, e de *R. turanicus* deve ser visto com cautela e reavaliado de forma mais abrangente utilizando maior número de informações disponíveis, tanto morfológicas quanto biológicas e moleculares. Assim, necessitando que um maior número de amostras seja utilizado, maiores estudos de variabilidade intraespecífica deverão ser levados em consideração.

6 CONCLUSÕES

Em decorrência dos resultados obtidos podemos concluir:

Pela primeira vez foram geradas seqüências de fragmentos dos genes 12S e 16S DNAr-mt de *R. sanguineus* dos estados brasileiros do Espírito Santo (EU346676 e EU346683), Goiás (EU346681 e EU346688), Mato Grosso do Sul (EU346677 e EU346684), Pará (EU346679 e EU346686), Rio de Janeiro (EU346680 e EU346687), Rio Grande do Norte (EU346678 e EU346685) e Rondônia (EU346675 e EU346682).

As seqüências 12S e 16S DNAr-mt produziram resultados diferentes em relação a comparação entre os isolados, porém indicam que os representantes de *R. sanguineus* presentes nas diversas regiões do Brasil estudadas apresentam relação filogenética com as seqüências de *R. sanguineus* de Taiwan e Tailândia.

Há diversidade genética entre populações de *R. sanguineus* oriundas de diferentes regiões do Brasil.

Embora tenha havido confirmação de distanciamento genético entre *R. sanguineus* do Brasil e Argentina pelo 12S DNAr-mt, e relações contrastantes entre as diferentes populações brasileiras e algumas daquelas depositadas no Genbank, ainda não há subsídios suficientes para afirmar que *R. sanguineus* não é a única espécie do gênero presente no Brasil.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo, através do sequenciamento de fragmentos dos genes 12S e 16S DNAr-*mt* de *R. sanguineus* de diversas regiões do território nacional e do depósito dessas seqüências, enriqueceu o universo de informações moleculares de isolados brasileiros e irá contribuir para futuras pesquisas relacionadas a taxonomia, filogenia e estudos de populações dentro do gênero *Rhipicephalus*.

Também se deve evidenciar que a descrição genética facilita o diagnóstico objetivo de espécies, o que é especialmente benéfico para espécies do complexo *R. sanguineus*, onde similaridades morfológicas e variações fenotípicas dentro de espécies podem impedir ou mesmo excluir um diagnóstico de espécie acurado, um problema complicado em estágios pré-adultos.

Seja qual for o real posicionamento taxonômico de *R. sanguineus* no Brasil e, em maior escala, na América do Sul, diferentes populações podem estar associadas com diferenças no comportamento, biologia e capacidade vetorial do carrapato. A consciência e o conhecimento dessas diferenças são importantes, já que tal conhecimento pode ser necessário para o controle de carrapatos e de doenças por eles transmitidas, e é crucial para o entendimento da epidemiologia e etiologia dos patógenos causadores das doenças em diferentes localidades.

