

PAULO HENRIQUE COSTA DE LIMA

**GENOMA MITOCONDRIAL NO ESTUDO FILOGENÉTICO DE
CARRAPATOS PERTENCENTES ÀS FAMÍLIAS
IXODIDAE E ARGASIDAE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

L732g
2016

Lima, Paulo Henrique Costa de, 1969-

Genoma mitocondrial no estudo filogenético de carrapatos
pertencentes às famílias Ixodidae e Argasidae / Paulo Henrique
Costa de Lima. – Viçosa, MG, 2016.

xv, 152f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Cláudio Lisias Mafra de Siqueira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Amblyomma cajennense* - Filogenia. 2. *Amblyomma
sculptum* - Filogenia. 3. Carrapato. 4. Genoma. 5. *Nothoaspis
amazoniensis*. 6. Relação hospedeiro-parasito. 7. Carrapato como
transmissor de doenças. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
pós graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22 ed. 595.42

PAULO HENRIQUE COSTA DE LIMA

**GENOMA MITOCONDRIAL NO ESTUDO FILOGENÉTICO DE
CARRAPATOS PERTENCENTES ÀS FAMÍLIAS
IXODIDAE E ARGASIDAE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de outubro de 2016.

Leandro Licursi de Oliveira

Itabajara da Silva Vaz Júnior

Jorge Abdala Dergam dos Santo
(Coorientador)

Otávio José Bernades Brustolini

Cláudio Lísias Mafra de Siqueira
(Orientador)

Dedico este trabalho:

Em primeiro lugar a Deus e a seu filho Jesus Cristo, que me concederam a saúde, o equilíbrio e a energia necessária para seguir em frente. Hoje e sempre.

Aos meus pais Pedro Ângelo e Dorinha pelos bons exemplos de vida transmitidos, pelo carinho, amizade, incentivo e apoio à minha caminhada profissional.

Aos meus queridos tios José Marculino e Francisca (tia Bibi) pela amizade, força e pelo imenso carinho de sempre.

À Paulinha minha jóia rara. Obrigado por ser minha filha e deixar minha vida mais iluminada.

À minha querida esposa Mônica Terra pela força, paciência e companheirismo durante este período de dedicação ao doutorado.

Aos meus irmãos Nonato e Ângelo pela grande irmandade verdadeira dedicada a mim, desde o meu primeiro dia de vida.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À minha família, que é a razão da minha persistência (pai, mãe, esposa, filhos, irmãos, sobrinhos, cunhados, tios e primos). A TODOS!!!!

Ao meu orientador, Professor Cláudio Lísias Mafra de Siqueira, pela confiança em mim depositada, por suas valiosas contribuições e palavras de incentivo. Muito obrigado professor.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelas oportunidades oferecidas.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada e a seus professores, em especial aqueles que me concederam a honra de ser seu aluno.

Ao Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular (LAPEM-UFV), sob a supervisão do Prof. Cláudio Mafra, pela oportudinada concedida de pesquisa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de doutorado e à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento do projeto.

Ao Prof. Jorge Dergam pela coorientação e pela grande cordialidade com que sempre me atendeu.

Ao Prof. Raphael Klein pela coorientação, pelos valiosos ensinamentos de biologia molecular e amizade.

Aos professores Luciano Fietto e Maximiller Dal-Bianco por terem participado, na banca de qualificação, com sugestões muito expressivas ao nosso trabalho, principalmente pela visão de pesquisadores.

Aos meus grandes amigos do LAPEM: Higo Nasser, Rafael Barcelos (o grande e famoso Bui), Carlos Emmanuel, Cynthia Montovani (a pequena grande

Cynthia), Gabriel, Fernanda Sales, Edvaldo Barros, Adriano Soares, Carlão Csermak, Igor Strelow, Paola Mara, Sarah, Raquel, Maria, Juliana e Natasha.

Ao Núcleo de Análises de Biomoléculas da UFV (NuBioMol) pela cessão e orientações quanto à utilização de equipamentos, e também a todos seus técnicos, em especial ao bioinformata Pedro Vidigal pela cordialidade, profissionalismo e direcionamento desta pesquisa no segmento da bioinformática.

Ao Professor Matias Plabo Juan Szabó e à doutoranda Maria Marlene Martins do Laboratório de Ixodologia, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, pela doação dos espécimes de *Amblyomma sculptum* utilizados nesta pesquisa.

Aos pesquisadores Nava S., Venzal J.M, Terassini F.A., Mangold A.J., Camargo L.M.A e Labruna M.B pela doação do espécime *Nothoaspis amazoniensis* utilizado neste pesquisa.

Ao Pós-doutorando Ramon de Freitas pelos ensinamentos referente a construção das bibliotecas genômicas.

Aos colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, Eduardo e Marco, sempre muito prestativos e competentes.

Aos colaboradores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular Nathalie, Túlio, Carol Canal, Priscila, Jean e Carlão.

A todos os amigos que fiz durante esta caminhada, em especial aos amigos Marcos Vidal, Davilson Bragine e Carlos Mário.

Ao meu orientador no mestrado, Prof. Luiz Augusto Cordeiro (UFERSA), a minha eterna gratidão por tudo que me ensinou durante o mestrado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho, e que não citei o nome, mas que devo gratidão.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.2. OBJETIVOS	2
1.2.1. Objetivo geral.....	2
1.2.2. Objetivos específicos.....	2
1.3. HIPÓTESE.....	3
1.4. JUSTIFICATIVA	3
1.5. CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.5.1. O carrapato - sua diversidade biológica	5
1.5.2. Estado da arte da filogenia molecular e o uso de marcadores moleculares na acarologia	14
1.5.2.1. Tecnologia de sequenciamento de nova geração como suporte a inferência filogenética e a filogenômica	14
1.5.2.2. O cenário dos marcadores moleculares na acarologia	17
1.5.2.2.1. DNA mitocondrial (mtDNA)	18
1.5.2.2.2. DNA ribossomal nuclear (rDNA)	20
1.5.3. Mecanismos que auxiliam a inferência filogenética	23
1.5.4. Referencial Bibliográfico	27
2. CAPÍTULO 2.....	40
ARTIGO ORIGINAL 1 - Caracterização organizacional e análise comparativa do mitogenoma do carrapato <i>Amblyomma sculptum</i>	40
2.1. INTRODUÇÃO	42
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.2.1. Busca das sequências em banco de dados	43

2.2.2. Extração e purificação do DNA mitocondrial de <i>Amblyomma sculptum</i>	44
2.2.3. Quantificação da amostra de DNA mitocondrial de <i>Amblyomma sculptum</i>	44
2.2.4. Preparo e normalização da amostra por PCR em tempo real.....	44
2.2.5. Clusterização da biblioteca - Genoma mitocondrial de <i>Amblyomma sculptum</i> ..	45
2.2.6. Sequenciamento de nova geração – Genoma mitocondrial de <i>Amblyomma sculptum</i>	45
2.2.7. Montagem e anotação funcional do genoma mitocondrial de <i>Amblyomma sculptum</i>	46
2.2.8. Genômica comparativa entre as sequências do gênero <i>Amblyomma</i>	47
2.2.9. Análise dos polimorfismos entre as sequências do gênero <i>Amblyomma</i>	47
2.3. RESULTADOS	48
2.3.1. Caracterização organizacional do mitogenoma de <i>Amblyomma sculptum</i>	48
2.3.2. Genômica comparativa entre os mitogenomas completos do gênero <i>Amblyomma</i>	52
2.3.3. Análise dos polimorfismos entre as sequências do gênero <i>Amblyomma</i>	55
2.4. DISCUSSÃO	60
2.5. CONCLUSÃO	63
2.6. REFERENCIAL BILIOGRÁFICO	64
3. CAPÍTULO 3.....	69
3.1. PARTE I.....	69
ARTIGO ORIGINAL 2 - Mitogenoma completo de <i>Nothoaspis amazoniensis</i> : caracterização organizacional, análise comparativa e filogenética integrada a outros membros da família Argasidae.	69
3.1.1. INTRODUÇÃO.....	71
3.1.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	73
3.1.2.1. Busca das sequências em banco de dados	73
3.1.2.2. Local de coleta do argasídeo <i>Nothoaspis amazoniensis</i>	74
3.1.2.3. Extração, purificação e quantificação do DNA total de <i>Nothoaspis amazoniensis</i>	75

3.1.2.4. Preparo e normalização da amostra por PCR em tempo real.....	75
3.1.2.5. Clusterização das amostras - Biblioteca genômica de <i>Nothoaspis amazoniensis</i>	75
3.1.2.6. Sequenciamento de nova geração - Biblioteca genômica de <i>Nothoaspis amazoniensis</i>	76
3.1.2.7. Montagem e anotação funcional do genoma mitocondrial de <i>Nothoaspis amazoniensis</i>	76
3.1.2.8. Genômica comparativa entre as sequências de carrapatos da família Argasidae	77
3.1.2.9. Análise filogenética	77
3.1.3. RESULTADOS	78
3.1.3.1. Caracterização organizacional do mitogenoma de <i>Nothoaspis amazoniensis</i>	78
3.1.3.2. Genômica comparativa entre os mitogenomas de argasídeos	82
3.1.3.3. Análise filogenética	86
3.1.4. DISCUSSÃO	88
3.1.5. CONCLUSÃO	93
3.1.6. REFERENCIAL BILIOGRÁFICO	94
3. CAPÍTULO 3.....	100
3.2. PARTE II	100
ARTIGO ORIGINAL 3 - Relação evolutiva entre o <i>Nothoaspis amazoniensis</i> (Acari, Ixodida, Argasidae), o hospedeiro chiroptera <i>Pteronotus</i> sp. e seu hábitat.	100
3.2.1. INTRODUÇÃO.....	102
3.2.2. MATERIAL E MÉTODOS	104
3.2.2.1. Local de coleta do argasídeo <i>Nothoaspis amazoniensis</i>	104
3.2.2.2. Extração, purificação e quantificação do DNA total	105
3.2.2.3. Preparo e normalização da amostra por PCR em tempo real.....	105
3.2.2.4. Clusterização das amostras - Biblioteca genômica para <i>N. amazoniensis</i>	105
3.2.2.5. Sequenciamento de nova geração - Biblioteca genômica para <i>N. amazoniensis</i>	106

3.2.2.6. Identificação do genoma mitocondrial do espécime pertencente à ordem Chiroptera.....	106
3.2.2.7. Montagem e anotação funcional do genoma mitocondrial de espécime pertencente à ordem Chiroptera.....	107
3.2.2.8. Análise filogenética.....	108
3.2.3. RESULTADOS.....	110
3.2.3.1. Caracterização organizacional do mitogenoma do espécime pertencente à ordem Chiroptera.....	110
3.2.3.2. Análise filogenética do mitogenoma de <i>Pteronotus</i> sp. PV-RO-BRA.....	114
3.2.4. DISCUSSÃO.....	116
3.2.5. CONCLUSÃO.....	121
3.2.6. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	122
4. CONCLUSÃO GERAL.....	128
5. ANEXOS.....	129
5.1. ANEXOS – CAPÍTULO 2.....	129
5.2. ANEXOS – CAPÍTULO 3 – PARTE I.....	139
5.3. ANEXOS – CAPÍTULO 3 – PARTE II.....	146

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação das famílias de carrapatos segundo Hoogstraal (1985).....	6
Figura 2: Diagrama esquemático de uma unidade de repetição em tandem do DNA ribossomal nuclear (rDNA).	21
Figura 3: Organização do genoma mitocondrial de <i>Amblyomma sculptum</i>	49
Figura 4: Alinhamento comparativo e organizacional dos genomas mitocondriais completos de carrapatos do gênero <i>Amblyomma</i>	54
Figura 5: Organização do genoma mitocondrial de <i>N. amazoniensis</i>	80
Figura 6: Alinhamento comparativo e organizacional dos genomas mitocondriais completos de carrapatos da família Argasidae.	85
Figura 7: Árvore filogenética constituída por genomas mitocondriais completos de carrapatos das famílias Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae.	87
Figura 8: Organização do genoma mitocondrial de <i>Pteronotus</i> sp. PV-RO-BRA.	111
Figura 9: Árvore filogenética constituída por genomas mitocondriais completos de representantes da ordem Chiroptera.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gêneros dos grupos Prostriata e Metastriata pertencentes à família Ixodidae.	7
Tabela 2: Espécies pertencentes à família Argasidae estabelecidas na fauna brasileira.	8
Tabela 3: Marcador molecular ou região do gene aplicável a cada nível taxonômico..	23
Tabela 4: Ordenamento de genes, posição do gene, espaços intergênicos, sobreposição gênica e sentido da transcrição na fita de DNA no genoma mitocondrial de <i>Amblyomma sculptum</i>	50
Tabela 5: Matrizes de distância e identidade do mitogenoma completo do gênero <i>Amblyomma</i>	53
Tabela 6: Alterações baseadas em polimorfismo de sequências mitocondriais e perfil de aminoácidos nas sequências de proteínas do complexo da cadeia respiratória em algumas espécies do gênero <i>Amblyomma</i>	56
Tabela 7: Perfil polimórfico para o gene ND5 entre as sequências mitogênicas do <i>A. sculptum</i> e <i>A. cajennense</i>	59
Tabela 8: Genomas mitocôndrias de carrapatos argasídeos disponibilizados no Genbank e utilizados neste estudo.	74
Tabela 9: Ordenamento de genes, posição do gene, espaços intergênicos, sobreposição gênica e sentido da transcrição na fita de DNA no genoma de <i>N. amazoniensis</i>	81
Tabela 10: Matrizes de distância e identidade entre os mitogenomas de carrapatos pertencentes à família Argasidae.	83
Tabela 11: Genomas mitocondriais completos de representantes	109
Tabela 12: Ordenamento de genes, posição do gene, espaços intergênicos, sobreposição gênica e sentido da transcrição na fita de DNA no mitogenoma de <i>Pteronotus</i> sp. PV-RO-BRA.	112

RESUMO

LIMA, Paulo Henrique Costa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2016. **Genoma mitocondrial no estudo filogenético de carrapatos pertencentes às famílias Ixodidae e Argasidae.** Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Coorientadores: Jorge Abdala Dergam dos Santos e Raphael Contelli Klein.

Dentro da família Ixodidae, relatos recentes descreveram que o cruzamento de carrapatos de populações do táxon *Amblyomma cajennense* provenientes de diferentes regiões geográficas, apresentavam desempenho reprodutivo com taxa de fertilidade reduzida, podendo este táxon englobar um complexo de espécies diferentes, com subtipos determinados pela distribuição biogeográfica. Por estudos morfológicos, filogenéticos e de biogeografia, concluiu-se que este carrapato deveria ser diferenciado em seis clados definidos por regiões geográficas, todos pertencentes ao Complexo *A. cajennense*. Considerando este contexto, buscou-se neste estudo ampliar a base de conhecimentos acerca do genoma mitocondrial completo do carrapato *Amblyomma sculptum*, e diferenciá-lo do *Amblyomma cajennense*, ambos subtipos e pertencentes ao Complexo *A. cajennense*. Dentre os achados, destacam-se o gene ND5 e as regiões controle 1 e 2 com características que os credenciam a atuarem como marcadores moleculares evolutivos para a diferenciação destes dois subtipos de carrapatos. Análises comparativas futuras fazem-se necessárias com sequências mitogenômicas dos demais membros do Complexo *A. cajennense*. Na família Argasidae existem indivíduos que são morfológicamente de difícil identificação. Esta dificuldade ocorre tanto com espécimes adultos, quanto em estádios imaturos, constituindo assim, um importante obstáculo para o estabelecimento de arranjos taxonômicos mais precisos para esta família de carrapatos, sendo um ponto negativo para estudos filogenéticos e epidemiológicos. Desta forma, para o estudo referente à família Argasidae, realizou-se análises comparativa e filogenética do mitogenoma de *Nothoaspis amazoniensis* para com outros membros desta família, com o objetivo de promover uma melhor compreensão das inter-relações evolutivas entre os carrapatos argasídeos. Como conclusão,

evidenciou-se que a abordagem filogenômica posicionou o mitogenoma de *N. amazoniensis* em um clado monofilético característico do arranjo taxonômico Cladista, englobado por representantes das regiões Afrotropical e Neotropical, com parasitismo específico em morcegos, o que pode ser um indicativo de um processo evolutivo de coevolução entre vetor e seu hospedeiro. Paralelamente, também se investigou para o *N. amazoniensis*, a interação parasita-hospedeiro baseando-se na presença de material genético proveniente da ação hematófaga realizado por este argasídeo em seus hospedeiros. O mitogenoma completo referente ao hospedeiro de *N. amazoniensis* foi sequenciado, montado e anotado, caracterizando-o como oriundo de animal membro da ordem Chiroptera. Por análise filogenética comparando esta sequência contra outras de representantes da Ordem Chiroptera, depositadas em bancos de dados biológicos, obteve-se a identificação desta em nível de gênero, denominando-a como *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA. Considerando os dados referentes à coleta do argasídeo *N. amazoniensis*, e aos resultados apresentados para este morcego, neste estudo, conclui-se que o *N. amazoniensis* apresenta uma dependência evolutiva, não somente ao seu provável hospedeiro do gênero *Pteronotus*, mas de uma forma geral, ao conjunto de condições específicas ecológicas bióticas e abióticas encontradas em seu ecossistema. No atual estudo, a abordagem filogenômica e o estabelecimento de genomas mitocondriais completos, como estratégias moleculares, foram de fundamental importância na inferência filogenética de carrapatos pertencentes às famílias Ixodidae e Argasidae, como também, no estudo sobre a associação evolutiva entre o *N. amazoniensis*, seu hospedeiro e o ecossistema habitado.

ABSTRACT

LIMA, Paulo Henrique Costa de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2016. **Mitochondrial genome in the phylogenetic study of ticks belonging to the Ixodidae and Argasidae families.** Adviser: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Co-advisers: Jorge Abdala Dergam dos Santos and Raphael Contelli Klein.

Within the Ixodidae family, recent reports have described that the crossing of populations of ticks *Amblyomma cajennense* taxon from different geographical regions, had reproductive performance with reduced fertility rate, which taxon may comprise a complex of different species, with subtypes determined by biogeographical distribution. Per morphologic, phylogenetic and biogeography studies have concluded that this tick should be differentiated into six clades defined by geographic regions, all belonging to the compound *A. cajennense*. In this context, this study targeted to expand the knowledge base about the complete mitochondrial genome of the tick *Amblyomma sculptum*, and differentiate it from *Amblyomma cajennense*, both subtypes and belonging to Complex *A. cajennense*. Among the findings, we can highlight the ND5 gene and control regions 1 and 2 which characteristics qualify them to act as evolutionary molecular markers for differentiation of these two subtypes of ticks. In the future is necessary more comparative analyzes with mitogenomics sequences of other members of the complex *A. cajennense*. In Argasidae family there are individuals who are morphologically difficult to identify. This difficulty occur in both, adult specimens and immature stages, then creating a major obstacle to the establishment of more precise taxonomic arrangements for this family of ticks, with a negative point for phylogenetic and epidemiological studies. Therefore, in the study relating to Argasidae family, it was carried comparative and phylogenetic analyzes of mitogenome of *Nothoaspis amazoniensis* to other members of this family, targeting a better understanding of the evolutionary interrelationships between ticks argasids. In conclusion, it was shown that the phylogenomic approach placed the mitogenome *N. amazoniensis* in a monophyletic clade typical of a taxonomic arrangement

Cladist comprised by representatives of Afrotropical and Neotropical regions, with specific parasitism in bats, which may indicate an evolutionary process of coevolution between vector and its host. At the same time, it was also investigated for *N. amazoniensis*, the parasite-host interaction taking in account the presence of genetic material from hematophagous action performed by this argasid in their hosts. The complete mitogenome referring to the host of *N. amazoniensis* was sequenced, assembled and annotated, characterizing it as originated from an animal member of the order Chiroptera. Through phylogenetic analysis, comparing this sequence against other sequences of representatives of Chiroptera order, placed in biological databases, it was obtained an identification of this sequence in the genus level, terming it as *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA. Considering the data regarding the collection of argasid *N. amazoniensis*, and the results presented for this bat in this study it was concluded that *N. amazoniensis* presents an evolutionary dependence, not only to the probable host *Pteronotus* gender, but in general, to the set of ecological specific conditions, biotic and abiotic, found in its ecosystem. In the current study, the phylogenomic approach and the establishment of complete mitochondrial genomes, as molecular strategies, have been of fundamental importance in the phylogenetic inference of ticks belonging to the Ixodidae and Argasidae families, as well as in the study of the evolutionary association between *N. amazoniensis*, its host and the ecosystem inhabited.

1. INTRODUÇÃO

O agrupamento de relação que engloba a participação de um parasita, o seu hospedeiro e o ecossistema em que participam, congrega uma análise de integração de múltiplas variáveis e fatores, representando uma visão sistêmica e não somente uma análise compartimentada e única, para definição desta inter-relação. Neste contexto, podemos vislumbrar a filogenia molecular como sendo uma abordagem relevante que integra e contribui para uma análise sistêmica mais aprimorada e precisa, favorecendo um melhor entendimento das inter-relações entre parasitas, hospedeiros e seus ecossistemas.

Este estudo propõe, através da integração da filogenia molecular e filogenômica, juntamente com a utilização das ferramentas moleculares ligadas à tecnologia de sequenciamento de nova geração e a procedimentos de bioinformática, em contribuir com a formatação de sequências genômicas mitocondriais completas dos carrapatos *Amblyomma sculptum* e *Nothoaspis amazoniensis*. Com o fornecimento e depósito destes genomas em bancos de dados biológicos de acesso livre, este estudo também teve a intenção de proporcionar um melhor entendimento sobre a inferência da história, taxonomia e relações evolutivas destes ácaros.

De uma forma mais ampla, propomos contribuir não apenas com as identificações taxonômicas mais precisas de espécimes de carrapatos representantes das famílias Ixodidae e Argasidae, mas também favorecer investigações epidemiológicas quanto ao estudo de populações e sub-populações, e suas relações com hospedeiros vertebrados domésticos e silvestres, e agentes simbiotes que possam albergar, em especial aqueles com potencial patogênico ao homem e/ou aos animais. Assim, contribuir com futuros estudos, tanto com a finalidade de identificação e contabilização de doenças veiculadas por carrapatos, quanto para a correta determinação de prováveis áreas endêmicas afetadas por agentes infecciosos veiculados por estes organismos, facilitando as intervenções ligadas à saúde pública e à silvestre

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo geral

Utilizar as sequências mitocondriais completas de *Amblyomma sculptum* e *Nothoaspis amazoniensis*, estruturadas neste estudo, em análises comparativa e filogenética com outros membros das famílias de carrapatos Ixodidae e Argasidae, com finalidade de um melhor entendimento sobre o contexto taxonômico e relações evolutivas destes ácaros.

1.2.2. Objetivos específicos

- ✓ Sequenciar, montar e realizar a anotação completa do genoma mitocondrial do carrapato pertencente à família Ixodidae, *Amblyomma sculptum*, um subtipo do Complexo *A. cajennense*;
- ✓ Realizar a análise comparativa, entre o mitogenoma de *Amblyomma sculptum* e outros relacionados às espécies de referência do gênero *Amblyomma*, com a finalidade de uma melhor identificação e diferenciação deste em relação a outros membros do Complexo *A. cajennense*;
- ✓ Sequenciar, montar e realizar a anotação completa do genoma mitocondrial do carrapato pertencente à família Argasidae, *Nothoaspis amazoniensis*;
- ✓ Utilizar o mitogenoma de *Nothoaspis amazoniensis* para a realização de análises comparativa e filogenética com outros membros da família Argasidae;
- ✓ Investigar a interação parasita-hospedeiro baseada na presença de material genético proveniente da alimentação realizada pela ação hematófaga do carrapato *Nothoaspis amazoniensis* em seus hospedeiros;
- ✓ Identificar os prováveis hospedeiros ao nível de ordem, família e gênero, com o propósito de verificar associação evolutiva entre o

Nothoaspis amazoniensis, seus hospedeiros e o ecossistema habitado.

1.3. HIPÓTESE

Genomas mitocondriais completos podem fornecer um maior grau de conhecimento quanto à dinâmica gênica e evolutiva em carrapatos ixodídeos e argasídeos, aumentando a precisão das análises e estudos referentes às relações filogenéticas entre os membros destas famílias, possibilitando melhores arranjos taxonômicos, ao nível de gênero e espécie, e sua diferenciação taxonômica.

1.4. JUSTIFICATIVA

Na biologia, a correta identificação e classificação taxonômica dos grupos de organismos são essenciais para o melhor entendimento das relações evolutivas e filogenéticas destes, com a taxonomia dos carrapatos tornando-se de grande relevância nos tempos atuais, visto toda a sua diversidade e importância para a saúde pública, a saúde de animais domésticos, de produção e silvestres.

A carência de estudos que visam um melhor entendimento da estrutura populacional, tanto na escala micro como macrogeográfica, e da resolução das relações sistemáticas filogenéticas em nível molecular, e a dificuldade, ou mesmo impossibilidade, a identificação entre indivíduos de diferentes gêneros e espécies das famílias Ixodidae e Argasidae, têm sido fatores limitantes para a caracterização e classificação objetiva de espécimes de carrapatos pertencentes a estas famílias. Estas condições limitantes interferem diretamente na compreensão das relações de estabelecimento dos nichos ecológicos, da escolha dos hospedeiros, da eficiência vetorial, da resistência por bases acaricidas, da interação destes ácaros a organismos simbiotes ou patógenos, do efeito epidemiológico e da concepção de novas estratégias de controle destes parasitas.

Para as famílias Ixodidae e Argasidae tem-se a identificação de espécimes auxiliada por chaves especializadas via características morfológicas

externas dos diferentes gêneros e espécies de carrapatos, em seus diversos instares. Especialmente para espécimes da Família Argasidae, esta identificação consiste em uma tarefa complexa e difícil, visto dentre outras questões, a ausência de dimorfismo sexual e de caracteres morfológicos úteis, e também a ausência de chaves taxonômicas atualizadas para a identificação de instares imaturos.

Assim, esta proposta justifica-se pela necessidade da geração de informações precisas que promovam o desenvolvimento de novas ferramentas que visem à identificação dos gêneros em diferentes instares, além de possibilitar a busca de marcadores moleculares adequados conservados para identificação taxonômica de representantes das famílias Ixodidae e Argasidae. Desta maneira, o estabelecimento prévio de uma estratégia molecular para conhecimento do mitogenoma destas famílias é de extrema necessidade devido à ausência de informações sobre a morfologia, biologia, ecologia e a importância que apresentam estas famílias, no que diz respeito à saúde pública, a saúde silvestre e o efeito da interação destas. Sem dúvida, a formalização e o direcionamento prévio de uma estratégia molecular, buscando um melhor entendimento da sistemática destas famílias de carrapatos, contribuirão de forma positiva na prevenção e no controle de epidemias provocadas por agentes infecciosos veiculados por membros destas famílias.

1.5. CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.5.1. O carrapato - sua diversidade biológica

De distribuição mundial, os carrapatos conseguiram colonizar praticamente todos biótopos terrestres (Sonenshine, 1991). Como artrópodes pertencentes à Classe Arachnida, Sub Classe Acari, Sub-ordem Ixodida (Aquino et al., 2007), estes ácaros possuem atualmente mais de 900 espécies descritas (Barker & Murell, 2004; Guglielmone et al., 2010; Burger et al., 2014), sendo agrupadas em três famílias: (i) Ixodidae, a família mais numerosa, possuindo entre 702 a 713 espécies (Barker & Murell, 2004; Guglielmone et al., 2010); (ii) Argasidae, família com aproximadamente 200 espécies (Estrada-Peña et al., 2010; Nava et al., 2010; Dantas-Torres et al., 2012; Barros-Battesti et al., 2013); e a (iii) Nuttalliellidae, família considerada monotípica, representada por uma única espécie presente no continente africano, a *Nuttalliella namaqua*, a qual apresenta características intermediárias dos representantes das famílias Ixodidae e Argasidae (Nava et al., 2009; Guglielmone et al., 2010).

A sub-ordem Ixodida está presente na região Neotropical (ilhas Caribenhas, sul do México e Américas Central e do Sul), contando com aproximadamente 203 espécies, sendo 116 representantes da família Ixodidae (Venzal et al., 2013) e 87 pertencentes a família Argasidae (Dantas-Torres et al., 2012; Venzal et al., 2013; Barros-Battesti et al., 2013). Até o presente momento, foram identificadas na fauna brasileira 65 espécies de carrapatos, sendo 44 espécies pertencentes à família Ixodidae e 21 à família Argasidae (Nava et al., 2010; Dantas-Torres et al., 2009, 2012; Barros-Battesti et al., 2013).

A família Ixodidae é a mais relevante em termos de importância médica e veterinária, sendo subdividida em dois grupos, Prostriata e Metastriata (Barker & Murrell, 2004). Na primeira lista taxonômica idealizada para esta família, Hoogstraal & Aeschlimann (1982) caracterizaram o grupo Prostriata pela subfamília Ixodinae, com o gênero *Ixodes* como único representante

desta. O agrupamento *Metastrinata* engloba as seguintes subfamílias, com seus respectivos gêneros: (i) *Amblyomminae* (*Aponomma* e *Amblyomma*); (ii) *Haemaphysalinae* (*Haemaphysalis*); (iii) *Hyalomminae* (*Hyalomma*); e (iv) *Rhipicephalinae* (*Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Rhipicentor*, *Anomalohimalaya*, *Nosomma*, *Rhipicephalus*, *Boophilus* e *Margaropus*) (Figura 1).

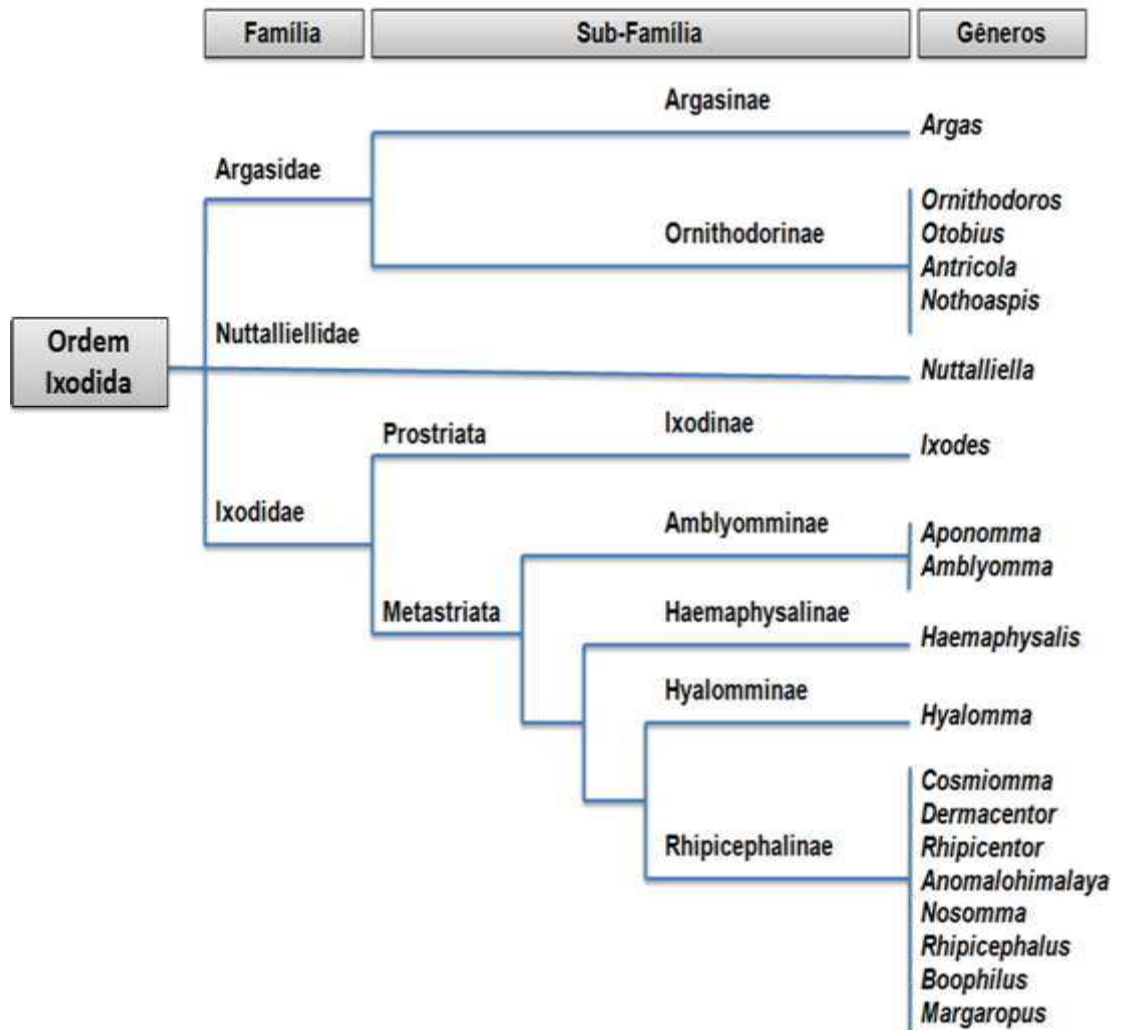


Figura 1: Classificação das famílias de carrapatos segundo Hoogstraal (1985).
Fonte: Adaptado de Parola & Raoult (2001).

Baseados em novos conhecimentos relacionados à taxonomia de ixodídeos, Barker & Murreli (2004) propuseram a criação da subfamília *Bothriocrotoninae* para posicionamento da linhagem de carrapatos australianos que anteriormente eram classificados como sendo do gênero *Aponomma* (carrapatos de répteis), e o enquadramento do gênero *Boophilus* como um

subgênero de *Rhipicephalus*. Além destas alterações no enquadramento taxonômicos de ixodídeos, Guglielmone et al. (2010) propuseram a inclusão dos gêneros *Cornupalpatum*, *Compluriscutula* no agrupamento Metastríata (Tabela 1).

Tabela 1: Gêneros dos grupos Prostríata e Metastríata pertencentes à família Ixodidae.

Família Ixodidae	Gêneros	Número de espécies	Observação
Prostríata	<i>Ixodes</i>	243	-----
Metastríata	<i>Amblyomma</i>	130	17 espécies anteriormente incluídas no gênero <i>Aponomma</i> .
	<i>Bothriocroton</i>	7	Todas as 7 espécies anteriormente incluídas no gênero <i>Aponomma</i> .
	<i>Haemaphysalis</i>	166	-----
	<i>Hyalomma</i>	27	-----
	<i>Cosmiomma</i>	1	-----
	<i>Dermacentor</i>	34	Incluindo o único membro do antigo gênero <i>Anocentor</i> .
	<i>Rhipicentor</i>	2	-----
	<i>Anomalohimalaya</i>	3	-----
	<i>Cornupalpatum</i>	1	-----
	<i>Compluriscutula</i>	1	-----
	<i>Nosomma</i>	2	-----
	<i>Rhipicephalus</i>	82	Incluindo 5 espécies do antigo gênero <i>Boophilus</i> .
<i>Margaropus</i>	3	-----	

Das 44 espécies de carrapatos ixodídeos endêmicas a fauna brasileira, trinta são pertencentes ao gênero *Amblyomma*, oito ao *Ixodes*, três ao *Haemaphysalis*, duas ao *Rhipicephalus* e uma espécie ao gênero *Dermacentor* (Dantas-Torres et al., 2009). Onofrio et al. (2009) confirmaram o número de oito espécies do gênero *Ixodes*, e Martins et al. (2010) realizaram a descrição e redescrição de 27 espécies de *Amblyomma* estabelecidas na fauna brasileira.

Com dimorfismo sexual pouco diferenciado, os carrapatos da família Argasidae são divididos em duas subfamílias, Argasinae e Ornithodorinae (Figura 1), sendo morfológica e biologicamente classificados em cinco gêneros: *Argas*, *Ornithodoros*, *Otobius*, *Antricola* e *Nothoaspis* (Hoogstraal, 1985; Guglielmone et al., 2010). *Ornithodoros* é o maior gênero da família Argasidae, sendo composto de 118 espécies em todo o mundo (Dantas-Torres et al., 2012;

Venzal et al., 2013; Barros-Basttesti et al., 2013). Das 21 espécies de argasídeos descritas até o momento na fauna brasileira, 16 espécies pertencem ao gênero *Ornithodoros*, três ao gênero *Antricola*, uma ao gênero *Argas* e uma ao gênero *Nothoaspis* (Barros-Basttesti et al., 2013) (Tabela 2).

Tabela 2: Espécies pertencentes à família Argasidae estabelecidas na fauna brasileira.

<i>Ornithodoros</i>	<i>Antricola</i>	<i>Argas</i>	<i>Nothoaspis</i>
<i>O. brasiliensis</i>	<i>A. coprophilus</i>	<i>A. miniatus</i>	<i>N. amazoniensis</i>
<i>O. capensis</i>	<i>A. guglielmonei</i>	-	-
<i>O. cavernicolous</i>	<i>A. delacruzii</i>	-	-
<i>O. fonsecai</i>	-	-	-
<i>O. hasei</i>	-	-	-
<i>O. jul</i>	-	-	-
<i>O. kohlsi</i>	-	-	-
<i>O. marinkellei</i>	-	-	-
<i>O. mimon</i>	-	-	-
<i>O. nattereri</i>	-	-	-
<i>O. rondoniensis</i>	-	-	-
<i>O. rostratus</i>	-	-	-
<i>O. rudis</i>	-	-	-
<i>O. setosus</i>	-	-	-
<i>O. stageri</i>	-	-	-
<i>O. talaje</i>	-	-	-

Possuindo quatro estádios de desenvolvimento (ovo, larva, ninfa e adulto), as famílias Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae diferem entre si tanto anatomicamente, quanto pelo ciclo de vida peculiar a cada família. Em cada estágio de desenvolvimento dos carrapatos ixodídeos, também conhecidos como carrapatos duros devido à presença de uma placa dorsal esclerotizada (exoesqueleto de quitina), a alimentação se processa uma única vez, por longo período de tempo utilizando durante o seu ciclo de vida uma grande diversidade de hospedeiros vertebrados. Nesta família, as fêmeas adultas podem alcançar até 100 vezes o seu peso em jejum, após o período de alimentação (Sonenshine, 1991; Parola & Raoult, 2001).

O ciclo de vida dos ixodídeos apresenta ampla relação a fatores ligados ao ambiente e ao acolhimento por hospedeiros, apesar destes ácaros passarem a maior parte do tempo do ciclo de vida fora destes. De acordo com seu ciclo de vida, os carrapatos ixodídeos apresentam as fases parasitárias e

não parasitárias. Ao que corresponde à fase parasitária larvas, ninfas e adultos alimentam do hospedeiro, entretanto os adultos Protistas e algumas espécies de *Amblyomma* *Bothriocroton* acasalam-se fora do hospedeiro. Alguns ixodídeos apresentam ciclo de vida com um ou dois hospedeiros, enquanto nas espécies que congregam três hospedeiros, a fase não parasitária é composta por processos biológicos importantes, tais como, a muda de larvas e ninfas ingurgitadas, ovoposição de fêmeas ingurgitadas, incubação dos ovos e a busca por hospedeiro em todos os estádios de desenvolvimento (Nava & Guglielmone, 2013).

Nos argasídeos, ou carrapatos moles, assim conhecidos devido à presença de uma cutícula flexível no seu dorso, a alimentação ocorre brevemente e muitas vezes, geralmente em uma única espécie de hospedeiro (Sonenshine, 1991; Parola & Raoult, 2001). Os argasídeos na fase adulta, após o acasalamento as fêmeas fecundadas, continuam a se alimentar, realizando oviposição de pequena massa de ovos, depositando geralmente cerca de 500 ovos por ciclo, o que é repetido por vários ciclos, sempre após uma refeição e um novo acasalamento (Sonenshine, 1991). O ciclo de vida se inicia à partir do ovo, avançando para larva, ninfa e, em seguida, adulto. Ao contrário dos carrapatos ixodídeos, os argasídeos apresentam uma variação de duas a nove ocorrências de ecdises durante o estágio de ninfa, sendo este número de mudas dependente da espécie de argasídeo e da qualidade e quantidade de sangue ingerido durante a ação hematofágica. Desta forma, as várias fases de ninfa para estes carrapatos contribuem para um ciclo de vida muito mais longo, podendo chegar até 10 anos - em contraste com representantes da família Ixodidae, nos quais varia entre meses a três anos -, apresentando grande resistência ao jejum prolongado (Sonenshine, 1991; Parola & Raoult., 2001; Vial, 2009). Sobre o hospedeiro vertebrado, as ninfas e os indivíduos adultos dos carrapatos argasídeos, desenvolvem um processo alimentar rápido, levando em torno de 20 a 40 minutos por período de alimentação, enquanto suas larvas necessitam um período maior de espoliação sobre o hospedeiro, entre sete a dez dias (Barros-Battesti et al., 2012).

No decorrer do processo de alimentação em seus hospedeiros vertebrados, os carrapatos enfrentam diversos obstáculos, como a ativação do mecanismo de hemostasia, inflamação e respostas imunitárias adaptativas. Para minimizar ou eliminar o efeito destas respostas, estes ácaros desenvolveram estratégias farmacológicas complexas e sofisticadas, compostas por lipídeos e proteínas bioativas com a finalidade de promover uma alimentação bem sucedida. Estas estratégias baseam-se em processos de anti-coagulação, anti-plaquetários, vasodilatadores, anti-inflamatórios e imunomoduladores (Ribeiro & Francischetti, 2002; Francischetti et al., 2009).