Por fim, mais estudos envolvendo dados morfológicos, biológicos e moleculares coletados de um amplo número de amostras de diferentes localidades geográficas são necessários para clarificar a sistemática de *R. sanguineus*, especialmente em comparação a *R. turanicus*, pois a biologia molecular sozinha, em função da especificidade de informação que gera, pode muitas vezes tornar certas questões ainda mais complexas e sem resposta clara.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 31, n. 4, p. 759-843, 1936.
- AVISE, J. C. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 313, p. 325-342, 1986.
- BARKER, S. C. Distinguishing species and populations of Rhipicephaline ticks with ITS 2 ribosomal RNA. *Journal of Parasitology*, v. 84, n. 5, p. 887-892, 1998.
- BARKER, S. C.; MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*, v. 129, n. 1, p. S15-S36, 2004.
- BEATI, L.; KEIRANS, J.E. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*, v. 87, n. 1, p. 32-48, 2001.
- BERNASCONI, M. V.; CASATI, S.; PÉTER, O.; PIFFARETTI, J. C.; *Rhipicephalus* ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino). *Infection, Genetics and Evolution*, v. 2, p. 111 – 120, 2002.
- BLACK, W. C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, p. 10034-10038, 1994.
- BLACK, W. C.; KLOMPEN, J. S. H.; KEIRANS, J. E. Phylogenetic relationships among tick subfamilies (Ixodida: Ixodidae: Argasidae) based on the 18S nuclear rDNA gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 7, p. 129-144, 1997.
- BLACK IV, W. C.; ROEHRDANZ, R. L. Mitochondrial Gene Order is Not Conserved in Arthropods: Prostriate and Metastriate Tick Mitochondrial Genomes. *Molecular Biology and Evolution*, v. 15, n. 12, p. 1772-1785, 1998.
- CAMPBELL, N. J. H.; BARKER, S. C. An unprecedented major rearrangement in an arthropod mitochondrial genome. *Molecular Biology and Evolution*, v. 15, p. 1786-1787, 1998.
- CAMPBELL, N. J. H.; BARKER, S. C. The novel mitochondrial gene arrangement of the cattle tick, *Boophilus microplus*: five fold tandem repetition of a coding region. *Molecular Biology and Evolution*, v. 16, p. 732-740, 1999.
- CRAMPTON, A.; MCKAY, Y.; BARKER, S. C. Phylogeny of ticks (Ixodida) inferred from nuclear ribosomal DNA. *International Journal for Parasitology*, v. 26, p. 511-517, 1996.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, v. 39, p. 783-791, 1985.
- GIL-COLLADO, J.; GUILLEN-LLERA, J. L.; ZAPATERO-RAMOS, L. M. Claves para la identificación de los Ixodoidea españoles. *Revista Ibérica de Parasitología*, v. 39, p. 107 – 118, 1979.
- HOOGSTRAAL, H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Advances in parasitology*, v. 24, p. 135-238, 1985.
- IOFFE-USPENSKY, I.; USPESKY, I.; MUMCUOGLU, K.Y.; GALUN, R.

Rhipicephalus sanguineus and *R. turanicus* (Acari: Ixodidae): Numerical indices for distinguishing between adults of closely related species in Israel. 5th International Conference on Ticks and Tick-Borne Pathogens. Neuchâtel, Switzerland, 29/08 – 02/09/2005.

IOFFE-USPENSKY, I.; MUMCUOGLU, K.Y.; USPESKY, I.; GALUN, R. *Rhipicephalus sanguineus* and *R. turanicus* (Acari: Ixodidae): Closely Related Species with Different Biological Characteristics. *Journal of Medical Entomology*, v. 34, n. 1, p. 74-81, 1997.

JIN, L.; NEI, M. Limitations of the Evolutionary Parsimony Method of Phylogenetic Analysis. *Molecular Biology and Evolution*, v. 7, n. 1, p. 82-102, 1990.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA: molecular evolutionary analysis, version 1.01. Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, 1993.

MANGOLD, A.J.; BARGUES, M.D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationship of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari:Ixodidae). *Parasitology Research*, v.84, p.478-484, 1998a.

MANGOLD, A.J.; BARGUES, M.D.; MAS-COMA, S. 18S rRNA gene sequences and phylogenetic relationships of European hard-tick species (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, v.84, p.31-37, 1998b.

McLAIN, D. K.; WESSON, D.; OLIVER, J. H.; COLLINS, F. Variation in ribosomal DNA internal transcribed spacer I among eastern populations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 32, p. 351–360, 1995.

MITANI, H.; TALBERT, A.; FUKUNAGA, M. New World Relapsing Fever *Borrelia* Found in *Ornithodoros porcinus* Ticks in Central Tanzania. *Microbiology and Immunology*, v. 48, n. 7, p. 501-505, 2004.

MURRELL, A. CAMPBELL, N. J. H. BARKER, S. C. Mitochondrial 12S rDNA Indicates That the Rhipicephalinae (Acari: Ixodida: Ixodidae) Is Paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.12, p.83-86, 1999.

MURRELL, A.; CAMPBELL, N. J. H.; BARKER, S. C. Phylogenetic Analyses of the Rhipicephaline Ticks Indicate That the Genus *Rhipicephalus* Is Paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2000.

MURRELL, A.; CAMPBELL, N. J. H.; BARKER, S. C. The value of idiosyncratic markers and changes to conserved tRNA sequences from the mitochondrial genome of hard ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) for phylogenetic inference. *Systematic Biology*, v. 52, p. 296–310, 2003.

NAVAJAS, M.; FENTON, B. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Experimental and Applied Acarology*, v. 24, p. 751–774, 2000.

NORRIS, D. E.; KLOMPEN, J. S. H.; BLACK W. C. Comparison of the mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA genes in resolving phylogenetic relationships among hard ticks (Acari : Ixodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, v. 92, n. 1, p. 117-129, 1999.

NORRIS, D. E.; KLOMPEN, J. S. H.; KEIRANS, J. E.; BLACK IV, W. C. Population Genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) Based on Mitochondrial 16S and 12S Genes.

Journal of Medical Entomology, v. 33, n. 1, p. 78-89, 1996.

OLIVEIRA, P.R.; BECHARA, G.H.; DENARDI, S.E.; SAITO, K.C.; NUNES, E.T.; SZABÓ, M.P.J.; MATHIAS, M.I.C. Comparison of external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. *Veterinary Parasitology*, v.129, p. 139-147, 2005.

OLIVER Jr, J. H. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 20, p. 397-430, 1989.

OLIVER Jr., J. H. Importance of systematics to public health : microbes, and disease. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 83, n. 1, p. 37-46, 1996.

PAPERNA, I.; GILADI, M. Morphological variability, host range and distribution of ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* complex in Israel. *Annales de Parasitologie* (Paris), v. 49, n. 3, p. 357-367, 1974.

PEGRAM, R. G. Biosystematic studies on the genus *Rhipicephalus*: the *R. sanguineus* and *R. simus* groups (Ixodoidea: Ixodidae). PhD Thesis, Brunel University, Uxbridge, England. 1984.

PEGRAM, R. G.; CLIFFORD, C. M.; WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari: Ixodoidea: Ixodidae). I. *R. sulcatus* Neumann, 1908 and *R. turanicus* Pomerantsev, 1936. *Systematic Parasitology*, v. 10, p. 3-26, 1987a.

PEGRAM, R. G.; KEIRANS, J. E.; CLIFFORD, C. M.; WALKER, J. B. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari: Ixodoidea: Ixodidae). II. *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. *Systematic Parasitology*, v. 10, p. 27-44, 1987b.

RAGEAU, J. Clés pour l'identification des tiques du Cameroun. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, v. 28, p. 5-6, 1953.

RIBEIRO, A.L.; FACCINI, J.L.H.; DAEMON, E. Estudo das variações morfológicas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae) no Brasil. *Revista Universidade Rural Série Ciências da Vida*, v.18, n.1-2, p. 25-33, 1996.

RICH, S. M.; CAPORALE, D. A.; TELFORD, S. R.; KOCHER, T. D.; HARTL, D. L.; SPIELMAN, A. Distribution of the *Ixodes ricinus*-like ticks of eastern North America. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 92, p. 6284-6288, 1995.

ROEHRDANZ, R. L.; DEGRUGILLIER, M. E.; BLACK, W. C. IV. Novel rearrangements of arthropod mitochondrial DNA detected with long-PCR: applications to arthropod phylogeny and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, v. 19, p. 841-849, 2002.

ROVEDA, R. J. Ixodoidea. Contribución biológica. *Revista de Medicina Veterinaria* (Buenos Aires), v. 36, p. 105-119, 1954.

RZHETSKY, A.; NEI, M. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 9, p. 945-967, 1992.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SHAO, R.; AOKI, Y.; MITANI, H.; TABUCHI, N.; BARKER, S. C.; FUKUNAGA, M. The mitochondrial genomes of soft ticks have an arrangement of genes that has remained unchanged for over 400 million years. *Insect Molecular Biology*, v. 13, n. 3, p. 219-224, 2004.