Segundo Fuente et al. (2008) e Liu & Bonnet (2014), o carrapato apresenta lugar de destaque para a transmissão de agentes infecciosos em humanos, ficando em segundo lugar, somente atrás dos mosquitos e em primeiro lugar na transmissão destes agentes para animais domésticos e silvestres. Entre os animais, são parasitas de anfíbios, répteis, aves, apresentando predomínio ao parasitismo em mamíferos (Cornejo et al., 2006, Nava & Guglielmo, 2013). Com grande eficiência vetorial, as diversas espécies de carrapatos contribuem na propagação de bactérias, vírus, protozoários, fungos e helmintos (Jongejan & Uilenberg, 2004; Fuente et al., 2008; Labruna et al., 2011; Solano-Gallegoa & Baneth, 2011; O'Dwyer, 2011; Lasta et al., 2013; Parola et al., 2013; Dalis et al., 2014; Saraiva et al., 2014). As principais doenças hemoparasitárias de importância epidemiológica, propagadas por estes ácaros, são ocasionadas por agentes de elevado potencial zoonótico, como: *Babesia* (Labruna et al., 2006; Solano-Gallegoa & Baneth, 2011), *Ehrlichia* (Labruna et al., 2006; Harrus & Waner, 2011; Kelly et al., 2013), *Anaplasma* (Kelly et al., 2013; Lasta et al., 2013), *Hepatozoon* (Dantas-Torres, 2008; O'Dwyer, 2011) e *Rickettsia* (Barros-Battesti, 2006; Oliveira et al., 2008; Labruna et al., 2011; Parola et al., 2013), com destaque no Brasil para a *Rickettsia rickettsii* como agente etiológico de um agravo de muita importância para a saúde pública humana (Szabó et al., 2013, Saraiva et al., 2014).

Como um fator peculiar que caracteriza a permissividade de um artrópode à infecção, multiplicação e transmissão de patógenos específicos, a competência vetorial está diretamente ligada a fatores intrínsecos, como por

exemplo: (a) características comportamentais inatas (respostas humoral e celular) que regulam a infecção por um agente patogênico; (b) a capacidade de transmitir este agente, e (c) aos parâmetros fisiológicos internos (habito alimentar, tempo de alimentação, preferência por hospedeiros, estado do sistema imunológico, possibilidade ou não da transmissão transovariana, dentre outras condições). Fatores extrínsecos ligados à competência vetorial também podem ser afetados por: (i) número de hospedeiros vertebrados e os padrões de atividade destes; (ii) condições climáticas; (iii) variação genética e o grau de infecciosidade do agente patogênico; e (iv) competição entre microorganismos por um mesmo vetor (Nuttall & Labuda, 2004; Goddard, 2008).

Considerando ainda os fatores intrínsecos ligados a competência vetorial do carrapato, a dinâmica de transmissão dos agentes infecciosos pode ser processada pela transmissão horizontal. Esta consiste no repasse do agente infeccioso pelo carrapato infectado em um hospedeiro, e deste hospedeiro uma vez infectado, a outro carrapato não infectado e também pela transmissão transovariana e transmissão transestadial (Walker & Ismail, 2008). Na transmissão transovariana contempla-se a passagem de bactérias (Socolovschi et al., 2009; Rollend et al., 2013), vírus (Rennie et al., 2001; Havlíková et al., 2013) e protozoários (Howell et al., 2007; Bastos et al., 2010), do agente infeccioso como todo, de uma fêmea contaminada aos seus ovos, infectando assim uma nova geração (Walker & Ismail, 2008). Na transmissão transestadial verifica-se a passagem da forma infecciosa entre os estádios de desenvolvimento (larva → ninfa → adulto) do carrapato (Freitas et al., 2009; Horta et al., 2009; Souza et al., 2009). Delinear e compreender bem os fatores estabelecidos entre patógenos e a competência vetorial em carrapatos é de extrema importância, visto estes serem as bases para o desenvolvimento de novas estratégias que visam à interrupção dos ciclos de vida dos patógenos transmitidos por estes artrópodes (Liu & Bonnet, 2014).

Hoogstraal (1985), um dos pesquisadores mais citados em trabalhos de filogenia de carrapatos, formulou teoria evolutiva para as famílias e suas respectivas subfamílias, gêneros e subgêneros, enfatizando a junção de um

estado amplo de coespeciação entre os carrapatos e seus hospedeiros. Em diferentes estádios de desenvolvimento, Hoogstraal identificou processos de alterações funcionais de estruturas, como a boca e coxas, adaptados a uma determinada condição ambiental e a um hospedeiro vertebrado específico. Estas alterações ou adaptações funcionais por especificidade aos hospedeiros seriam, de acordo com este autor, de extrema importância para a evolução dos carrapatos nos mais variados ecossistemas. Em contraste, Klompen et al. (1996) enfatizaram a especificidade ecológica, sugerindo que a limitação do ciclo de vida da maioria dos carrapatos está ligada a fatores como a especificidade ecológica, a biogeografia e as condições abióticas, e não necessariamente, a utilização específica de um determinado hospedeiro. Nava & Guglielmone (2013), em pesquisa com carrapatos ixodídeos típicos da região Neotropical, também enfatizaram que a especificidade estrita nestes carrapatos não é comum e sugeriram que a influência da ecologia do carrapato, a especificidade do hábitat, o tempo de geração do carrapato, a fenologia, o tempo fora do hospedeiro e o tipo de ciclo de vida poderiam ser fatores mais relevantes que a especificidade a hospedeiros.

Segundo Cumming (2000), existe uma falta marcante de correspondência entre fatores filogenéticos que liguem os carrapatos a seus hospedeiros suportando a hipótese de que, a coespeciação tenha sido um padrão dominante na evolução dos carrapatos. A falta da comprovação de que a coespeciação ocorreu entre carrapatos e hospedeiros sugere que a preferência por hospedeiros (por um contexto alimentar) é um roteiro pobre a ser contabilizado na história evolutiva e não deve ser utilizada como o componente fundamental para teorias ligadas à evolução destes ácaros.

Para McCoy et al. (2013), a resposta referente à questão que aborda a especificidade ou generalidade dos carrapatos para com seus hospedeiros está suportada entre dois extremos. O primeiro extremo é caracterizado pela diversidade morfológica ligada às adaptações estruturais e funcionais, direcionadas para atender a especificidade a um hospedeiro. O outro extremo sugere que os carrapatos são em grande parte limitados pelas condições biogeográficas e que estes ácaros tendem a utilizar na exploração, todas as

espécies disponíveis em um determinado hábitat. Também por estes pesquisadores, foi destacada a ideia de que carrapatos participam tanto no formato generalista em escalas geográficas maiores (escala global) para a exploração de seus hospedeiros, quanto no formato especialista para escalas locais, sem necessariamente, neste último caso, levar a especiação.

Por sua ecologia contrastante, carrapatos especialistas e generalistas são respectivamente conhecidos como endófilo e exofílico para afinidade ao hospedeiro. O estilo de vida endófilo se destaca pela alta especificidade ao hospedeiro, permanecendo escondidos dentro ou perto de ninhos ou tocas de seus hospedeiros, enquanto o exodófilo disponibiliza baixa especificidade e elevada promiscuidade aos mais variados hospedeiros, procurando acolhimento ativamente (Hoogstraal & Aeschlimann 1982; Sobrinho et al., 2012).

Oosten et al. (2016) compararam carrapatos *Ixodes arboricola* (endófilo) e *Ixodes ricinus* (exofílico) e analisaram o efeito da alimentação em três diferentes hospedeiros (com suas características ecológicas particulares) comuns ao macro-hábitat de ambas as espécies de carrapato. *Parus major* (ave frequentemente infestada por ambos os carrapatos), Melro-Preto (ave frequentemente infestada por *I. ricinus*, mas nunca por *I. arboricola*) e o Pica-Pau Malhado (sem relatos de ambos os carrapatos infestando este tipo de ave) foram os hospedeiros utilizados por estes pesquisadores que observaram para o carrapato *I. arboricola*, sucesso referente aos parâmetros de fixação e peso por ingurgitamento em *Parus major* e não sucesso em Melro-Preto e Pica-Pau Malhado, já *I. ricinus* apresentou sucesso para fixação e peso, quando foi alimentado em *Parus major* e Melro-Preto, mas resultado diferente para alimentação em Pica-Pau Malhado. Baseados nestes resultados, Oosten et al. (2016) apresentam duas hipóteses contrastantes, a primeira reporta a especificidade realizada, como sendo limitada por adaptações necessárias e impulsionadas pelo hospedeiro. Para a segunda hipótese ficou estabelecido que a especificidade pode ser restringida por outros processos, tais como a adaptação ao hábitat, comportamento e história de vida

Apesar de recentes estudos observacionais sustentarem a visão de que, filogeneticamente, carrapatos compartilham diversas espécies hospedeiras quando encontradas em faixas ecológicas semelhantes, a teoria sobre a evolução da diversidade de hospedeiros prevê que a especialização de acolhimento deve evoluir em carrapatos dada as suas características de história de vida (McCoy et al., 2013).

McCoy et al. (2005) analisaram o efeito evolutivo da disponibilidade de acolhimento e influência do isolamento geográfico em carrapato *Ixodes uriae* (parasita de aves marinhas, distribuído globalmente). Foi analisado o paratismos deste ixodídeo em 30 populações de seis espécies de aves, sendo três espécies em cada hemisfério do globo (norte e sul). Ficou demonstrado neste processo, que *I. uriae* evoluiu de forma independente aos hospedeiros distribuídos em ambos os hemisférios, sugerindo que o grau de diferenciação entre as populações de *I. uriae* variaram espacialmente dentro de cada região e que a divergência entre estas populações é um processo contínuo que ocorre várias vezes em áreas isoladas. Com o aumento da ocorrência de novas interações interespecíficas, devido a mudanças globais e fragmentação de hábitat sobre as distribuições das espécies, os resultados obtidos por estes pesquisadores também enfatizam a importância para o parasita a respeito dos efeitos combinatório do fluxo de genes e da seleção.

1.5.2. Estado da arte da filogenia molecular e o uso de marcadores moleculares na acarologia

1.5.2.1. Tecnologia de sequenciamento de nova geração como suporte a inferência filogenética e a filogenômica

No decorrer das últimas décadas, a evolução da tecnologia de sequenciamento de DNA, em especial a tecnologia de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS), proporcionou um incremento na comparação e análise de sequências de nucleotídeos, caracterizando marcadores moleculares (Medrum et al., 2011; Blaimer et al., 2015). Esta nova tecnologia permitiu baratear e agilizar, com enorme volume

de dados obtidos, estes processos (Metzker, 2010; Meldrum et al., 2011; Zhang et al., 2011). Junto a esta tecnologia de segunda geração, aplicativos robustos e eficazes de bioinformática também contribuíram para a elevação da montagem, comparação e análise de sequências parciais e completas dos genomas nuclear e mitocondrial (Smith, 2015, 2016). Estes fatos juntos favoreceram um melhor entendimento das relações evolutivas e filogenéticas para muitos grupos de organismos (Metzker, 2010; Mardis, 2011, Smith, 2015). Desta forma, a filogenia molecular tornou-se uma ferramenta indispensável e valiosa para análise comparativa da grande diversidade de genoma existente (Yang & Rannala, 2012), o que de certa forma vem se consolidando, como evidenciado pelos crescentes depósitos de sequências e genomas em bancos de dados biológicos (Li et al., 2010; Smith, 2015, 2016).

Com níveis de acurácia mais elevados, em comparação aos fornecidos pela análise filogenética, uma abordagem de inferência evolutiva tem sido explorada nestes últimos anos com a finalidade de promover um levantamento evolutivo mais robusto, com a possibilidade de criar árvores filogenéticas mais resolvidas. A Filogenômica, que combina os campos da evolução e genômica, é esta abordagem que foge da tradicional análise de gene único e de fragmentos gênicos, utilizando em processos comparativos, informações genômicas de múltiplos genes para inferir com maior precisão a história evolutiva de processos biológicos complexos de organismos contemporâneos (Delsuc et al., 2005; Behura, 2015). Estas informações genômicas são condizentes aos dados genômicos, propriamente ditos, de sequências de nucleotídeos e aminoácidos, e também aos dados transcriptômicos e proteômicos que fornecem amplo arranjo evolutivo do genoma de um organismo, em relação aos seus caracteres gênicos e proteicos, possibilitando desta forma, a caracterização diferenciada dos níveis de divergência dos táxons que envolvem uma árvore filogenética (Medina, 2005; Huerta-Cepas et al. 2007).

Filogenias moleculares baseadas em genes individuais muitas vezes levam a resultados aparentemente conflitantes, sem uma conformidade evolutiva (incongruência). Para superar essa limitação, a aplicação da

inferência filogenômica, através da combinação de informações de múltiplos genes ou sítios, associada ao emprego de ferramentas estatísticas robustas e testes filogenéticos podem minimizar ou eliminar esta desconformidade e contribuir para uma história evolutiva mais precisa (Gee, 2003). Tanto a quantificação, quanto a qualificação dos bancos de dados biológicos, devido à implementação do sequenciamento de nova geração, beneficiaram o incremento da filogenômica, bem como também o reconhecimento da importância da evolução horizontal na formação de genomas, o que consiste um tema bastante confuso quanto à inferência de árvores filogenéticas baseadas em informações restritas, ou seja, na sequência de único gene (Leigh et al., 2011).

Grandes conjuntos de candidatos marcadores congruentes (genes apropriados) são concatenados com a finalidade de maximizar o sinal filogenético ou história evolutiva (Baptiste et al., 2005). A inferência filogenética torna-se mais precisa a partir da utilização simultânea destes conjuntos de dados (Eulenstein et al., 2004; Semple et al. 2004). A abordagem estatística é utilizada para testar se marcadores individuais ligados a estes conjuntos de dados podem estabelecer a mesma história evolutiva, que a história estabelecida pela concatenação deste conjunto de dados. Desta forma, se o gene individualmente contribuir com mesma história evolutiva, ele é reconhecido como um marcador congruente (Baptiste et al., 2005).

Segundo Posada (2016), o contexto da abordagem filogenômica pode ser complexo, o que acarreta a sobreposição de vários desafios relacionados à aquisição, manipulação, análise e interpretação de grandes conjuntos de dados, e a reconstrução da árvore filogenética do gene ou da espécie. Além destes desafios, inclui-se ainda o desenvolvimento de estratégias adequadas de sequenciamento, o modelo de compartimentação dos múltiplos genes, com a finalidade de estabelecer a predição acurada, e a identificação de genes homólogos/ortólogos, a qual é processada somente com a utilização de métodos que congregam genomas completos.

A filogenômica nos últimos anos tem estruturado diversos estudos ligados: (i) a estimativa de tempo de divergência de genes e espécies, a

previsão da função do gene e a compreensão de padrões evolutivos de macromoléculas e adaptações moleculares (Kumar et al., 2012); (ii) a história evolutiva de endosimbiontes (Comas et al., 2007); e (iii) a biologia celular, com a finalidade de definir origens evolutivas de linhagens celulares (Behura, 2015).

1.5.2.2. O cenário dos marcadores moleculares na acarologia

Com o fortalecimento da filogenia molecular, a sistemática evolutiva foi revigorada e pesquisadores evolucionistas passaram a aceitar que comparações moleculares de sequência de nucleotídeos integrassem, como componentes essenciais, a inferência da história evolutiva de qualquer grupo de organismo (Adoutte et al., 1999).

De acordo com Roderick (1996) e Caterino et al. (2000), os métodos analíticos baseados na Genética Molecular têm revolucionado a sistemática evolucionária no estudo dos insetos. Navajas & Feton (2000), preconizaram que estes métodos se apresentam como ferramentas filogenéticas de grande potencial de aplicação em estudos evolutivos em ácaros e carrapatos.

Com relação à evolução de vários marcadores moleculares de genes ou regiões gênicas, tem-se que diferentes forças seletivas levaram a diferentes graus de conservação da sequência de nucleotídeos, considerando que para a caracterização de genes ou regiões gênicas, estes marcadores moleculares devem ser escolhidos com muito critério, visto poderem englobar amplas e verdadeiras relações filogenéticas e taxonômicas (Hwang & Kim, 1999).

Para Cruickshank (2002), diferentes marcadores moleculares têm sido utilizados na filogenia de ácaros e carrapatos, tendo problemas em cada um destes. No entanto, estes podem ser sanados pela escolha de um marcador mais apropriado para a tarefa que se deseja executar, minimizando-se os problemas e limitações antes que qualquer sequenciamento seja realizado, economizando assim tempo e dinheiro.

Um marcador molecular ideal deve ter várias características. Dentre estas destacamos: (a) ser evolutivamente conservado, o suficiente para permitir a identificação do táxon selvagem ou população da qual a espécie descende; (b) estar estruturado e bastante variável em toda a gama geográfica das

espécies, apresentando curta ou nenhuma variação intraespecífica quando comparada com a variação interespecífica; (c) evoluir a um ritmo rápido, mas constante, com a finalidade de proporcionar um número suficiente de novos caracteres moleculares informativos (Cruickshand, 2002; Bruford et al., 2003).

Hwang & Kim (1999), relataram que marcadores moleculares hiperconservados e, ou, regiões gênicas altamente conservadas, com relação à sequência de nucleotídeos, são úteis para investigar as relações filogenéticas em níveis taxonômicos mais altos (ramos profundos da história evolutiva). No entanto, em estudos filogenéticos que visam elucidar níveis taxonômicos mais baixos (ramos que divergiram recentemente), faz-se a utilização de marcadores moleculares hipervariáveis e, ou, regiões gênicas com alta variação de nucleotídeos.

Assim, considerando as premissas acima, temos o DNA mitocondrial (mtDNA) e o DNA ribossomal nuclear (rDNA), os quais foram demonstrados como sendo estruturas moleculares de excelente potencial a serem utilizadas em estudos taxonômicos e de evolução molecular na acarologia (Navajas & Feton, 2000; Roehrdanz et al., 2002; Burger et al., 2012, 2013).

1.5.2.2.1. DNA mitocondrial (mtDNA)

A mitocôndria contém seu próprio DNA (mtDNA), apresentando poucos genes, 37 genes no total, os quais codificam 13 proteínas (todas subunidades do complexo da cadeia respiratória), 22 RNAs transportadores (tRNAs) necessários para a síntese de proteínas mitocondriais e 2 RNAs ribossômicos (rRNAs) (Wong & Senadheera, 1997; Houshmand, 2003).

Estes, têm sido amplamente utilizados como marcadores moleculares de escolha para análise da sistemática molecular e estudos evolutivos das populações de metazoários (Dermauw et al., 2009), sendo distribuídos em duas categorias: genes mitocondriais ribossomais e genes codificadores de proteínas. São dois os genes mitocondriais ribossomais: o 12S rDNA (Norris et al., 1999; Ketchum et al., 2009; Levin et al., 2012) e o 16S rDNA (Black et al., 1994; Crosbie et al. 1998; Estrada-Peña et al., 2010; Tian et al., 2011). Com relação aos genes codificadores de proteínas, podem ser citados os genes das

subunidades I (Söller et al., 2001), II (Casati et al., 2008) e III (Kain et al., 1999) da citocromo oxidase (COI, COII e COIII); da ATP Sintase 6 e 8 (A6 e A8); da NADH Desidrogenase 1-6 e 4L (ND1-6, ND4L); e do Citocromo b apoenzima (Cytb) (Hwang & Kim, 1999).

No Reino Animalia ou Metazoa, os genes mitocondriais são 10 a 20 vezes mais rápidos na sua taxa evolutiva do que as sequências de codificação do DNA ribossomal nuclear (Li, 1997). Nesses genes mitocondriais, segundo Hwang & Kim (1999), tem-se mais dificuldade para o desenvolvimento de iniciadores (*primers*) universais destinados a amplificação de regiões específicas no mtDNA, quando em comparação com o rDNA nuclear, o que se deve a grande variabilidade existente no segmento mtDNA. Devido a isto, apenas alguns genes mitocondriais, tais como, 12S rDNA, 16S rDNA, Cytb, ND1 e COI, têm sido empregados nos estudos filogenéticos. Em relação as informações evolutivas, em geral, as sub-unidades 12S e 16S rDNAs são as regiões mais conservadas entre os genes mitocondriais. A região da COI é a mais conservada entre os três genes codificadores de citocromo-oxidase, assim como a ND1, entre os sete genes que codificam NADH desidrogenase. A região do gene Cytb é mais conservada do que ND1, sendo, no entanto menos conservada do que a do COI (COI > Cytb > ND1).

Ballard et al. (1992), relataram que a sequência do gene 12S rDNA é altamente conservada, o que habilita esse marcador molecular para ser utilizado quando se busca ilustrar a filogenia de níveis mais elevados em nível de filo ou subfilo, por exemplo. Black & Piesman (1994) e Kambhampati et al. (1996), preconizaram que a sequência do gene 16S rDNA é mais variável que a sequência 12S. Sendo assim, o gene 16S rDNA poderia ser utilizado para estudos filogenéticos ao nível taxonômico de família e gênero, com menor frequência de seu uso na identificação de espécie.

O grande número de mitocôndrias nas células animais e, conseqüentemente, o elevado número de cópias de DNA mitocondrial (2 a 10 cópias) presentes nestas células, tornam muito mais fácil o trabalho com genes mitocondriais, do que com uma única cópia proporcionada pelos genes do DNA nuclear. Têm-se ainda o fato da herança materna ser particularmente útil no

estudo de táxon com hierarquia a nível infraespecífica (Wong & Senadheera, 1997; Cruickshand, 2002).

De acordo com Li et al. (2012), outras características, como o fato do genoma ser pequeno (com aproximadamente 16 kb nos animais) e circular, com raras exceções, a rápida taxa de evolução, a baixa ou ausência de recombinação de sequência e a elevada conservação da ordem em que os genes estão arranjados no genoma, também favorecem e justificam a escolha dos genes mitocondriais como marcadores moleculares de grande potencial filogenético.

Para Bensasson (2001), uma das desvantagens dos genes mitocondriais é que estes genes podem ser transpostos da mitocôndria para o núcleo, formando assim os chamados genes Numts (pseudogenes mitocondriais ou DNA mitocondrial nuclear), podendo incorrer em amplificação e sequenciamento por engano, o que pode levar a erros na interpretação filogenética. Richly & Leister (2004), relataram que esta transferência do DNA mitocondrial para o núcleo é de conhecimento em muitos genomas eucarióticos, incluindo artrópodes, não tendo sido ainda relatada na sistemática molecular de ácaros e carrapatos (Bensasson, 2001).

1.5.2.2.2. DNA ribossomal nuclear (rDNA)

O DNA ribossomal nuclear (rDNA), que codifica o RNA ribossômico (rRNA), tem sido o mais frequentemente aplicado em abordagens filogenéticas, visto reunir muitas características ideais a um marcador evolutivo (Navajas & Fenton, 2000). Este DNA é organizado no formato de *tandem* no genoma, com cada unidade de repetição consistindo em genes que codificam uma sub-unidade nuclear pequena 18S rDNA, uma sub-unidade grande 28S rDNA e uma sub-unidade 5.8S rDNA, sendo estas regiões de codificação separadas umas das outras por espaçadores. O gene 5.8S rDNA é separado do gene 18S rDNA pelo espaçador transcrito interno 1 (ITS1) e separado do gene 28S rDNA pelo espaçador transcrito interno 2 (ITS2) (Hillis & Dixon, 1991; Navajas & Fenton, 2000; De Luca et al., 2004). Os genes 18S e 28S rDNAs são

separadas por dois espaçadores transcritos externos (ETS) e um espaçador não transcrito (NTS), com estes espaçadores juntos compondo o chamado espaçador intergênico (IGS) (Hwang & Kim, 1999; Chen et al., 2000; Chen et al., 2002), (Figura 2).

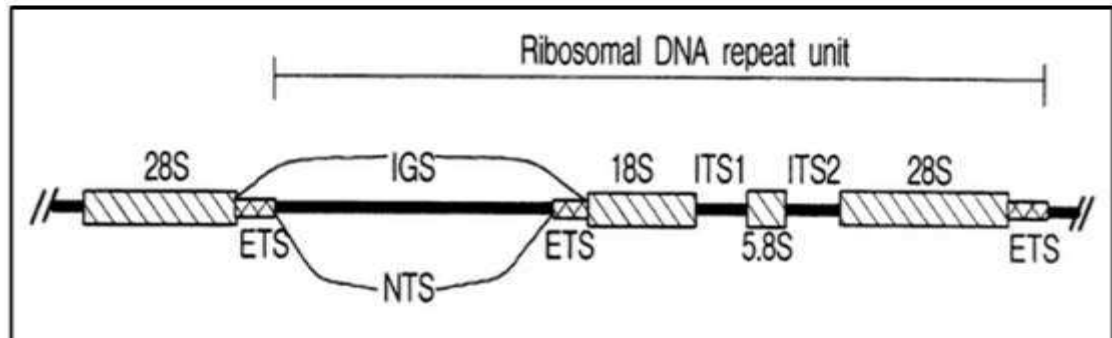


Figura 2: Diagrama esquemático de uma unidade de repetição em tandem do DNA ribossomal nuclear (rDNA).

Fonte: Hwang & Kim (1999).

De acordo com Hillis & Dixon (1991), as regiões separadoras de rDNA nuclear evoluem mais rapidamente do que as regiões codificantes de rRNA nuclear. Este fato é estabelecido devido as substituições de nucleotídeos que ocorrem nas regiões espaçadoras, visto estas substituições, por sua vez, proporcionarem uma taxa evolutiva relativamente mais rápida para essas regiões, não produzindo efeitos letais para os organismos, uma vez que nestas regiões ocorrem mutações neutras.

Diferentemente das regiões separadoras de rDNA, mutações presentes nas sequências do rRNA transcrito nas regiões codificadores de rRNA ocorrem devido as variações de nucleotídeos nestas regiões. De certa forma, a estruturação ribossomal pode ficar comprometida por estas mutações, atuando negativamente no processo de síntese proteica (Hwang & Kim, 1999).

Para Navajas & Fenton (2000), as regiões de codificação de rRNA são relativamente mais conservadas do que as regiões espaçadoras. Devido a esta condição evolutiva que diferencia as duas regiões do rDNA nuclear, temos alguns estudos com o objetivo de mensurar um efeito mais amplo para as relações filogenéticas, utilizando as sequências de nucleotídeos destas regiões. Nesta mesma linha de raciocínio, também podem ser incluídos os

estudos entre linhagens basais da vida e as relações entre espécies ou populações.

Níveis filogenéticos mais profundos como reinos, filos, classes ou ordem podem ser restabelecidos pela a utilização de estruturas genômicas mais conservadas, como é caso do gene 18S rDNA nuclear (Friedrich & Tautz, 1995; Aguinaldo et al., 1997).

O segmento 18S rDNA apresenta o nível de conservação de seus nucleotídeos semelhante ao do segmento genômico 5.8S nuclear. Entretanto, com 150 pares de base (pb) de comprimento, a região 5.8S não é indicada para estabelecer estudos de reconstrução filogenética, sendo um segmento que contém informações filogenéticas insuficientes devido ao seu tamanho reduzido (Hwang & Kim, 1999). O gene 28S rDNA nuclear mostra uma maior variabilidade na taxa de evolução quando comparado ao gene 18S rDNA nuclear. Esse gene possui muitos domínios divergentes ou segmentos de expansão, de modo que seu tamanho varia bastante entre os filos, sendo de grande importância para a identificação e análise das relações filogenéticas em níveis taxonômicos como ordens ou famílias (Gillespie et al., 2005).

Um número crescente de análises filogenéticas tem se baseado na região espaçadora transcrita interna 2 (ITS2). Com taxa evolutiva muito rápida, proporcionando grande número de substituição de bases e, conseqüentemente, informações filogenéticas, esta região parece ser o seguimento de nucleotídeos ideal para a reconstrução das relações evolutivas ao nível de gênero (Coleman, 2003) e espécie (dentro e entre espécie) em metazoários (Cruickshank, 2002; Coleman, 2003). Este gene, além de ser em eucariotos uma estrutura específica para a identificação taxonômica ao nível de espécie, também é um segmento genômico que apresenta várias informações importantes sobre as relações taxonômicas direcionadas a táxons mais elevados (Coleman, 2007; Selig et al., 2008). Com menor frequência de uso como marcador molecular evolutivo em relação a ITS2, a região espaçadora intergênica (IGS) também apresenta boa variabilidade na sua sequência de nucleotídeos, podendo ser empregada para resolver problemas filogenéticos

em níveis taxonômicos mais baixos como gêneros e espécies, ou até mesmo ao nível de população (Perera et al., 1998; Bunikis et al., 2004).

Aplicações de cada marcador molecular ou região do gene passível de utilização na identificação taxonômica molecular de carrapatos está resumida na Tabela 3.

Tabela 3: Marcador molecular ou região do gene aplicável a cada nível taxonômico.

Níveis Taxonômicos / Especificação		Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie	População
DNA Nuclear (rDNA)	SSU (16-18S)	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>b</u>	-	-	-
	LSU (23-28S)	-	-	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>b</u>	-	-
	5.8S	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>b</u>	-	-	-	-
	IGS	-	-	-	-	-	-	<u>a</u>	<u>a</u>
	ITS	-	-	-	-	-	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>a</u>
DNA Mitochondrial (mtDNA)	12S	-	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>b</u>	-	-	-
	16S	-	-	-	-	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>b</u>	-
	ND1	-	-	-	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>b</u>
	ND2	-	-	-	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>b</u>
	COI	-	-	-	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>b</u>
	COII	-	-	-	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>b</u>
	CYtb	-	-	-	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>b</u>

Fonte: Adaptado de Hwang & Kim (1999). A letra a indica o marcador molecular ou região do gene mais frequentemente aplicável ao nível taxonômico, enquanto que a letra b indica o marcador molecular ou região do gene menos frequentemente aplicável ao nível taxonômico.

1.5.3. Mecanismos que auxiliam a inferência filogenética

Em filogenia, a reconstrução de uma história evolutiva é baseada em amostragens e análises de características fisiológicas e morfológicas estáveis, e também, na análise de fragmentos de sequências de nucleotídeos e aminoácidos (Lin et al., 2007). Atualmente, com o incremento da tecnologia de sequenciamento de nova geração, a inferência filogenética passou a incorporar a análise de múltiplos genes, com a introdução de genomas parciais e completos (Smith, 2015, 2016). Estes caracteres moleculares ou dados discretos são utilizados pelos três principais métodos filogenéticos de inferência evolutiva do estado de caracteres, sendo eles: a Máxima Parcimônia, a Máxima Verossimilhança e a Inferência Bayesiana (Lin et al., 2007).

O método de Máxima Parcimônia (MP) é estruturado na hipótese mais simples para a reconstrução filogenética, ou seja, é a hipótese que apresenta o menor número de mudanças (ou passos) do estado de caractere, em relação a todas as outras hipóteses possíveis. Desta forma, uma árvore consenso é estabelecida (Lin et al., 2007). Este método preconiza a otimização da análise específica para os caracteres observados, não utilizando nenhum modelo de substituição de nucleotídeos para prever a dinâmica dos caracteres ancestrais. A MP pode ser considerada como um método não paramétrico, visto as árvores geradas serem avaliadas com base em uma métrica geral de número mínimo necessário de mudanças do caráter de estado para gerar os dados de uma determinada árvore, não assumindo uma distribuição específica (Kolaczkowski & Thornton, 2004).

A análise de Máxima Verossimilhança (MV) em filogenia baseia-se na performance da inferência probabilística de um modelo proposto (hipótese), a qual tem como objetivo avaliar o processo evolutivo e sua dinâmica e as diversas mudanças aleatórias de caracteres nas sequências de nucleotídeos (dados) (Pagel, 1999). A MV irá identificar a árvore com topologia mais verossímil, ou seja, a árvore que indicar a maior probabilidade alcançada que confirme como verdadeira a hipótese estabelecida em relação ao estado observado dos dados. Quanto maior o nível de divergência das sequências de nucleotídeos, maior será o efeito dos eventos múltiplos e aleatórios sobre o estado de caractere original (Felsenstein, 1985; Rannala & Yang, 1996).

Introduzido por Felsenstein (1985) pela primeira vez em estudos de filogenia, o teste estatístico de *bootstrap* tem a finalidade de promover e consolidar a confiabilidade dos resultados para os métodos de MP e MV, baseando-se na reamostragem à partir da amostra original. Em filogenia, este teste não preconiza a estimativa geral de confiabilidade filogenética da árvore como um todo, mas sim tem como foco a confiabilidade específica para cada nó (ancestral) em relação ao agrupamento descendente, consistindo desta forma em uma vantagem, que é identificar a parte da árvore que proporciona maior confiança em relação às informações evolutivas (Alfaro et al., 2003; Huelsenbeck & Rannala, 2004; Hall, 2013).

Com habilidade de integrar funções complexas e multidimensionais, a Inferência Bayesiana (IB) é uma abordagem estatística quantitativa altamente relacionada com a MV (Rannala & Yang, 1996; Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Este método se baseia no pressuposto de que a incerteza sobre a quantidade desconhecida de parâmetros de um modelo é constituída por uma condição de distribuição probabilística dos dados conhecidos e também de dados que se tornam disponíveis (Sivaganesan et al., 2008). Na filogenia Bayesiana, parâmetros como a topologia de árvores, comprimento dos ramos e os parâmetros de substituição são modelados como variáveis aleatórias e de distribuição de probabilidade prévia em cada um (Cummings et al., 2003; Huelsenbeck & Rannala, 2004).

Como resultado do processo de IB, é estabelecida a distribuição probabilística *a posteriori* (novo estado do conhecimento), sendo esta definida como a probabilidade de alguma hipótese condicional aos dados observados (Cummings et al., 2003), a qual é sensível à escolha do modelo correto para a constituição, análise e validação de uma árvore filogenética, ou seja, sensível à escolha do modelo mais acurado para descrever as relações entre os dados (Huelsenbeck & Rannala, 2004). A distribuição *a posteriori* é estabelecida pela junção constitutiva da distribuição probabilística *a priori* (estado atual do conhecimento ou informações previamente disponíveis sobre os parâmetros) e da função de verossimilhança proveniente da distribuição probabilística das observações de novos dados. Estes novos dados atualizam o estado atual do conhecimento com base no Teorema de Bayes (Sivaganesan et al., 2008).

Segundo Cummings et al. (2003), a intratabilidade da determinação matemática direta das probabilidades posteriores levou à aplicação de procedimentos estimativos estocásticos (eventos aleatórios), como o método de simulação de Monte Carlo via Cadeias de Markov (*Markov chain Monte Carlo* - MCMC). A abordagem MCMC envolve uma série de alterações de parâmetros dos propostos, cada um dos quais é aceito ou rejeitado como uma função da alteração resultante na probabilidade. Quando o processo estocástico alcança a sua distribuição estacionária, a frequência com a qual os

valores individuais dos parâmetros são observados estabelecem uma convergência que formalizam a probabilidade da distribuição *a posteriori*.

Tanto o suporte de confiabilidade filogenético *bootstrap*, quanto à probabilidade *a posteriori* são ferramentas de extrema importância para a constituição de um estudo de filogenia, cuja função é promover a confiabilidade e a credibilidade dos limites superior e inferior a um nó ancestral, não sendo porém intercambiáveis e certamente não podendo ser comparadas diretamente (Douady et al., 2003). Estas ferramentas são potencializadas pela utilização de modelos estatísticos que analisam a dinâmica da evolução de DNA e os modelos de substituição de nucleotídeos. Como um dos principais objetivos, a MV e a IB são métodos de inferência filogenética que buscam no estado inicial do caractere (original) uma forma de estabelecer a reconstrução do estado de caractere dos nós ancestrais (Rannala & Yang, 1996).

1.5.4. Referencial Bibliográfico

- Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., Rosa, R. 1999. Animal evolution - the end of the intermediate taxon? *Trends Genet.*, 15:104-108.
- Alfaro, M.E., Zoller, S., Lutzoni, F. 2003. Bayes or Bootstrap? A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov Chain Monte Carlo sampling and bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. *Mol. Biol. Evol.*, 20(2):255-266.
- Aguinaldo, A.M.A., Turbeville, J.M., Linford, L.S., Rivera, M.C., Garey, J.R., Raff, R.A., Lake, J.A. 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*, 387:489-493.
- Aquino A.M., Correia, M.E.F., Menezes, E.B., Menezes, E.L.A. 2007. Ácaros: taxonomia, bioecologia e sua importância agrícola. Documentos – Embrapa Agrobiologia, INSS 1517-8498:240 – Seropédica, Embrapa Agrobiologia., 24 pp.
- Ballard, J.W.O., Olsen, G.J., Faith, D.P., Odgers, W.A., Rowell, D.M., Atkinson, P.W. 1992. Evidence from 12S ribosomal RNA sequences that onychophorans are modified arthropods. *Science*, 258:1345-1348.
- Baptiste, E., Susko, E., Leigh, J., MacLeod, D., Charlebois, R.L., Doolittle, W.F. 2005. Do orthologous gene phylogenies really support tree-thinking? *BMC Evol. Biol.*, 5(1):33.
- Barker, S.C., Murrell, A. 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitol.*, 129:S15-S36.
- Barros-Battesti, D.M., Arzuá, M., Bechara, G.H. 2006. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 223 pp.
- Barros-Battesti, D.M., Onofrio, V.C., Nieri-Bastos, F.A., Soares, J.F., Marcili, A., Famadas, K.M., Faccini, J.L.H., Ramirez, D.G., Doyle, R.I., Martins, J.R., Junior, J.R., Guglielmone, A.A., Labruna, M.B. 2012. *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae): description of the larva, redescription of male and female, and neotype designation. *Zootaxa*. 3178:22-32.

- Barros-Battesti, D.M., Ramirez, D.G., Landulfo, G.A., Faccini, J.I.H., Dantas-Torres, F., Labruna, M.B., Venzal, J.M. 2013. Immature argasid ticks: diagnosis and keys for neotropical region. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 22(4):443-456.
- Bastos, R.G., Ueti, M.W., Knowles, D.P., Scoles, G.A. 2010. The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 gene plays a critical role in the fitness of ticks fed on cattle during acute *Babesia bovis* infection. *Parasit. Vectors*, 3:111.
- Behura, S.K. 2015. Insect phylogenomics. *Insect Mol. Biol.*, 24(4):403-411.
- Bensasson, D., Zhang, D.X., Hartl, D.L., Hewitt, G.M. 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol. Evol.*, 16(6):314-321.
- Black, W.C., Piesman, J. 1994. Phylogeny rate hard-and soft tick (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:10034-10038.
- Blaimer, B.B, Brady, S.G, Schultz, T.R., Lloyd, M.W., Fisher, B.L., Ward, P.S. 2015. Phylogenomic methods outperform traditional multi-locus approaches in resolving deep evolutionary history: a case study of formicine ants. *BMC Evol. Biol.*, 15:271.
- Bruford, M.W., Bradley, D.G., Luikart, G. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat. Rev. Genet.*, 4:900-910.
- Bunikis, J., Tsao, J. Garpmo, U., Berglund, J., Fish, D., Barbour, A.G. 2004. Typing of *Borrelia relapsing fever* group strains. *Emerg. Infect. Dis*, 10(9):1661-1664.
- Burger, T.D., Shao, R., Beati, L., Miller, H., Barker, S.C. 2012. Phylogenetic analysis of ticks (Acari: Ixodida) using mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes indicates that the genus *Amblyomma* is polyphyletic. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 64:45-55.
- Burger, T.D., Shao, R., Barker, S.C., 2013. Phylogenetic analysis of the mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes of ticks reveals a deep phylogenetic structure within the genus *Haemaphysalis* and further elucidates the polyphyly of the genus *Amblyomma* with respect to

- Amblyomma sphenodonti* and *Amblyomma elaphense*. Ticks Tick Borne Dis., 4:265-274.
- Burger, T.D., Shao, R., Labruna, M.B., Barker, S.C. 2014. Molecular phylogeny of soft ticks (Ixodida: Argasidae) inferred from mitochondrial genome and nuclear rRNA sequences. Ticks Tick Borne Dis., 5:195-207.
- Casati, S., Bernasconi, M.V., Gern, L., Piffaretti, J.C. 2008. Assessment of intraspecific mtDNA variability of European *Ixodes ricinus* sensu stricto (Acari: Ixodidae). Infect. Genet. Evol., 8(2):152-158.
- Caterino, M.S., Cho, S., Sperling, F. A.H. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. Annu. Rev. Entomol., 45:1-54.
- Chen, C. A., David, J., Miller, D.J., Nuwei Vivian Wei, N.V., Dai, C-F., Yang, H-P. 2000. The ETS/IGS Region in a lower animal, the seawhip, *Junceella fragilis* (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia): compactness, low variation and apparent conservation of a pre-rRNA processing signal with fungi. Zool. Stud., 39(2):138-143.
- Chen, C.A., Wei, N.V., Dai, C-F. 2002. Genotyping the clonal population structure of a gorgonian coral, *Junceella fragilis* (Anthozoa: Octocorallia: Ellisellidae) from Lanyu, Taiwan, using simple sequence repeats in ribosomal intergenic spacer. Zool. Stud., 41(3):295-302.
- Coleman, A.W. 2007. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. Nucleic Acids Res., 35:3322-3329.
- Coleman, A.W. 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. Trends Genet., 19:370-375.
- Comas, I., Moya, A., Gonzalez-Candelas, F. 2007. From phylogenetics to phylogenomics: the evolutionary relationships of insect endosymbiotic gamma-proteobacteria as a test case. Syst. Biol., 56:1-16.
- Cornejo, C.G., Pérez, T.M., Nava, S., Guglielmone, A.A. 2006. First records of the ticks *Amblyomma calcaratum* and *A. pacae* (Acari: Ixodidae) parasitizing mammals of Mexico. Rev. Mex. Biodivers., 77:123-127.

- Cummings, M.P., Handley, S. A., Myers, D.S., Reed, D., Rokas, A., Winka, K. 2003. Comparing bootstrap and posterior probability values in the four-taxon case. *Syst. Biol.*, 52(4):477-487.
- Crosbie, P.R., Boyce, W.M., Rodwell, T.C. 1998. DNA sequence variation in *Dermacentor hunteri* and estimated phylogenies of *Dermacentor* spp. (Acari: Ixodidae) in the New World. *J. Med. Entomol.*, 35(3):277-288.
- Cruickshank, R.H. 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Syst. Appl. Acarol.*, 7:3-14.
- Dalis, J.S., Kazeem, H.M., Kwaga, J.K.P., Kwanashie, C.N. 2014. Severe generalized skin lesions due to mixed infection with *Sporothrix schenckii* and *Dermatophilus congolensis* in a bull from Jos, Nigeria. *Vet. Microbiol.*, 172 (3-4):475-478.
- Dantas-Torres, F. 2008. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit. Vectors.*, 1:25.
- Dantas-Torres, F., Onofrio, V.C., Barros-Battesti, D.M. 2009. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. *Syst. Appl. Acarol.* 14:30-46.
- Dantas-Torres, F., Venzal, J M., Bernardi, L.F.O., Ferreira, R.L., Onofrio, V.C., Marcili, A., Bermúdez, S.E., Ribeiro, A.F., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B. 2012. Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari: Argasidae) from Brazil. *J. Parasitol.*, 98(1):36-45.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Philippe, H. 2005. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nat. Rev. Genet.*, 6:361-375.
- De Luca, F., Reyes, A., Grunder, J., Kunz, P., Agostinelli, A., De Giorgi, C., Lamberti F. 2004. Characterization and sequence variation in the rDNA region of six nematode species of the genus *Longidorus* (Nematoda). *J. Nematol.*, 36(2):147-152.
- Dermauw, W., Leeuwen, T.V., Vanholme, B., Tirry, L. 2009. The complete mitochondrial genome of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart): a novel gene arrangement among arthropods. *BMC Genomics*, 10:10.

- Douady, C.J., Delsuc, F., Boucher, Y., Doolittle, W.F., Douzery E.J.P. 2003. Comparison of bayesian and maximum likelihood bootstrap measures of phylogenetic reliability. *Mol Biol Evol.* 20(2):248-254.
- Estrada-Peña, A., Mangold, A.J., Nava, S., Venzal, J.M., Labruna, M., Guglielmone, A. A. 2010. A review of the systematics of the tick family Argasidae (Ixodida). *Acarologia*, 50(3):317-333.
- Eulenstein, O., Chen, D., Burleigh, J.G., Fernandez-Baca, D., Sanderson, M.J. 2004. Performance of flip supertree construction with a heuristic algorithm. *Syst Biol.*, 53:299-308.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies. An approach using the bootstrap. *Evolution.* 39:783-791.
- Francischetti, I.M., Sa-Nunes, A., Mans B.J., Santos I.M., Ribeiro, J.M. 2009. The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.* 14:2051-2088.
- Freitas, L.H.T., Faccini, J.L.H., Labruna, M.B. 2009. Experimental infection of the rabbit tick, *Haemaphysalis leporispalustris*, with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, and comparative biology of infected and uninfected tick lineages. *Exp. Appl. Acarol.*, 47(4):321-345.
- Friedrich, M., Tautz, D. 1995. Ribosomal DNA phylogeny of the major existing classes of arthropods and the evolution of myriapods. *Nature*, 376:165-167.
- Fuente, J., Estrada-Peña, A., Venzal, J.M., Kocan, K. M., Sonenshine, D.E. 2008. Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.*, 13:6938-6946.
- Gee H. 2003. Evolution: ending incongruence. *Nature.* 425(6960):782.
- Gillespie, J.J., Munro, J.B., Heraty, J.M., Yoder, M.J., Owen, A.K., Carmichael, A.E. 2005. A Secondary structural model of the 28S rRNA expansion segments D2 and D3 for Chalcidoid Wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Mol. Biol. Evol.*, 22(7):1593-1608..
- Goddard, J. 2008. Infectious diseases and arthropods - dynamics of arthropod-borne diseases. *Humana Press*, 2:19-28.
- Guglielmone, A. A., Robbins, R.G., Apanaskevich, D. A., Petney, T.N., Estrada-Peña, A., Horak, I.G., Shao, R., Barker, S.C. 2010. The Argasidae, Ixodidae

- and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, 2528:1-28.
- Hall, B.G. 2013. Building Phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol. Biol. Evol.* 30(5):1229-1235.
- Havlíková, S., Ličková, M., Klempa, B. 2013. Non-viraemic transmission of tick-borne viruses. *Acta Virol.*, 57:123-129.
- Harrus, S., Waner, T. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet. J.*, 187:292-296.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.*, 66(4):411-453.
- Hoogstraal H., Aeschlimann, A. 1982. Tick-host specificity. *Bull. Soc. Entomol. Suisse*, 55:5-32.
- Hoogstraal H. 1985. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Adv. Parasitol.*, 24:135-238.
- Horta, M.C., Moraes-Filho, J., Casagrande, R.A., Saito, T.B., Rosa, S.C., Ogrzewalska, M., Matushima, E.R., Labruna, M.B. 2009. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9(1):109-118.
- Houshmand, M. 2003. Mitochondrial DNA mutations, pathogenicity and inheritance. *Iran. J. Biotechnol.*, 1(1):1-18.
- Howell, J.M., Ueti, M.W., Palmer, G.H., Scoles, G.A., Knowles, D.P. 2007. Transovarial Transmission Efficiency of *Babesia bovis* tick stages acquired by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* during acute infection. *J. Clin. Microbiol.* 45(2):426-431.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic tree. *Bioinformatics*, 17, 754-755.
- Huelsenbeck, J.P., Rannala, B. 2004. Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. *Syst. Biol.*, 53(6):904-913.
- Huerta-Cepas, J., Dopazo, H., Dopazo, J., Gabaldón, T. 2007. The human phylome. *Genome Biol.*, 8:109.

- Hwang, U.W., Kim, W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematic. *Korean J Parasitol.*, 37(4):215-228.
- Jongejan, F., Uilenberg, G. 2004. The global importance of ticks. *Parasitol.*, 129:S3-S14.
- Kain, D.E., Sperling, F.A.H., Daly, H.V., Lane, R.S. 1999. Mitochondrial DNA sequence variation in *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Heredity*, 83:378-386.
- Kambhampati, S., Kjer, K.M., Thorne, L. 1996. Phylogenetic relationship among termite families based on DNA sequence of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene. *Insect. Mol. Biol.*, 5(4):229-238.
- Ketchum, H.R., Teel, P.D., Coates, C.J., Strey, O.F., Longnecker, M.T. 2009. Genetic variation in 12S and 16S mitochondrial rDNA genes of four geographically isolated populations of gulf coast ticks (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, 46(3):482-489.
- Kelly, P.J., Chuanling Xu, C., Lucas, H., Loftis, A., Abete, J., Zeoli, F., Stevens, A., Jaegersen, K., Ackerson, K., Gessner, A., Kaltenboeck, B., Wang, C. 2013. Ehrlichiosis, babesiosis, anaplasmosis and hepatozoonosis in dogs from St. Kitts, west Indies. *PLoS One*, 8:1-e53450.
- Klompen, J.S., Black, W.C.IV, Keirans, J.E., Oliver, J.H.Jr. 1996. Evolution of ticks. *Annu. Rev. Entomol.*, 41:141-161
- Kolaczkowski, B., Thornton, J.W. 2004. Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous. *Nature*, 431: 980-984.
- Kumar, S., Filipski, A.J., Battistuzzi, F.U., Kosakovsky Pond, S.L., Tamura, K. 2012. Statistics and truth in phylogenomics. *Mol. Biol. Evol.*, 29:457-472.
- Labruna, M.B., Machado, R.Z. 2006. Agentes transmitidos por carrapatos na região neotropical. In: Barros-Batesti, D. M.; Arzua, M.; Bechara, G. H. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical, um guia ilustrado para a identificação de espécies. São Paulo: Instituto Butantan, 1(10):115-138.

- Labruna, M.B., Mattar, V.S., Nava, S., Bermudez, S., Venzal, J.M., Dolz, G., Abarca, K., Romero, L., Sousa, R., Oteo, J., Zavala-Castro, J. 2011. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev.MVZ Córdoba*. 16(2):2435-2457.
- Lasta, C.S., Santos, A.P., Messick, J.B., Oliveira, S.T., Biondo, A.W., Vieira, R.F., Dalmolin, M.L., González, F.H.D. 2013. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 22:3:360-366.
- Leigh, J.W., Lapointe, F-J., Lopez, P., Bapteste, E, 2011. Evaluating phylogenetic congruence in the post-genomic era. *Genome Biol. Evol.*, 3:571-587.
- Levin, M.L., Studer, E., Killmaster, L., Zemtsova, G., Mumcuoglu, K.Y. 2012. Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.*, 58(1):51-68.
- Li, H., Liu, H., Shi, A., Stys, P., Zhou, X., Cai, W. 2012. The complete mitochondrial genome and novel gene arrangement of the unique-headed bug *Stenopirates sp.* (Hemiptera: Enicocephalidae). *PLoS One*, 7(1):29419.
- Li, W-H. 1997. Molecular evolution. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA. 432 pp.
- Lin, Y. M., Fang, S.C., Thorne, J.L. 2007. A tabu search algorithm for maximum parsimony phylogeny inference. *Eur. J. Oper. Res.*, 176:1908-1917.
- Liolios, K., Chen, I-M.A., Mavromatis, K., Tavernarakis, N., Hugenholtz, P., Markowitz, V.M., Kyrpides, N.C. 2010. The genomes on line database (GOLD) in 2009: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucl. Acids. Res.*, 38(1):D346-D354.
- Liu, X.Y., Bonnet, S.I. 2014. Hard tick factors implicated in pathogen transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8(1):e2566.
- McCoy, K.D., Chapuis, E., Tirard, C., Boulinier, T., Michalakis, Y., Bohec, C.L., Maho, Y.L., Gauthier-Clerc, M. 2005. Recurrent evolution of host-specialized races in a globally distributed parasite. *Proc. Biol. Sci.*, 272(1579):2389-2395.

- McCoy, K.D., Léger, E., Dietrich, M. 2013. Host specialization in ticks and transmission of tick-borne diseases: a review. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 3:57.
- Mardis, E.R. 2011. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature*, 470:198-203.
- Martins, T.F., Onofrio, V.C., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B. 2010. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks Tick Borne Dis.*, 1(2):75-99.
- Medina M. 2005. Genomes, phylogeny, and evolutionary systems biology. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, 102:6630-6635.
- Medrum, C., Doyle, M.A., Tohill, R.W. 2011. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin. Biochem. Rev.*, 32:4.
- Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Review.*, 11:31-46.
- Nava, S., Guglielmone, A.A., Mangold, A.J. 2009. An overview of systematics and evolution of ticks. *Front. Biosci.*, 14:2857-77.
- Nava, S., Venzal, J.M., Terassini, F. A., Atilio J., Mangold, A.J., Camargo, L.M.A., Labruna, M.B. 2010. Description of a new argasid tick (Acari: Ixodida) from bat caves in brazilian amazon. *J. Parasitol.*, 96(6):1089-1101.
- Nava, S., Guglielmone, A. A. 2013. A meta-analysis of host specificity in neotropical hard ticks (Acari: Ixodidae). *Bull. Entomol. Res.*, 103:216-224.
- Navajas, M., Fenton, B. 2000. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Exp. Appl. Acarol.*, 24:751-774.
- Norris, D.E., Klompen, J.S.H., Black, W.C. 1999. Comparison of the mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA genes in resolving phylogenetic relationships among hard ticks (Acari: Ixodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 92:117-129.
- Nuttall, P.A., Labuda, M. 2004. Tick–host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, 129:S177-S189.
- O'dwyer, L.H. 2011. Brazilian canine hepatozoonosis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 20(3):181-193.

- Oliveira, K.A., Oliveira, L.S., Dias, C.C.A., Silva Jr,A., Almeida, M.R., Almada, G., Bouyer, D.H., Galvão, M.A.M., Mafra, C.L. 2008. Molecular identification of *Rickettsia felis* ticks and fleas from an endemic area for Brazilian Spotted Fever. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 103(2):191-194.
- Onofrio, V.C., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., Faccini, J.L. 2009. Diagnoses of and illustrated key to the species of Ixodes Latreille, 1795 (Acari: Ixodidae) from Brazil. Syst. Parasitol., 72(2):143-57.
- Oosten, A.R.V., Heylen, D.J.A, Elst, J., Philtjens, S., Matthysen, E. 2016. An experimental test to compare potential and realised specificity in ticks with different ecologies. Evol. Ecol., 30(3):487-501.
- Pagel, M. 1999. Inferring the historical patterns of biological evolution. Nature, 401:877-884.
- Parola, P., Raoult, D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat. Clin. Infect. Dis., 32:897-928.
- Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M.Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P.E., Raoult, D. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the World: a geographic approach. Clin. Microbiol. Rev., 26(4):657-702.
- Perera, O.P., Cockburn, A.F., Mitchell, S.E., Conn, J., Seawright, J. A. 1998. Species-specific repeat units in the intergenic spacer of the ribosomal RNA cistron of *Anopheles aquasalis* Curry. Am. J. Trop. Med. Hyg., 59:673-678.
- Posada, D. 2016. Phylogenomics for systematic biology. Syst. Biol. 65(3):353-356.
- Rannala, B., Yang, Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. J. Mol. Evol., 43(3):304-311.
- Rennie, L., Wilkinson, P.J., Mellor, P.S. 2001. Transovarial transmission of African swine fever virus in the argasid tick *Ornithodoros moubata*. Med. Vet. Entomol., 15:140-146.
- Ribeiro, J.M, Francischetti, I.M. 2002. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. Annu. Rev. Entomol., 19:19.
- Richly, E., Leister, D. 2004. NUMTs in Sequenced eukaryotic genomes. Mol. Biol. Evol., 21(6):1081-1084.

- Roderick, G.K. 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annu. Rev. Entomol.*, 41:325-352.
- Roehrdanz, R.L., Degrugillier, M.E., Black, W.C. 2002. Novel rearrangements of arthropod mitochondrial DNA detected with long-PCR: applications to arthropod phylogeny and evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 19:841-849.
- Rollend, L., Fish, D., Childs, J.E. 2013. Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: A summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Borne. Dis.*, 4:46-51.
- Saraiva, D.G., Soares, H.S., Soares, J.F., Labruna, M.B. 2014. Feeding Period Required by *Amblyomma aureolatum* Ticks for Transmission of *Rickettsia rickettsii* to vertebrate hosts. *Emerg. Infect. Dis.*, 20(9):1504-1510.
- Selig, C., Wolf, M., Muller, T., Dandekar, T., Schultz, J. 2008. The ITS2 Database II: homology modelling RNA structure for molecular systematic. *Nucleic Acids Res.*, 36:377-380.
- Semple, C., Daniel, P., Hordijk, W., Page, R.D., Steel, M. 2004. Supertree algorithms for ancestral divergence dates and nested taxa. *Bioinformatics*. 20: 2355-2360.
- Sivaganesan, M., Seifring, S., Varma, M., Haugland, R. A., Shanks, O.C. 2008. A Bayesian method for calculating real-time quantitative PCR calibration curves using absolute plasmid DNA standards. *BMC Bioinformatics*, 9:120.
- Sobrinho, R., Millánb, J., Oleagac, A., Gortázarc, C., Fuente, J., Fons, F.R. 2012. Ecological preferences of exophilic and endophilic ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing wild carnivores in the Iberian Peninsula. *Vet. Parasitol.*, 184(2-4):248-257.
- Socolovschi, C., Huynh, T.P, Davoust, B., Gomez, J., Raoult, D., Parola, P. 2009. Transovarial and trans-stadial transmission of *Rickettsiae africae* in *Amblyomma variegatum* ticks. *BMC Bioinformatics*, 9:120.
- Solano-Gallegoa, L., Baneth, G. 2011. Babesiosis in dogs and cats —Expanding parasitological and clinical spectra. *Vet. Parasitol.*, 181:48-60.
- Söller, R., Wohltmann, A., Witte, H., Blohm, D. 2001. Phylogenetic relationships within terrestrial mites (Acari: Prostigmata, Parasitengona) inferred from

- comparative DNA sequence analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 18:47-53.
- Sonenshine, D.E. 1991. *Biology of ticks*. Oxford University Press, New York and Oxford, 1:273-275.
- Souza, C., Moraes-Filho, J., Souza, S., Ogrzewalska, M., Labruna, M.B. 2009. Experimental infection of capybaras *Hydrochaeris hydrochoerus* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajenense*. *Vet. Parasitol.*, 161(1-2):116-121.
- Smith, D.R. 2015. The past, present and future of mitochondrial genomics: have we sequenced mtDNA enough? *Brief. Funct. Genomics*, 1-8.
- Smith, D.R. 2016. Goodbye genome paper, hello genome report: the increasing popularity of 'genome announcements' and their impact on science. *Brief. Funct. Genomics*, 1-7.
- Szabó, M.P.J., Adriano Pinter, A., Labruna, M.B. 2013. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 3(27):1-9.
- Tian, Z., Liu, G., Xie, J., Yin, H., Luo, J., Zhang, L., Zhang, P., Luo, J. 2011. Discrimination between *Haemaphysalis longicornis* and *H. qinghaiensis* based on the partial 16S rDNA and the second internal transcribed spacer (ITS-2). *Exp. Appl. Acarol.*, 54(2):165-172.
- Venzal, J.M., Nava, S., González-Acuña, D., Mangold, A.J., Muñoz-Leal, S., Lado, P., Guglielmone, A.A. 2013. A new species of *Ornithodoros* (Acari: Argasidae), parasite of *Microlophus* spp. (Reptilia: Tropiduridae) from northern Chile. *Ticks Tick Borne Dis.*, 4:128-132.
- Vial, L. 2009. Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite*, 16:191-202.
- Walker, D.H., Ismail, N. 2008. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6:375-386.
- Wong, L.J.C., Senadheera, D. 1997. Direct Detection of multiple point mutations in Mitochondrial DNA. *Clin. Chem.*, 43(10):1857-1861.

- Yang, Z., Rannala, B. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nat. Rev. Genet.*, 13:303-314.
- Zhang, J., Chiodin, R., Badra, A., Zhang, G. 2011. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J. Genet. Genomics*, 38(3):95-109.

2. CAPÍTULO 2

ARTIGO ORIGINAL 1 - Caracterização organizacional e análise comparativa do mitogenoma do carrapato *Amblyomma sculptum*.

Resumo: Este estudo teve como objetivo aprofundar o conhecimento sobre o mitogenoma do subtipo *Amblyomma sculptum*, fornecendo dados genéticos que contribuam com estudos futuros sobre genética de populações e taxonômicos por morfologia, visando uma melhor compreensão sobre as inter-relações evolutivas dos membros do Complexo *Amblyomma cajennense*. Esta primeira descrição do genoma mitocondrial completo do carrapato *A. sculptum*, demonstrou arquitetura com estrutura circular, apresentando 37 genes, sendo 13 codificadores de proteínas, dois de RNA ribossomal (12S rRNA e 16S rRNA) e 22 transportadores de aminoácidos (tRNA). A análise comparativa foi realizada entre os mitogenomas de *A. sculptum* e seis espécies de referência do gênero *Amblyomma*. Por esta análise, observamos que o gene ND5, relacionado ao metabolismo energético, e as regiões controle 1 e 2 possuem características de marcadores moleculares evolutivos que podem ser aplicados na diferenciação dos carrapatos subtipos *A. sculptum* e *A. cajennense*.

Palavras-chaves: Complexo *Amblyomma cajennense*, sequenciamento de nova geração; mitogenoma; genômica comparativa, polimorfismo.

Title: Organizational characterization and comparative analysis of mitogenome of tick *Amblyomma sculptum*.

Abstract: The present study aimed to deepen the knowledge about the mitogenome of *Amblyomma sculptum* subtype, providing genetic information that can contribute to future studies on population genetics and taxonomic groups by morphology, thus aiming at a better understanding of the evolutionary interrelationships of the members of *Amblyomma cajennense* complex. This first description of the complete mitochondrial genome of the tick *A. sculptum* demonstrated architecture with circular structure, reporting 37 genes which 13 were encoding proteins, 2 of ribosomal RNA (12S rRNA and 16S rRNA) and 22 amino acid transporters (tRNA). The comparative analysis was conducted among mitogenome *A. sculptum* and six reference species of *Amblyomma* gender. For this analysis we observe that the ND5 gene related to energetic metabolism, and the control regions 1 and 2 have characteristics of evolutionary molecular markers that can be applied in the differentiate the subtype's ticks *A. sculptum* and *A. cajennense*.

Key words: Complex *Amblyomma cajennense*, new generation sequencing, mitogenome, comparative genomics, polymorphism.

2.1. INTRODUÇÃO

Com distribuição mundial, os carrapatos são notórios vetores de uma grande variedade de agentes infecciosos causadores de doenças hemoparasitoses, como babesioses (Labruna et al., 2006; Solano-Gallegoa & Baneth, 2011), riquetsioses (Labruna et al., 2006; Labruna et al., 2011a), erliquioses (Labruna et al., 2006; Harrus & Waner, 2011; Kelly et al., 2013), anaplasmoses (Kelly et al., 2013; Lasta et al., 2013) e hepatozoonose (Dantas-Torres, 2008; O'Dwyer, 2011). Nos carrapatos do gênero *Amblyomma*, o *Amblyomma cajennense* encontra-se distribuído na região Neotropical, desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina (Estrada-Peña, et al. 2004; Nava et al., 2014), destacando-se como de grande importância, seja no campo da saúde pública e na saúde de animais domésticos e silvestres (Estrada-Peña, et al. 2004; Guglielmone et al., 2006), seja pela interação destes na transmissão de agentes infecciosos. Nestes, destacamos atuação como a principal espécie vetora da bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente da Febre Maculosa Brasileira (Labruna et al., 2009; 2011a; Szabó et al., 2013, Saraiva et al., 2014).

Relatos relativamente recentes descreveram que o cruzamento de espécimes de populações do táxon *A. cajennense* provenientes de diferentes regiões geográficas, apresentavam desempenho reprodutivo com taxa de fertilidade reduzida, podendo este táxon englobar um complexo de espécies diferentes, com subtipos determinados pela distribuição biogeográfica (Labruna et al., 2011b; Mastropaolo et al., 2011). Estas pesquisas sugeriram novos estudos enfatizando a genética populacional e extensas análises morfológicas, visto estarem evidenciando várias particularidades biológicas, geográficas, genéticas e morfológicas. Estas particularidades sugerem a existência de um complexo com diferentes subtipos dentro do gênero *Amblyomma*. Estudos quanto a distribuição biogeográfica e a inferência filogenética de genes nucleares e mitocondriais no *A. cajennense*, demonstraram evidências referentes a elevada divergência genética, com caracterização críptica e pequena troca genética entre os isolados avaliados, resultando na identificação

de caracteres fenotípicos anteriormente ignorados (Beati et al., 2013). Por estes estudos filogenéticos, concluiu-se que este carrapato deveria ser diferenciado em seis clados definidos por regiões geográficas. Posteriormente, utilizando-se microscopia eletrônica de varredura, confirmou-se o status taxonômico de complexo para *A. cajennense*, reavaliando o táxon com base em análises da morfologia dos espécimes e na biogeográfica dos mesmos (Nava et al., 2014). Nesta reavaliação, *A. cajennense* foi redescrito, validando as espécies *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma mixtum* como dois subtipos diferentes, anteriormente conhecidos por sinonímia. Estes autores também descreveram e definiram *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. e *Amblyomma patinoi* n. sp, como 3 novas espécies integrantes do mesmo Complexo *A. cajennense*.

Neste contexto, nosso objetivo foi ampliar a base de conhecimentos acerca do genoma mitocondrial completo do carrapato subtipo *Amblyomma sculptum*, pertencente ao Complexo *A. cajennense*, e realizar a análise comparativa, entre este mitogenoma e outros relacionados às espécies de referência do gênero *Amblyomma*, com a finalidade de uma melhor identificação e diferenciação deste genoma mitocondrial em relação a outros membros do Complexo *A. cajennense*. Com isto, disponibilizar dados genéticos para estudos futuros taxonômicos e sobre genética de populações, e melhor compreender as inter-relações evolutivas dos membros do Complexo *A. cajennense*.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Busca das sequências em banco de dados

Buscas de sequências completas do genoma mitocondrial para exemplares de carrapatos da família Ixodidae, gênero *Amblyomma*, foram realizadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). Como resultado desta busca foram encontradas seis sequências mitocondriais para este gênero, sendo *A. cajennense* (NC_020333.1), *Amblyomma americanum* (NC_027609.1), *Amblyomma fimbriatum* (NC_017759.1), *Amblyomma*

triguttatum (NC_005963.1), *Amblyomma elaphense* (NC_017758.1) e *Amblyomma sphenodonti* (NC_017745.1).

2.2.2. Extração e purificação do DNA mitocondrial de *Amblyomma sculptum*

Devido as características estruturais semelhantes em termos de grau de condensação e dimensão entre o DNA mitocondrial das células eucariotas e o DNA plasmidial (Tintaya et al., 2013) foi utilizado kit específico para extração e purificação de DNA plasmidial. Assim, o DNA mitocondrial de duas fêmeas adultas da espécie *A. sculptum*, morfologicamente identificadas e descontaminadas, foi extraído e purificado através do QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, USA), sendo todo o procedimento realizado conforme o recomendado pelo fabricante.

2.2.3. Quantificação da amostra de DNA mitocondrial de *Amblyomma sculptum*

A amostra de DNA mitocondrial obtida foi quantificada utilizando o kit Quant-iT™ PicoGreen® (Invitrogen, UK), de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, o reagente fluorescente Picogreen 200x foi diluído com TE (Tris-EDTA) para a concentração de 1X, sendo as diluições seriadas preparadas de uma amostra de DNA lambda fornecida pelo kit e utilizada como padrão para a construção da curva padrão.

2.2.4. Preparo e normalização da amostra por PCR em tempo real

Para a preparação da biblioteca genômica mitocondrial para *A. sculptum* procedeu-se a fragmentação do DNA mitocondrial e a adição de sequências do adaptador e do index, de acordo com o Nextera DNA Sample Prep kit (Illumina, USA), utilizando-se aproximadamente 50 ng de DNA.

Após análise quanto à qualidade e quantificação com o auxílio do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA), a amostra de DNA foi preparada para uma concentração inicial de 10nM. Uma alíquota dessa biblioteca contendo 2 nM de fragmentos de DNA foi quantificada através de uma curva de quantificação absoluta utilizando o kit KAPA SYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystems, USA), conforme as recomendações do fabricante, em equipamento StepOne Real Time (Applied Biosystems, USA).

2.2.5. Clusterização da biblioteca - Genoma mitocondrial de *Amblyomma sculptum*

Para clusterização da biblioteca, 16 pMoles foram aplicados na superfície da lâmina de sequenciamento (flow cell) utilizando-se o sistema automatizado cBot Cluster Generation System (Illumina, USA). Nesse procedimento, os adaptadores presentes nas extremidades das bibliotecas foram ligados à oligonucleotídeos fixados na superfície da flow cell. O processo de indexação dos fragmentos à lâmina foi realizado segundo as recomendações do fabricante, utilizando o kit HiSeq cBot Manifold (Illumina, USA) e os reagentes do TrueSeq PE Cluster Kit v3 - cBot HS (Illumina, USA).

2.2.6. Sequenciamento de nova geração – Genoma mitocondrial de *Amblyomma sculptum*

O sequenciamento foi realizado em plataforma Illumina HiSeq 2500, no modo High Output. Este processo foi estabelecido por uma corrida utilizando o método de leitura paired-end, single indexed, com um total de 209 ciclos, sendo os 101 primeiros ciclos com a finalidade de realizar o sequenciamento do read 1 (100 pb) e os outros 101 ciclos para o read 2, enquanto os demais sete ciclos foram direcionados para o sequenciamento do barcode das bibliotecas, permitindo a separação dos adaptadores únicos de cada uma das bibliotecas. Os procedimentos foram realizados com a utilização do TrueSeq SBS Kit v3-HS – 200 cycles (Illumina, USA) de acordo com o protocolo do fabricante.

Neste sequenciamento foram geradas 148.451.690 reads com tamanho entre 81 a 101 nucleotídeos

2.2.7. Montagem e anotação funcional do genoma mitocondrial de *Amblyomma sculptum*

Para a análise da qualidade das sequências de reads geradas, utilizou-se o software FastQC versão 0.11.1 (Andrews, 2010). Após esta primeira análise, o software Trimmomatic, versão 2.32 (Bolger et al., 2014) foi utilizado com a finalidade de eliminar as bases sequenciadas com baixa qualidade (probabilidade de erro maior que 10^{-2} ; Q20) e remoção das reads menores que 75 nucleotídeos, correspondendo a 25,48% de eliminação. Após esta remoção foram contabilizadas 92.090.746 reads paired-end e 18.537.396 reads single, com tamanhos entre 75 a 101 nucleotídeos.

Os arquivos paired-end e single gerados com alta qualidade pelo Trimmomatic foram utilizados no processo de montagem da sequência consenso para caracterização do genoma mitocondrial do *A. sculptum*. Esta montagem foi realizada utilizando a sequência do genoma de *A. cajennense* (NC_020333.1) como genoma de referência. Nessa análise, as sequências das reads foram alinhadas no genoma de referência usando o software Bowtie2 versão 2.2.1 (Langmead & Salzberg, 2012), sendo a sequência consenso desse mapeamento obtida com o auxílio da ferramenta Bcftools do software SAMtools versão 1.01.19 (Li et al., 2009). Em seguida, a sequência do contig do genoma mitocondrial foi validada pelo mapeamento das reads usando o software CLC Genomics Workbench versão 6.5.1 (CLC bio, Denmark), onde 110.628.142 reads foram alinhadas, correspondendo a uma cobertura de 113,14 vezes.

Os genes mitocondriais foram preditos e anotados através da utilização do software DOGMA - Dual Organellar Genome Annotator (Wyman et al., 2004), considerando a configuração para genes mitocondriais de invertebrados, e pela comparação dessa predição com o genoma referência de *A. cajennense*, usando o software CLC Genomics Workbench.

2.2.8. Genômica comparativa entre as sequências do gênero *Amblyomma*

A sequência montada do genoma *A. sculptum* e demais sequências mitocondriais completas de *A. cajennense*, *A. americanum*, *A. fimbriatum*, *A. triguttatum*, *A. elaphense* e *A. sphenodonti* foram alinhadas usando o software ClustalW (Larkin et al., 2007). Através do software MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) e utilização do algoritmo de determinação p-distância, este alinhamento foi processado gerando matrizes de distância e a distância média entre as sequências mitocondriais do gênero *Amblyomma*. A composição do perfil de nucleotídeos das sequências foi obtido através do software Sequence Manipulation Suite - SMS versão 2.0 (Stothard, 2000).

Através do software MAUVE – Multiple Genome Alignment (Darling et al., 2010) foi realizado o alinhamento múltiplo em Blocos Colineares Locais (LBCs) com o objetivo de realizar a comparação dos genomas mitocondriais e verificar as possíveis variações estruturais originadas em processos evolutivos de rearranjos gênicos como processos por inversão, translocação, inserção, deleção e duplicação entre as sequências analisadas.

2.2.9. Análise dos polimorfismos entre as sequências do gênero *Amblyomma*

Utilizando o aplicativo de genotipagem do software CLC Genomics Workbench, foi realizada a análise comparativa dos polimorfismos entre a sequência de *A. sculptum* e as sequências das espécies *A. cajennense*, *A. americanum*, *A. fimbriatum*, *A. triguttatum*, *A. elaphense* e *A. sphenodonti*. Nesta análise somente foram considerados polimórficos os SNPs com frequência de 100% e cobertura maior que 10 vezes. O índice de qualidade da predição dos polimorfismos foi estabelecido com a probabilidade de erro de 10^{-3} (Q30) para os nucleotídeos.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Caracterização organizacional do mitogenoma de *Amblyomma sculptum*

O genoma mitocondrial completo para *A. sculptum* foi depositado no GeneBank sob o número de acesso KX_622791, equivalendo a uma sequência circular de 14.780pb (Figura 3.A), composta por 37 genes no total, característicos de metazoários e artrópodes (Shao et al., 2006), sendo 13 genes codificadores de proteínas (GCPs), todas subunidades do complexo da cadeia respiratória, dois genes de RNA ribossomal (12S rRNA e 16S rRNA) e 22 genes transportadores de aminoácidos (tRNA), necessários para a síntese de proteínas mitocondriais. Vinte e três genes foram transcritos no sentido da fita positiva e 14 foram orientados para transcrição no sentido da fita negativa (Tabela 4). A ordenação e o sentido de leitura dos 37 genes, para *A. sculptum*, apresentaram o mesmo padrão encontrados nos outros mitogenomas dos carrapatos pertencentes a sub-família Metastriata (Burger, et al. 2012; 2013; 2014; Williams-Newkirka, et al., 2015).

Treze sítios de clivagem para enzimas de restrição foram descritos no mitogenoma de *A. sculptum* (Figura 3.B; Tabela S1 - Anexos Capítulo 2), sendo os mesmos apresentados no mitogenoma de *A. cajennense*, com este possuindo um sítio de restrição HindIII a mais. Trechos gênicos em sobreposição foram encontrados em 10 combinações de genes, envolvendo um total de 72 pb sobrepostas. A maior sobreposição com 24 pb foi encontrada entre os genes tRNA-Glu e ND1 (Tabela 4; Tabela S2 – Anexos Capítulo 2). Além das regiões controles 1 e 2 (regiões não codificadoras) contendo 304 pb cada, típicas de carrapatos do grupo Metastriata (Campbell, et al., 1999; Shao et al., 2004), várias outras regiões intergênicas não codificadoras apresentam-se no mitogenoma de *A. sculptum* (Tabela 4; Tabela S3 - Anexos Capítulo 2).

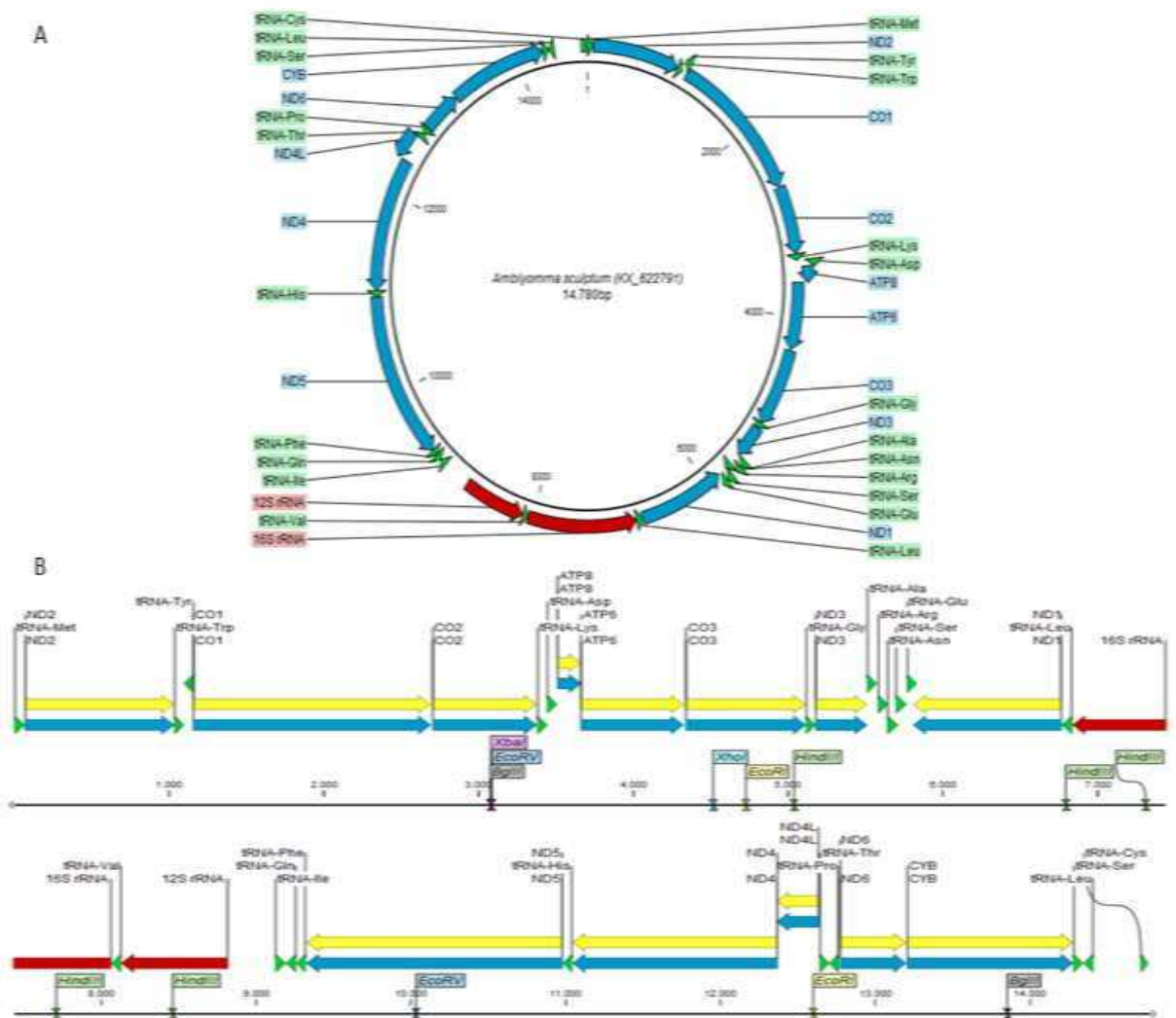


Figura 3: Organização do genoma mitocondrial de *Amblyomma sculptum*.

Nota: (A) Formato circular com os 37 genes. (B) Formato linear com os 37 genes mais a representação do CDS (em amarelo) referente a cada gene codificador de proteína e os sítios de enzimas de restrição. As Regiões Controle 1 e 2 são localizadas, respectivamente, entre os genes 12S rRNA/tRNA-Ile e tRNA-Leu/tRNA-Cys.

Tabela 4: Ordenamento de genes, posição do gene, espaços intergênicos, sobreposição gênica e sentido da transcrição na fita de DNA no genoma mitocondrial de *Amblyomma sculptum*.

Genes	Posição do gene & Regiões Intergênicas		Tamanho do gene e das Regiões Intergênicas (pb)	Sentido do gene na fita de DNA
//* tRNA-Met	1	68	68	positivo
ND2	69	1034	966	positivo
tRNA-Trp	1035	1096 ^b	62	positivo
tRNA-Tyr	1095 ^b	1161 ^b	67	negativo
CO1	1154 ^b	2692	1539	positivo
CO1 - CO2 ^a	2693 ^a	2701 ^a	9	-
CO2	2702	3376	675	positivo
CO2 - tRNA-Lys ^a	3377 ^a	3378 ^a	2	-
tRNA-Lys	3379	3444 ^b	66	positivo
tRNA-Asp	3443 ^b	3507 ^b	65	positivo
ATP8	3507 ^b	3665 ^b	159	positivo
ATP6	3659 ^b	4324	666	positivo
ATP6 - CO3 ^a	4325 ^a	4336 ^a	12	-
CO3	4337	5114	778	positivo
tRNA-Gly	5115	5175	61	positivo
ND3	5176	5511 ^b	336	positivo
tRNA-Ala	5510 ^b	5572	63	positivo
tRNA-Ala - tRNA-Arg ^a	5573 ^a	5580 ^a	8	-
tRNA-Arg	5581	5644 ^b	64	positivo
tRNA-Asn	5640 ^b	5709 ^b	70	positivo
tRNA-Ser	5696 ^b	5764	69	positivo
tRNA-Ser - tRNA-Glu ^a	5765 ^a	5766 ^a	2	-
tRNA-Glu	5767	5831 ^b	65	positivo
ND1	5808 ^b	6767	960	negativo
tRNA-Leu	6768	6836	69	negativo
16S rRNA	6837	8065	1229	negativo

Continua...

(Continuação: Tabela 4)

Genes	Posição do gene & Regiões Intergênicas		Tamanho do gene e das Regiões Intergênicas (pb)	Sentido do gene na fita de DNA
TRNA-Val	8066	8128	63	negativo
12S rRNA	8129	8819	691	negativo
12SrRNA – tRNA-Ile (RC1) ^a	8820 ^a	9123 ^a	304	-
tRNA-Ile	9124	9191	68	positivo
tRNA-Ile - tRNA-Gln ^a	9192 ^a	9193 ^a	2	-
tRNA-Gln	9194	9259	66	negativo
tRNA-Gln - tRNA-Phe ^a	9260 ^a		1	-
TRNA-Phe	9261	9320	60	negativo
tRNA-Phe – ND5 ^a	9321 ^a	9324 ^a	4	-
ND5	9325	10980	1656	negativo
tRNA-His	10981	11042	62	negativo
tRNA-His – ND4 ^a	11043 ^a		1	-
ND4	11044	12369 ^b	1326	negativo
ND4L	12363 ^b	12638	276	negativo
ND4L – tRNA-Thr ^a	12639 ^a	12640 ^a	2	-
tRNA-Thr	12641	12702	62	positivo
tRNA-Pro	12703	12764	62	negativo
tRNA-Pro - ND6 ^a	12765 ^a	12770 ^a	6	-
ND6	12771	13199	429	positivo
ND6 – CYB ^a	13200 ^a	13202 ^a	3	-
CYB	13203	14278	1076	positivo
tRNA-Ser	14279	14342	64	positivo
tRNA-Ser – tRNA-Leu ^a	14343 ^a	14345 ^a	3	-
tRNA-Leu	14346	14409	64	negativo
tRNA-Leu – tRNA-Cys (RC2) ^a	14410 ^a	14713 ^a	304	-
tRNA-Cys	14714	14764	51	positivo
tRNA-Cys - tRNA-Met ^a //*	14765 ^a	14780 ^a	16	-

Nota: ^a Regiões intergênicas; ^b Trechos de sobreposição gênica; (RC1)^a e (RC2)^a - Região Controle 1 e 2; // * - Ligação circular do mitogenoma de *Amblyomma sculptum*.