- SHAO, R.; BARKER, S. C.; MITANI, H.; AOKI, Y.; FUKUNAGA, M. Evolution of Duplicate Control Regions in the Mitochondrial Genomes of Metazoa: A Case Study with Australasian *Ixodes* Ticks. *Molecular Biology and Evolution*, v. 22, n. 3, p. 620-629, 2005.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 87, p. 651-701, 1994.
- SZABÓ, M.P.J.; MANGOLD, A.J.; JOÃO, C.F.; BECHARA, G.H.; GUGLIELMONE, A.A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Veterinary Parasitology*, v. 130, p. 131-140, 2005.
- TAGLE, I. Presencia accidental de *Rhipicephalus sanguineus* en un perro de Santiago de Chile. *Agricultura Técnica (Chile)*, v. 36, p. 137, 1976.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 10.1093/molbev/msm092, 2007.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 10, p. 512-526, 1993.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, n. 22, p. 4673-4680, 1994.
- WALKER, J.B.; KEIRANS, J.E.; HORAK, I.G. The genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae): A guide to the brown ticks of the world. Cambridge: Cambridge University Press, 643 pp, 2000.
- WALKER, A. R.; BOUATTOR, A.; CAMICAS, J.-L.; ESTRADA-PENÃ, A.; HORAK, I. G.; LATIF, A. A.; PEGRAM, R. G.; PRESTON, P. M. Ticks of Domestic Animals in África. *A Guide to Identification of Species*. The University of Edinburgh, Bioscience Reports, 221 pp, 2003.
- WESSON, D. M.; McLAIN, D. K.; OLIVER, J. H.; PIESMAN, J. Investigation of the validity of species status of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) using rDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, p. 10221-10225, 1993.
- ZÄHLER, M.; FILIPPOVA, N. A.; MOREL, P. C.; GOTHE, R.; RINDER, H. Relationships between species of the *Rhipicephalus sanguineus* group: a molecular approach. *Journal of Parasitology*, v. 83, n. 2, p. 302-306, 1997.
- ZÄHLER, M.; GOTHE, R.; RINDER, H. Genetic evidence against a morphologically suggestive conspecificity of *Dermacentor reticulatus* and *D. marginatus* (Acari: Ixodidae). *International Journal for Parasitology*, v. 25, p. 1413-1419, 1995.

ANEXO

Árvores Baseadas em Análise de Máxima Parsimônia (MP)