A sequência nucleotídica do mitogenoma de *A. sculptum* apresentou 36,90% de adenina, 39,20% de timina, 10,03% de guanina e 13,87% de citosina. O conteúdo AT teve uma participação maior no genoma com 76,10%, contra um conteúdo de GC de 23,90%, sendo estas características bem típicas do genoma mitocondrial de metazoários artrópodes (Castellana et al., 2011) e semelhantes aos dados de GC encontrados, em estudos filogenéticos de carrapatos da família Ixodidae (Burger et al. 2012, 2013; Williams-Newkirka et al., 2015). Em ácaros, o DNA mitocondrial apresenta elevada variabilidade e tendência de códons ricos em conteúdo AT, sendo estas, condições que dificultam o desenho de primers universais para a amplificação de regiões específicas (Dabert, 2006), uma vez que os valores obtidos não atingem a composição ideal que varia de 40 a 60% de GC (Yang et al., 2008; Nonis et al., 2011). Em metazoários, as regiões que apresentam taxa evolutiva mais rápida são aquelas possuidoras de fraco conteúdo AT e forte GC, com predomínio de substituições por inserção destes últimos nucleotídeos desde a divergência de um ancestral (Su et al., 2011). A baixa concentração de GC nos mitogenomas das espécies de *Amblyomma* aqui analisadas, pode ser um indicativo do estágio elevado de conservação desta estrutura gênica. A composição do perfil de nucleotídeos para *A. sculptum* apresentou pouca variação quando comparada, principalmente, com os valores obtidos para *A. cajennense* (Tabela S4 - Anexos Capítulo 2).

2.3.2. Genômica comparativa entre os mitogenomas completos do gênero *Amblyomma*

Valores das matrizes de distância e identidade para as sequências mitogenômicas de *A. sculptum* e *A. cajennense* confirmam um elevado grau de conservação e uma estreita ligação evolutiva entre estas duas espécies, respectivamente, 0,008 e 99,20% (Tabela 5), o que vem a corroborar dados anteriores (Beati et al., 2013; Nava et al., 2014), indicando que o Complexo *A. cajennense* engloba estas duas espécies, já para o índice de identidade média

do agrupamento, o valor de 76,70%, seja indicativo desta conservação moderada entre as sequências analisadas.

Tabela 5: Matrizes de distância e identidade do mitogenoma completo do gênero *Amblyomma*.

Matriz p-distância	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>Amblyomma sculptum</i>	-	-	-	-	-	-	-
2. <i>Amblyomma cajennense</i>	0,008	-	-	-	-	-	-
3. <i>Amblyomma americanum</i>	0,190	0,191	-	-	-	-	-
4. <i>Amblyomma triguttatum</i>	0,222	0,223	0,222	-	-	-	-
5. <i>Amblyomma fimbriatum</i>	0,237	0,238	0,231	0,240	-	-	-
6. <i>Amblyomma elaphense</i>	0,265	0,266	0,262	0,261	0,269	-	-
7. <i>Amblyomma sphenodonti</i>	0,267	0,268	0,258	0,260	0,269	0,249	-
Matriz Identidade	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>Amblyomma sculptum</i>	-	-	-	-	-	-	-
2. <i>Amblyomma cajennense</i>	99,20%	-	-	-	-	-	-
3. <i>Amblyomma americanum</i>	81,00%	81,00%	-	-	-	-	-
4. <i>Amblyomma triguttatum</i>	78,00%	78,00%	78,00%	-	-	-	-
5. <i>Amblyomma fimbriatum</i>	76,00%	76,00%	77,00%	76,00%	-	-	-
6. <i>Amblyomma elaphense</i>	74,00%	73,00%	74,00%	74,00%	73,00%	-	-
7. <i>Amblyomma sphenodonti</i>	73,00%	73,00%	74,00%	74,00%	73,00%	75,00%	-
Grupo	Distância Média & Desvio Padrão					Identidade Média	
<i>Amblyomma</i>	0,233 ± 0,001818					76,70%	

O alinhamento comparativo e organizacional dos genomas mitocondriais, obtido pela análise do software MAUVE para as sete espécies do gênero *Amblyomma* analisadas (Figura 4), corroborou os indicativos das matrizes distância, identidade e distância média. Através da análise dos LCBs ficaram demonstradas elevadas taxas de conservação e colinearidade em relação aos genes desses genomas, mais precisamente para o agrupamento de alinhamento entre *A. sculptum* e *A. cajennense*. Estes achados também foram demonstrados na análise do alinhamento para o agrupamento de *A. americanum*, *A. fimbriatum*, *A. triguttatum*, *A. elaphense* e *A. sphenodonti*. Na análise comparativa dos LCBs evidenciamos a inexistência de grandes rearranjos gênicos entre o agrupamento de alinhamento das sequências de *A. sculptum* e *A. cajennense* e o agrupamento dos demais mitogenomas de *Amblyomma*. Desta forma, caracterizamos sintonia variada, sendo elevada dentro dos dois agrupamentos e moderada entre os dois agrupamentos, o que seria devido à baixa taxa de rearranjos gênicos entre as espécies analisadas.

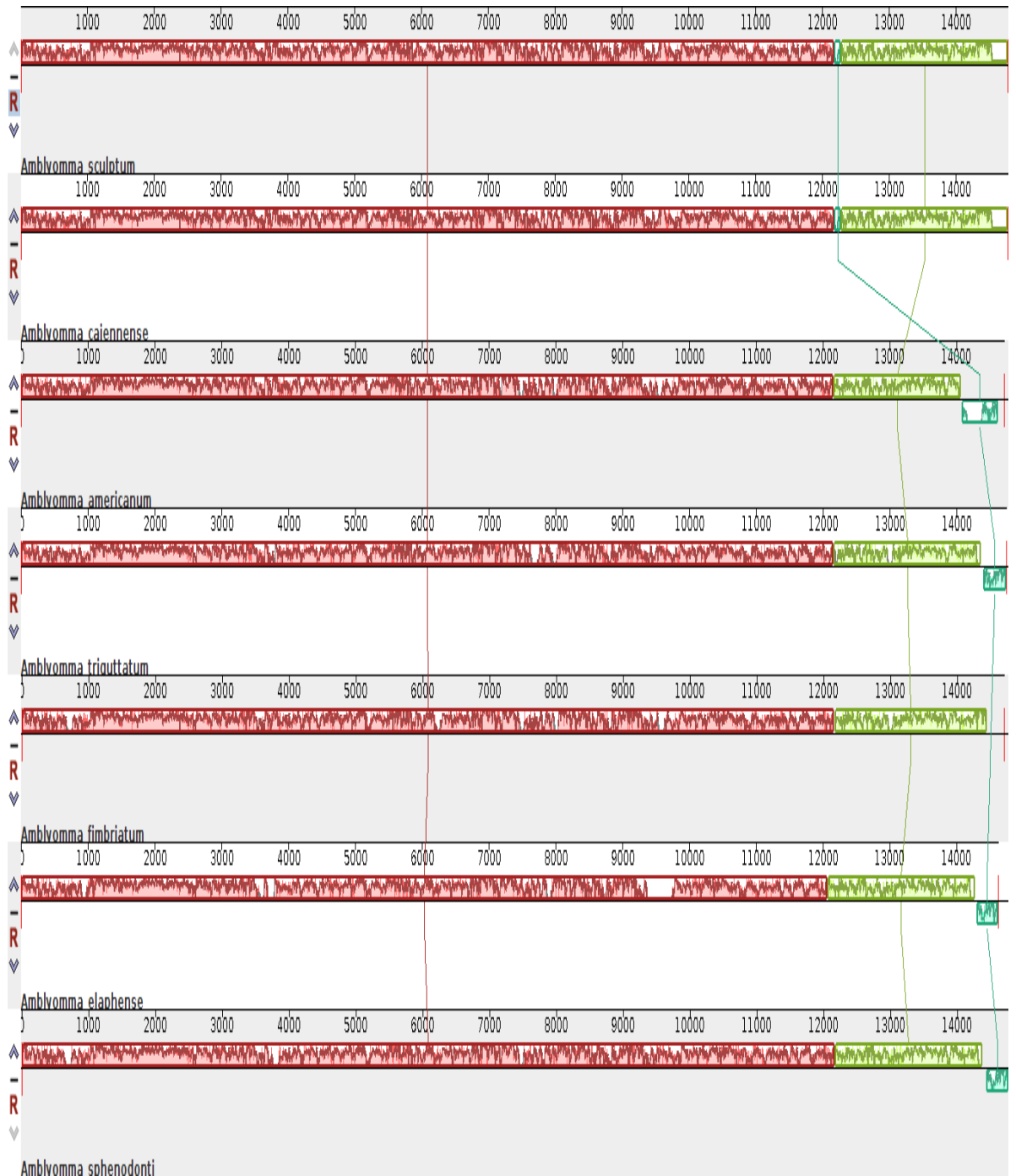


Figura 4: Alinhamento comparativo e organizacional dos genomas mitocondriais completos de carrapatos do gênero *Amblyomma*.

Nota: a linha de cor vermelha conecta blocos conservados e a presença de linhas verde e azul cruzadas correspondem, respectivamente, a rearranjos gênicos por translocação e translocação com inversão.

Na análise do alinhamento comparativo identificamos tendência conservada para a organização mitogenômica do gênero *Amblyomma*, com os LCBs apresentados para *A. sculptum* e *A. cajennense* evidenciando uma

estreita ligação entre estas duas espécies, preconizando a diferenciação destas duas com relação as demais espécies analisadas. Esta diferenciação poderia ser considerada uma característica específica dos subtipos do Complexo *A. cajennense* para com os demais membros do gênero *Amblyomma*. Este achado demonstra a existência de rearranjos gênicos por translocação e inversão, como evidenciado no intervalo gênico compreendido, aproximadamente, entre 12.070 a 14.780 pb. Os dois blocos envolvidos englobam os genes codificadores das proteínas ND4L, ND6 e CYB, os genes codificadores para RNA transportador tRNA-Pro, tRNA-Thr, tRNA-Leu e tRNA-Cys e a região controle 2 (Figura 3.B; Figura 4). No alinhamento comparativo, o grau de conservação de uma determinada região dos LCBs é indicado pelo perfil de similaridade, identificado pelas cores de cada bloco, e também, pelo nível de identidade que corresponde à altura dos picos dentro do bloco (Darling et al., 2010).

2.3.3. Análise dos polimorfismos entre as sequências do gênero *Amblyomma*

Para análise de polimorfismo, o genoma mitocondrial do *A. sculptum* foi confrontado com os genomas de referência das demais espécies do gênero *Amblyomma*. De forma geral, a análise comparativa dos polimorfismos nas sequências avaliadas indicou baixo perfil polimórfico entre as sequências de aminoácidos. Este achado seria mais um indicativo do nível de conservação evolutiva das sequências analisadas, principalmente quando se comparam as sequências mitogenômicas de *A. cajennense* e *A. sculptum* (Tabela 6).

Tabela 6: Alterações baseadas em polimorfismo de sequências mitocondriais e perfil de aminoácidos nas sequências de proteínas do complexo da cadeia respiratória em algumas espécies do gênero *Amblyomma*.

Genoma Referência Vs.	A. <i>sculptum</i>	Genes Mitocondriais Codificadores de Proteínas														CR (%) ^a
		COX1	COX2	COX3	ATP6	ATP8	CYB	ND1	ND2	ND3	ND4	ND4L	ND5	ND6	TPSeq	
<i>Amblyomma cajennense</i>	X	0	1	1	1	1	3	0	2	1	2	0	7	1	20	-
	Y	512	224	259	221	52	358	319	321	111	441	91	551	142	3602 ^b	100
	Z	0,00	0,45	0,39	0,45	1,92	0,84	0,00	0,62	0,90	0,45	0,00	1,27	0,70	0,56 ^c	-
<i>Amblyomma americanum</i>	X	15	19	16	28	4	33	27	19	2	28	20	22	6	239	-
	Y	512	224	259	221	52	358	316	321	110	441	91	547	142	3594 ^b	83
	Z	2,93	8,48	6,18	12,67	7,69	9,22	8,54	5,92	1,82	6,35	21,98	4,02	4,23	6,65 ^c	-
<i>Amblyomma triguttatum</i>	X	14	9	22	13	2	36	39	17	1	26	15	39	1	234	-
	Y	507	224	259	220	54	358	333	321	113	442	91	551	142	3615 ^b	74
	Z	2,76	4,02	8,49	5,91	3,70	10,06	11,71	5,30	0,88	5,88	16,48	7,08	0,70	6,47 ^c	-
<i>Amblyomma fimbriatum</i>	X	18	15	12	12	5	43	16	3	2	23	6	39	1	195	-
	Y	512	224	259	220	52	358	330	320	112	442	91	552	142	3614 ^b	68
	Z	3,52	6,70	4,63	5,45	9,62	12,01	4,85	0,94	1,79	5,20	6,59	7,07	0,70	5,40 ^c	-
<i>Amblyomma elaphense</i>	X	31	8	14	11	2	28	11	10	3	15	8	20	0	161	-
	Y	511	225	258	220	51	359	315	320	112	437	89	555	144	3596 ^b	61
	Z	6,07	3,56	5,43	5,00	3,92	7,80	3,49	3,13	2,68	3,43	8,99	3,60	0,00	4,48 ^c	-
<i>Amblyomma sphenodonti</i>	X	27	12	20	5	4	21	15	10	0	25	18	7	1	165	-
	Y	511	224	259	221	52	359	326	319	113	438	91	555	144	3612 ^b	60
	Z	5,28	5,36	7,72	2,26	7,69	5,85	4,60	3,13	0,00	5,71	19,78	1,26	0,69	4,57 ^c	-

Nota: X - Diferença de polimorfismo entre as sequências de proteínas comparadas; Y - Número de resíduos de aminoácidos na proteína; Z - Diferença de resíduos de aminoácidos em %; TPSeq - Total de polimorfismo por sequências comparadas; ^aCR - Cobertura do alinhamento das reads em porcentagem no genoma referência; ^bTotal de resíduos de aminoácidos por sequências comparadas; ^cPorcentagem de resíduos de aminoácidos por sequências comparadas.

A redução do polimorfismo entre as comparações de sequências de referências e *A. sculptum*, caracterizada pela porcentagem de resíduos de aminoácidos por sequências comparadas (letra c, Tabela 6), pode ser explicada pela menor frequência de reads alinhados entre os genomas. Este achado seria corroborado pela menor cobertura do alinhamento das reads (CR) e pela maior divergência entre os genomas de referência analisados e o genoma do *A. sculptum*.

Avaliando perfis das alterações na substituição de nucleotídeos, em termos de local (sítios) e tipo de resíduos de aminoácidos, no gene ND5 (NADH desidrogenase subunidade 5) para *A. americanum*, *A. fimbriatum*, *A. triguttatum*, *A. elaphense* e *A. sphenodonti*, observamos diferentes padrões entre estas espécies em relação a sequência mitocondrial de *A. sculptum*. Entretanto, foi na comparação das sequências mitogenômicas de *A. cajennense* e *A. sculptum* que observamos uma diferenciação específica do gene ND5 entre estes dois membros do Complexo *Amblyomma cajennense*.

Apesar da alta similaridade entre as sequências de nucleotídeos de *A. cajennense* e *A. sculptum*, a análise comparativa para polimorfismo identificou sete alterações pontuais em locais de substituição de nucleotídeos (sítios) e tipo de resíduos de aminoácidos na sequência do gene ND5 para estas duas espécies. Este gene é um importante integrante do complexo I (NADH-desidrogenase) da cadeia respiratória (engloba os genes ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 e ND6) em metazoários, sendo funcionalmente um dos responsáveis pela transferência de elétrons do $\text{NADH}+\text{H}^+$ para a ubiquinona, estando diretamente envolvido no processo de síntese de ATP (Fonseca et al., 2008).

Do total das substituições de nucleotídeos na sequência do gene ND5 que evidenciamos, cinco são decorrentes de transições de purinas e duas por transversão (Tabela 7). Este achado indicaria que a sequência aminoacídica da proteína expressada, juntamente com seus sítios de troca e seus respectivos resíduos de aminoácidos, constituiriam um indicativo específico para diferenciação a nível molecular de *A. sculptum* e *A. cajennense*. Mais estudos confrontando estes sítios e seus respectivos resíduos de aminoácidos versus

as sequências de nucleotídeos e proteína deste gene para os demais membros do complexo *A. cajennense* fazem-se necessários para elucidação de tal achado.

Tabela 7: Perfil polimórfico para o gene ND5 entre as seqüências mitogênicas do *A. sculptum* e *A. cajennense*.

<i>Amblyomma sculptum</i> Vs. <i>Amblyomma cajennense</i>									
Posição (sítios de troca) no gene de referência	Gene de Ref. ^A	Gene Alelo ^B	Número de cobertura ^C	Índice "Q" Qualidade média da seqüência	Posição da troca ^D	Nucleotídeos alterados ^D	Posição da mudança no códon (sítio) do RNAm	Posição da troca ^E	Mudança de resíduo de aminoácido
9344	G	A	10	36,50	1637	C > U	2°	546	Treonina → Metionina
9492	G	A	22	38,41	1489	C > U	1°	497	Prolina → Serina
9503	A	G	21	38,81	1478	U > C	2°	493	Valina → Alanina
9648	G	A	50	38,00	1333	C > U	1°	445	Prolina → Serina
9745	T	A	53	37,85	1236	A > U	3°	412	Leucina → Fenil-alanina
10061	G	A	151	37,94	920	C > U	2°	307	Alanina → Valina
10938	A	T	91	38,53	43	U > A	1°	15	Leucina → Metionina

Nota: ^AGene de referência representado pelo *Amblyomma cajennense*; ^BGene alelo representando *Amblyomma sculptum*; ^Ccom 100% de frequência; ^Dna região de codificação nas seqüências de RNAm; ^Edos resíduos de aminoácidos nas seqüências de proteína ND5.

Pelas análises de polimorfismo e dos alinhamentos de resíduos de nucleotídeos entre as regiões controle 1 e 2 das espécies do gênero *Amblyomma*, verificamos que estas regiões não codificadoras apresentam potencial de uso como marcador molecular para a diferenciação de *A. sculptum* das demais espécies analisadas. Apesar da alta similaridade das regiões controle 1 e 2, entre *A. sculptum* e *A. cajennense*, estas regiões permitem o desenho de conjuntos de primers espécie-específicos para a diferenciação destes dois subtipos do Complexo *Amblyomma cajennense*. Demonstrativo de similaridade dos primers forward e reverse para as sequências sense e anti-sense da região controle 1 e 2 para *Amblyomma sculptum* juntamente com seus fragmentos produzidos são apresentados nas Figuras S1 e S2 (Anexos Capítulo 2).

Informações suplementares sobre os resultados das comparações polimórficas entre o mitogenoma de *A. sculptum* e das espécies utilizadas neste estudo, como genomas de referência, estão apresentadas em material suplementar referente às Planilhas S1, S2, S3, S4, S5 e S6 (Anexos Capítulo 2), respectivamente para os genomas mitocondriais de *Amblyomma cajennense*, *A. americanum*, *A. fimbriatum*, *A. triguttatum*, *A. elaphense* e *A. sphenodonti*.

2.4. DISCUSSÃO

A estruturação genômica da sequência de *A. sculptum* foi comparada principalmente ao genoma de *A. cajennense* visto, dentre as demais espécies estudadas, ser esta, a que apresenta ligação evolutiva mais estreita. Isto deve-se ao fato de ambas as espécies pertencerem ao mesmo grupo taxonômico, o Complexo *Amblyomma cajennense*, conforme preconizado por Beati et al. (2013) e Nava et al. (2014).

As matrizes calculadas para distância, identidade e distância média apresentaram valores que caracterizam uma relação moderadamente conservada entre as sequências que analisamos. Questões recentes enfatizam que *A. elaphense* (Burger et al., 2012; 2013) e *A. sphenodonti* (Miller et al., 2007; Burger et al., 2012; 2013) possam participar de um outro agrupamento taxonômico, que não seja do gênero *Amblyomma*, visto indicações de que

estas espécies não apresentam uma relação monofilética com os demais membros deste agrupamento, demandando mais análises para determinação de suas posições taxonômicas. Possivelmente o índice de identidade média do agrupamento, com o valor de 76,70%, seja indicativo desta conservação moderada entre as sequências de *A. elaphense* e *A. sphenodonti* e as demais sequências analisadas.

Conforme achados anteriores, a sintenia ou colinearidade dos blocos apresentados na análise comparativa dos mitogenomas do gênero *Amblyomma*, corresponde ao predomínio da conservação da ordem precisa e conteúdo dos genes entre espécies inter-relacionados em relação a um antepassado comum (Chauve & Tannier, 2008; Rödelsperger & Dieterich, 2010). O grau de conservação da sintenia dos blocos verificado no alinhamento comparativo que realizamos é um indicativo de que os genes que compõem o genoma mitocondrial do gênero *Amblyomma*, possuem grande importância funcional, como era de se esperar, uma vez que em metazoários estes genes são conservados e codificadores de proteínas integrantes dos complexos da cadeia respiratória (Wolstenholme, 1992; Fonseca et al., 2008). Relatada anteriormente, a ausência ou reduzida recombinação e a elevada conservação da ordem em que os genes estão arranjados, seria uma característica típica dos genomas mitocondriais (Li et al., 2012). Para níveis taxonômicos mais baixos, como família e gênero, o conteúdo do genoma mitocondrial em metazoário, em termos de número e ordem de genes é conservado, diferenciando-se em níveis taxonômicos mais elevados (Shao et al., 2006). A utilização de dados provenientes de mitogenomas tem enfatizado a resolução das relações filogenéticas a nível de populações de carrapatos (Burger et al., 2012, 2013) proporcionando rica fonte de dados marcadores moleculares para a identificação e resolução destas relações, em estudos de genética de populações e evolução (Shao & Barker, 2007).

Na comparação dos mitogenomas, *A. sculptum* e *A. cajennense* apresentaram-se estreitamente relacionados, com a variação intra-específica muito baixa para todos os genes, destacando-se a maior diferenciação polimórfica para o gene NAD5. Estudo realizado com ixodídeos e argasídeos para os genes COX1 e NAD5, apresentou resultados semelhantes em relação aos destacados no atual trabalho (Chitimia et al., 2010). Em estudos

filogenéticos de moscas, tem sido verificado que o gene mitocondrial ND5 apresenta poucas diferenças genéticas em relação ao gene COX1 (Citocromo c oxidase subunidade 1), gene este conhecido pelo seu grande potencial de marcação molecular em estudos evolutivos (Mandal et al., 2014). Este gene foi utilizado na diferenciação geográfica e identificação de mudanças na estrutura populacional entre as populações do mosquito *Aedes albopictus* introduzidas nos Estados Unidos e Brasil (Birungib & Munstermann, 2002), bem como na identificação das variantes das populações desta espécie na Itália, Camarões e Hawaii (Usmani-Brown et al., 2009). O potencial do gene ND5 como marcador molecular evolutivo para a diferenciação de populações de borboletas de origem monofilética foi verificado como de resolução filogenética superior ao gene COX1 (Norgate et al., 2009). Os resultados obtidos por estes pesquisadores, principalmente o apresentado por Norgate et al. (2009), vem a corroborar os achados que aqui apresentamos, visto o gene COX1, em relação ao ND5, não ter apresentado nenhuma alteração do seu perfil polimórfico, na comparação entre os mitogenomas de *A. sculptum* e *A. cajennense*. Este fato, mais o conteúdo polimórfico apresentado pelo gene ND5, constitui um indicativo que este gene denota potencial de utilização como marcador molecular para a diferenciação destes dois subtipos do Complexo *A. cajennense*.

2.5. CONCLUSÃO

Esta primeira descrição do genoma mitocondrial completo do carrapato *A. sculptum* e os resultados das análises genéticas comparativas entre espécies do gênero *Amblyomma*, sugerem alta identidade entre os mitogenomas de *A. sculptum* e *A. cajennense*, caracterizando-os como dois subtipos do Complexo *A. cajennense*, fato este, que corrobora o achado por Nava et al. (2014).

Dentre os achados, destacamos o gene ND5 e as regiões controle 1 e 2 com características que os credenciam a atuarem como marcadores moleculares evolutivos para a diferenciação dos carrapatos subtipos *A. sculptum* e *A. cajennense*. Análises comparativas futuras fazem-se necessárias com sequências mitogenômicas dos demais membros do Complexo *A. cajennense*. Entendemos que estes achados são de grande contribuição para estudos futuros de genética de populações, o que virá possibilitar uma melhor compreensão da interação entre os mecanismos evolutivos moleculares e morfológicos dos carrapatos ixodídeos pertencentes a este complexo.

2.6. REFERENCIAL BILIOGRÁFICO

- Andrews, S., 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (acesso: 27/03/2016).
- Beati, L., Nava, S., Burkman, E.J., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., Guglielmone, A.A., Caceres, A.G., Guzmán-Cornejo, C.M., León, R., Durden, L.A., Faccini, J.L.H., 2013. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evol. Biol.*, 13:267.
- Birungib, J., Munstermann, L.E., 2002. Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial nd5 sequences: evidence for an independent invasion into Brazil and United States. *Ann. of the Entomol. Soc. Am.*, 95(1):125-132.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, 1-7.
- Burger, T.D., Shao, R., Beati, L., Miller, H., Barker, S.C., 2012. Phylogenetic analysis of ticks (Acari: Ixodida) using mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes indicates that the genus *Amblyomma* is polyphyletic. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 64:45-55.
- Burger, T.D., Shao, R., Barker, S.C., 2013. Phylogenetic analysis of the mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes of ticks reveals a deep phylogenetic structure within the genus *Haemaphysalis* and further elucidates the polyphyly of the genus *Amblyomma* with respect to *Amblyomma sphenodonti* and *Amblyomma elaphense*. *Ticks Tick Borne Dis.*, 4:265-274.
- Campbell, J.N.H., Barker, C.S., 1999. The novel mitochondrial gene arrangement of the cattle tick, *Boophilus microplus* tandem fivefold repetition of the coding region. *Mol. Biol. Evol.*, 16:732-740.
- Castellana, S., Vicario, S., Saccone, C., 2011. Evolutionary patterns of the mitochondrial genome in metazoa: exploring the role of mutation and selection in mitochondrial protein-coding genes. *Gen. Biol. Evol.*, 3:1067-1079.
- Chauve, C., Tannier, E., 2008. A methodological framework for the reconstruction of contiguous regions of ancestral genomes and its application to mammalian genomes. *Plos Comput. Biol.*, 4(11):e1000234.

- Chitimia, L., Lin, R.Q., Cosoroaba, I., Wu, X.Y., Song, H.Q., Yuan, Z.G., Zhu, X.Q. 2010. Genetic characterization of ticks from southwestern Romania by sequences of mitochondrial *cox1* and *nad5* genes. *Exp. Appl. Acarol.*, 52:305-311.
- Dabert, M. 2006. DNA markers in the phylogenetics of the Acari. *Biol. Lett. Rev.*, 43(2):97-107.
- Dantas-Torres, F., 2008. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit. & Vect. Rev.*, 1-17.
- Darling, A.E., Bad, B., Leg, N.T., 2010. Progressive MAUVE: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One*, 5(6):e11147.
- Estrada-Peña, A., Guglielmone, A., Mangold, A.J., 2004. The distribution and ecological preferences of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. *Annals of Trop. Med. Parasitol.*, 98(3): 283-292.
- Fonseca, R.R., Johnson, W.E., O'Brien, S.J., Ramos, M.J., Antunes, A., 2008. The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomics*, 4(9):119.
- Guglielmone, A.A., Beati, L.L., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.D., Nava, S., Venzal, J.M., Mangold, A.J., Szabó, M.P.J., Martins, J.R., González-Acuña, D., Estrada-Peña, A., 2006. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp. & Appl. Acarol.*, 40(2):83-100.
- Kelly, P.J., Chuanling Xu, C., Lucas, H., Loftis, A., Abete, J., Zeoli, F., Stevens, A., Jaegersen, K., Ackerson, K., Gessner, A., Kaltenboeck, B., Wang, C., 2013. Ehrlichiosis, Babesiosis, Anaplasmosis and Hepatozoonosis in Dogs from St. Kitts, West Indies. *PLoS One*, 8(1):e53450.
- Harrus, S., Waner, T., 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*), An overview. *Vet. J.*, 187:292-296.
- Labruna, M.B., Machado, R.Z., 2006. Agentes transmitidos por carrapatos na região neotropical, in: Barros-Battesti, D.M., Arzua, M., Bechara, G.H. (Eds. 1), Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical, um guia ilustrado para a identificação de espécies. *Vox/ICTTD-3/Butantan*, São Paulo, pp. 115-138.
- Labruna, M.B., 2009. Ecology of rickettsia in South America. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1166:156-66.

- Labruna, M.B., Mattar, S., Nava, S., Bermudez, S., Venzal, J.M., Dolz, G., Abarca, K., Romero, L., Sousa, R., Oteo, J., Zavala-Castro, J., 2011a. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev.MVZ Córdoba*, 16(2):2435-2457.
- Labruna, M.B., Soares, J.F., Martins, T.F., Soares, H.S., Cabrera, R.R. 2011b. Cross-mating experiments with geographically different populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.*, 54:41-49.
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie2. *Nat. Methods*, 9:357-359.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. *ClustalW and ClustalX version 2*. *Bioinformatics*, 23(21):2947-2948.
- Lasta, C.S., Santos, A.P., Messick, J.B., Oliveira, S.T., Biondo, A.W., Vieira, R.F., Dalmolin, M.L., González, F.H.D., 2013. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 22(3):360-366.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25:2078-2079.
- Li, H., Liu, H., Shi A., Stys, P., Zhou, X., Cai, W., 2012. The complete mitochondrial genome and novel gene arrangement of the unique - headed bug *Stenopirates* sp. (Hemiptera: Enicocephalidae). *PLoS One*, 7(1):e29419.
- Mandal, S., Chhakchhuak, L., Gurusubramanian, G., Kumar, N.S., 2014. Mitochondrial markers for identification and phylogenetic studies in insects – A Review. *DNA Barcodes*, 2:1-9.
- Mastroiolo, M., Nava, S., Guglielmone, A.A., Mangold, A.J., 2011. Biological differences between two allopatric Populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Argentina. *Exp. Appl. Acarol.*, 53(4):371-375.
- Miller, H.C., Conrad, A.M., Barker, S.C., Charles, H., 2007. Distribution and phylogenetic analyzes of an endangered tick, *Amblyomma sphenodonti*. *J. Zool.*, 34:97-105.
- Nava, S., Beati, L., Labruna, M.B., Cáceres, A.G., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense*

- (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). Ticks Tick Borne Dis., 5(3):252-276.
- Norgate, M., Chamings, J., Pavlova, C.A., Bull, J.K., Murray, N.D., Sunnucks, P., 2009. Mitochondrial DNA Indicates Late Pleistocene Divergence of Populations of *Heteronympha merope*, an emerging model in environmental change biology. PLoS One, 11:e7950.
- Nonis, A., Scortegagna, M., Nonis, A., Ruperti, B., 2011. PRaTo: A web-tool to select optimal primer pairs for qPCR. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 415:707-708.
- O'dwyer, L.H., 2011. Brazilian canine hepatozoonosis. Rev. Bras. Parasitol. Vet., 20(3):181-193.
- Rödelsperger, C., Dieterich, C., 2010. CYNTENATOR: Progressive gene order alignment of 17 vertebrate genomes. PLoS One, 5(1):e8861.
- Saraiva, D.G., Soares, H.S., Soares, J.F., Labruna, M.B., 2014. Feeding period Required by *Amblyomma aureolatum* ticks for transmission of *Rickettsia rickettsii* to vertebrate hosts. Emerg. Infect. Dis., 20(9):1504-1510.
- Shao, R., Barker, S.C., Mitani, H., Aoki Y., Fukunaga, M., 2004. Evolution of duplicate control regions in the mitochondrial genomes of metazoan: a case study with australasian ixodes ticks. Mol Biol Evol., 22(3):620-629.
- Shao, R.F., Barker, S.C., Mitani, H., Takahashi, M., Fukunaga, M., 2006. Molecular mechanisms for the variation of mitochondrial gene content and gene arrangement among chigger mites of the genus *Leptotrombidium* (Acari: Acariformes). J Mol Evol., 63:251-261.
- Shao, R., Barker, S.C., 2007. Mitochondrial genomes of parasitic arthropods: implications for studies of population genetics and evolution. Parasitol., 134:153-167.
- Solano-Gallegoa, L., Baneth, G., 2011. Babesiosis in dogs and cats - expanding parasitological and clinical spectra. Vet. Parasitol., 181:48-60.
- Stothard, P., 2000. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. Biotech., 28:1102-1104.
- Szabó, M.P.J., Pinter, A., Labruna, M.B., 2013. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. Front. Cell. Infect. Microb., 3(27):1-9.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30:2725-2729.
- Tintaya, W.Q., White, R.R., Popov, V.N., Vijg, J., Maslov, A.Y., 2013. Fast mitochondrial DNA isolation from mammalian cells for next-generation sequencing. *BioTech.*, 55:133-136.
- Usmani-Brown, S., Cohnstaedt, L., Munstermann, L.E., 2009. Population Genetics of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) invading populations, using mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 5 sequences. *Ann. of the Entomol. Soc. of Am.*, 102(1):144-150.
- Su, Z., Huang, W., Gu, W., 2011. Comment on "positive selection of tyrosine loss in metazoan evolution". *Science*. 332(6032):917.
- Wolstenholme, D.R., 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. of Cytol.*, 141:173-216.
- Williams-Newkirka, A.J., Burroughsd, M., Changayile, S.S., Dasch, G.A.D., 2015. The mitochondrial genome of the lone star tick (*Amblyomma americanum*). *Ticks and Tick-borne Dis.*, 6(6):793-801.
- Wyman, S.K., Jansen, R.K., Boore, J.L., 2004. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinform.*, 20(17):3252-3255.
- Yang, C.H., Cheng, Y.H., Chang, H.W., Chuang, L.Y., 2008. Primer design with specific PCR product size using memetic algorithm. *IEEE Conf. on Soft Comput. in Ind. Appl. (SMCia/08)*, Muroran, Japan, pp. 332-337.

3. CAPÍTULO 3

3.1. PARTE I

ARTIGO ORIGINAL 2 - Mitogenoma completo de *Nothoaspis amazoniensis*: caracterização organizacional, análise comparativa e filogenética integrada a outros membros da família Argasidae.

Resumo: A identificação taxonômica de indivíduos da família Argasidae por características morfológicas externas, em especial considerando espécimes em diferentes estádios de desenvolvimento, apresenta grande dificuldade para especialistas. Neste contexto, a filogenia molecular - baseada na tecnologia de sequenciamento de nova geração, e a aplicação de ferramentas de bioinformática contribuindo com o fornecimento de sequências genômicas completas aos bancos de dados biológicos - pode fornecer dados importantes sobre a história e as relações evolutivas dos argasídeos. Para melhor compreender estas relações, sequenciamos e montamos o primeiro mitogenoma completo do argasídeo *Nothoaspis amazoniensis*. Utilizamos a filogenômica para identificar a história evolutiva desta espécie de carrapato, comparando os dados obtidos com 26 sequências mitocondriais completas disponibilizadas em bancos de dados biológicos. Na análise de alinhamento múltiplo comparativo, identificamos ausência de rearranjos gênicos, elevada similaridade e identidade, e estreita ligação de organização entre os mitogenomas de *N. amazoniensis* e demais argasídeos analisados. Evidenciamos que a abordagem filogenômica posicionou este mitogenoma em um clado monofilético característico do arranjo taxonômico Cladista, o qual inclui representantes das regiões Afrotropical e Neotropical, com parasitismo específico em morcegos, o que pode ser um indicativo de um processo evolutivo de coevolução entre o parasita e seu hospedeiro.

Palavras-chaves: argasídeos, sequenciamento de nova geração, *de novo assembly*, filogenômica, arranjo taxonômico

Title: The complete mitogenome of *Nothoaspis amazoniensis*: organizational characteristics, comparative analysis and phylogenetic integrated to other members of the Argasidae family.

Abstract: The taxonomic identification of individuals in the family Argasidae by external morphological characteristics, especially considering specimens at different stages of development, exhibit very difficult for specialists. In this context, the molecular phylogeny - based on the technology of new generation sequencing and on robust and effective bioinformatics tools contributing to the development of complete genome sequences to biological databases - can provide important information about the history and the evolutionary relationships of ticks. To better understand these relationships, we sequenced and assembled the first complete mitogenome of the tick *Nothoaspis amazoniensis*. We used phylogenomic to identify the evolutionary history of this species of tick, comparing the data obtained with 26 complete mitochondrial sequences available in biological databases. In the comparative multiple alignment analysis we identified the absence of gene rearrangements, high similarity, identity, and close association of organization between mitogenome *N. amazoniensis* and other ticks analyzed. We demonstrated that the phylogenomic approach has positioned this mitogenome in a characteristic monophyletic clade of a taxonomic arrangement Cladist, which included representatives of Afrotropical and Neotropical regions, with specific parasitism in bats, which may be indicative of an evolutionary process of co-speciation between vector and its host.

Keywords: argasids, next generation sequencing, *new assembly*, phylogenomic, taxonomic arrangement.

3.1.1. INTRODUÇÃO

Com dimorfismo sexual e estádios poucos diferenciados, os carrapatos da família Argasidae são divididos em duas subfamílias, Argasinae e Ornithodorinae, sendo morfológica e biologicamente classificados em cinco gêneros: *Argas*, *Ornithodoros*, *Otobius*, *Antricola* e *Nothoaspis* (Hoogstraal, 1985; Guglielmone et al., 2010). Dentre estes, o gênero *Ornithodoros* é o que engloba o maior número de espécies, contando, até o momento, com 118 descritas em todo o mundo (Dantas-Torres et al., 2012; Venzal et al., 2013; Barros-Basttesti et al., 2013). Das 21 espécies de argasídeos presentes na fauna brasileira, 16 pertencem ao gênero *Ornithodoros*, três ao gênero *Antricola*, uma ao gênero *Argas* e uma ao gênero *Nothoaspis* (Barros-Basttesti et al., 2013).

De uma forma geral, os principais subgêneros da subfamília Argasinae (*Argas* e *Persicargas*) são parasitas exclusivos de aves, sendo suas estruturas corporais externas lisas para permitir o movimento através das penas. Dentre os membros da subfamília Ornithodorinae destacam-se os subgêneros *Carios*, *Alectorobius*, *Parantricola*, *Reticulinasus*, *Subparratus*, *Chiropterargas*, *Antricola* e *Nothoaspis*, os quais parasitam principalmente mamíferos, com destaque ao parasitismo em morcegos (Klompen et al., 1996; Nava et al., 2009).

Na família Argasidae, algumas espécies são morfológicamente de difícil identificação. Esta dificuldade ocorre tanto com espécimes adultos (devido ao dimorfismo sexual pouco diferenciado), quanto com larvas. A ausência de caracteres morfológicos adequados ou pré-definidos para cada gênero, refletindo reais relações filogenéticas entre os mesmos, constitui um importante obstáculo para o estabelecimento de arranjos taxonômicos mais precisos para esta família, sendo ponto negativo para estudos filogenéticos, faunísticos e epidemiológicos (Nava et al., 2009; Estrada-Peña, et al., 2010).

Esta ausência de um entendimento consistente sobre as interpretações do processo taxonômico e evolutivo da família Argasidae tem perdurado por muitos anos, sem uma solução eficaz para este problema. Vários grupos ou “escolas de taxonomia” propuseram alguns arranjos taxonômicos para esta família, sem, no entanto obter consenso entre elas, resultando em muitas

vezes, uma mesma espécie sendo classificada em mais de um gênero (Nava et al., 2009). Para Estrada-Peña et al. (2010), a ausência de normatização morfológica adequada para a identificação dos membros desta família, propicia um enquadramento duvidoso da classificação taxonômica de gênero para aproximadamente 130 espécies de argasídeos, dentre as quase 200 descritas no mundo. Também para Burger et al. (2014), os arranjos taxonômicos propostos até o momento para argasídeos são limitados, dependendo de caracteres morfológicos e fisiológicos ou do ciclo de vida, o que de certa forma, é uma condição complicadora e promotora das divergências encontradas nestes arranjos taxonômicos, agravada pelo fato destes terem sido estabelecidos antes do incremento da utilização de marcadores moleculares para diferenciação e análise das relações taxonômicas.

No decorrer dos últimos anos, com a evolução da tecnologia de sequenciamento de DNA de nova geração e dos aplicativos de bioinformática, verificamos incremento na montagem, comparação e análise de sequências parciais e completas de genomas nucleares e mitocondriais (Smith, 2015, 2016). Estas ferramentas contribuíram para identificação e mapeamento de um maior número de marcadores moleculares genéticos e um melhor entendimento das relações filogenéticas e evolutivas para muitos grupos de organismos (Metzker, 2010; Mardis, 2011, Smith, 2015). Neste novo contexto, a filogenia molecular tem se firmado como ferramenta indispensável e valiosa para análise comparativa da grande diversidade de genomas existentes (Yang & Rannala, 2012). Isto, de certa forma, foi consolidado devido às novas publicações e ao crescente número de sequências e genomas depositados em bancos de dados biológicos (Liolios et al., 2010; Smith, 2015, 2016).

Estudos que buscam a reconstrução evolutiva utilizando a abordagem filogenômica, têm possibilitado menor erro probabilístico proveniente de eventos aleatórios e maior relevância na análise dos dados genômicos, em comparação as análises filogenéticas utilizando um único gene ou fragmento do gene (Castresana, 2007; Pennisi, 2008). Esta abordagem possibilita a análise comparativa de genomas inteiros, permitindo a obtenção de informações sobre perfis filogenéticos e integração destes em larga escala,, favorecendo análise e resolução dos métodos filogenéticos (Delsuc et al., 2005). Incremento na amostragem dos táxons e a utilização por concatenação

de dados genômicos gerados em larga escala, permite ainda elevar consistentemente a acurácia dos testes e métodos de reconstruções filogenéticas (Rokas et al., 2003; Delsuc et al., 2005; Baptiste et al., 2002; 2008).

O objetivo deste projeto foi o sequenciamento, a montagem e obtenção da sequência do primeiro genoma mitocondrial completo do carrapato argasídeo *Nothoaspis amazoniensis*, utilizando este mitogenoma para análises comparativa e filogenética com outros membros da família Argasidae, disponibilizando os dados gerados para estudos futuros sobre taxonomia e genética de populações. Com isto, contribuir para uma melhor compreensão das inter-relações evolutivas desta família de carrapatos.

3.1.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.2.1. Busca das sequências em banco de dados

As buscas de sequências completas do genoma mitocondrial para exemplares de carrapatos da família Argasidae foram realizadas no GenBank/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) com auxílio do aplicativo Blastn (Tabela 8).

Tabela 8: Genomas mitocôndrias de carrapatos argasídeos disponibilizados no Genbank e utilizados neste estudo.

Espécies	ID GenBank (genome mt)	Origem dos dados
<i>Antricola mexicanus</i>	NC_023340.1	Burger et al., 2014
<i>Argas africanus</i>	NC_019642.1	Mans et al., 2012 - Dados não publicados
<i>Argas lagenoplastis</i>	NC_023369.1	Burger et al., 2014
<i>Argas miniatus</i>	NC_023371.1	Burger et al., 2014
<i>Argas persicus</i>	NC_029174.1	Mans et al., 2016 - Dados não publicados
<i>Argas sp. SpringbokSA-QMS95171</i>	KC_769588.1	Burger et al., 2014
<i>Argas striatus</i>	NC_029175.1	Mans et al., 2016 - Dados não publicados
<i>Argas walkerae</i>	NC_029176.1	Mans et al., 2016 - Dados não publicados
<i>Carios capensis</i>	NC_005291.1	Fukunaga et al., 2010 - Dados não publicados
<i>Carios faini</i>	NC_029177.1	Mans et al., 2016 - Dados não publicados
<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	NC_023373.1	Burger et al., 2014
<i>Ornithodoros compactus</i>	NC_029178.1	Mans et al., 2016 - Dados não publicados
<i>Ornithodoros costalis</i>	NC_029179.1	Mans, 2016 - Dados não publicados
<i>Ornithodoros moubata</i>	NC_004357.1	Shao et al., 2004
<i>Ornithodoros porcinus</i>	NC_005820.1	Mitani et al., 2004
<i>Ornithodoros rostratus</i>	NC_023372.1	Burger et al., 2014
<i>Ornithodoros savignyi</i>	NC_029180.1	Mans et al., 2016 - Dados não publicados
<i>Otobius megnini</i>	NC_023370.1	Burger et al., 2014

3.1.2.2. Local de coleta do argasídeo *Nothoaspis amazoniensis*

A coleta do espécime de *Nothoaspis amazoniensis* ocorreu em expedição de campo realizada por Marcelo B. Labruna, Jose M. Venzal, Santiago Nava, Flavio A. Terassini, os quais procederam coletas em uma caverna identificada como BAT CAVE 2 (08° 37' 59" S, 63° 57' 29" W e 81m de altitude), localizada em frente a margem oeste do Rio Madeiras, no município de Porto Velho, Estado de Rondônia, Brasil (Nava et al. 2010). Esta estrutura geológica apresentou como características internas temperatura média de 31,9 ± 2,1°C, umidade relativa de 97,00 ± 1,0% e, por ser habitação de morcegos, nível moderado de amônia.

3.1.2.3. Extração, purificação e quantificação do DNA total de *Nothoaspis amazoniensis*

O DNA total de um espécime macho de *Nothoaspis amazoniensis*, previamente descontaminado e identificado por suas características morfológicas externas, conforme taxonomia descrita por Nava et al. (2010), foi extraído e purificado com o auxílio do QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA), conforme recomendado pelo fabricante. A amostra de DNA total obtida foi quantificada utilizando Quant-iT™ PicoGreen® (Invitrogen, UK), conforme recomendações do fabricante.

3.1.2.4. Preparo e normalização da amostra por PCR em tempo real

Na preparação da biblioteca genômica para *N. amazoniensis* procedeu-se a fragmentação do DNA mitocondrial e a adição de sequências do adaptador e do index, de acordo com o Nextera DNA Sample Prep kit (Illumina, USA), utilizando-se aproximadamente 50 ng de DNA.

Após análise do controle da qualidade e quantificação, com o auxílio do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA), a amostra de DNA foi preparada para uma concentração inicial de 10nM. Uma alíquota dessa biblioteca contendo 2 nM de fragmentos de DNA foi quantificada através de uma curva de quantificação absoluta utilizando KAPA SYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystems, USA), conforme as recomendações do fabricante, em equipamento StepOne Real Time (Applied Biosystems, USA).

3.1.2.5. Clusterização das amostras - Biblioteca genômica de *Nothoaspis amazoniensis*

O processo de indexação dos fragmentos à lâmina foi realizado segundo as recomendações do fabricante, utilizando o HiSeq cBot Manifold (Illumina, USA) e os reagentes do TrueSeq PE Cluster Kit v3 - cBot HS (Illumina, USA). Dezesesseis pMoles da biblioteca foram aplicados na superfície da lâmina de sequenciamento utilizando o cBot Cluster Generation System (Illumina, USA).

3.1.2.6. Sequenciamento de nova geração - Biblioteca genômica de *Nothoaspis amazoniensis*

O sequenciamento foi realizado em plataforma Illumina HiSeq 2500, no modo High Output, sendo este processo estabelecido por uma corrida utilizando o método de leitura paired-end, single indexed, com um total de 209 ciclos, sendo os 101 primeiros ciclos com a finalidade de realizar o sequenciamento do read 1 (100 pb), outros 101 ciclos para o read 2, e os demais sete ciclos direcionados para o sequenciamento do barcode das bibliotecas, o que permitiu a separação dos adaptadores únicos de cada uma das bibliotecas. Os procedimentos foram realizados com o auxílio do TrueSeq SBS Kit v3-HS – 200 cycles (Illumina, USA), conforme protocolo do fabricante. Foram geradas 129.718.692 reads, com tamanhos entre 85 a 101 nucleotídeos, as quais foram analisadas quanto a qualidade pelo software FastQC versão 0.11.1 (Andrews, 2010).

3.1.2.7. Montagem e anotação funcional do genoma mitocondrial de *Nothoaspis amazoniensis*

Após esta primeira análise, o software Trimmomatic, versão 2.32 (Bolger et al., 2014) foi utilizado com a finalidade de eliminar as bases sequenciadas com baixa qualidade (probabilidade de erro maior que 10^{-2} ; Q20) e remoção das reads menores que 75 nucleotídeos. Após a remoção de 14,11%, as reads foram contabilizadas e diferenciadas em 100.869.030 paired-end e 10.547.679 reads single, correspondendo a tamanhos entre 75 a 101 nucleotídeos.

Os arquivos paired-end e single gerados com alta qualidade foram utilizados no processo de montagem da sequência mitocondrial do *N. amazoniensis* usando o algoritmo *De Novo Assembly* do software CLC Genomics Workbench, versão 6.5.1 (CLCbio, Dinamarca). Essa montagem produziu uma sequência contig, contendo 14.416 pb, que foi estruturada pelo alinhamento de 1.464.476 reads e sequenciamento com cobertura média de 9.727,28 vezes.

Os genes mitocondriais foram preditos e anotados através da utilização do software DOGMA - Dual Organellar Genome Annotator (Wyman et al., 2004), considerando a configuração para genes mitocondriais de invertebrados,

e pela comparação dessa predição com os genomas de referência de *N. amazoniensis* (KC_769595.1/genoma parcial) e *Otobius megnini* (NC_023370), usando o software CLC Genomics Workbench. A predição e anotação dos genes de RNA transportador (tRNA) também foram confirmadas pelo software ARWEN (Laslett & Canbäck, 2008).

3.1.2.8. Genômica comparativa entre as sequências de carrapatos da família Argasidae

A sequência montada do genoma do *N. amazoniensis* e demais sequências mitocondriais completas de argasídeos foram alinhadas usando o software ClustalW (Larkin et al., 2007). Através do software MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) e do algoritmo de determinação p-distância, este alinhamento foi processado gerando matrizes de distância e distância média entre as sequências mitocondriais dos gêneros da família Argasidae. A estatística e composição do perfil de nucleotídeos da sequência foram obtidas através do software Sequence Manipulation Suite – SMS, versão 2.0 (Stothard, 2000).

Através do software MAUVE – Multiple Genome Alignment (Darling et al., 2010) foi realizado o alinhamento múltiplo em Blocos Colineares Locais (LBCs), com o objetivo de realizar a comparação dos genomas mitocondriais e verificar as possíveis variações estruturais originadas em processos evolutivos de rearranjos gênicos, entre as sequências analisadas, como, p. ex., processos por inversão, translocação, inserção, deleção e duplicação.

3.1.2.9. Análise filogenética

Na análise filogenética foram utilizadas 27 sequências de genomas mitocondriais completas, conforme descrição a seguir: (i) a sequência de *N. amazoniensis*, foco deste estudo; (ii) 18 sequências de carrapatos membros da família Argasidae (Tabela 1); (iii) cinco sequências de carrapatos Metastriata (*Amblyomma cajennense*, *Bothriocroton concolor*, *Haemaphysalis flava*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Dermacentor nitens*); (iv) uma sequência de carrapatos Prostriata (*Ixodes uriae*), como representante da família Ixodidae; (v) a sequência mitogenômica do carrapato *Nuttalliella namaqua*, como

representante monotípico da família *Nuttalliellidae*; e (vi) a sequência mitogenômica da espécie *Varroa destructor*, ácaro ectoparasita de colônias de abelhas, utilizada com a finalidade de compor o grupo externo e mostrar a direção evolutiva na análise filogenética.

Realizamos a reconstrução filogenética para o *N. amazoniensis* e demais mitogenomas de argasídeos pelo método de Inferência Bayesiana, utilizando o software MrBayes versão 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003). A identificação do melhor modelo de substituição de nucleotídeos para as sequências mitogenômicas foi estabelecida através do aplicativo JModelTest2 versão 2.1 (Darriba et al., 2012), sendo o Geral de Tempo Reverso com sítios invariáveis e distribuição Gamma (GTR+I+G) confirmado como o melhor modelo predito para esta análise. O algoritmo de simulação Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) iniciou-se à partir de uma árvore aleatória, sendo processado por um milhão de gerações, com frequência de amostragem a cada 1.000 gerações. Dez por cento das amostras iniciais foram descartadas (*burn in*) para obter as distribuições dos valores da probabilidade *a posteriori* e gerar a árvore filogenética consenso.

3.1.3. RESULTADOS

3.1.3.1. Caracterização organizacional do mitogenoma de *Nothoaspis amazoniensis*

O genoma mitocondrial completo do *N. amazoniensis* foi depositado no GeneBank sob o número de acesso KX_712088, equivalendo a uma sequência circular de 14.416pb (Figura 5.A), totalizando 37 genes na sua composição, sendo 13 genes codificadores de proteínas (GCPs), todas subunidades do complexo da cadeia respiratória, dois genes de RNA ribossomal (12S rRNA e 16S rRNA) e 22 genes transportadores de aminoácidos (tRNA), necessários para a síntese de proteínas mitocondriais. Vinte e dois genes foram transcritos no sentido da fita positiva e 15 foram orientados para transcrição no sentido da fita negativa (Tabela 9).

Treze sítios de clivagem para enzimas de restrição foram descritos no mitogenoma de *N. amazoniensis* (Figura 5.B; Tabela S1 - Anexos Capítulo 3). Trechos gênicos em sobreposição foram encontrados em 22 combinações de genes, envolvendo um total de 265 pb sobrepostas. A maior sobreposição, com 66 pb, foi encontrada entre os genes COX2 e tRNA-Lys (Tabela 9; Tabela S2 - Anexos Capítulo 3). Além da região controle (região não codificadora) contendo 341 pb, típicas de carrapatos argasídeos (Shao et al., 2004a, 2004b; Burger, et al. 2014), várias outras regiões intergênicas não codificadoras foram identificadas no mitogenoma de *N. amazoniensis* (Tabela 9; Tabela S3 - Anexos Capítulo 3).

A sequência nucleotídica do mitogenoma de *N. amazoniensis* apresentou 39,34% de adenina, 33,59% de timina, 8,13% de guanina e 18,94% de citosina, tendo o conteúdo AT participação maior no genoma com 72,93%, contra um conteúdo de GC de 27,07%, sendo estas características bem típicas do genoma mitocondrial de metazoários artrópodes (Castellana et al., 2011) e semelhantes aos dados de GC encontrados em estudos filogenéticos realizados por Burger et al. (2014) para carrapatos da família Argasidae.

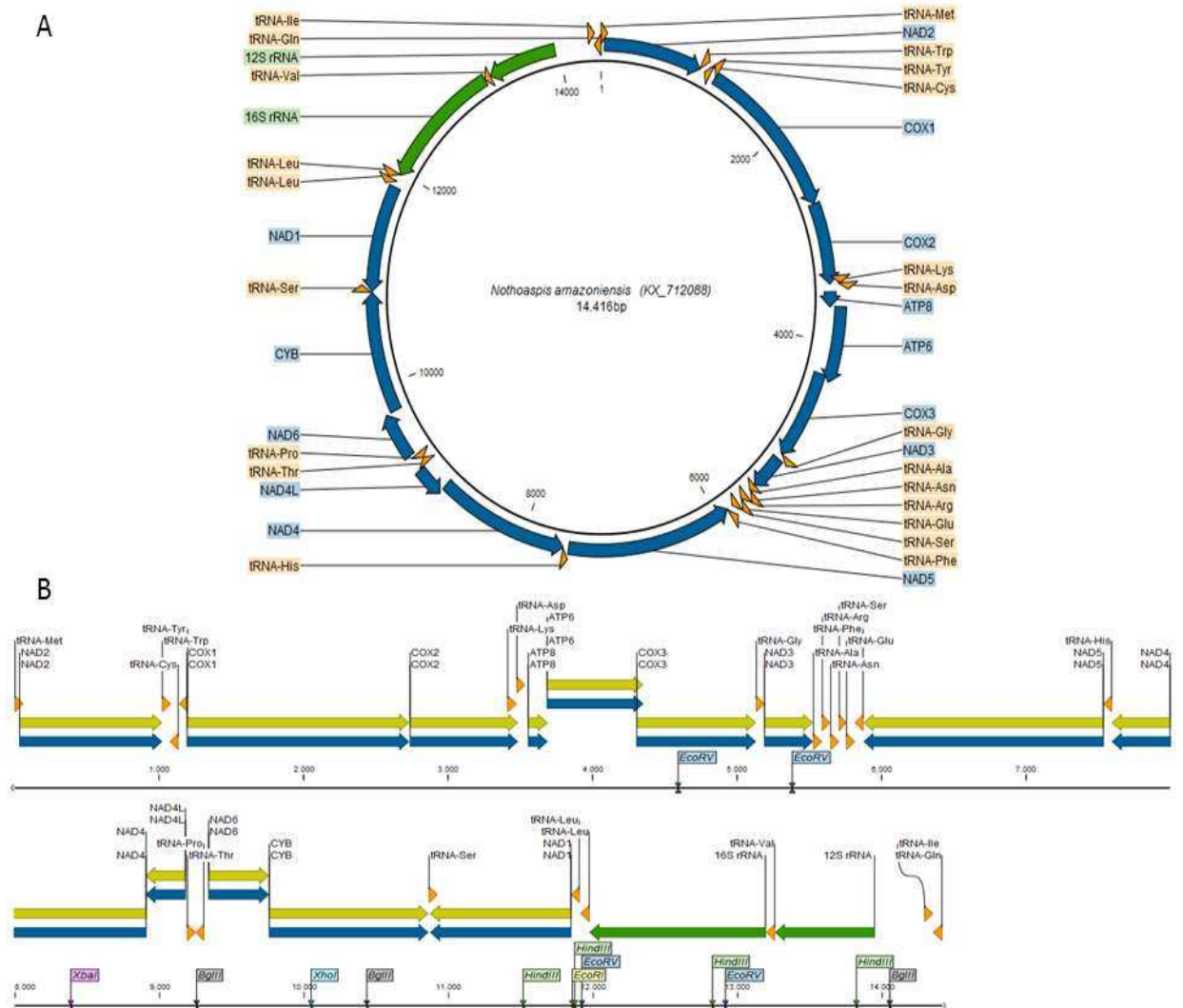


Figura 5: Organização do genoma mitocondrial de *N. amazoniensis*.

Nota: (A) Formato circular com 37 genes. (B) Formato linear com 37 genes mais a representação do CDS (em amarelo) referente a cada gene codificador de proteína e os sítios de enzimas de restrição. A Região Controle está localizada entre os genes 12S rRNA e tRNA-Ile.

Tabela 9: Ordenamento de genes, posição do gene, espaços intergênicos, sobreposição gênica e sentido da transcrição na fita de DNA no genoma de *N. amazoniensis*.

Genes	Posição do gene & Regiões Intergênicas		Tamanho do gene e das Regiões Intergênicas (pb)	Sentido do gene na fita de DNA
//* tRNA-Met	1	61 ^b	61	positivo
NAD2	32 ^b	1021	990	positivo
tRNA-Trp	1020	1082 ^b	63	positivo
tRNA-Cys	1075 ^b	1135	61	negativo
tRNA-Cys / tRNA-Tyr ^a	1136 ^a	1137 ^a	2	-
tRNA-Tyr	1138	1199 ^b	62	negativo
COX1	1192 ^b	2730	1539	positivo
COX1 / COX2 ^a	2731 ^a	2733 ^a	3	-
COX2	2734	3483 ^b	750	positivo
tRNA-Lys	3410 ^b	3475 ^b	66	positivo
tRNA-Asp	3474 ^b	3533	60	positivo
tRNA-Asp / ATP8 ^a	3534 ^a	3551 ^a	18	-
ATP8	3552	3689 ^b	138	positivo
ATP6	3683 ^b	4351 ^b	669	positivo
COX3	4303 ^b	5130 ^b	828	positivo
tRNA-Gly	5130 ^b	5189 ^b	60	positivo
NAD3	5187 ^b	5525	339	positivo
tRNA-Ala	5526	5587 ^b	62	positivo
tRNA-Arg	5587 ^b	5644	58	positivo
tRNA-Asn	5645	5706 ^b	62	positivo
tRNA-Ser	5704 ^b	5754	51	positivo
tRNA-Glu	5755	5815 ^b	61	positivo
tRNA-Phe	5814 ^b	5874	61	negativo
NAD5	5875	7537 ^b	1663	negativo
tRNA-His	7535 ^b	7594 ^b	60	negativo
NAD4	7593 ^b	8909 ^b	1317	negativo
NAD4L	8903 ^b	9181	279	negativo
NAD4L / tRNA-Thr ^a	9182 ^a	9188 ^a	7	-

Continua...

(Continuação: Tabela 9)

Genes	Posição do gene & Regiões Intergênicas		Tamanho do gene e das Regiões Intergênicas (pb)	Sentido do gene na fita de DNA
tRNA-Thr	9189	9247	59	positivo
tRNA-Pro	9248	9308	61	negativo
tRNA-Pro / NAD6 ^a	9309 ^a	9336 ^a	28	-
NAD6	9337	9756 ^b	420	positivo
CYB	9756 ^b	10859	1104	positivo
CYB / tRNA-Ser ^a	10860 ^a	10861 ^a	2	-
tRNA-Ser	10862	10924 ^b	63	positivo
NAD1	10872 ^b	11849 ^b	978	negativo
tRNA-Leu	11847 ^b	11906	60	negativo
tRNA-Leu / tRNA-Leu ^a	11907 ^a	11910 ^a	4	-
tRNA-Leu	11911	11975 ^b	65	negativo
16S rRNA	11975 ^b	13195	1221	negativo
tRNA-Val	13196	13258	63	negativo
12S rRNA	13259	13949	691	negativo
12S rRNA / tRNA-Ile ^{a (RC)}	13950 ^a	14290 ^a	341	-
tRNA-Ile	14291	14353 ^b	63	positivo
tRNA-Gln //*	14351 ^b	14416	66	negativo

Nota: ^a Espaços intergênicos; ^b Trechos de sobreposição gênica; (RC) - Região Controle; // * - Ligação circular do mitogenoma de *Nothoaspis amazoniensis*.

3.1.3.2. Genômica comparativa entre os mitogenomas de argasídeos

Matrizes de distância e identidade agrupando 19 mitogenomas de argasídeos são apresentadas na Tabela 10. Os valores demonstrados nestas matrizes confirmam um grau moderado a elevado de similaridade dos mitogenomas analisados, caracterizando estreita rela o evolutiva para os membros da família Argasidae. Esta condi o evolutiva foi identificada pelo o grau moderado de 69,64% para identidade média na análise de conserva o das seq ncias entre as subfamílias Argasinae e Ornithodorinae e pelos graus elevados de 73,65% e 77,33% de identidade média, respectivamente para as seq ncias dentro das subfamílias Ornithodorinae e Argasinae.

Tabela 10: Matrizes de distância e identidade entre os mitogenomas de carrapatos pertencentes à família Argasidae.

		Matriz p-distância																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18			
Família Argasidae	Subfamília Ornithodorinae	1 <i>Nothoaspis amazoniensis</i>																				
		2 <i>Antricola mexicanus</i>	0,229																			
		3 <i>Carios faini</i>	0,231	0,219																		
		4 <i>Carios capensis</i>	0,240	0,233	0,227																	
		5 <i>Ornithodoros brasiliensis</i>	0,266	0,262	0,265	0,261																
		6 <i>Ornithodoros rostratus</i>	0,266	0,263	0,261	0,257	0,225															
		7 <i>Otobius megnini</i>	0,276	0,267	0,270	0,278	0,269	0,261														
		8 <i>Ornithodoros savignyi</i>	0,288	0,291	0,295	0,296	0,268	0,274	0,293													
		9 <i>Ornithodoros moubata</i>	0,289	0,284	0,281	0,282	0,269	0,270	0,278	0,223												
		10 <i>Ornithodoros porcinus</i>	0,290	0,283	0,283	0,281	0,266	0,269	0,282	0,227	0,172											
		11 <i>Ornithodoros costalis</i>	0,290	0,288	0,280	0,284	0,271	0,275	0,279	0,299	0,288	0,293										
		12 <i>Ornithodoros compactus</i>	0,291	0,288	0,282	0,285	0,270	0,271	0,279	0,223	0,035	0,171	0,287									
	Subfamília Argasinae	13 <i>Argas striatus</i>	0,294	0,291	0,289	0,295	0,295	0,287	0,290	0,321	0,297	0,302	0,298	0,300								
		14 <i>Argas walkerae</i>	0,302	0,300	0,296	0,300	0,294	0,292	0,292	0,316	0,306	0,308	0,298	0,306	0,251							
		15 <i>Argas sp. SpringbokSA-QMS95171</i>	0,303	0,301	0,296	0,306	0,305	0,297	0,293	0,320	0,314	0,310	0,304	0,314	0,256	0,236						
		16 <i>Argas miniatus</i>	0,305	0,301	0,294	0,302	0,298	0,291	0,296	0,322	0,310	0,307	0,302	0,310	0,253	0,160	0,235					
		17 <i>Argas lagenoplastis</i>	0,308	0,306	0,299	0,309	0,303	0,296	0,299	0,319	0,309	0,316	0,304	0,308	0,255	0,229	0,232	0,231				
		18 <i>Argas africanumbae</i>	0,309	0,304	0,303	0,307	0,304	0,299	0,295	0,319	0,313	0,312	0,304	0,313	0,255	0,234	0,133	0,238	0,233			
		19 <i>Argas persicus</i>	0,309	0,301	0,298	0,306	0,304	0,296	0,301	0,320	0,310	0,315	0,304	0,309	0,260	0,174	0,241	0,180	0,236	0,238		
		Matriz Identidade																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18			
Família Argasidae	Subfamília Ornithodorinae	1 <i>Nothoaspis amazoniensis</i>																				
		2 <i>Antricola mexicanus</i>	77,08%																			
		3 <i>Carios faini</i>	76,87%	78,14%																		
		4 <i>Carios capensis</i>	75,97%	76,67%	77,32%																	
		5 <i>Ornithodoros brasiliensis</i>	73,38%	73,80%	73,52%	73,93%																
		6 <i>Ornithodoros rostratus</i>	73,39%	73,69%	73,90%	74,30%	77,53%															
		7 <i>Otobius megnini</i>	72,43%	73,30%	72,95%	72,20%	73,08%	73,86%														
		8 <i>Ornithodoros savignyi</i>	71,15%	70,93%	70,45%	70,44%	73,19%	72,62%	70,69%													
		9 <i>Ornithodoros moubata</i>	71,09%	71,56%	71,90%	71,80%	73,05%	72,96%	72,24%	77,71%												
		10 <i>Ornithodoros porcinus</i>	71,03%	71,67%	71,71%	71,94%	73,36%	73,12%	71,80%	77,29%	82,84%											
		11 <i>Ornithodoros costalis</i>	71,03%	71,17%	72,04%	71,64%	72,88%	72,47%	72,09%	70,12%	71,19%	70,69%										
		12 <i>Ornithodoros compactus</i>	70,93%	71,16%	71,83%	71,52%	73,01%	72,89%	72,12%	77,73%	96,54%	82,89%	71,27%									
	Subfamília Argasinae	13 <i>Argas striatus</i>	70,62%	70,93%	71,11%	70,45%	70,52%	71,31%	71,05%	67,91%	70,29%	69,79%	70,20%	70,05%								
		14 <i>Argas walkerae</i>	69,82%	70,03%	70,36%	70,04%	70,57%	70,78%	70,75%	68,38%	69,41%	69,20%	70,16%	69,41%	74,86%							
		15 <i>Argas sp. SpringbokSA-QMS95171</i>	69,71%	69,94%	70,36%	69,40%	69,52%	70,33%	70,69%	67,98%	68,58%	68,97%	69,57%	68,60%	74,35%	76,43%						
		16 <i>Argas miniatus</i>	69,47%	69,86%	70,56%	69,79%	70,23%	70,90%	70,35%	67,77%	68,99%	69,28%	69,78%	68,99%	74,69%	84,04%	76,51%					
		17 <i>Argas lagenoplastis</i>	69,19%	69,36%	70,10%	69,09%	69,68%	70,39%	70,13%	68,14%	69,08%	68,41%	69,60%	69,16%	74,51%	77,12%	76,84%	76,90%				
		18 <i>Argas africanumbae</i>	69,14%	69,61%	69,71%	69,28%	69,63%	70,08%	70,53%	68,13%	68,74%	68,79%	69,58%	68,72%	74,48%	76,55%	86,72%	76,17%	76,72%			
		19 <i>Argas persicus</i>	69,05%	69,89%	70,25%	69,36%	69,56%	70,36%	69,88%	67,98%	68,96%	68,51%	69,57%	69,09%	74,01%	82,57%	75,94%	81,97%	76,39%	76,22%		
Agrupamento		Distância Média & Desvio Padrão												Identidade Média								
		0,279 ± 0,002												72,10%								

Obtida pelo software MAUVE, a análise de alinhamento comparativo e organizacional entre os mitogenomas dos carrapatos da família Argasidae identificou um único padrão de LCB (Figura 6), caracterizado pela elevada similaridade e identidade, apresentando tendência conservada, com ausência de rearranjos gênicos e estreita ligação de organização entre os mitogenomas. No alinhamento comparativo, o grau de conservação de uma determinada região dos LCBs é indicado pelo perfil de similaridade, identificado pela cor de cada bloco, e também, pelo nível de identidade que corresponde à altura dos picos dentro do bloco (Darling et al., 2010).

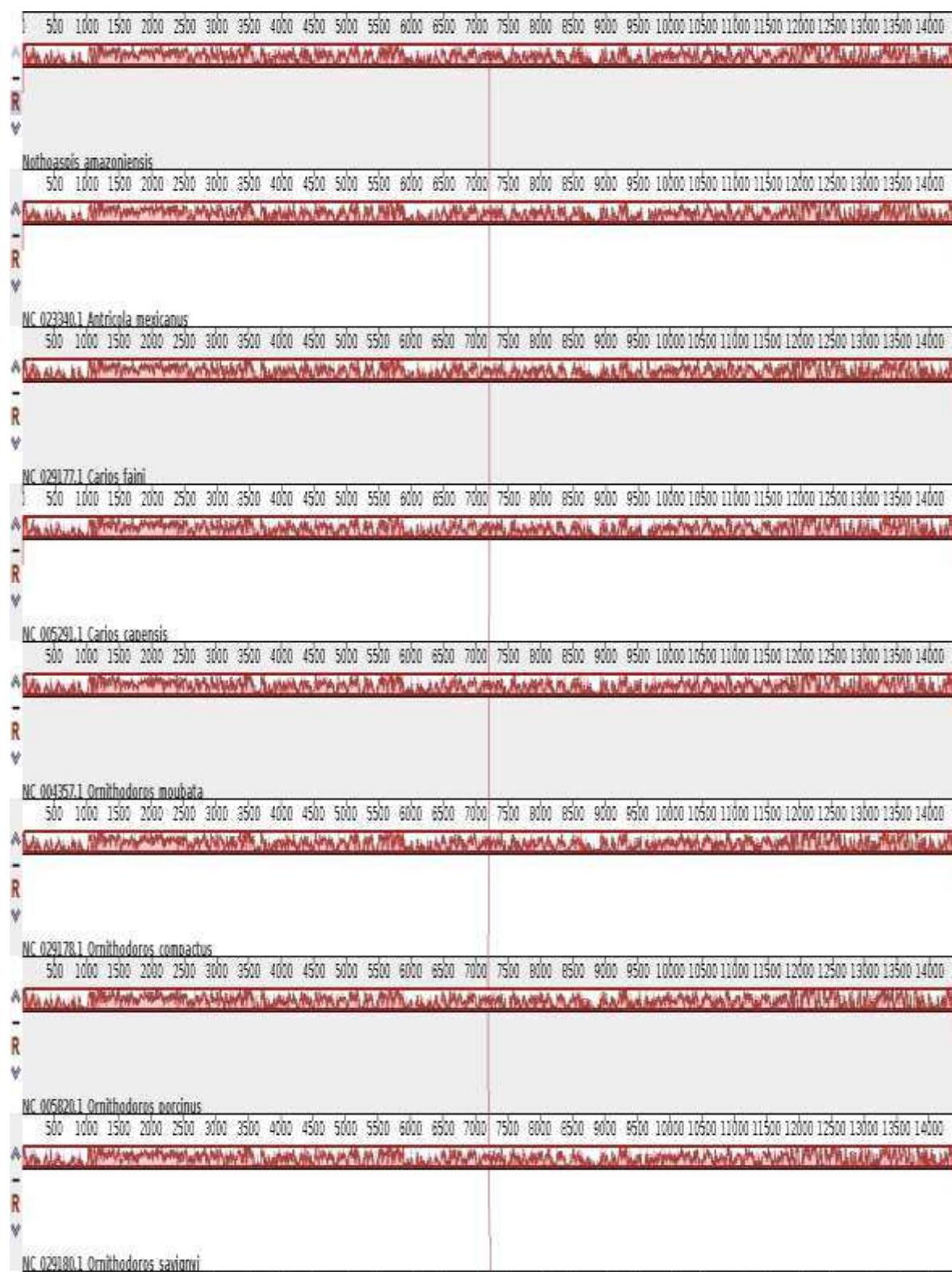


Figura 6: Alinhamento comparativo e organizacional dos genomas mitocondriais completos de carrapatos da família Argasidae.

Nota: Os demais 11 genomas mitocondriais de argasídeos analisados neste estudo apresentaram o mesmo padrão de alinhamento em BCLs. Análise BCLs completa encontra-se na Figura S1 (Anexos, Capítulo 3, Parte I). A linha de cor vermelha conecta blocos conservados.

3.1.3.3. Análise filogenética

A reconstrução e análise filogenética preconizadas pelo método de Inferência Bayesiana, realizada para as sequências mitocondriais completas dos carrapatos das famílias Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae gerou uma árvore enraizada (Figura 7) por um grupo externo representado pelo ácaro *V. destructor*. A topologia estabelecida para esta árvore propõe que a espécie *Nuttalliella namaqua* e o agrupamento monofilético de espécimes Metastrata e Prostrata, membros da família Ixodidae perfazem grupos irmãos a família Argasidae, apresentando 93,53% de probabilidade *a posteriori*, em relação a ancestralidade comum a estes grupos irmãos.

Dentro da família Argasidae, o monofiletismo da subfamília Argasinae e gênero *Argas* foi estabelecido pela probabilidade *a posteriori* de 100%, reunindo em um único clado monofilético as espécies *Argas miniatus*, *Argas walkerae*, *Argas persicus*, *Argas* sp. SpringbokSA-QMS95171, *Argas africolumbae*, *Argas lagenoplastis* e *Argas striatus*.

Para a subfamília Ornithodorinae foi estruturado um agrupamento monofilético através de 100% de probabilidade *a posteriori*. Este mesmo agrupamento apresentou distintamente, com 100% de probabilidade *a posteriori*, um ramo apoiando a espécie *Otobius megnini* e um clado monofilético referente ao gênero *Carios*, englobando a espécie foco deste estudo, *Nothoaspis amazoniensis*, e as espécies *Carios capensis*, *Carios faini* e *Antricola mexicanus*. O agrupamento que reuniu os membros do gênero *Ornithodoros*, subfamília Ornithodorinae, apresentou um comportamento parafilético, onde a espécie *Ornithodoros costalis* não contemplou o mesmo ancestral comum ao agrupamento das espécies *Ornithodoros brasiliensis*, *Ornithodoros rostratus*, *Ornithodoros savignyi*, *Ornithodoros porcinus*, *Ornithodoros compactus* e *Ornithodoros moubata*.

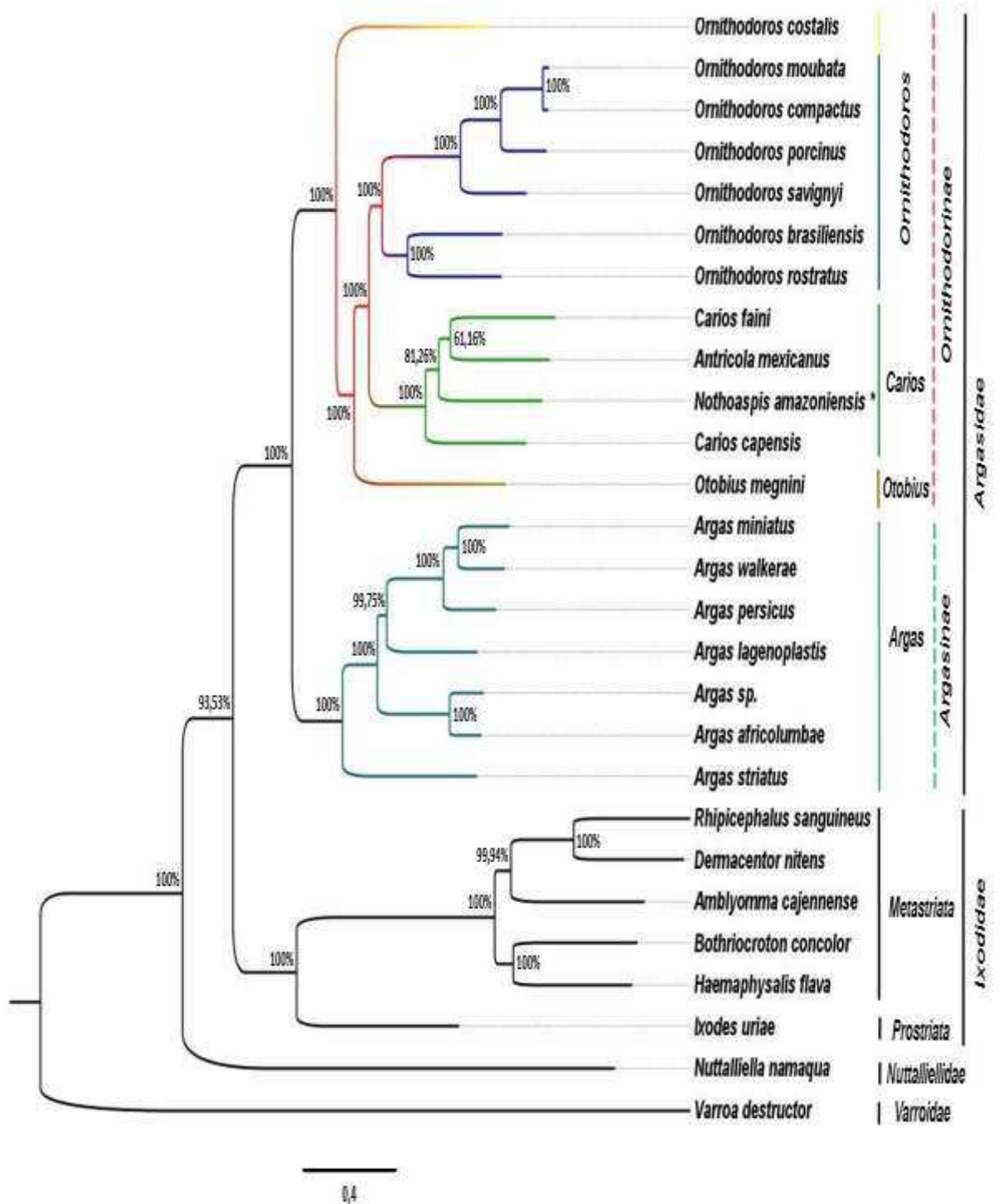


Figura 7: Árvore filogenética constituída por genomas mitocondriais completos de carrapatos das famílias Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae.

Nota: Árvore gerada pelo método de Inferência Bayesiana, após 1.000.000 de gerações, com frequência de amostragem a cada 1.000 gerações e descarte de 10% das amostras iniciais (burn in). Os números nas junções dos ramos e nós demonstram a percentagem da probabilidade *a posteriori* alcançada em relação a ancestralidade em comum. *Identificação da espécie *Nothoaspis amazoniensis* como foco desta pesquisa.

3.1.4. DISCUSSÃO

A ordenação e o sentido de leitura dos 37 genes mitocondriais, característicos de metazoários e artrópodes (Shao et al., 2006), para *N. amazoniensis* apresentaram o mesmo padrão encontrado nos outros mitogenomas de carrapatos pertencentes a família Argasidae (Shao et al., 2004a; Mitani et al., 2004; Burger et al., 2014).

Em ácaros, o DNA mitocondrial apresenta elevada variabilidade e tendência de códons ricos em conteúdo AT, sendo esta, condição que dificulta o desenvolvimento de primers universais para a amplificação de regiões específicas (Dabert, 2006), uma vez que os valores obtidos não atingem a composição ideal de conteúdo GC, que varia de 40 a 60% (Yang et al., 2008; Nonis et al., 2011). Em metazoários, as regiões que apresentam taxa evolutiva mais rápida são aquelas possuidoras de fraco conteúdo AT e forte GC, com predomínio de substituições por inserção destes últimos nucleotídeos desde a divergência de um ancestral (Su et al. 2011). A baixa concentração de GC no mitogenoma da espécie *N. amazoniensis*, talvez seja um indicativo do estágio elevado de conservação desta estrutura gênica.

Através da análise dos LCBs, ficou demonstrada a ausência de recombinação gênica e o alto nível de conservação e colinearidade em relação aos genes do mitogenoma *N. amazoniensis* e demais genomas analisados, caracterizando elevada sintonia entre esses mitogenomas. Este fato vem corroborar as informações preconizadas por Nava et al. (2009), ressaltando a ausência de recombinação gênica do DNA mitocondrial, o que seria uma vantagem para estudos de populações. Também, Shao et al. (2004a) destacaram a hipótese de que os carrapatos argasídeos possuem o arranjo ancestral de seus genes mitocondriais, originário de artrópodes, sendo, este arranjo ancestral mantido inalterado por mais de 400 milhões de anos em relação às linhagens precursoras dos argasídeos.

A falta de um entendimento coerente sobre as interpretações do processo taxonômico e evolutivo da família Argasidae perdura há vários anos sem uma solução eficaz, com vários grupos de pesquisadores ou “escolas de

taxonomia” propondo arranjos taxonômicos para esta família, porém sem um consenso entre eles (Nava et al. 2009). Entre as propostas taxonômicas para esta família de carrapatos podemos destacar quatro esquemas ou arranjos taxonômicos, cada um com sua normatização e peculiaridades, sendo o: Soviético (Filippova, 1966; Pospelova-Shtrom, 1969), Americano (Clifford et al., 1964, Hoogstraal, 1985), Francês (Camicas & Morel, 1977; Camicas et al. 1998) e o Cladístico (Klompen & Oliver, 1993). Pelas análises que realizamos com os mitogenomas de argasídeos, obtivemos uma boa resolução filogenética baseada na hipótese cladística de Klompen & Oliver (1993).