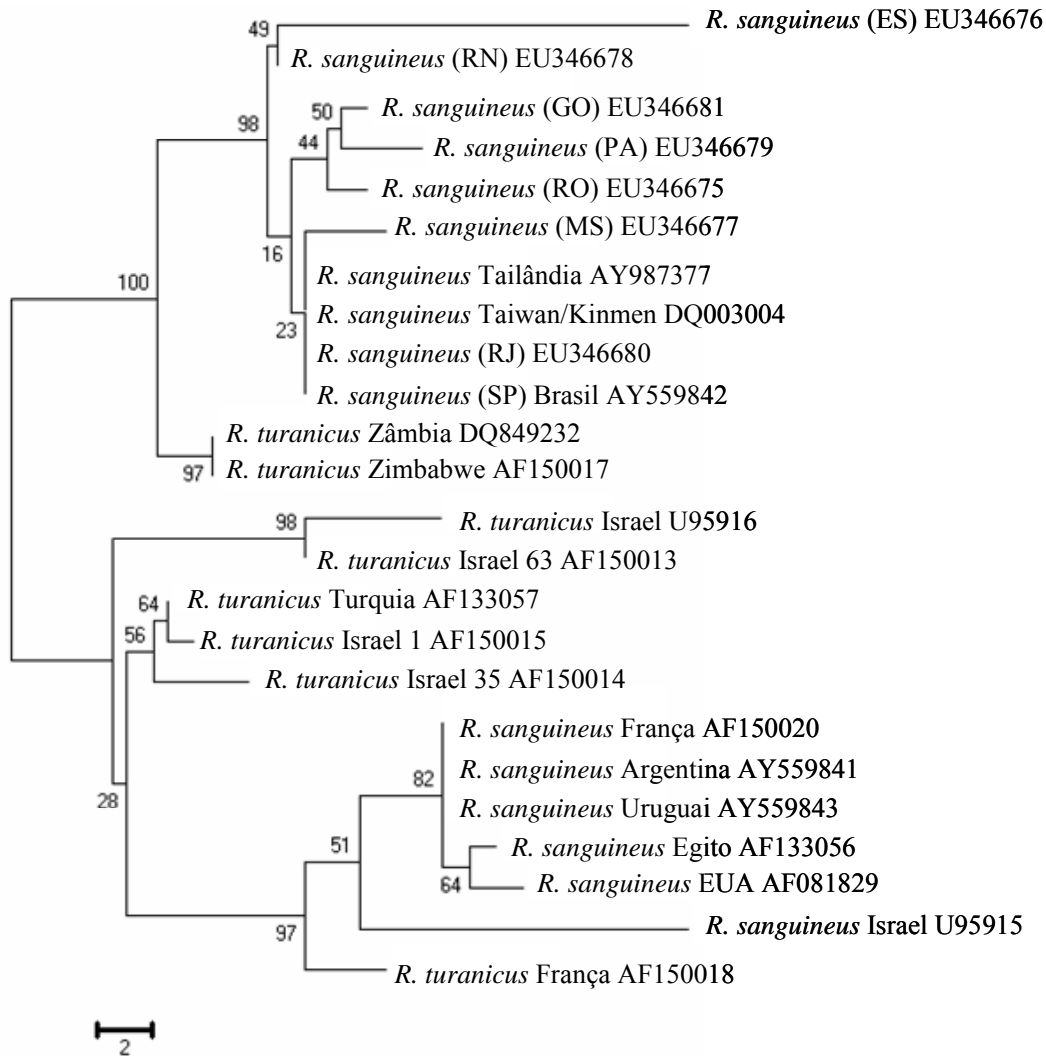


Figura 8: Árvore baseada em análise de máxima parsimônia (sem raiz), do gene 12S rRNA. Os números representam a percentagem de 1000 réplicas “bootstrap”.

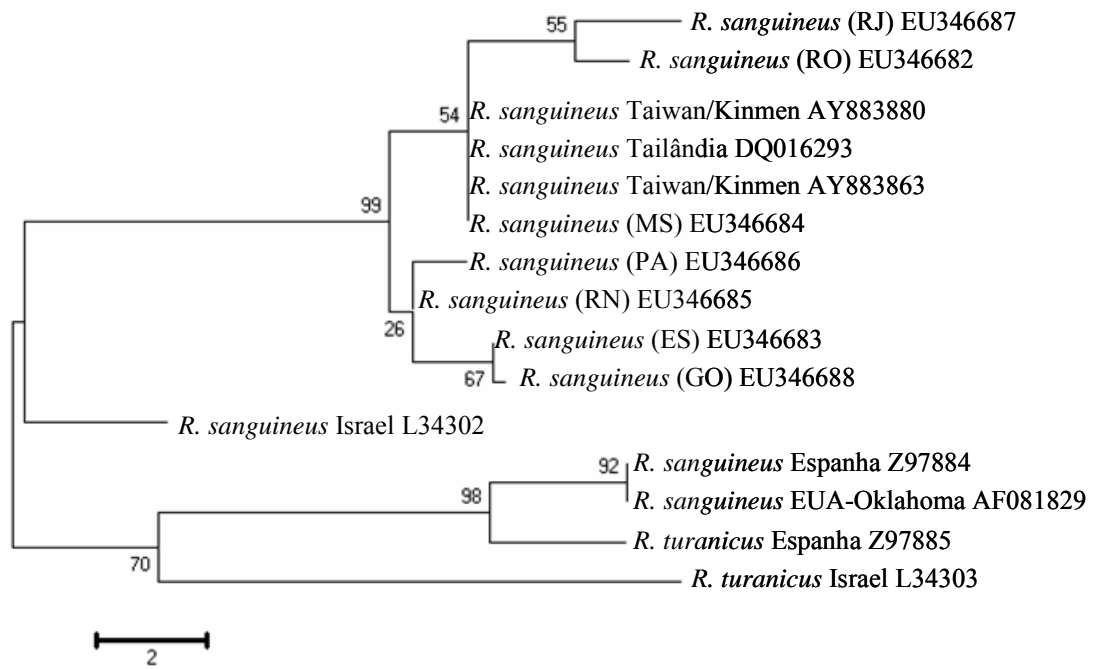


Figura 9: Árvore baseada em análise de máxima parsimônia (sem raiz), do gene 16S RNAr. Os números representam a percentagem de 1000 réplicas “bootstrap”.