Para os mitogenomas da subfamília Argasinae, a reconstrução filogenética apresentou suporte monofilético com probabilidade *a posteriori* máxima, condição corroborada pelos estudos de sistemática e evolução em argasídeos realizados por Klompen & Oliver (1993), os quais relataram o monofiletismo para o gênero *Argas*. Este monofiletismo para a subfamília Argasinae caracterizou-se pelo agrupamento natural (100%) do subgênero *Persicargas* [*Argas (Persicargas) miniatus*, *Argas (Persicarga) persicus*, e *Argas (Persicargas) walkerae*]. Pela filogenia apresentada, *Argas* sp. SpringbokSA-QMS95171 provavelmente refere-se a um espécime representante do subgênero *Argas*, pois apresentou 100% de probabilidade *a posteriori* para ancestralidade em comum ao subgênero *Argas (Argas) africolumbae*, estando inserido a um agrupamento que congrega este subgênero e os demais, *Argas (Argas) striatus* e *Argas (Argas) lagenoplastis*. Entretanto, não pudemos confirmar uma estruturação monofilética para este agrupamento do subgênero *Argas*, o que seria explicado pela condição desconhecida de *Argas* sp. SpringbokSA-QMS95171, em relação a ausência de definição taxonômica mais precisa para subgênero e espécie.

Klompen & Oliver (1993) utilizaram a diferenciação morfológica de 83 caracteres, desenvolvimento e comportamento de espécimes da família Argasidae para estabelecer a sua hipótese cladística, enfatizando que o reconhecimento de táxons monofiléticos seria um dos pontos fortes desta teoria. Para Rieppel (2005), a estruturação do monofiletismo (grupo natural) é de extrema importância para a sistemática filogenética, sendo este, o processo

garantidor do êxito dos métodos evolutivos de identificação, cuja função é verificar e estabelecer a afinidade natural existente entre os organismos biológicos analisados e constituir a hierarquia de agrupamento.

O estudo filogenético realizado conseguiu ressaltar, por dados filogenômicos, uma boa resolução da hipótese filogenética de Klompen & Oliver (1993), englobando no gênero *Carios* os subgêneros *Alectorobius* e *Reticulinasus* do gênero *Ornithodoros*, como anteriormente preconizados pela classificação taxonômica proposta por Clifford et al. (1964), Hoogstraal (1985) e Camicas et al. (1998).

Em nosso estudo, a espécie *Carios capensis*, parasita de aves das regiões Neotropical, Neártica e Paleártica (Barros-Battesti et al., 2013), apresenta-se enquadrada nesta condição de classificação. Esta espécie, também conhecida por seus sinônimos *Ornithodoros (Alectorobius) capensis* (Clifford et al. 1964) e *Alectorobius (Alectorobius) capensis* (Camicas et al., 1998), encontra-se inserida em um agrupamento monofilético estabelecido por elevada probabilidade *a posteriori* (100%), com integrantes participantes da classificação taxonômica de Klompen & Oliver (1993). Estes pesquisadores propuseram a junção dos subgêneros *Carios*, *Chiropterargas*, *Alectorobius*, *Reticulinasus*, *Subparmatius*, *Parantricola*, *Antricola* e *Nothoaspis* em um mesmo gênero denominado *Carios*. Os resultados que apresentamos para *C. capensis* apoiam esta espécie no gênero *Carios* e não no *Ornithodoros*, conforme preconizado por Horak et al. (2002), Ushijima et al. (2003) e Barker & Murrell (2004), reforçando a teoria proposta por Klompen & Oliver (1993). A mesma hipótese foi estabelecida para a *Carios faini*, espécie parasita de morcegos na região Afrotropical, também conhecida pelo sinônimo *Ornithodoros (Reticulinasus) faini* (Hoogstraal, 1960), a qual se encontra agrupada no mesmo clado que *C. capensis*. Entretanto, com probabilidade *a posteriori* de 81,26%, *C. faini* também forma um agrupamento específico monofilético com outras espécies parasitas de morcegos, *Nothoaspis amazoniensis* e *Antricola mexicanus*, ambas estabelecidas na região biogeográfica Neotropical (Nava et al., 2010; Barros-Battesti et al., 2013).

De acordo com Labruna & Venzal (2009), a adoção do gênero *Carios* ainda seria uma questão muito controversa, sem consenso entre os taxonomistas de carrapatos. Estes mesmos pesquisadores também enfatizaram sobre a necessidade de uma quantidade maior de análises moleculares para a família Argasidae que incluam um número maior de marcadores e sequências completas destes. Segundo Camicas et al. (1998), Estrada-Penã et al. (2004) e Venzal et al. (2008), é de extrema importância a incorporação de um maior número de informações ligadas a história de vida, caracteres morfológicos e moleculares, e a interação destes, para o estabelecimento do gênero *Carios*. O proposto pelo o arranjo taxonômico Cladista (Klompen & Oliver, 1993), com a estruturação do gênero *Carios* dentro da subfamília Ornithodorinae, contribuiu para o processo de divergência aos demais arranjos em aproximadamente 50% das classificações taxonômicas preconizadas para subgêneros e gêneros entre e dentro das duas subfamílias de argasídeos. Para Klompen & Oliver (1993), o estabelecimento de um clado bem estruturado para *Carios* seria um ponto positivo e relevante para comprovar a teoria cladista para este gênero de argasídeo.

No agrupamento do gênero *Ornithodoros*, pela classificação taxonômica de Klompen & Oliver (1993), os subgêneros *Pavlovskyella* e *Ornithodoros* apresentam-se como grupos irmãos, condição confirmada pelos resultados que aqui apresentamos. Tanto o agrupamento dos subgêneros *Ornithodoros* (*Pavlovskyella*) *brasiliensis* e *Ornithodoros* (*Pavlovskyella*) *rostratus*, quanto o agrupamento *Ornithodoros* (*Ornithodoros*) *savignyi*, *Ornithodoros* (*Ornithodoros*) *porcinus*, *Ornithodoros* (*Ornithodoros*) *compactus* e *Ornithodoros* (*Ornithodoros*) *moubata* indicam um comportamento monofilético com máxima probabilidade *a posteriori*. Entretanto, no agrupamento do gênero *Ornithodoros* observamos um comportamento parafilético, uma vez que a espécie *Ornithodoros costalis* não contempla o mesmo ancestral comum que os demais membros deste gênero, os quais constituem um agrupamento monofilético.

Com posição bem definida na subfamília Ornithodorinae, com elevada probabilidade *a posteriori*, a análise filogenética contribuiu para definir o status

de *Otobius megnini* como integrante do gênero *Otobius*, conforme classificação de Clifford et al. (1964), Hoogstraal (1985) e Klompen & Oliver (1993). Analisando os genes mitocôndrias 12S e os codificadores de proteínas, Burger et al. (2014) e Gu et al. (2014) estabeleceram, através de estudos de filogenia, um status melhor definido para *Otobius megnini*, como sendo uma espécie pertencente ao gênero *Otobius*, subfamília Ornithorinae, conforme previamente proposto por Clifford et al. (1964) e Klompen & Oliver (1993), discordando do enquadramento taxonômico proposto por Hoogstraal (1985), o qual enquadrava *O. megnini* ao gênero *Otobius*, porém na subfamília Otobinae. Nos trabalhos realizados por Burger et al. (2014) e Gu et al. (2014) ficou demonstrado o estabelecimento de *O. megnini* dentro da subfamília Ornithorinae, entretanto em um agrupamento irmão a parte dos demais gêneros desta subfamília.

Em uma visão geral, a árvore gerada por Inferência Bayesiana apresentou uma análise filogenética bem consolidada com elevados níveis de probabilidade *a posteriori*. Este método paramétrico conseguiu contribuir com a formatação de uma inferência evolutiva robusta e bem suportada para as inter-relações dos integrantes da família Argasidae, em relação a classificação taxonômica preconizada pelo arranjo cladista de Klompen & Oliver (1993), no entanto, esta inferência evolutiva ainda não pode ser considerada como definitiva para as espécies analisadas, necessitando para análises futuras, de um incremento de dados sobre história de vida, morfologia e caracteres moleculares suportados por sequências mitocondriais completas de membros desta família de carrapatos.

Conforme apresentado por Guglielmone et al. (2010), como uma forma de minimizar ou até mesmo eliminar os obstáculos atuais para a identificação taxonômica de argasídeos, as técnicas de biologia molecular, através da manipulação do DNA, podem vir a contribuir como estratégias importantes para a identificação de indivíduos e, com maior precisão, estabelecendo árvores filogenéticas mais coesas para esta família de carrapatos. Para Nava et al. (2009) e Estrada-Peña et al. (2010), a utilização da taxonomia molecular associada a catalogação morfológica tradicional, a dita Taxonomia Clássica, seja de grande utilidade para a obtenção de critérios mais

homogêneos no estabelecimento de um arranjo taxonômico mais preciso para a família Argasidae.

3.1.5. CONCLUSÃO

Com os resultados aqui apresentados, evidenciamos que a estratégia de se utilizar genomas mitocondriais completos para inferir a história evolutiva em argasídeos é de grande importância, possibilitando forte suporte e boa compreensão das inter-relações evolutivas para as espécies de carrapatos, o que foi confirmado pelo elevado grau de similaridade dentro das subfamílias Argasinae e Ornithodorinae, juntamente com seus respectivos subgêneros, e também corroborado pelo processo monofilético estabelecido para estas subfamílias.

Concluimos que a estratégia de análise filogenômica contribuiu para o estabelecimento da espécie *Nothoaspis amazoniensis* em um clado monofilético caracterizado pela teoria de Klompen & Oliver (1993), e englobado por representantes das regiões biogeográficas Afrotropical e Neotropical, com parasitismo específico em morcegos, enfatizando desta forma, a caracterização de um possível estado amplo de coevolução entre parasita e seu hospedeiro, fato este, de grande importância para a evolução das espécies nos mais variados ecossistemas. Pelo contexto filogenético apresentado, também evidenciamos a tendência da filogenia gerada neste estudo, para os demais membros da família Argasidae, em se enquadrar no arranjo taxonômico cladista de Klompen & Oliver (1993).

3.1.6. REFERENCIAL BILIOGRÁFICO

- Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (acesso: 28/04/2016).
- Barros-Battesti, D.M., Ramirez, D.G., Landulfo, G.A., Faccini, J.I.H., Dantas-Torres, F., Labruna, M.B., Venzal, J.M. 2013. Immature argasid ticks: diagnosis and keys for Neotropical region. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 22(4):443-456.
- Bapteste, E., Brinkmann, H., Lee, J.A., Moore, D.V., Sensen, C.W., Gordon, P., Durufle, L., Gaasterland, T., Lopez, P., Müller, M., Philippe, H. 2002. The analysis of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: *Dictyostelium*, *Entamoeba*, and *Mastigamoeba*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:1414-1419.
- Bapteste, E., Susko, E., Leigh, J., Ruiz-Trillo, I., Bucknam, J., Doolittle, W.F. 2008. Alternative methods for concatenation of core genes indicate a lack of resolution in deep nodes of the prokaryotic phylogeny. *Mol. Biol. Evol.*, 25(1):83-91.
- Barker, S.C., Murrell, A. 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology.*, 129:S15-S36.
- Burger, T.D., Shao, R., Labruna, M.B., Barker, S.C. 2014. Molecular phylogeny of soft ticks (Ixodida: Argasidae) inferred from mitochondrial genome and nuclear rRNA sequences. *Ticks. Tick. Borne Dis.*, 5:195-207.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, 1-7.
- Camicas, J.L., Morel, P.C. 1977. Position systématique et classification des tiques (Acarida: Ixodida). *Acarologia*, 18:410-420.
- Camicas, J.L., Hervy, J.P., Adam, F., Morel, P.C. 1998. Les Tiques du Monde. Nomenclature, Stades Décrits, Hôtes, Répartition (Acarina, Ixodida). Orstom édition, Paris. 300pp.

- Castellana, S., Vicario, S., Saccone, C., 2011. Evolutionary patterns of the mitochondrial genome in metazoa: exploring the role of mutation and selection in mitochondrial protein-coding genes. *Gen. Biol. Evol.*, 3:1067-1079.
- Castresana, J. 2007. Topological variation in single-gene phylogenetic trees. *Genome Biol.*, 8:216.
- Clifford, C.M., Kohls, G.M., Sonenshine, D.E. 1964. The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). I. The genera and subgenera. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 57:429-437.
- Dabert, M. 2006. DNA markers in the phylogenetics of the Acari. *Biol. Lett. Rev.*, 43(2):97-107.
- Darling, A. E., Bad, B., Leg, N.T. 2010. ProgressiveMAUVE: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PloS One*, 5(6):e11147.
- Dantas-Torres, F., Venzal, J.M., Bernardi, L.F.O., Ferreira, R.L., Onofrio, V.C., Marcili, A., Bermúdez, S.E., Ribeiro, A.F., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B. 2012. Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari: Argasidae) from Brazil. *J. Parasitol.*, 98(1):36-45.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D.j. 2012. ModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Method.*, 9(8):772.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Philippe, H. 2005. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nat. Rev. Genet.*, 6:361-375.
- Estrada-Peña, A., Venzal, J.M., Barros-Battesti, D.M., Onofrio, V.C., Trajano, E., Firmino, J.V.L. 2004. Three new species of *Antricola* (Acari: Argasidae) from Brazil, with a key for the known species in the genus. *J. Parasitol.*, 90:490-498.
- Estrada-Peña, A., Mangold, A.J., Nava, S., Venzal, J.M., Labruna, M., Guglielmone, A.A. 2010. A review of the systematics of the tick family Argasidae (Ixodida). *Acarologia*, 50(3):317-333.
- Filippova, N.A., 1966. Argasid ticks (Argasidae). Zoologicheskogo Institut Akademii Nauk SSSR, Moscow-Leningrad (*in Russian*).

- Gu, X.B., Liu, G.H., Song, H.Q., Liu, T.Y., Yang, G.Y., Zhu, X.Q. 2014. The complete mitochondrial genome of the scab mite *Psoroptes cuniculi* (Arthropoda: Arachnida) provides insights into Acari phylogeny. *Parasit. Vectors*, 7:340.
- Guglielmone, A. A., Robbins, R G., Apanaskevich, D.A., Petney, T.N., Estrada-Peña, A., Horak, I.G., Shao, R., Barker, S.C. 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, 2528:1-28.
- Hoogstraal, H. 1960. *Ornithodoros (Reticulinasus) faini* sp. nov. (Ixodoidea, Argasidae) from Congo fruit bats, *Rousettus leachii* (Smith). *Rev. Zottl. Bot. Afr.*, 62:358-378.
- Hoogstraal, H. 1985. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Adv. Parasitol.*, 24:135-238.
- Horak, I., Camicas J-L., Keirans, J.E. 2002. The Argasidae, Ixodidae, and Nuttalliellidae (Acari: Ixodidae): a world list of valid tick names. *Exp. Appl. Acarol.*, 28:25-54.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic tree. *Bioinformatics*, 17:754-755.
- Klompen, J.S.H., Oliver, J.H. 1993. Systematic relationships in the soft ticks (Acari: Ixodida: Argasidae). *Syst. Entomol.*, 18:313-331.
- Klompen, J.S., Black IV, W.C., Keirans, J.E., Oliver, J.H. Jr. 1996. Evolution of ticks. *Annu. Rev. Entomol.*, 41:141-161.
- Labruna, M.B., Venzal, J.M., 2009. *Carios fonsecai* sp. nov. (Acari Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. *Acta Parasitol.* 54:355-363.
- Laslett, D., Canbäck, B. 2008. ARWEN: a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 24(2): 172-175.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. 2007. *ClustalW and ClustalX version 2*. *Bioinformatics*, 23(21):2947-2948.

- Liolios, K., Chen, I-M.A., Mavromatis, K., Tavernarakis, N., Hugenholtz, P., Markowitz, V.M., Kyrpides, N.C. 2010. The Genomes On Line Database (GOLD) in 2009: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucl. Acids. Res.*, 38(1):D346-D354.
- Mardis, E.R. 2011. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature*, 470:198-203.
- Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies – the next generation. *Nat. Review*, 11:31-46.
- Mitani, H., Talbert, A., Fukunaga, M. 2004. New World relapsing fever *Borrelia* found in *Ornithodoros porcinus* ticks in central Tanzania. *Microbiol. Immunol.*, 48(7):501-505.
- Nava, S., Guglielmone, A.A., Mangold, A.J. 2009. An overview of systematics and evolution of ticks. *Front. Biosci.*, 14: 2857-2877.
- Nava, S., Venzal, J.M, Terassini, F.A., Mangold, A.J., Camargo, L.M.A, Labruna, M.B. 2010. Description of a new argasid tick (Acari: Ixodida) from bat caves in brazilian amazon. *J. Parasitol.*, 96(6):1089-1101.
- Nonis, A., Scortegagna, M., Nonis, A., Ruperti, B., 2011. PRaTo: A web-tool to select optimal primer pairs for qPCR. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 415:707-708.
- Pennisi, E. 2008. Building the tree of life, genome by genome. *Science*, 320(5884):1716-1717.
- Pospelova-Shtrom, M.V., 1969. On the system of classification of ticks of the family Argasidae Can., 1890. *Acarologia*, 11:1–22.
- Rieppe, O. 2005. Monophyly, paraphyly, and natural kinds. *Biol. Philos.*, 20:465-487.
- Rokas, A.B.L., Williams, N., King, S.B., Carroll, M.P., Cummings, S.A., Handley, D.S., Myers, D.L., Reed, K., Winka, J. 2003. Finnerty. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature*, 425:798-804.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19:1572-1574.

- Shao, R., Aoki, Y., Mitani, H., Tabuchi, N., Barker, S.C., Fukunaga, M. 2004a. The mitochondrial genomes of soft ticks have an arrangement of genes that has remained unchanged for over 400 million years. *Insect. Mol. Biol.*, 13(3):219-224.
- Shao, R., Barker, S.C., Mitani, H., Aoki Y., Fukunaga, M. 2004b. Evolution of duplicate control regions in the mitochondrial genomes of metazoan: a case study with australasian ixodes ticks. *Mol. Biol. Evol.*, 22(3):620-629.
- Shao, R.F., Barker, S.C., Mitani, H., Takahashi, M., Fukunaga, M. 2006. Molecular mechanisms for the variation of mitochondrial gene content and gene arrangement among chigger mites of the genus *Leptotrombidium* (Acari: Acariformes). *J. Mol. Evol.*, 63:251-261.
- Smith, D.R. 2015. The past, present and future of mitochondrial genomics: have we sequenced mtDNA enough? *Brief. Funct. Genomics*, 1-8.
- Smith, D.R. 2016. Goodbye genome paper, hello genome report: the increasing popularity of genome announcements' and their impact on science. *Brief. Funct. Genomics*, 1-7.
- Stothard, P. 2000. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 28:1102-1104.
- Su, Z., Huang, W., Gu, W. 2011. Comment on "positive selection of tyrosine loss in metazoan evolution". *Science*, 332(6032):917.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30:2725-2729.
- Ushijima, Y., Oliver, J.H.Jr., Keirans, J.E., Tsurumi, M., Kawabata, H., Watanabe, H., Fukunaga, M. 2003. Mitochondrial sequence variation in *Carlos capensis* (Neumann), a parasite of seabirds, collected on Torishima Island in Japan. *J. Parasitol.*, 89(1):196-8.
- Venzal, J.M., Nava, S., González-Acuña, D., Mangold, A.J., Muñoz-Leal, S.; Lado, P., Guglielmone. A.A. 2013. A new species of *Ornithodoros* (Acari: Argasidae), parasite of *Microlophus* spp. (Reptilia: Tropiduridae) from northern Chile. *Ticks Tick. Borne. Dis.*, 4:128-132.

- Venzal, J.M., Estrada-Peña, A., Mangold, A.J., González-Acuña, D., Guglielmone, A.A. 2008. The *Ornithodoros (Alectorobius) talaje* species group (Acari: Ixodida: Argasidae): description of *Ornithodoros (Alectorobius) rioplatensis* n. sp. from southern South America. *J. Med. Entomol.*, 45:832-840.
- Wyman, S.K., Jansen, R.K., Boore, J.L. 2004. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinformatics*, 20(17):3252-3255.
- Yang, C.H., Cheng, Y.H., Chang, H.W., Chuang, L.Y. 2008. Primer design with specific PCR product size using memetic algorithm. *IEEE Conf. on Soft Comput. in Ind. Appl. (SMCia/08)*, Muroran, Japan. 332-337.
- Yang, Z., Rannala, B. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nat. Rev. Genet.*, 13:303-314.

3. CAPÍTULO 3

3.2. PARTE II

ARTIGO ORIGINAL 3 - Relação evolutiva entre o *Nothoaspis amazoniensis* (Acari, Ixodida, Argasidae), o hospedeiro chiroptera *Pteronotus* sp. e seu hábitat.

Resumo: Muitos trabalhos baseados no comportamento alimentar hematófago de carrapatos foram realizados com o objetivo de se identificar o tipo de associação parasita-hospedeiro e mensurar a intensidade da relação evolutiva estabelecida por esta associação, considerando estas variáveis como diretamente ligadas à dinâmica de transmissão de agentes patogênicos. Neste estudo avaliamos, com auxílio de ferramentas de sequenciamento de nova geração e bioinformática esta interação, a partir de material genético decorrente da alimentação do carrapato *Nothoaspis amazoniensis* em seu hospedeiro vertebrado. Mitogenoma referente a este hospedeiro foi montado e anotado, caracterizando-o como oriundo de animal membro da ordem Chiroptera. Por análise filogenética comparando esta sequência contra outras de representantes da Ordem Chiroptera depositadas em repositórios de acesso livre, obtivemos a identificação em nível de gênero, denominando como *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA. Considerando dados referentes a coleta do argasídeo *N. amazoniensis*, e aos resultados aqui apresentados para este morcego, podemos concluir que o *N. amazoniensis* apresenta uma dependência evolutiva, não somente ao seu provável hospedeiro do gênero *Pteronotus*, mas de uma forma geral, ao conjunto de condições específicas ecológicas bióticas e abióticas encontradas em seu ecossistema.

Palavras-chaves: mitogenoma, argasídeo, morcego, especificidade parasita-hospedeiro, fatores abióticos.

Title: Evolutionary relationship between *Nothoaspis amazoniensis* (Acari, Ixodida, Argasidae), the host chiroptera *Pteronotus* sp. and their habitat.

Abstract: Many works based on the blood-sucking feeding behavior of ticks were conducted in order to identify the type of host-parasite association and quantify the intensity of the evolutionary relationship established by this association, considering these variables as directly linked to the dynamics of transmission of agents' pathogens. In this study we evaluated this interaction with the aid of new generation sequencing tools and bioinformatics, using genetic material obtained from *Nothoaspis amazoniensis* tick feeding in its vertebrate host. Mitogenoma related to this host was assembled and annotated, characterizing it as derived of animal member from Chiroptera order. Through phylogenetic analysis we compared this sequence against other Chiroptera order representatives deposited in open access repositories and obtained the identification of gender level named as *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA. Considering the data collection of argasid *N.amazoniensis*, and the results here presented for this bat, we conclude that the *N.amazoniensis* presents an evolutionary dependence, not only regarding to its probable host from *Pteronotu* sp. gender, but in general, to the set of specific biotic and abiotic ecological conditions found in its ecosystem.

Keywords: mitogenoma, argasids, bat, host-parasite specificity, abiotic factors.

3.2.1. INTRODUÇÃO

Como ectoparasitas hematófagos obrigatórios de anfíbios, répteis, aves e mamíferos em geral (Cornejo et al., 2006, Nava & Guglielmone, 2013), os carrapatos são eficientes vetores na transmissão de vírus, bactérias, protozoários, fungos e helmintos (Jongejan & Uilenberg, 2004; Fuente et al., 2008; Labruna et al., 2011; Solano-Gallegoa & Baneth, 2011; O'Dwyer, 2011; Lasta et al., 2013; Parola et al., 2013; Dalis et al., 2014; Saraiva et al., 2014), apresentando-se em primeiro lugar na transmissão destes agentes infecciosos para animais domésticos e silvestres, e em segundo lugar, depois dos mosquitos, na transmissão para humanos (Fuente et al., 2008; Liu & Bonnet, 2014, Brites-Neto et al., 2015). Com distribuição geográfica à partir do Ártico até as regiões tropicais, os carrapatos possuem nestas últimas uma maior diversidade de hospedeiros (Mihalca et al., 2011).

Considerando algumas atribuições referentes a filogenia em carrapatos, Hoogstraal & Aeschlimann (1982) e Hoogstraal (1985), através de suas teorias evolutiva, enfatizaram o agrupamento de variáveis ligadas a alterações funcionais de estruturas morfológicas, especificidade parasita-hospedeiro e adaptação a um determinado hábitat, como sendo condições fundamentais ao estabelecimento de um estado amplo de coespeciação entre os carrapatos e seus hospedeiros. Para Hoogstraal (1985), o estabelecimento do estado de coespeciação é de extrema importância para evolução destes ácaros em seus mais variados ecossistemas. Klompen et al. (1996) enfatizaram a especificidade ecológica, sugerindo que a limitação do ciclo de vida da maioria dos carrapatos esta ligada a fatores como a biogeografia e as condições abióticas, e não necessariamente, na utilização específica de um determinado hospedeiro.

Neste contexto, mensurar a complexidade da inter-relação evolutiva de especificidade dos parasitas para com seus prováveis hospedeiros requer um melhor conhecimento sobre a importância ecológica de cada espécie parasitada e preferência por hospedeiro (especificidade estrutural). Assim, conhecimentos sobre as relações filogenéticas entre as espécies hospedeiras

(especificidade filogenética), ou seja, as espécies hospedeiras com maior frequência ao parasitismo por um organismo, podem ser consideradas como as mais estreitamente relacionadas a um determinado nível filogenético. Desta maneira, como variável de relevante importância, a escala espacial, abordando especificidade geográfica, também vem a contribuir para a mensuração da especificidade parasita-hospedeiro explorada pelo parasita (Poulin et al. 2011).

McCoy et al. (2013), também levantaram a questão da especificidade ou generalidade dos carrapatos para com seus hospedeiros. Para estes pesquisadores a resposta para esta questão está localizada entre dois extremos: (i) a diversidade morfológica ligada as adaptações estruturais e funcionais, direcionadas para atender a especificidade a um hospedeiro; e (ii) as limitações biogeográficas que imprimem o parasitismo generalista a todas as espécies disponíveis em um determinado hábitat. Estes autores também enfatizaram que carrapatos congregam tanto o padrão generalista para hospedeiros em escalas geográficas maiores (escala global), quanto o padrão especialista para escalas locais, neste último caso, nem sempre levando à especiação. Para Nava et al. (2013) e Espinaze et al. (2016), outra variável a ser considerada quanto à caracterização da especificidade ao hospedeiro, é a diferenciação dos estádios de vida dos carrapatos, sendo os estádios imaturos mais generalistas, enquanto que espécimes adultos da mesma espécie apresentam-se mais especialistas ou exigentes.

A especificidade plena parasita-hospedeiro apresenta vantagens evolutivas para os parasitas, sendo entretanto uma desvantagem clara para estes organismos o processo de extinção das espécies hospedeiras associadas, estando a permanência do parasita a um hábitat em dependência direta à estabilidade ecológica em que se enquadra este hospedeiro (Koh et al., 2004; Giovanni, 2015). O declínio desta dinâmica pode levar ao processo de coextinção para a associação parasita-hospedeiro (Koh et al., 2004; Lafferty et al., 2012), influenciando diretamente na disseminação de patógenos em um determinado ecossistema (Giovanni, 2015).

Nesta relação, a competência vetorial desses artrópodes hematófagos pode sofrer influência direta dos seguintes fatores: (i) imunidade inata do

hospedeiro, decorrente tanto da infecção ou exposição prévia a um determinado patógeno, quanto da transmissão deste; (ii) variação genética e o grau de infecciosidade do microrganismo patógeno envolvido; e (iii) competição entre microrganismos por um mesmo vetor. Além destas condições, a competência vetorial pode ser ainda comprometida pela preferência e número de hospedeiros vertebrados e pelos padrões de atividade, hábito alimentar e tempo de alimentação do vetor, e pelas condições climáticas e ambientais as quais seus hospedeiros estão expostos (Labuda & Nuttall, 2004; Goddard, 2008).

Considerando o contexto da especificidade funcional entre os carrapatos e seus hospedeiros vertebrados, a competência vetorial e a especificidade ecológica desses, tivemos como objetivo, através da tecnologia de sequenciamento de nova geração e de ferramentas de bioinformáticas, investigar a interação parasita-hospedeiro baseando-se na presença de material genético proveniente da ação hematófaga do carrapato *Nothoaspis amazoniensis* em seus hospedeiros. Por taxonomia molecular, realizamos a identificação dos prováveis hospedeiros, para *N. amazoniensis*, ao nível de ordem, família e gênero, verificando a relação associativa evolutiva entre este argasídeo, seus hospedeiros e o ecossistema habitado.

3.2.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.2.1. Local de coleta do argasídeo *Nothoaspis amazoniensis*

A coleta do espécime macho de *Nothoaspis amazoniensis* aconteceu em expedição de campo realizada por Marcelo B. Labruna, Jose M. Venzal, Santiago Nava, Flavio A. Terassini, os quais procederam coletas em uma caverna identificada como BAT CAVE 2 (08° 37' 59" S, 63° 57' 29" W e 81m de altitude), localizada em frente a margem direita do Rio Madeiras, no município de Porto Velho, Estado de Rondônia, Brasil (Nava et al. 2010). Esta estrutura geológica apresentou como características internas temperatura média de 31,9 ± 2,1°C, umidade relativa de 97,00 ± 1,0% e, devido à presença de morcegos, nível moderado de amônia.

3.2.2.2. Extração, purificação e quantificação do DNA total

O DNA total de um carrapato macho adulto da espécie *N. amazoniensis*, previamente identificado por suas características morfológicas externas, conforme taxonomia descrita por Nava et al. (2010), previamente descontaminado, foi extraído e purificado com o auxílio do QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA), conforme recomendado pelo fabricante. A amostra de DNA total obtida foi quantificada com auxílio do Quant-iT™ PicoGreen® (Invitrogen, UK), conforme recomendações do fabricante.

3.2.2.3. Preparo e normalização da amostra por PCR em tempo real

Na preparação da biblioteca genômica para *N. amazoniensis* procedeu-se à fragmentação do DNA total (nuclear e mitocondrial) e a adição de sequências do adaptador e do index, de acordo com o protocolo Nextera DNA Sample Prep kit (Illumina, USA), utilizando-se aproximadamente 50 ng de DNA.

Após análise do controle da qualidade e quantificação, com o auxílio do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA), a amostra de DNA foi preparada para uma concentração inicial de 10nM. Uma alíquota dessa biblioteca contendo 2 nM de fragmentos de DNA foi quantificada através de uma curva de quantificação absoluta utilizando KAPA SYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystems, USA), conforme as recomendações do fabricante, em equipamento StepOne Real Time (Applied Biosystems, USA).

3.2.2.4. Clusterização das amostras - Biblioteca genômica para *N. amazoniensis*

O processo de indexação dos fragmentos à lâmina foi realizado segundo as recomendações do fabricante, utilizando o HiSeq cBot Manifold (Illumina, USA) e os reagentes do TrueSeq PE Cluster Kit v3 - cBot HS (Illumina, USA). Dezesesseis pMoles da biblioteca de *N. amazoniensis* foram aplicados na superfície da lâmina de sequenciamento utilizando sistema automatizado cBot Cluster Generation System (Illumina, USA).

3.2.2.5. Sequenciamento de nova geração - Biblioteca genômica para *N. amazoniensis*

A corrida de sequenciamento foi realizada em plataforma Illumina HiSeq 2500, no modo High Output, utilizando o método de leitura paired-end, single indexed, com um total de 209 ciclos, sendo os 101 primeiros ciclos com a finalidade de realizar o sequenciamento do read 1 (100 pb), outros 101 ciclos para o read 2, e os demais 7 ciclos direcionados para o sequenciamento do barcode das bibliotecas, o que permitiu a separação dos adaptadores únicos de cada uma das bibliotecas, quais sejam, *N. amazoniensis* e seu hospedeiro vertebrado. Os procedimentos foram realizados com o auxílio do TrueSeq SBS Kit v3-HS – 200 cycles (Illumina, USA), conforme protocolo do fabricante. Foram geradas 129.718.692 reads, com tamanhos entre 85 a 101 nucleotídeos, as quais foram analisadas quanto a qualidade pelo software FastQC versão 0.11.1 (Andrews, 2010).

Após a análise da qualidade, o software Trimmomatic versão 2.32 (Bolger et al., 2014) foi utilizado com a finalidade de eliminar as bases sequenciadas com baixa qualidade (probabilidade de erro maior que 10^{-2} ; Q20) e remoção das reads menores que 75 nucleotídeos. Foram removidas o equivalente a 14,11% das reads obtidas, mantendo-se contabilizadas e diferenciadas 100.869.030 paired-end e 10.547.679 single reads com tamanhos entre 75 a 101 nucleotídeos.

3.2.2.6. Identificação do genoma mitocondrial do espécime pertencente à ordem Chiroptera

O genoma mitocondrial de um representante da ordem Chiroptera foi identificado durante o sequenciamento do mitogenoma completo do argasídeo *N. amazoniensis*, o qual se encontra depositado no GenBank sob o número de acesso KX_712088. Esse genoma mitocondrial estava presente entre as 129.718.692 reads geradas no sequenciamento da biblioteca genômica de *N. amazoniensis*, da qual obtivemos dois grupos distintos de alinhamentos de reads que deram origem a duas diferentes sequências consenso, sendo uma

específica ao mitogenoma do *N. amazoniensis* contendo 14.416 pb (proveniente do alinhamento de 1.464.476 reads) e a outra apresentada 16.605 pb (proveniente do alinhamento de 7.393 reads).

Para identificação dessa segunda sequência, foi utilizado o software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), mais especificamente o aplicativo Blastn, buscando verificar a similaridade existente entre a sequência montada de 16.605 pb e sequências depositadas no GenBank/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). Através dessa análise, verificamos que as similaridades variaram entre 80 a 96% de identidade (Tabela S1) entre a sequência de 16.605 pb e 26 sequências mitocondriais típicas da ordem Chiroptera. Isto permitiu sua caracterização como pertencente a esta ordem de mamíferos.

3.2.2.7. Montagem e anotação funcional do genoma mitocondrial de espécime pertencente à ordem Chiroptera

Os arquivos paired-end e single de alta qualidade gerados foram utilizados no processo de montagem da sequência mitocondrial do representante da ordem Chiroptera, utilizando o algoritmo *De Novo Assembly* do software CLC Genomics Workbench, versão 6.5.1 (CLCbio, Dinamarca). Essa montagem produziu um contig, contendo 16.605 pb, que foi estruturado pelo alinhamento de 7.393 reads e sequenciamento com cobertura média de 42,72 vezes.

Os genes mitocondriais foram preditos e anotados através da utilização do software DOGMA - Dual Organellar Genome Annotator (Wyman et al., 2004), considerando a configuração para genes mitocondriais de vertebrados. Através do software CLC Genomics Workbench, também foi realizada a comparação dessa predição com o genoma de referência de *Pteronotus rubiginosus* (HG_003312.1), visto apresentar 96% de identidade para similaridade com a sequência consenso. A predição e anotação dos genes de RNA transportador (tRNA) também foram confirmadas pelo software ARWEN (Laslett & Canbäck, 2008). A composição do perfil de nucleotídeos da

sequência foi obtida através do software Sequence Manipulation Suite – SMS, versão 2.0 (Stothard, 2000).

3.2.2.8. Análise filogenética

Para a análise filogenética foram utilizadas 28 sequências de genomas mitocondriais completos, sendo: (i) o contig que obtivemos; (ii) 26 sequências representantes da ordem Chiroptera, conforme descrição na Tabela 11; e (iii) a sequência mitogenômica da espécie *Equus asinus* (NC_001788.1), mamífero representante da ordem Perissodactyla, com a finalidade de compor o grupo externo e mostrar a direção evolutiva na análise filogenética. As buscas destas 27 sequências foram realizadas no GenBank/NCBI, com auxílio do aplicativo Blastn.

Tabela 11: Genomas mitocondriais completos de representantes da ordem Chiroptera disponibilizados no Genbank e utilizados neste estudo.

Descrição das espécies	ID GenBank (genoma mitocondrial)
<i>Anoura caudifer</i>	HG_003307.1
<i>Artibeus lituratus</i>	JN_209840.1
<i>Brachyphylla cavernarum</i>	HG_003308.1
<i>Carollia perspicillata</i>	HG_003309.1
<i>Hipposideros armiger</i>	JN_980966.1
<i>Lophostoma silvicolum</i>	HG_003311.1
<i>Micronycteris megalotis</i>	HF_947304.1
<i>Mystacina tuberculata</i>	AY_960981.1
<i>Pteronotus parnellii</i>	KF_752590.1
<i>Pteronotus rubiginosus</i>	HG_003312.1
<i>Pteropus dasymallus</i>	AB_042770.1
<i>Pteropus scapulatus</i>	AF_321050.1
<i>Pteropus vampyrus</i>	KP_214033.1
<i>Rhinolophus ferrumequinum korai</i>	JN_392460.1
<i>Rhinolophus ferrumequinum nippon</i>	KT_779432.1
<i>Rhinolophus ferrumequinum quelpartis</i>	JX_084273.1
<i>Rhinolophus ferrumequinum tragatus</i>	KT_783534.1
<i>Rhinolophus formosae</i>	EU_166918.1
<i>Rhinolophus luctus</i>	JN_986580.1
<i>Rhinolophus monoceros</i>	AF_406806.1
<i>Rhinolophus pumilus</i>	AB_061526.1
<i>Rhinolophus sinicus sinicus</i>	KR_106992.1
<i>Rhinophylla pumilio</i>	HG_003313.1
<i>Sturnira tildae</i>	HG_003314.1
<i>Tonatia saurophila</i>	HG_003315.1
<i>Vampyrum spectrum</i>	HG_003316.1

A reconstrução filogenética para a sequência do representante Chiroptera foi realizada pelo método de Inferência Bayesiana, com o auxílio do software MrBayes versão 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003).

Os genomas foram alinhados utilizando o software MAFFT (Katoh & Standley, 2016), sendo os sítios contendo gaps excluídos, estabelecendo a identificação do melhor modelo de substituição de nucleotídeos para as sequências mitogenômicas através do aplicativo JModelTest2 versão 2.1

(Darriba et al., 2012). O GTR+I+G com sítios invariáveis e distribuição Gamma (GTR+I+G) foi confirmado como o melhor modelo predito para esta análise. O algoritmo de simulação Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) iniciou-se à partir de uma árvore aleatória, sendo processado por um milhão de gerações, com frequência de amostragem a cada 1.000 gerações. Dez por cento das árvores iniciais foram descartadas (*burn in*) visando obter as distribuições dos valores da probabilidade *a posteriori* e geração da árvore filogenética consenso.

3.2.3. RESULTADOS

3.2.3.1. Caracterização organizacional do mitogenoma do espécime pertencente à ordem Chiroptera

Após montagem e anotação dos genes, uma sequência consenso circular com 16.605 pb foi depositada no GeneBank sob o número de acesso KX819316 e denominação de *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA (Figura 1.A), estabelecida conforme estudo filogenético apresentado neste estudo e identificação do local de coleta do carrapato *N. amazoniensis*, a partir do qual obteve-se o referido material. O mitogenoma completo totalizou 37 genes na sua composição, sendo 13 genes codificadores de proteínas (GCPs) subunidades do complexo da cadeia respiratória, dois genes de RNA ribossomal (12S rRNA e 16S rRNA) e 22 genes transportadores de aminoácidos (tRNA) necessários para a síntese de proteínas mitocondriais. Destes genes, vinte e oito são transcritos no sentido da fita positiva, sendo nove orientados para transcrição no sentido da fita negativa (Tabela 1).

Entre as dezessete regiões intergênicas não codificadoras presentes no mitogenoma, a região controle foi a que se destacou com 1.169 pb (Tabela 1; Tabela S2). Trechos gênicos em sobreposição foram encontrados em 13 combinações de genes, envolvendo um total de 238 pb sobrepostas. A maior sobreposição, apresentando 68 pb, foi encontrada entre os genes NAD4L e tRNA-Arg (Tabela 1; Tabela S3). Doze sítios de clivagem para enzimas de restrição foram descritos no mitogenoma de *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA,

Tabela 12: Ordenamento de genes, posição do gene, espaços intergênicos, sobreposição gênica e sentido da transcrição na fita de DNA no mitogenoma de *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA.

Genes	Posição do gene & Regiões Intergênicas		Tamanho do gene e das Regiões Intergênicas (pb)	Sentido do gene na fita de DNA
/** tRNA-Phe	1	69	69	positivo
tRNA-Phe / 12S rRNA ^a	70 ^a		1	-
12S rRNA	71	1026	956	positivo
12S rRNA / tRNA-Val ^a	1027 ^a	1033 ^a	7	-
tRNA-Val	1034	1102	69	positivo
tRNA-Val / 16S rRNA ^a	1103 ^a	1110 ^a	8	-
16S rRNA	1111	2665	1555	positivo
16S rRNA / tRNA-Leu ^a	2666 ^a	2671 ^a	6	-
tRNA-Leu	2672	2747	76	positivo
tRNA-Leu / NAD1 ^a	2748 ^a	2749 ^a	2	-
NAD1	2750	3703	954	positivo
NAD1 / tRNA-Ile ^a	3704 ^a	3705 ^a	2	-
tRNA-Ile	3706	3774 ^b	69	positivo
tRNA-Gln	3772 ^b	3844	73	negativo
tRNA-Met	3845	3913 ^b	69	positivo
NAD2	3860 ^b	4954 ^b	1095	positivo
NAD2 / tRNA-Trp ^a	4955 ^a		1	-
tRNA-Trp	4956 ^b	5024	69	positivo
tRNA-Trp / tRNA-Ala ^a	5025 ^a	5026 ^a	2	-
tRNA-Ala	5027	5095	69	negativo
tRNA-Ala / tRNA-Asn ^a	5096 ^a		1	-
tRNA-Asn	5097	5169	73	negativo
tRNA-Asn / tRNA-Cys ^a	5170 ^a	5203 ^a	34	-
tRNA-Cys	5204	5269	66	negativo
tRNA-Tyr	5270	5336 ^b	67	negativo
COX1	5329 ^b	6879	1551	positivo
COX1 / tRNA-Ser ^a	6880 ^a	6883 ^a	4	-
tRNA-Ser	6884	6952	69	negativo
tRNA-Ser / tRNA-Asp ^a	6953 ^a	6959 ^a	7	-
tRNA-Asp	6960	7027	68	positivo

Continua...

(Continuação: Tabela 12)

Genes	Posição do gene & Regiões Intergênicas		Tamanho do gene e das Regiões Intergênicas (pb)	Sentido do gene na fita de DNA
COX2	7028	7708	681	positivo
COX2 / tRNA-Lys ^a	7709 ^a	7714 ^a	6	-
tRNA-Lys	7715	7782	69	positivo
tRNA-Lys / ATP8 ^a	7783 ^a		1	-
ATP8	7784	7984 ^b	201	positivo
ATP6	7945 ^b	8622 ^b	678	positivo
COX3	8604 ^b	9426 ^b	823	positivo
tRNA-Gly	9409 ^b	9478	70	positivo
NAD3	9479	9823 ^b	345	positivo
NAD4L	9823 ^b	10188 ^b	366	positivo
tRNA-Arg	9827 ^b	9894 ^b	68	positivo
NAD4	10185 ^b	11564 ^b	1380	positivo
tRNA-His	11563 ^b	11630	68	positivo
tRNA-Ser	11631	11690	60	positivo
tRNA-Leu	11691	11760 ^b	70	positivo
NAD5	11752 ^b	13578 ^b	1827	positivo
NAD6	13568 ^b	14092	525	negativo
tRNA-Glu	14093	14160 ^b	68	negativo
tRNA-Glu / CYB ^a	14161 ^a	14164 ^a	4	-
CYB	14165	15301	1137	positivo
CYB / tRNA-Thr ^a	15302 ^a	15304 ^a	3	-
tRNA-Thr	15305	15371 ^b	67	positivo
tRNA-Pro	15371 ^b	15436 ^b	66	negativo
RC (tRNA-Pro / tRNA-Phe) ^a /**	15437 ^a	16605 ^a	1169	-

Nota: ^a Espaços intergênicos; ^b Trechos de sobreposição gênica; (RC) - Região Controle; /** - Ligação circular do mitogenoma de *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA.

3.2.3.2. Análise filogenética do mitogenoma de *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA

A reconstrução e análise filogenética do mitogenoma de *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA foram estabelecidas através de uma abordagem filogenômica e consolidadas pelo método de Inferência Bayesiana. Verificou-se pela análise da árvore filogenética (Figura 2) obtida, a caracterização de agrupamentos específicos para as famílias Mormoopidae, Phyllostomidae e Rhinolophidae, pertencentes à Sub-ordem Microchiroptera, com monofiletismo ao nível de 100% de probabilidade *a posteriori*, em relação a ancestralidade comum apresentada, especificamente a cada família. O mesmo comportamento monofilético, com 100% de probabilidade *a posteriori*, também foi estabelecido para um grupo que reuni membros da Família Pteropodidae e Sub-ordem Megachiroptera. As espécies *Mystacina tuberculata* (Família Mystacinidae) e *Hipposideros armiger* (Família Hipposideridae) apresentam-se como grupos irmãos, respectivamente, às famílias Phyllostomidae e Rhinolophidae.

A sequência consenso obtida, referente ao morcego, foi enquadrada em um agrupamento monofilético com 100% de probabilidade *a posteriori* com as espécies *Pteronotus parnellii* e *Pteronotus rubiginosus*, pertencentes à família Mormoopidae. Devido a esta condição monofilética ao nível máximo de probabilidade *a posteriori*, juntamente com os resultados observados pelo aplicativo Blastn - que estabeleceu identidades de 91 e 96% de similaridade, respectivamente, para as sequências de *Pteronotus parnellii* e *Pteronotus rubiginosus* (Tabela S1) - permitiu enquadrar a sequência consenso obtida como sendo referente ao gênero *Pteronotus*, sem definição quanto ao enquadramento em nível taxonômico de espécie. Desta forma, denominamos esta sequência consenso de *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA.

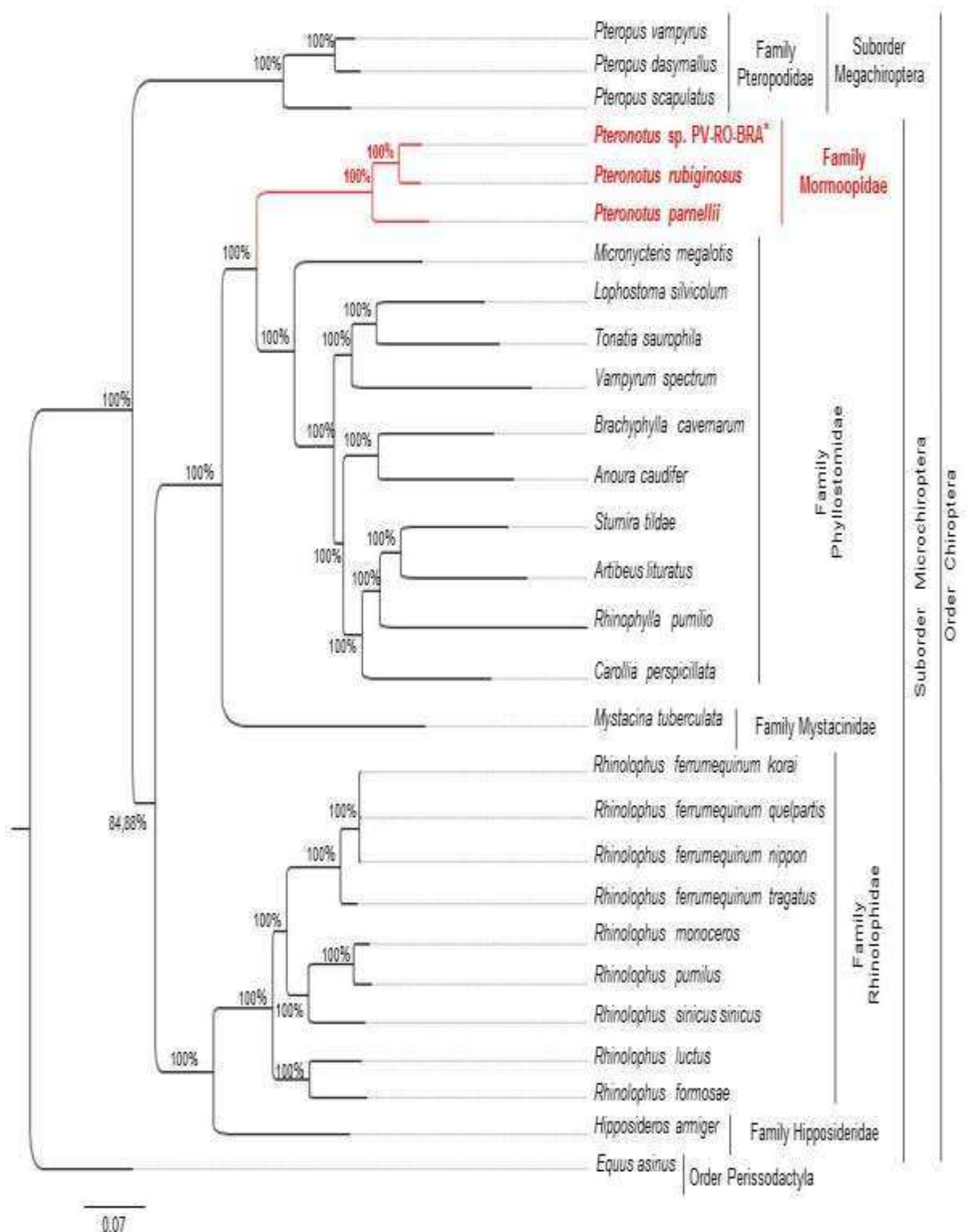


Figura 9: Árvore filogenética constituída por genomas mitocondriais completos de representantes da ordem Chiroptera.

Nota: Árvore gerada pelo método de Inferência Bayesiana, após 1.000.000 de gerações, com frequência de amostragem a cada 1.000 gerações e descarte de 10% das amostras iniciais (*burn in*). Os números nas junções dos ramos e nós demonstram a porcentagem da probabilidade *a posteriori* alcançada em relação a ancestralidade em comum. *Identificação da sequência do espécime *Pteronotus sp. PV-RO-BRA*.

3.2.4. DISCUSSÃO

Obtivemos através da tecnologia de sequenciamento de nova geração e pela utilização de ferramentas de bioinformática, a identificação do genoma mitocondrial completo de um espécime da ordem Chiroptera, família Mormoopidae e gênero *Pteronotus*, denominado *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA. Este achado corrobora a relação parasita-hospedeiro entre o carrapato *N. amazoniensis* e o morcego *Pteronotus* sp., tendo sido este material genético obtido à partir do ato de hematofagia de um carrapato *N. amazoniensis*.

Trabalhos prévios avaliaram o comportamento alimentar de diversos artrópodes hematófagos buscando identificar o tipo de associação parasita-hospedeiro, mensurando a intensidade e dependência evolutiva decorrente desta interação (Pichon et al., 2003; Kent et al. 2005; Allan et al., 2010; Önder et al. 2013; Puente et al., 2013; Lah et al., 2015; Bernotienė & Valkiūnas, 2016), a qual pode interferir diretamente na dinâmica de transmissão de agentes patogênicos por estes veiculados (Puente et al., 2013; Giovanni, 2015). Estes patógenos, além de utilizar o seu vetor como meio de transmissão, também podem ocasionar no mesmo diferentes alterações, levando a alterações em sua biologia e no processo de interação parasito-vetor-hospedeiro vertebrado, induzindo alterações, dentre outras, p. ex., da taxa de transmissão, na locomoção, na busca por hospedeiros susceptíveis e no comportamento alimentar e reprodutivo (Hurd, 2003; Lefèvre et al., 2006; Bennett et al., 2008; Lefèvre & Thomas, 2008). Compreensão desta associação parasita-hospedeiro é de extrema importância para o desenvolvimento de novas estratégias destinadas ao combate da transmissão desses patógenos, bem como para um melhor conhecimento sobre as condições do ecossistema onde ocorre esta associação.

Quanto ao ciclo de vida do argasídeo *N. amazoniensis*, verifica-se alternância entre as fases alimentar e a não-alimentar, onde os espécimes quando nos estádios de larva e ninfa II realizam hematofagia em morcegos, não se alimentando no estágio de ninfa I e, provavelmente, também no estágio adulto, sendo estes dois estádios caracterizados pela presença de hipóstomo

aparentemente sem função (Nava et al., 2010). Oliver (1989) relatou que alguns espécimes machos do gênero *Ixodes* e os argasídeos *Antricola*, *Nothoaspis* e *Otobius* apresentam fase não-alimentar durante os estádios de ninfa e adulto devido redução significativa do hipóstomo. Sobre o hospedeiro vertebrado, os argasídeos nos estádios de ninfas e adultos, realizam seu processo alimentar de maneira rápida, em torno de 20 a 40 minutos por período de alimentação, com suas larvas demandando um período sobre o hospedeiro, entre sete a dez dias (Barros-Battesti et al., 2012). Como explicação para o desenvolvimento e sobrevivência do *N. amazoniensis* na fase não-alimentar podemos considerar o suprimento nutricional decorrente da digestão prolongada do sangue proveniente dos estágios nos quais se verifica ocorrência de hematofagia. De acordo com Mans et al. (2016), a dinâmica da digestão em carrapatos ocorre com diferenças entre ixodídeos e argasídeos, onde nestes últimos tem-se curto período de hematofagia com digestão prolongada, em contraposição ao longo período de hematofagia e digestão contínua observado em carrapatos ixodídeos. Olega et al. (2015) relataram três fases da digestão para o argasídeo *Ornithodoros erraticus*, sendo este processo dependente de fatores ambientais e fisiológicos. Na primeira fase, verificada nas primeiras horas, logo após “o desprendimento” do carrapato de seu hospedeiro vertebrado, tem-se concentração do sangue ingerido, com água e sódio expelidos pelas glândulas coxais, com início da hemólise dos eritrócitos e uma insignificante digestão da hemoglobina. A seguir, com duração de 2 a 5 dias, a segunda fase se caracteriza por uma digestão intensiva e eliminação de resíduos. Na terceira fase deste processo de digestão, nestes ácaros hematófagos, observa-se um longo período de digestão lenta, o que permite a manutenção deste argasídeo durante o jejum prolongado. Isto possibilita, de uma forma geral, que carrapatos argasídeos apresentem uma grande resistência à ausência de alimentação e jejum prolongado (Parola & Raoult, 2001; Vial, 2009). Desta forma, devido ao seu hábito alimentar e como estratégia evolutiva, o carrapato *N. amazoniensis* pode está compartilhando nos quatro estádios de desenvolvimento uma taxa de digestão reduzida, prolongada e compensatória, objetivando uma otimização energética que

favoreça sua fisiologia, e desenvolvimento e manutenção em todos os estádios, em especial nos de ninfa I e adulto, estes correspondendo a fase não-alimentar.

Nava et al. (2010), em coleta de campo, evidenciaram que dentre três espécies de morcego (*Pteronotus parnellii*, *Anoura caudifer* e *Carollia perspicillata*) capturadas em um mesmo habitat e examinadas para infestação de carrapato, somente a espécie *Pteronotus parnellii* apresentou larvas de *N. amazoniensis*. De acordo com a descrição de Gutiérrez et al. (2008) e López-Wilchis et al. (2016), o gênero *Pteronotus* é composto por três subgêneros, *Pteronotus*, *Chilonycteris* e *Phyllodia*, sendo o subgênero *Phyllodia* o mais amplamente distribuído e morfometricamente variável. Estes pesquisadores relataram que o gênero *Pteronotus* é representado por seis espécies reconhecidas (*Pteronotus davyi*; *P. gymnonotus*; *P. parnellii*; *P. personatus* - com distribuição do México ao Brasil -; e *P. macleayi* e *P. quadridens* - nas Antilhas e Bahamas), sendo a espécie *Pteronotus parnellii*, do subgênero *Phyllodia*, caracterizada atualmente por nove subespécies [*Pteronotus (Phyllodia) parnellii parnellii*; *P. (P.) p. rubiginosus*; *P. (P.) p. fuscus*, *P. (P.) p. gonavensis*; *P. (P.) p. mesoamericanus*; *P. (P.) p. mexicanus*, *P. (P.) p. portoricensis*; *P. (P.) p. paraguayensis* e *P. (P.) p. pusillus*], que juntas formam um complexo de espécies crípticas.

Neste contexto taxonômico apresentado pelo gênero *Pteronotus* e considerando os resultados quanto a identidade de similaridade de sequências e a inferência filogenética, podemos propor uma proximidade filogenética da sequência do DNA mitocondrial *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA ao complexo de espécies crípticas de *Pteronotus parnellii*.

Considerando Nava et al. (2010), pode-se deduzir quanto à dependência do argasídeo *N. amazoniensis*, tanto na condição de especificidade a hospedeiros do gênero *Pteronotus* (especificidade ecológica biótica), quanto a condição de especificidade ecológica biogeográfica e abiótica, visto a alternância das fases de alimentação e não alimentação, entre os estádios de desenvolvimento, ser um indicativo da ecologia necessária para este argasídeo. Esta necessidade ecológica do *N. amazoniensis* vem de encontro à

interseção das teorias evolutivas preconizadas por Hoogstraal & Aeschlimann (1982) e Hoogstraal (1985), os quais enfatizaram que a coevolução entre carrapatos e seus hospedeiros deve-se à relação de especificidade ao acolhimento, processo este, promovido por variações fenotípicas e adaptações estruturais e funcionais específicas, e Klompen et al. (1996), os quais ressaltaram a especificidade ecológica biogeográfica e abiótica destes ácaros. Venzal et al. (2015), em pesquisa de campo realizada na Nicarágua, relataram a ocorrência da espécie *Nothoaspis reddelli* neste país. Até então, este argasídeo era somente encontrado no México (Keirans & Clifford, 1975; Guzmán-Cornejo, 2012). O achado de Venzal et al. (2015), apresentou semelhanças ambientais ao de Nava et al. (2010) para o argasídeo *N. amazoniensis*, sendo descrita 34°C para temperatura média interna da caverna, alta umidade relativa do ar e presença de atmosfera perniciosa devido a riqueza de compostos nitrogenados provenientes de excrementos produzidos pelo grande número de morcegos da espécie *P. gymnonotus*, que habitavam esta caverna. Venzal et al. (2015) concluíram que a distribuição das espécies do gênero *Nothoaspis* não é limitada apenas pelo hospedeiro vertebrado, sendo definida também por ambientes como alta temperatura e umidade, característica comum observada em cavernas habitadas por grande número de morcegos; ecossistemas aos quais o gênero *Nothoaspis* apresenta forte especificidade. Esta conclusão foi baseada na compilação de seus dados, os dados de Keirans & Clifford (1975) e Guzmán-Cornejo (2012) para *Nothoaspis reddelli* e os de Nava et al. (2010) para *N. amazoniensis*. Este conceito de especificidade ambiental proposto por Venzal et al. (2015) corrobora conclusão de Nava et al. (2010), os quais também condicionaram o desenvolvimento e manutenção do argasídeo *N. amazoniensis* a ambientes com estas características.

De acordo com Gandon & Michalakis (2002), durante o processo de coevolução, o qual exige reciprocidade adaptativa evolutiva, mas não necessariamente igualdade de benefícios entre populações de parasitas e hospedeiros, a competência coevolutiva estabelecida entre estas populações apresenta dependência relacionada à variação genética adaptativa presente

em cada uma destas e a pressões seletivas impostas por cada espécie sobre a outra.

A interação das variáveis ambientais ligadas ao habitat em que foi coletado o espécime *N. amazoniensis*, juntamente com a espécie hospedeira chiroptera, são fatores que podem ter contribuído diretamente para a modulação e equilíbrio da ecologia deste argasídeo. Considerando o exposto por Nava et al. (2010) e os resultados aqui apresentados, com a identificação de *Pteronotus* sp. como hospedeiro vertebrado para o acolhimento, pode-se ter o indicativo de que os carrapatos *N. amazoniensis* coevoluíram com esse Chiroptera, devido as facilidades estruturais e funcionais adaptadas ao gênero *Pteronotus*, bem como, também, pelas condições ambientais específicas determinantes para seu pleno desenvolvimento. No entanto, mesmo observando uma considerável coadaptação entre estes dois organismos, não podemos confirmar em definitivo o processo de coevolução nesta relação, visto não sabermos como se deu a evolução dos ancestrais desta relação, nem quais foram as forças seletivas atuantes uma sobre a outra. Neste sentido, também consideramos a hipótese de que esta possível coevolução pode ter sido consolidada por condições abióticas favoráveis existentes no habitat (riqueza de nutrientes e compostos orgânicos, temperatura, umidade e demais fatores abióticos), as quais estiveram expostos os estádios de desenvolvimento deste argasídeo. Além dos processos abióticos específicos ao hábitat estarem favorecendo o equilíbrio da interação entre *N. amazoniensis* e o *Pteronotus* sp., a dinâmica da fisiologia digestiva e a alternância entre as fases alimentar e não alimentar deste argasídeo, também podem estar contribuindo para uma interação forte entre estes dois organismos. Assim, apesar de ser uma relação parasitária, a dinâmica digestiva e a alternância nas fases de alimentação podem favorecer para uma relação menos saturante, com menor período de ação espoliativa sobre o hospedeiro, quando comparado ao estilo de vida de outros argasídeos. Para Labruna et al. (2005), em relação a coevolução carrapato-hospedeiro, somente a coexistência do carrapato a um determinado táxon ou agrupamento de hospedeiro filogeneticamente próximo não é suficiente para a consolidação de uma dada espécie de carrapato em uma área

específica, estando a junção desta condição a fatores abióticos como determinante para o sucesso quanto a sobrevivência e o estabelecimento de uma espécie de carrapato em um determinado ambiente. Para estes pesquisadores, a especificidade quanto ao hospedeiro é apenas uma das variáveis, e não a única, que contribui com o sucesso da manutenção do equilíbrio ecológico do carrapato em um habitat, com as alterações nas condições ambientais podendo afetar diretamente o equilíbrio entre as populações de parasitas e seus hospedeiros vertebrados.

3.2.5. CONCLUSÃO

Perante as condições ambientais descritas por Nava et al. (2010), durante a coleta do argasídeo *N. amazoniensis*, e aos resultados de filogenia estabelecido para *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA aqui apresentados, sugere-se que o *N. amazoniensis* apresenta forte interação biótica, não somente ao seu provável hospedeiro específico, o chiroptero do gênero *Pteronotus*, mas de uma forma geral, ao conjunto de condições específicas ecológicas bióticas e abióticas encontradas em seu ecossistema.

Considerando os quatro estádios de desenvolvimento e suas respectivas fases alimentar e não-alimentar, ficou evidente que os carrapatos *N. amazoniensis* dependem de alguma forma das condições abióticas para o seu desenvolvimento.

3.2.6. REFERENCIAL BILIOGRÁFICO

- Allan, B. F., Goessling, L. S., Storch, G.A., Thach, R.E. 2010. Blood Meal Analysis to Identify Reservoir Hosts for *Amblyomma americanum* Ticks. *Emerging Infect. Dis.*, 16(3):433-440.
- Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (acesso: 27/06/2016).
- Barros-Battesti, D.M., Onofrio, V.C., Nieri-Bastos, F.A., Soares, J.F., Marcili, A., Famadas, K.M., Faccini, J.L.H., Ramirez, D.G., Doyle, R.I., Martins, J.R., Junior, J.R., Guglielmone, A.A., Labruna, M.B. 2012. *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae): description of the larva, redescription of male and female, and neotype designation. *Zootaxa*. 3178:22-32.
- Bennett, K.E., Hopper, J.E., Stuart, M.A., West, M., Drolet, B.S. 2008. Blood-feeding behavior of vesicular stomatitis virus infected *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *J. Med. Entomol.*, 45:921-926.
- Bernotienė, R., Valkiūnas, G. 2016. PCR detection of malaria parasites and related haemosporidians: the sensitive methodology in determining bird-biting insects. *Malar. J.*, 15:283.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, 1-7.
- Brites-Neto, J., Duarte, K.M.R, Martins, T.F. 2015. Tick-borne infections in human and animal population worldwide. *Vet. World.*, 8(3):301-315.
- Cornejo, C.G.; Pérez, T.M.; Nava, S., Guglielmone, A.A. 2006. First records of the ticks *Amblyomma calcaratum* and *A. pacae* (Acari: Ixodidae) parasitizing mammals of Mexico. *Ver. Mex. Biodivers.*, 77:123-127.
- Dalis, J.S., Kazeem, H.M., Kwaga, J.K.P., Kwanashie, C.N. 2014. Severe generalized skin lesions due to mixed infection with *Sporothrix schenckii* and *Dermatophilus congolensis* in a bull from Jos, Nigeria. *Vet. Microbiol.*, 172 (3-4):475-478.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D.j. 2012. ModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Method.*, 9(8):772.

- Espinaze, M.P., Hellard, E., Horak, I.G, Cumming, G.S. 2016. Analysis of large new South African dataset using two host-specificity indices shows generalism in both adult and larval ticks of mammals. *Parasitol.*, 143(3):366-73.
- Fuente, J., Estrada-Peña, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., Sonenshine, D.E. 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.*,1;13:6938-46.
- Gandon, S., Michalakis, Y. 2002. Local adaptation, evolutionary potential and host–parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *J. Evol. Biol.*, 15:451-462.
- Giovanni, S. 2015. Past, present and future of hosteparasite co-extinctions. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.*, 4:431-441.
- Goddard, J. 2008. Infectious Diseases and Arthropods - Dynamics of Arthropod-Borne Diseases. Humana Press., 2:19-28.
- Gutiérrez, E.E, Molinari, J. 2008. Morphometrics and taxonomy of bats of the genus *Pteronotus* (Subgenus *Phyllodia*) in Venezuela you have access. *J. Mammal.*, 89(2):292-305.
- Guzmán-Cornejo, C., Paredes-León, R., Labruna, M.B., Nava, S., Venzal, J.V. 2012. Molecular identification and description of the female of *Nothoaspis reddelli* (Ixodida: Argasidae) from a cave in southeastern Mexico. *J. Parasitol.*, 98(5):918-923.
- Hoogstraal H., Aeschlimann, A. 1982. Tick-host specificity. *Bull. Soc. Entomol. Suisse.*, 55:5-32.
- Hoogstraal H. 1985. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Adv. Parasitol.*, 24:135-238.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic tree. *Bioinformatics*,17:754-755.
- Hurd H. 2003. Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annu. Rev. Entomol.*, 48:141-161.
- Jongejan, F., Uilenberg, G. 2004. The global importance of ticks. *Parasitol.*, 129:S3-S14.

- Katoh, K., Standley, D.M. 2016. A simple method to control over-alignment in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics*, 32(13): 1933-1942.
- Keirans, J.E., Clifford, C.M. 1975. *Nothoaspis reddelli*, new genus and new species (Ixodoidea: Argasidae), from bat cave in Mexico. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 68(1):81-85.
- Kent, R.J., Norris, D.E. 2005. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73(2):336-342.
- Klompen, J.S., Black IV, W.C., Keirans, J.E., Oliver, J.H. Jr. 1996. Evolution of ticks. *Annu. Rev. Entomol.*, 41:141-161.
- Koh, L.P, Dunn, R.R, Sodhi, N.S, Colwell, R.K, Proctor, H.C, Smith, V.S. 2004. Species coextinctions and the biodiversity crisis. *Science*, 305(5690):1632-1634.
- Labuda, M., Nuttall, P.A. 2004. Tick-borne viruses. *Parasitol.*, 129:S221-45.
- Labruna, M.B., Mattar, S., Nava, S., Bermudez, S., Venzal, J.M., Dolz, G., Abarca, K., Romero, L., Sousa, R., Oteo, J., Zavala-Castro, J., 2011. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev.MVZ Córdoba*, 16(2):2435-2457.
- Lafferty, K.D. 2012. Biodiversity loss decreases parasite diversity: theory and patterns. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 367(1604):2814-27.
- Labruna, M.B., Jorge R.S.P., Sana, D.A., Jácomo, A.T.A, Kashivakura, C.K., Furtado, M.M., Ferro, C., Perez, S. A., Silveira, L., Santos jr., T.S., Marques, S.R., Morato, R.G., Nava, A., Adania, C. H.,Teixeira, R.H.F., Gomes, A.A.B., Conforti, V.A., Azevedo, F.C.C., Prada, C.S., Silva, J.C.R., Batista, A.F., Marvulo, M.A.F., Morato, R.L.G., Alho, C.J.R., Pinter, A., Ferreira, P.M., Ferreira, F., Barros-Battesti, D.M. 2005. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. *Exp. Appl. Acarol.*, 36:149-163.
- Lah, E.F.C, Yaakop, S., Ahamad, M., Nor, S. Md. 2015. Molecular identification of blood meal sources of ticks (Acari, Ixodidae) using cytochrome b gene as a genetic marker. *ZooKeys*, 478:27-43.

- Laslett, D., Canbäck, B. 2008. ARWEN: a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 24(2):172-175.
- Lasta, C.S., Santos, A.P., Messick, J.B., Oliveira, S.T., Biondo, A.W., Vieira, R.F., Dalmolin, M.L., González, F.H.D., 2013. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 22(3):360-366.
- Lefèvre, T., Koella, J.C., Renaud, F. et al. 2006. New prospects for research on manipulation of insect vectors by pathogens. *PLoS Pathog.*, 2:633-635.
- Lefèvre, T., Thomas, F. 2008. Behind the scene, something else is pulling the strings: emphasizing parasitic manipulation in vector-borne diseases. *Infect. Genet. Evol.*, 8:504-519
- Liu, X.Y., Bonnet, S.I. 2014. Hard tick factors implicated in pathogen transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8(1):e2566.
- López-Wilchis, R., Flores-Romero, M., Guevara-Chumacero, L.M., Serrato-Díaz, A., Díaz-Larrea, J., Salgado-Mejia, F., Carlos Ibañez, C., Salles, L.O., Juste, J. 2016. Evolutionary scenarios associated with the *Pteronotus parnellii* cryptic species-complex (Chiroptera: Mormoopidae). *Acta Chiropt.*, 18(1):91-116.
- Mans, B.J., Castroa, M.H., Pienaar, R., Klerka, D., Gavena, P., Genua, S., Latif, A.A. 2016. Ancestral reconstruction of tick lineages. *Ticks Tick Borne Dis.*, 7:509–535.
- McCoy, K.D., Léger, E., Dietrich, M. 2013. Host specialization in ticks and transmission of tick-borne diseases: a review. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 3:57.
- Mihalca, A.D., Gherman, C. M., Cozma, V. 2011. Coendangered hard-ticks: threatened or threatening? *Parasit. Vectors.*, 4:71.
- Nava, S., Venzal, J.M, Terassini, F.A., Mangold, A.J., Camargo, L.M.A, Labruna, M.B. 2010. Description of a new argasid tick (Acari: Ixodida) from bat caves in brazilian amazon. *J. Parasitol.*, 96(6):1089-1101.
- Nava, S., Guglielmone, A.A. 2013. A meta-analysis of host specificity in neotropical hard ticks (Acari: Ixodidae). *Bull. Entomol. Res.* 103(2):216–224.

- O'dwyer, L.H., 2011. Brazilian canine hepatozoonosis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 20(3):181-193.
- Oleaga, A., Obolo-Mvoulouga, P., Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R. 2015. Midgut proteome of an argasid tick, *Ornithodoros erraticus*: a comparison between unfed and engorged females. *Parasit. Vectors.*, 8:525.
- Oliver, J.H. 1989. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 20:397-430.
- Önder, Ö., Shao, W., Kemps, B.D., Lam, H., Brisson, D. 2013. Identifying sources of tick blood meals using unidentified tandem mass spectral libraries. *Nat. Commun.*, 4:1746.
- Parola P., Raoult, D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.*, 32:897-928.
- Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M.Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P.E., Raoult, D. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the World: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.*, 26(4):657-702.
- Pichon, B., Egan, D., Rogers, M., Gray, J. 2003. Detection and identification of pathogens and host DNA in unfed host-seeking *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae) restricted access. *J. Med. Entomol.*, 40(5):723-731.
- Poulin, R., Krasnov, B.R., Mouillot, D. 2011. Host specificity in phylogenetic and geographic space. *Trends Parasitol.*, 27(8):355-361.
- Puente, J.M.de la, Ruiz, S., Soriguer, R., Figuerola, J. 2013. Effect of blood meal digestion and DNA extraction protocol on the success of blood meal source determination in the malaria vector *Anopheles atroparvus*. *Malar. J.*, 12:109.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19:1572-1574.
- Saraiva, D.G., Soares, H.S., Soares, J.F., Labruna, M.B. 2014. Feeding period required by *Amblyomma aureolatum* ticks for transmission of *Rickettsia rickettsii* to vertebrate hosts. *Emerging Infect. Dis.*, 20(9):1504-1510.
- Solano-Gallegoa, L., Baneth, G., 2011. Babesiosis in dogs and cats - expanding parasitological and clinical spectra. *Vet. Parasitol.*, 181:48-60.

- Stothard, P. 2000. The sequence manipulation suite: javascript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 28:1102-1104.
- Venzal, J.M., Hernández, L.V., Labruna, M.B., Nava, S. 2015. *Nothoaspis reddelli* Keirans & Clifford, 1975 (Acari, Ixodida, Argasidae): distribution extension. *Check List*, 11(4):1698.
- Vial, L. 2009. Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite*, 16:191-202.
- Wyman, S.K., Jansen, R.K., Boore, J.L. 2004. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinformatics*, 20(17):3252-3255.

4. CONCLUSÃO GERAL

Pode-se concluir que a abordagem filogenômica utilizada nos três estudos - considerando todos os mitogenomas estruturados durante esta pesquisa (*A. sculptum*, *N. amazoniensis* e *Pteronotus* sp PV-RO-BRA) - contribuiu para uma melhor precisão das análises referentes às relações filogenéticas entre os membros das famílias Ixodidae e Argasidae, possibilitando:

- (i) a identificação e diferenciação do genoma mitocondrial do *A. sculptum* em relação ao *A. cajennense*, ambos considerados espécies crípticas e subtipos do Complexo *A. cajennense*;
- (ii) um melhor entendimento sobre o arranjo taxonômico estabelecido para *N. amazoniensis* em relação a outros argasídeos, posicionando-o em um clado monofilético característico do arranjo taxonômico Cladista, englobado por representantes das regiões Afrotropical e Neotropical, todos parasitas específicos morcegos - podendo este fato, ser um indicativo de um processo coevolutivo entre o *N. amazoniensis* e seu hospedeiro;
- (iii) a verificação da relação associativa evolutiva entre o argasídeo *N. amazoniensis*, seu hospedeiro *Pteronotus* sp. e o ecossistema habitado - o que ficou caracterizado pela dependência evolutiva deste argasídeo, não somente ao seu provável hospedeiro, mas de uma forma geral, ao conjunto de condições específicas ecológicas bióticas e abióticas encontradas em seu ecossistema.

5. ANEXOS

5.1. ANEXOS – CAPÍTULO 2

Tabela S1 - Sítios de clivagem para enzimas de restrição no genoma mitocondrial de *Amblyomma sculptum*.

Sítios de clivagem	Posição da clivagem entre bases	Tipo de clivagem	Gene
BgIII	3076-3077 / 3080-3081	A	CO2
XbaI	3079-3080 / 3083-3084	A	CO2
EcoRV	3085-3086	B	CO2
XhoI	4515-4516 / 4519-4520	A	CO3
EcoRI	4726-4727 / 4730-4731	A	CO3
HindIII	5037-5038 / 5041-5042	A	CO3
HindIII	6794-6795 / 6798-6799	A	tRNA-Leu
HindIII	7308-7309 / 7312-7313	A	16SrRNA
HindIII	7707-7708 / 7711-7712	A	16SrRNA
HindIII	8460-8461 / 8464-8465	A	12SrRNA
EcoRV	10032-10033	B	ND5
EcoRI	12599-12600 / 12603-12604	A	tRNA-Thr
BgIII	13853-13854 / 13857-13858	A	CYB

Nota: A - simetricamente situada ao redor do eixo de simetria; B - no eixo de simetria.

Tabela S2 - Sobreposições gênicas no genoma mitocondrial de *Amblyomma sculptum*.

Genes	Trechos de sobreposição	pb
tRNA-Trp / tRNA-Tyr	1095-1096	2
tRNA-Tyr / CO1	1154-1161	8
tRNA-Lys / tRNA-Asp	3443-3444	2
tRNA-Asp / ATP8	3507	1
ATP8 / ATP6	3659-3665	7
ND3 / tRNA-Ala	5510-5511	2
tRNA-Arg / tRNA-Asn	5640-5644	5
tRNA-Asn / tRNA-Ser	5696-5709	14
tRNA-Glu / ND1	5808-5831	24
ND4 / ND4L	12363-12369	7

Tabela S3 - Regiões intergênicas não codificadoras no genoma mitocondrial de *Amblyomma sculptum*..

Genes	Intervalos das regiões intergênicas	pb
CO1 / CO2	2693-2701	9
CO2 / tRNA-Lys	3377-3378	2
ATP6 / CO3	4325-4336	12
tRNA-Ala / tRNA-Arg	5573-5580	8
tRNA-Ser / tRNA-Glu	5765-5766	2
12SrRNA / tRNA-Ile (RC1)	8820-9123	304
tRNA-Ile / tRNA-Gln	9192-9193	2
tRNA-Gln / tRNA-Phe	9260	1
tRNA-Phe / ND5	9321-9324	4
tRNA-His / ND4	11043	1
tRNA-Pro / ND6	12765-12770	6
ND6 / CYB	13200-13202	3
tRNA-Ser / tRNA-Leu	14343-14345	3
tRNA-Leu / tRNA-Cys (RC2)	14410-14713	304
tRNA-Cys / tRNA-Met	14765-14780	16

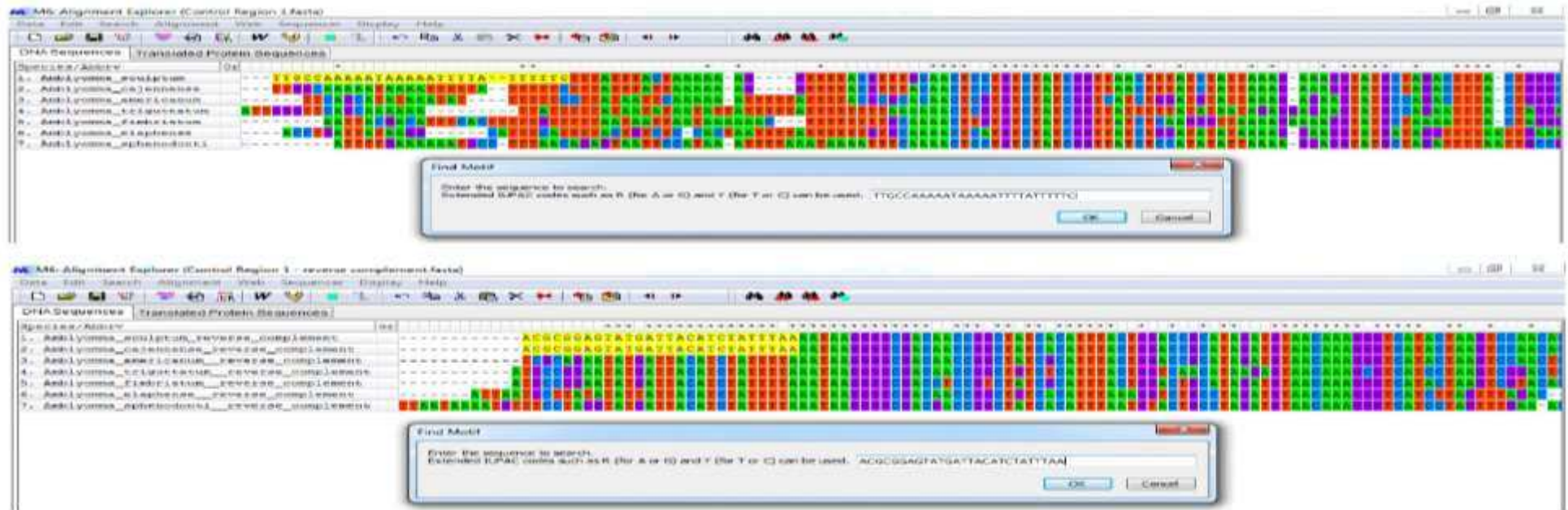
Nota: RC1: Região Controle 1; RC2: Região Controle 2.

Tabela S4 – Estatística dos nucleotídeos nos genomas mitocondriais das espécies analisadas nesta pesquisa

Padrão de bases	<i>A. sculptum</i> (14780 resíduos)		<i>A. cajennense</i> (14780 resíduos)		<i>A. americanum</i> (14709 resíduos)		<i>A. triguttatum</i> (14740 resíduos)		<i>A. fimbriatum</i> (14705 resíduos)		<i>A. elaphense</i> (14627 resíduos)		<i>A. sphenodonti</i> (14772 resíduos)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
G	1482	10,03	1488	10,07	1458	9,91	1381	9,37	1385	9,42	1234	8,44	1438	9,73
A	5454	36,90	5444	36,83	5478	37,24	5653	38,35	5601	38,09	5696	38,94	5585	37,81
T	5794	39,20	5783	39,13	5816	39,54	5903	40,05	5820	39,58	6072	41,51	5905	39,97
C	2050	13,87	2064	13,96	1957	13,30	1803	12,23	1899	12,91	1625	11,11	1844	12,48
G:C	3532	23,90	3552	24,03	3415	23,22	3184	21,60	3284	22,33	2859	19,55	3282	22,22
A:T	11248	76,10	11227	75,96	11294	76,78	11556	78,40	11421	77,67	11768	80,45	11490	77,78

Nota: A - Número de vezes que o nucleotídeo participa no genoma; B – Porcentagem de participação do nucleotídeo no genoma (%).

Figura S1 - Demonstrativo de similaridade dos primers forward e reverse , respectivamente, em relação as sequências sense e anti-sense da região controle 1 de *Amblyomma sculptum*.



Software Sequence Manipulation Suite - SMS versão 2.0 (Stothard, 2000)

PCR Products results Control Region 1 - In silico PCR

```
Primers: >Control_Region_1_Forward
          TTGCCAAAAATAAAAAATTTTATTTTC
          >Control_Region_1_Reverse
          ACCGGAGTATGATTACATCTATTTAA
```

```
>304 bp product from linear template Amblyomma_sculptum, base 1 to base 304 (Control_Region_1_Forward - Control_Region_1_Reverse)
TTGCCAAAAATAAAAAATTTTATTTTCCTTCTTACTAAAAAAGGTTTACGTTTGCAC
TCCTGCTATCGGTEAACTTTEATCTATTAAGAAAGGATGCTAGACTTFACTGGGCTTT
TTTTCTTATTAATCAGTTCGTGATTTAGAGCTAGATGAGACATCTATTTCTTTCTCC
GAATTATATTTAGTAGATGTGTGTTGGACTTAGATGACCCCTTGTTCATCTATGCG
GTCCAGTAAATGTGATAGCCGGTGTGCGCCCTTATTTTAAATAGATGTAATCATACTCC
GCCT
```

Figura S2 - Demonstrativo de similaridade dos primers forward e reverse , respectivamente, em relação as sequência sense e anti-sense da região controle 2 de *Amblyomma sculptum*.



Software Sequence Manipulation Suite - SMS versão 2.0 (Stothard, 2000)

FCR Products results Control Region 2 - In silico FCR

Primers: >Control_Region_2_Forward

CGTTTGTTAACCTTTTCTCGAAATTCC

>Control_Region_2_Reverse

AAATAAGGGGCGACAAACCGGCTATCACAT

>268 bp product from linear template *Amblyomma sculptum*, base 9 to base 276 (Control_Region_2_Forward - Control_Region_2_Reverse)

```
CGTTTGTTAACCTTTTCTCGAAATTCCGAGAAAAGGTTTTCAGTTTGCAACTCCTGCTAT
CGTTAACTTATCTATTAAAGAAAAGGTATGCTAGACTTACTGGGCTTTTTTTCCTAT
TTAAATCAGTCTGATTAGAGCTAGATGAGACATCTATTTTCCTTCCGAAATTATTA
TTTAGTAGATGTGTGTTGACTTAGATGACCTTTGTTACATCTATGCGGTCCAGTAA
TGTATAGCCGGTTGTGCCCCCTTATT
```

CAPÍTULO 2 - ARTIGO ORIGINAL 1 - Caracterização organizacional e análise comparativa do mitogenoma do carrapato *Amblyomma sculptum*.

CD com as planilhas em excel:

- Planilhas S1, S2, S3, S4, S5 e S6, respectivamente para a identificação de polimorfismos para os genomas mitocondriais de *Amblyomma cajennense*, *A. americanum*, *A. fimbriatum*, *A. triguttatum*, *A. elaphense* e *A. sphenodonti*, em relação ao genoma mitocondrial de *A. sculptum*.

Depósito no GenBank: Genoma Mitocondrial *Amblyomma sculptum*

LOCUS *Amblyomma_sculptum*_(KX_622791) 14780 bp DNA circular UNA 22-JUL-2016

DEFINITION *Amblyomma sculptum* mitochondrion, complete genome.

KEYWORDS

SOURCE *Amblyomma sculptum* (unknown)

ORGANISM *Amblyomma sculptum*

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida;
Acari; Parasitiformes; Ixodida; Ixodoidea; Ixodidae; Amblyomminae;
Amblyomma.

REFERENCE 1 (bases 1 to 14780)

AUTHORS Lima,P.H.C., Barcelos,R.M., Klein,R.C., Vidigal,P.M.P.,
Fabres-Klein,M.H., Dergam,J.A. and Mafra,C.

TITLE The complete mitochondrial genome of *Amblyomma sculptum*

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 14780)

AUTHORS Lima,P.H.C., Barcelos,R.M., Klein,R.C., Vidigal,P.M.P.,
Fabres-Klein,M.H., Dergam,J.A. and Mafra,C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-JUL-2016) Biochemistry and Molecular Biology, Federal
University of Vicoso, Av PH Rolfs, s/n. Campus UFV., Vicoso, MG
36570-900, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers

tRNA 1..68

/product="tRNA-Met"

source 1..14780

/organism="Amblyomma sculptum"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

CDS 69..1034

/gene="ND2"

/codon_start=1

/transl_table=5

/product="NADH dehydrogenase subunit 2"

/translation="MLFKNVMKWLIVMTILISLSSNSWFLWLMMEMNLLIFISILNK
KKMNSNLMSVYFVIQSFSSSTIFFFSSLNLFQMFLLFKMIMSISMLIKLAVVPFHW

LTSLSEMEDFSSLWVILTMQKMIPLIVLYTYNVEIIIMFAAIIIGSILALNSKTIK

KILIFSSISHQGWMSLILMKSFWLTYLLIYSTLIFKISSSLTKVNFNMTSLFFIN

NKYPEKISIISSMMLSLGGMPFLGFFIKLMSIIILINNFNIIIIIMSSMINIYFYL

RIFTPLLLNYFSFKNYFKSNYSVKNFILTMNVIFSIFLLNVIMF"

gene 69..1034

/gene="ND2"

tRNA 1035..1096

/product="tRNA-Trp"

tRNA complement(1095..1161)

/product="tRNA-Tyr"

CDS 1154..2692

/gene="CO1"

/codon_start=1

/transl_table=5

/product="cytochrome c oxidase subunit 1"

/translation="MLPRWMYSTNHKDIGTMYLIFGSWAGMAGLSMSILIRMELGQPG

LLIGNDQIYNVIVTAHAFIMIFFMVMPIIMIGGFNWLVPIMLGAPDMAFPRMNNMSFW

LLPPSLCLLINSLLIESGAGTGWTVYPPPLSSNLSHYGPSVDLAFSLHLAGASSILGS

INFITTIINMRSTGMTMERIPLFVWVSVFITILLLLSLPVLAGAITMLLTDNRNFTSF

FDPSGGDPILYQHLFWFFGHPEVYILILPGFGMISHIICFHTGKKEPFGNLGMIYAM

LAIGLLGFVWAHHMFTVGMVDVTRAYFTSATMIIAVPTGIKIFSWLATLHGTKIKFN

TPIMWSLGFIFLTIGGLTGIMLANSSIDIILHDTYYVAHFHYVLSMGAVFAIMGAI

IHWFPMMFGMNFNSVMTKSQFILTFIGVNLTFPPQHFLGLSGMPRRYSYDPDFFSKWN

FISSIGSIISLLGVILMIIFWISLIEKKSIISSLSSSSSSIEWMMNFPPSEHTFSQNN

IIIK"

gene 1154..2692

/gene="CO1"
 CDS 2702..3376
 /gene="CO2"
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="cytochrome c oxidase subunit 2"
 /translation="MMTWSQITFPDMNSPIMEQMAFFHDHSMIIIISITITMYMIVN
 IMMNSFTSRSMMEGQEIEIWTVIPAILLIFIALPSLHLLYLTD EIFNAQTSIKIIGH
 QWYWSY EYSDFNKEFDSFLIPETDL DINSFR LLET DNNLMIPFNTMIKFLITSADVIH
 SWTIPSLGMKMDAIPGR LNQTFSIAKR PGLFFGQCSEICGTNHSFMPISLEVSSVKNF
 LNFMKI"
 gene 2702..3376
 /gene="CO2"
 tRNA 3379..3444
 /product="tRNA-Lys"
 tRNA 3443..3507
 /product="tRNA-Asp"
 CDS 3507..3665
 /gene="ATP8"
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="ATP synthase subunit 8"
 /translation="MPQLYPMSWTMLTSFMLAFFIILMTIIFFFKPKYSMLFNKKKNT
 TYFFQFKW"
 gene 3507..3665
 /gene="ATP8"
 CDS 3659..4324
 /gene="ATP6"
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="ATP synthase subunit 6"
 /translation="MMNNLFSIFDPSTSN TMSMNWMLCFWMLIIPFPFWASSSLFLI
 SWKTYLKKFFQEISNNVSTFKYKNILMLIVIFCLILFSNSLGLLPYVFTPSSHLLFSM
 FFSFPLWISLILFNLLNKFTK TMSHLVPLGSPIALSFFMVLIETVSNLIRPITLSVRL
 TANMISGHLLIHLLSTMMIMSPSFFSLMFPIMVMLLILETAVAMIQS FVFVTLISLYL
 NET"
 gene 3659..4324
 /gene="ATP6"
 CDS 4337..5114
 /gene="CO3"
 /codon_start=1
 /transl_except=(pos:5114,aa:TERM)
 /transl_table=5
 /product="cytochrome c oxidase subunit 3"
 /translation="MMFHFPFHLVEKSPWPLTSSISAFSLTLG FVN YFN NNNNILLV LIA
 MMVFLSSFQWWRDVSREASFQGFHTKYVLEGLKLGMLLIFLSEVFFFISFFWAFHHS
 SLSPNIEIGSQWPPQNIIPNPF EIPLLNSTILISSGISVTWAHHAIMNGDYFSSLMS
 LKITIMLGAMFTMFQVFEYYQAQFSITDSVFGSTFFLTTFGHGHIHVIIGSLFLLVSYF
 RIKNSLISKSHFFGF EASAWYWHFVDV VVWLF LFTFMYWVWF"
 gene 4337..5114
 /gene="CO3"
 tRNA 5115..5175
 /product="tRNA-Gly"
 CDS 5176..5511
 /gene="ND3"
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="NADH dehydrogenase subunit 3"
 /translation="MFLFFIIFLILLIFVYLI MNFKNLKMKELSPFECGFDPFSL S
 RVPFSLKFFFLGIVFLVFDVEIIVLPFPFLLINKSFSLMFSFIMINLVILLGFLYEW
 KSGMIEWMK"
 gene 5176..5511
 /gene="ND3"

tRNA 5510..5572
/product="tRNA-Ala"

tRNA 5581..5644
/product="tRNA-Arg"

tRNA 5640..5709
/product="tRNA-Asn"

tRNA 5696..5764
/product="tRNA-Ser"

tRNA 5767..5831
/product="tRNA-Glu"

CDS complement(5808..6767)
/gene="ND1"
/codon_start=1
/transl_table=5
/product="NADH dehydrogenase subunit 1"
/translation="MLNLLIFVITLLMALLSIAFFTLLEKIMGYCQIRKGPNKSGFQ
GLLQPFSDAIKLFSNEMNFMFYLNVLVYLVSPILSIFMMLMLWTIFYFKSNLLNMNLS
LIFFLCISSMSSYSILFGGWSSNSKYSLIGAYRGFAQIISYEVSAMILISFLLVES
YSFNKFLLIQENFSVFISFPIIGMIWLIVLMAETNRTPFDLAESESELVSGFNIEYGS
WLFAlfMSEYGMiILVSLITNYMLFGFYyTNNLITLFLMIMFILIRSTFVRYRYDNL
MMMAWKTILPVVIFFFSMMFLMVFILNSFCINFWNYLNPLeF"

gene complement(5808..6767)
/gene="ND1"

tRNA complement(6768..6836)
/product="tRNA-Leu"

rRNA complement(6837..8065)
/product="16S ribosomal RNA"
/note="label: 16S rRNA"

tRNA complement(8066..8128)
/product="tRNA-Val"

rRNA complement(8129..8819)
/product="12S ribosomal RNA"
/note="label: 12S rRNA"

misc_feature 8820..9123
/note="control region 1"

tRNA 9124..9191
/product="tRNA-Ile"

tRNA complement(9194..9259)
/product="tRNA-Gln"

tRNA complement(9261..9320)
/product="tRNA-Phe"

CDS complement(9325..10980)
/gene="ND5"
/codon_start=1
/transl_table=5
/product="NADH dehydrogenase subunit 5"
/translation="MYMNWSILLAIMSLMFGFMMSFYLNnitVIEYIMISINSLDL
KFYFLFDWVSSMFSMVVLISSMVVMYSNSYMNTDKNKNSFCMIVLLFVFSMILLIMM
PNMFTIILGWDGLGLVSYCLVIYYQSINSYNSGMMTIISNRIGDVMILSMIFFVVSFG
SFDFLSFNKVELICGILILVAGLTKSAQIPFSAWLPAAMAAPTPVSSLVHSSTLVTAG
VYILMRFSYLFEVKIFSTILIKVSVITMLMAGLNAFFEMDFKKVIAFSTLSQLSMMMI
ILSLGKMElsFFHLLMHAMFKSMLFLCAGFVIHSFYGVQDIRMLGNFFKFSPVISSCM
MISFSLSLMGFPFIGGFYSKDLIVEFFFFKVNILLILFILGVMFTLLYCMRLIYELL
LKGILSMsiYSSSFSYyMVFPILMLCFLVLISGNLLFWFSNPNSLIIFISKFPKLFML
VFMLMLLMVFkILNKNFLNLLANLDFYKIWFLSSLTsYVMLAGSKPILKSSISDWTW
MENLGPkMINNSMENMFNLNFWVEKQNLskILLVIMTMIMiIL"

gene complement(9325..10980)
/gene="ND5"

tRNA complement(10981..11042)
/product="tRNA-His"

CDS complement(11044..12369)
/gene="ND4"
/codon_start=1

```

/transl_table=5
/product="NADH dehydrogenase subunit 4"
/translation="MLSIVIFISFWIMCVSFFFKTLEIMVMILFLMMTFLCYMTHMNMVM
EIMENFSLDMLSNLMISLTIWISFLMVLASFTNSVSLNKMFLFYIMLMMFLLLVCFSV
SNLLAFYFFFESVLFPIVMLIFGWGNQPERLQAGFYMLMYTIFGSFPMFVVIIFYFWK
NYSMLYLYMNWIELNMGFIFMFLMLGFLVKIPMFFFHLWLPKAHVEAPISGSMILAGI
LLKLGVYGIFRFKKMMIVELVKTGEVLTTSIWGGVMISLFCMYQIDIKALIAYSVC
HMGVILGGMINFSIFSSWGSLLLMIHGHLCSGLFCLANVIYERVFTRNMMVMFKGLKM
FFPSLTLLWWFLFSITNMSAPLTMNLFGEFFLSLSILKFSIFYFLPIMLIIFLSACYSI
YMYSYINHGYGWTFWSLKPILSREYLTVFLHAFPMFMWFLKVSMFCKWI"
gene      complement(11044..12369)
          /gene="ND4"
CDS       complement(12363..12638)
          /gene="ND4L"
          /codon_start=1
          /transl_table=5
          /product="NADH dehydrogenase subunit 4L"
          /translation="MVMISLFFVYLMGILALLINRFHLMVLSIEFMYSLTVLMMIL
FSLNVLNIFLFLVSLVCEAALGLSLLVLLNFYYGNEMLNAMNLIK"
gene      complement(12363..12638)
          /gene="ND4L"
tRNA      12641..12702
          /product="tRNA-Thr"
tRNA      complement(12703..12764)
          /product="tRNA-Pro"
CDS       12771..13199
          /gene="ND6"
          /codon_start=1
          /transl_table=5
          /product="NADH dehydrogenase subunit 6"
          /translation="MKLFLMISIVLISMHPMMMLIAVILLTLFISLLFYTITENSLF
PLIMILMILGGLIIFMYIISLCPNKKMNFYKISIVGFAVLFNLNFMFMKILNQNL
IKIYFFTFVNMLLILLMLYLLITLSVILKLNLNWISSPMKSN"
gene      12771..13199
          /gene="ND6"
CDS       13203..14278
          /gene="CYB"
          /codon_start=1
          /transl_except=(pos:14277..14278,aa:TERM)
          /transl_table=5
          /product="cytochrome b"
          /translation="MLKILNPMINLPSISSISYMWNFSGSLLGICLMIQILSGFFLAMN
FSSDVSTAFMMISHIQRDVNYGWLIRSIHANGASLFFIFIYIHVGRGIYSSFFFKV
WLSGLVIFILMATAFLGYILPWGQMSFWGATVITNLISAVPYFGHSITYWIWGGFSV
DNNTLIRFFSLHFILFPILLVMSMIHILLIHEKGSSNPLGISMNVDKIPFHPYFTIKD
LLGIMLIVIPFSLFILLFPYSMMDAENFNMANPMITPPHIQPEWYFLFAYAILRSIPN
KLGGLVALLMSIIILFLTFFMKNKISSFYFSLAKKLTFWTLVNTFFILTFLGAMPIE
YPYDILSKIITFIYFLIFIMFPLI"
gene      13203..14278
          /gene="CYB"
tRNA      14279..14342
          /product="tRNA-Ser"
tRNA      complement(14346..14409)
          /product="tRNA-Leu"
misc_feature 14410..14713
          /note="control region 2"
tRNA      14714..14764
          /product="tRNA-Cys"

```

5.2. ANEXOS – CAPÍTULO 3 – PARTE I

Tabela S1 - Sítios de clivagem para enzimas de restrição no mitogenoma de *Nothoaspis amazoniensis*.

Sítios de clivagem	Posição da clivagem entre bases	Tipo de clivagem	Gene/Intervalo intergênico
EcoRV	4592-4593	B	COX3
EcoRV	5381- 5382	B	NAD3
XbaI	8385-8386 / 8389-8390	A	NAD4
BglII	9255-9256 / 9259-9260	A	tRNA-Pro
XhoI	10048-10049 / 10052-10053	A	CYB
BglII	10433-10434 / 10437-10438	A	CYB
HindIII	11515-11516 / 11519-11520	A	NAD1
EcoRI	11855-11856 / 11859-11860	A	tRNA-Leu
HindIII	11871-11872 / 11875-11876	A	tRNA-Leu
EcoRV	11921-11922	B	tRNA-Leu
HindIII	12825-12826 / 12829-12830	A	16S rRNA
EcoRV	12915-12916	B	16S rRNA
HindIII	13821-13822 / 13825-13826	A	12S rRNA
BglII	14051-14052 / 14055-14056	A	12S rRNA / tRNA-Ile ^(RC)

Nota: A - simetricamente situada ao redor do eixo de simetria; B - no eixo de simetria; RC - Região Controle.

Tabela S2 - Sobreposições gênicas para o mitogenoma de *Nothoaspis amazoniensis*

Genes	Trechos de sobreposição	pb
tRNA-Met / NAD2	32-61	30
NAD2 / tRNA-Trp	1020-1021	2
tRNA-Trp / tRNA-Cys	1075-1082	8
tRNA-Tyr / COX1	1192-1199	8
COX2 / tRNA-Lys	3410-3475	66
tRNA-Lys / tRNA-Asp	3474-3475	2
COX2 / tRNA-Asp	3474-3483	10
ATP8 / ATP6	3683-3689	7
ATP6 / COX3	4303-4351	49
COX3 / tRNA-Gly	5130	1
tRNA-Gly/ND3	5187-5189	3
tRNA-Ala / tRNA-Arg	5587	1
tRNA-Asn / tRNA-Ser	5704-5706	3
tRNA-Glu / tRNA-Phe	5814-5815	2
NAD5 / tRNA-His	7535-7537	3
tRNA-His / NAD4	7593-7594	2
NAD4 / NAD4L	8903-8909	7
NAD6 / CYB	9756	1
tRNA-Ser / NAD1	10872-10924	53
NAD1 / tRNA-Leu	11847-11849	3
tRNA-Leu / 16S rRNA	11975	1
tRNA-Ile / tRNA-Gln	14351-14353	3

Tabela S3 - Regiões intergênicas não codificadoras no mitogenoma de *Nothoaspis amazoniensis*

Genes	Intervalos das regiões intergênicas	pb
tRNA-Cys / tRNA-Tyr	1136-1137	2
COX1 / COX2	2731-2733	3
tRNA-Asp / ATP8	3534-3551	18
NAD4L / tRNA-Thr	9182-9188	7
tRNA-Pro / ND6	9309-9336	28
CYB / tRNA-Ser	10860-10861	2
tRNA-Leu / tRNA-Leu	11907-11910	4
12S rRNA / tRNA-Ile ^(RC)	13950-14290	341

Nota: RC - Região Controle.

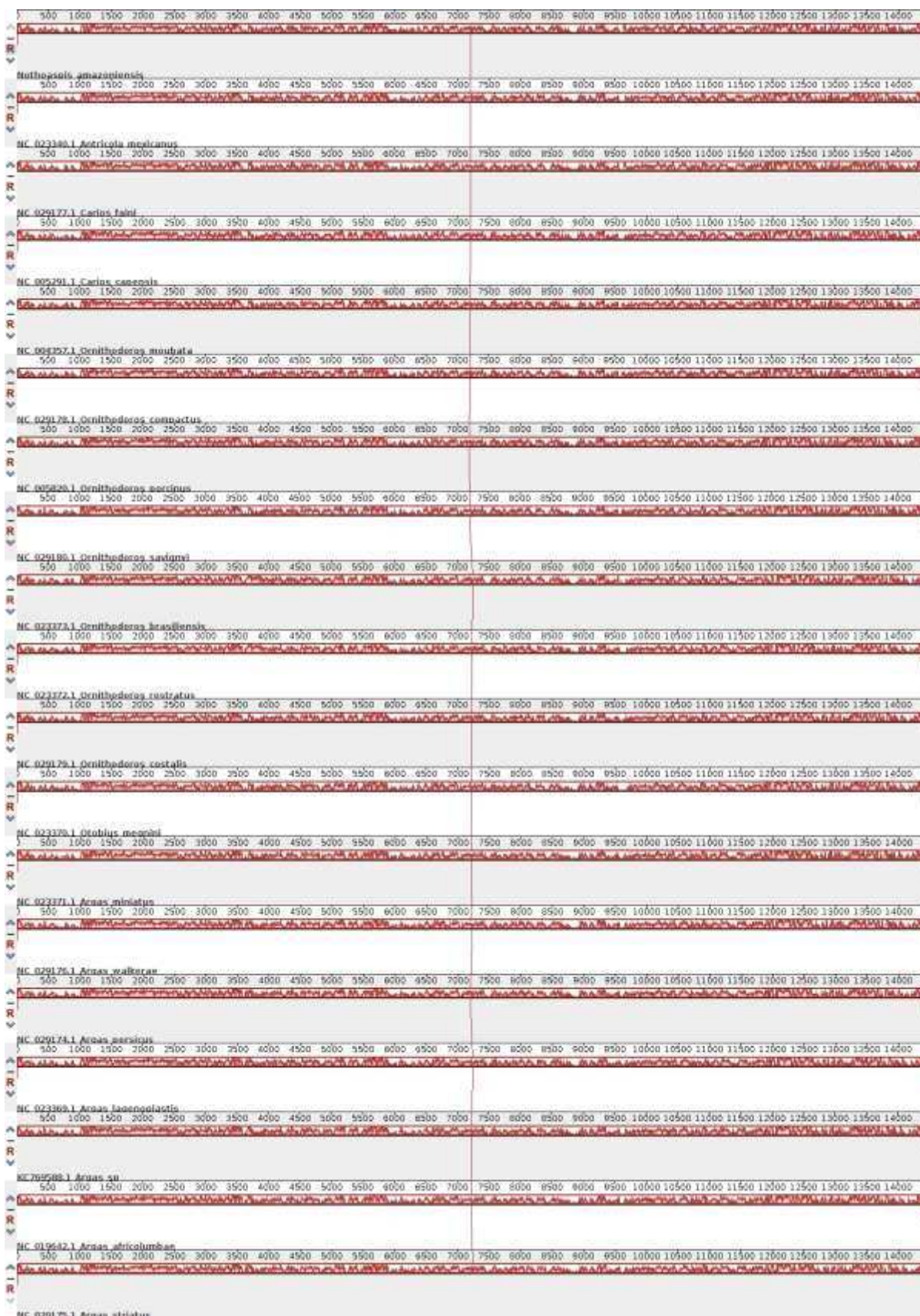


Figura S1: Alinhamento comparativo e organizacional dos genomas mitocondriais completos de carrapatos da família Argasidae – BCLs (Blocos Colineares Locais).

Depósito no GenBank: Genoma Mitocondrial de *Nothoaspis amazoniensis*

LOCUS Nothoaspis_amazoniensis_(KX712088) 14416 bp DNA circular UNA 08-AUG-2016

DEFINITION Nothoaspis amazoniensis mitochondrion, complete genome.

KEYWORDS .

SOURCE Nothoaspis amazoniensis

ORGANISM Nothoaspis amazoniensis

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida;
Acari; Parasitiformes; Ixodida; Ixodoidea; Argasidae;
Ornithodorinae; Nothoaspis.

REFERENCE 1 (bases 1 to 14416)

AUTHORS Lima,P.H.C., Vidigal,P.M.P., Barcelos,R.M., Klein,R.C.,
Fabres-Klein,M.H., Dergam,J.A., Venzal,J.M. and Mafra,C.

TITLE Nothoaspis amazoniensis mitochondrion, complete genome

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 14416)

AUTHORS Lima,P.H.C., Vidigal,P.M.P., Barcelos,R.M., Klein,R.C.,
Fabres-Klein,M.H., Dergam,J.A., Venzal,J.M. and Mafra,C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (08-AUG-2016) Biochemistry and Molecular Biology
Department, Federal University of Vicosa, Av PH Rolfs, s/n. Campus
UFV., Vicosa, Minas Gerais 36570-900, Brazil

COMMENT ##Assembly-Data-START

##Assembly Method :: CLC Genomics Workbench, version 6.5.1

Sequencing Technology :: Illumina - HiSeq 2500

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

tRNA 1..61

/product="tRNA-Met"

source 1..14416

/organism="Nothoaspis amazoniensis"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

CDS 32..1021

/gene="NAD2"

/codon_start=1

/transl_except=(pos:1019..1021,aa:TERM)

/transl_table=5

/product="NADH dehydrogenase subunit 2"

/translation="MPQMWLIPLLMMIPNLIYWFLISSVIMSFSSSSMFFLWMCLEI

NMMSFIPMMHSKNTMSMNSIVTYFLIQSTASSIFLLTSLITLTLMTMKFLSNMIMIS

MLIKLGMSPFHSWLPQISEGLSYSSLILLTIQKMPIYILSIFTSNLSIFILSAT

IGSLGGFNQFSIRKILAFSSISHLVSTLLMINSNFWLTYLLIYSFILLTINFINY

FSMNFNLNFKKENSNMNLFITLMLLSLGGMPPMIGFMMKWALSIIMNQFMTISIFLI

MSSLINLFFYLRLSYTMILKFTTSSKWSASASHNLIYMLMFQAVSIFLLISMI"

gene 32..1021

/gene="NAD2"

tRNA 1020..1082

/product="tRNA-Trp"

tRNA complement(1075..1135)

/product="tRNA-Cys"

tRNA complement(1138..1199)

/product="tRNA-Tyr"

CDS 1192..2730

/gene="COX1"

/codon_start=1

/transl_table=5

/product="cytochrome c oxidase subunit 1"

/translation="MLPRWMFSTNHKDIGTMYLMLGAWSMMMGMSLSILIRLELGQPG

SMIGDDQIYNVIVTSHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLIPIMLGTPDMAFPRMNNMSFW

LLPSSLFLLSSSLTESGVGTGWTVYPPPLASNISHSGMSVDLAIFSLHLAIGSSILGS

INFITTIMNMRPKGMKIEQIPLFLWSVIITILLLLSLPVLGAIITMLLDRNFNTSF

FDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEVYILILPGFGMISHVICFQTGKKEPFGTLGMIYAM
AAIGLLGFVWAHHMFTVGMVDTRAYFTAATMIIAVPTGIKIFSWLATLHGWWIQYD
TPILWSLGFVFLFTIGGLTGIIANSSIDITLHDTYYVAHFHYVLSMGAVFAILAGI
THWFPMFFGWTFNSILLKIHFFSMFIGVNITFFPQHFLGLAGMPRRYSYDPDFFTKWN
VISSLGSILSFISVLMFIYIMWESISLKRQLIYSQFPNSLIEWQLNFPPSEHTFNQIN
ILIK"

gene 1192..2730
/gene="COX1"

CDS 2734..3483
/gene="COX2"
/codon_start=1
/transl_table=5
/product="cytochrome c oxidase subunit 2"
/translation="MMTWSNISFPNSNSPIMEQLIFFHDHSMTIIILITIITLYMITN
IVSNKFKNRFLMEGQEIEILWTIIPITIIILYIALPSLRLLYLMESFFPMSMTLKVIGH
QWYWSYSEYSDFNIDFDSFMIPNESMNKNSFRLLDVDNRLIIPYNTNMRFLVSSMDVIH
SWTIPSLGMKVDAVPGRLNQTVSTPLRPGIFFGQCSEICGANHSFMPISMEITSIKNF
FNWINLFSLNGWNLSIGLLNHTMVFLLSMKN"

gene 2734..3483
/gene="COX2"

tRNA 3410..3475
/product="tRNA-Lys"

tRNA 3474..3533
/product="tRNA-Asp"

CDS 3552..3689
/gene="ATP8"
/codon_start=1
/transl_table=5
/product="ATP synthase subunit 8"
/translation="MNWNLLIIFSLILILTTSMMYFNFIQKSIKKTMKKNWS
W"

gene 3552..3689
/gene="ATP8"

CDS 3683..4351
/gene="ATP6"
/codon_start=1
/transl_table=5
/product="ATP synthase subunit 6"
/translation="MMMNLFAIFDPSSNMLSMNWLSTLIILMIPYSYWLIPSRHIL
IWFTISNYLITELNSLFSKNKKKFMFMLSFLWFIMSNMLMGLFPYIFTSTSHINLTT
SLAIPLWLTMLFGWINQTNHMFHMLVPNGTPMILSSFVLIETTSNLRIPITLAVRL
SANMISGHLLCLLSNILESTQNLFILVIPMILILLTLETAVAIQSYVFTLTSLYL
NELN"

gene 3683..4351
/gene="ATP6"

CDS 4303..5130
/gene="COX3"
/codon_start=1
/transl_table=5
/product="cytochrome c oxidase subunit 3"
/translation="MCIRNINIIMFKWIKLMKFQPFHIVDKSPWPITGSIAAFTFMTG
MIDLHMFNNLKILFIATITFMTMIQWWRDICREASFQGNHTSIVLKSMMKWGMSLFII
SEIFFFISFFWAFFHSSLSPNIEIGIQWPPMAILPFNPFSIPLNNTILLSSGISITW
SHHSILMSNLNEAKNSLSTILLGMLFTALQAWYEQAPFSISDSIYGSTFFMATGFH
GLHVIIIGSTFLLISLIRLILMHFSNSHHFGFEAAAWYWHFVDVWVWFLYTFVYWWWVY"

gene 4303..5130
/gene="COX3"

tRNA 5130..5189
/product="tRNA-Gly"

CDS 5187..5525
/gene="NAD3"
/codon_start=1
/transl_table=5

```

/product="NADH dehydrogenase subunit 3"
/translation="MMALFITSMLITIIITMGNLTMKKSLSFKKEKNSPFECGFDPFS
LARQPFSIRFFMIAIIFLIFDIEIIILLPFPMLNNFNMMNLIIFMTLIIILMISLFY
EWKNGMIQWL"
gene      5187..5525
          /gene="NAD3"
tRNA      5526..5587
          /product="tRNA-Ala"
tRNA      5587..5644
          /product="tRNA-Arg"
tRNA      5645..5706
          /product="tRNA-Asn"
tRNA      5704..5754
          /product="tRNA-Ser"
tRNA      5755..5815
          /product="tRNA-Glu"
tRNA      complement(5814..5874)
          /product="tRNA-Phe"
CDS       complement(5875..7537)
          /gene="NAD5"
          /codon_start=1
          /transl_except=(pos:complement(5875),aa:TERM)
          /transl_table=5
          /product="NADH dehydrogenase subunit 5"
          /translation="MIFLKWGILMLILSLAFFLFSIFELMSMKVILLEYIIMSYPGNFE
IKMFFLFDWMSMIFSSVVLVIGSVIIYSADYMIDEKFKTYFLYGVLLFVGSMLMIL
SPNLIMILLGWDGLGLVSYCLVVFYQNYKSDVAGMITIMSNRVGDIMILLSIVMLLN
GVLDLDFMLFSSMFWICGYMLVIAGMTKSAQIPFSAWLPAAMAAPTVPVSSLVHSSTLVTA
GVYILIRLKFMMMITNYSNFLMYFSLVTMMAGFNAVLETDLKKIIALSTLSQLGLMM
VILSIGKADLSFFHLLTHALFKAMFLCAGFMIHTSLGSQDIRFMGGFYWMNPLIGVA
FSLANMSLFGIPFLSGFYSKDLILEFIYMSSAGAVLLIGIVVSTITTSIYSFRVMFY
LWKGGVKMLNFNYHWSIYMEVPILLMGVFLVFCGSMILSWILLDCEVINLNFSDSILN
LWIVFIGFWIFVYFFVWDDLGCFSIKMFVGNMWFMTFTGPIFSMNLNKGIIYYNCD
NGWVEELGPQGLYKFNFEFSKFIQWVQLSSFSNIICFLFFVIFIF"
gene      complement(5875..7537)
          /gene="NAD5"
tRNA      complement(7535..7594)
          /product="tRNA-His"
CDS       complement(7593..8909)
          /gene="NAD4"
          /codon_start=1
          /transl_except=(pos:complement(7593..7595),aa:TERM)
          /transl_table=5
          /product="NADH dehydrogenase subunit 4"
          /translation="MLSILLGILGMFVFSWLWLSFMEIVLVVIFISILGFFMMEWGMNI
GIGFLGVLDLMSFLLVLSLWIGILMVIASMNLVYSESMFKFYLAMMLFLLTFCFMI
LNLFGFYLLFESILIPIIIMLVGWGVQPERLQAGIYMLFYTLVGSPLLLLFLLIYSG
TSIFFMNWLNFNISILFFMGVVGFLVKMPMYLVHLWLPKAHVEAPIAGSMVLAGVLL
KLGYYGMYRVKVVLDAKMIEMGSLFISIVLIGGVIIGMICLQQVDVKSLIAYSSVAHM
GLALGGIFSMSVWGFMGNILIMLGHGLCSSGLFCLANIFYERFYTRSMLLLKGVGIIF
PFMSFWWFLFVSINMSAPSMNLGGEIMLIGSLIKWDFLVMIPMLMVLMLFLSAGYSLYM
YSYLNHGSGWVVYSVNSISLREIVLMFLHFCPLVMWIIKMEFFCLY"
gene      complement(7593..8909)
          /gene="NAD4"
CDS       complement(8903..9181)
          /gene="NAD4L"
          /codon_start=1
          /transl_table=5
          /product="NADH dehydrogenase subunit 4L"
          /translation="MIMVGGVIFIASLVSIMLDRKHILIMLLCLEFMYLGVLYVMFVM
MGEVNFELGMIVMMFFIVCEAGLGLSILVGSVYFYGNDKVGAMILVKC"
gene      complement(8903..9181)
          /gene="NAD4L"

```

tRNA 9189..9247
/product="tRNA-Thr"

tRNA complement(9248..9308)
/product="tRNA-Pro"

CDS 9337..9756
/gene="NAD6"
/codon_start=1
/transl_table=5
/product="NADH dehydrogenase subunit 6"
/translation="MFYIILPSNFNNYIHNLNYTYIEYMLSLETDMYMYMKYSWFIL
ITLLILGGLLVIFLYITSLTPNKKFIFNKKILILIPMSFFFKYTNIMIPAHPNQILFL
FTPKSLLIMIFTLAYMILTITIMNLIKSNMTPPKSN"

gene 9337..9756
/gene="NAD6"

CDS 9756..10859
/gene="CYB"
/codon_start=1
/transl_table=5
/product="cytochrome b"
/translation="MITRKNNNILSIINSTLIDLPAISNISYMWVFGSLLSFCLMTQI
LSGIFLAFHFSADINLAFSSISHSRDVNFGWLIRAIHANTASLFFVCLYIHIARGIY
YSSFLQATWLSGTFIIFLLMATAFLGYVLPWVGQMSFWGATVITNLLSAIPYIGTKIT
YWIWGGFSDVNPTLRFFTLHFLFPFILSFLIMIHISLHETGSSNPLGLTNNIDKIP
FHPYFSLKDLIGVISLISISLLILINPYLLMDPENFLMANPLITPPHIQPEWYFLFA
YAILRSIPNKLGGVIALIMSIMIIMSLPLTVKPKFKSSFNNPLKLLFWLWLVNIFILL
TFIGACVPEPPFILIGQTLTFMYFSFFLLIPLI"

gene 9756..10859
/gene="CYB"

tRNA 10862..10924
/product="tRNA-Ser"

CDS complement(10872..11849)
/gene="NAD1"
/codon_start=1
/transl_table=5
/product="NADH dehydrogenase subunit 1"
/translation="MLVIFSVMMLLVMVLMMSVAFFTLMERKILGYIHIRKGPKNKGVFV
GLLQPFSDVIKLFKEMNLMFMNLVYHFIPGFSLLMLMFWLLFSWESGQVEMEYG
MVYFLCVSSLGVYVILGGGWFSNSKYGLLGSFRGLAQVISYEVSAMIMMSVFLSSS
YELSKIGEFQDSMWMWLGMIGLFFIWMVSCLAETNRSPFDLSEGESELVSGFNIEYGS
YGFALFMSEYGNIIIFMSVISSILFFGGVGMIFMLINMYIFLVVRGTLVRYRYDVL
MMMMAWKMWLPVSINLIFYFIFIKMIFNCSSFSKTFSSYSFLYFQNTYFM"

gene complement(10872..11849)
/gene="NAD1"

tRNA complement(11847..11906)
/product="tRNA-Leu"

tRNA complement(11911..11975)
/product="tRNA-Leu"

rRNA complement(11975..13195)
/gene="rrn16"
/product="16S ribosomal RNA"
/label="16S rRNA"

tRNA complement(13196..13258)
/product="tRNA-Val"

rRNA complement(13259..13949)
/gene="rrn12"
/product="12S ribosomal RNA"
/label="12S rRNA"

tRNA 14291..14353
/product="tRNA-Ile"

tRNA complement(14351..14416)
/product="tRNA-Gln"

5.3. ANEXOS – CAPÍTULO 3 – PARTE II

Tabela S1. Identidades apresentadas entre a sequência consenso montada de *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA e demais sequências representantes da ordem - Resultado do Blastn.

Descrição / genoma mitocondrial completo	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Pteronotus rubiginosus</i>	26504	26950	100%	0.0	96%	HG003312.1
<i>Pteronotus parnellii</i>	22286	22647	99%	0.0	91%	KF752590.1
<i>Micronycteris megalotis</i>	14118	14479	96%	0.0	83%	HF947304.1
<i>Lophostoma silvicolum</i>	13165	13597	95%	0.0	82%	HG003311.1
<i>Brachyphylla cavernarum</i>	12999	13360	94%	0.0	82%	HG003308.1
<i>Tonatia saurophila</i>	12959	13355	95%	0.0	82%	HG003315.1
<i>Sturnira tildae</i>	12927	13281	95%	0.0	82%	HG003314.1
<i>Carollia perspicillata</i>	12728	13146	94%	0.0	82%	HG003309.1
<i>Artibeus lituratus</i>	12645	13011	94%	0.0	82%	JN209840.1
<i>Mystacina tuberculata</i>	12264	12642	95%	0.0	81%	AY960981.1
<i>Rhinolophus luctus</i>	12168	12168	96%	0.0	81%	JN986580.1
<i>Anoura caudifer</i>	12102	12478	94%	0.0	81%	HG003307.1
<i>Rhinolophus ferrumequinum korai</i>	11969	11969	96%	0.0	80%	JN392460.1
<i>Rhinolophus ferrumequinum nippon</i>	11963	11963	96%	0.0	80%	KT779432.1
<i>Rhinolophus ferrumequinum quelpartis</i>	11952	11952	96%	0.0	80%	JX084273.1
<i>Hipposideros armiger</i>	11851	11851	96%	0.0	80%	JN980966.1
<i>Rhinolophus ferrumequinum tragatus</i>	11745	11745	92%	0.0	81%	KT783534.1
<i>Rhinolophus formosae</i>	11742	12016	95%	0.0	81%	EU166918.1
<i>Rhinolophus monoceros</i>	11708	11708	92%	0.0	81%	AF406806.1
<i>Rhinolophus pumilus</i>	11707	11707	92%	0.0	81%	AB061526.1
<i>Vampyrum spectrum</i>	11633	11974	94%	0.0	80%	HG003316.1
<i>Pteropus vampyrus</i>	11631	11879	94%	0.0	80%	KP214033.1
<i>Rhinolophus sinicus sinicus</i>	11559	11820	94%	0.0	80%	KR106992.1
<i>Pteropus dasymallus</i>	11557	11800	94%	0.0	80%	AB042770.1
<i>Pteropus scapulatus</i>	11540	11860	94%	0.0	80%	AF321050.1
<i>Rhinophylla pumilio</i>	11498	11922	94%	0.0	80%	HG003313.1

Tabela S2 - Regiões intergênicas não codificadoras no mitogenoma de *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA

Genes	Intervalos das regiões intergênicas	pb
tRNA-Phe / 12S rRNA	70	1
12S / tRNA-Val	1027-1033	7
tRNA-Val / 16S rRNA	1103-1110	8
16S rRNA / tRNA-Leu	2666-2671	6
tRNA-Leu / NAD1	2748-2749	2
NAD1 / tRNA-Ile	3704-3705	2
NAD2 / tRNA-Trp	4955	1
tRNA-Trp / tRNA-Ala	5025-5026	2
tRNA-Ala / tRNA-Asn	5095	1
tRNA-Asn / tRNA-Cys	5170-5203	34
COX1 / tRNA-Ser	6880-6883	4
tRNA-Ser / tRNA-Asp	6953-6959	7
COX2 / tRNA-Lys	7709-7714	6
tRNA-Lys / ATP8	7783	1
tRNA-Glu / CYB	14161-14164	4
CYB / tRNA-Thr	15302-15304	3
tRNA-Pro / tRNA-Phe (RC)	15437-16605	1169

Nota: RC - Região Controle.

Tabela S3 - Sobreposições gênicas para o mitogenoma de *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA

Genes	Trechos de sobreposição	pb
tRNA-Ile / tRNA-Gln	3772-3774	3
tRNA-Met / NAD2	3860-3913	54
COX1 / tRNA-Tyr	5329-5336	8
ATP8 / ATP6	7945-7984	40
ATP6 / COX3	8604-8622	19
COX3 / tRNA-Gly	9409-9426	18
NAD3 / NAD4L	9823	1
NAD4L / tRNA-Arg	9827-9894	68
NAD4L / NAD4	10185-10188	4
NAD4 / tRNA-His	11563-11564	2
tRNA-Leu / NAD5	11752-11760	9
NAD5 / NAD6	13568-13578	11
tRNA-Thr / tRNA-Pro	15371	1

Tabela S4. Sítios de clivagem para enzimas de restrição no mitogenoma *Pteronotus* sp PV-RO-BRA.

Sítios de clivagem	Posição da clivagem entre bases	Tipo de clivagem	Gene/Intervalo intergênico
HindIII	1263-1264 / 1267-1268	A	16S rRNA
XbaI	1550-1551 / 1554-1555	A	16S rRNA
EcoRV	5379-5380	B	COX1
XbaI	6423-6424 / 6427-6428	A	COX1
BamHI	6706-6707 / 6710-6711	A	COX1
BamHI	7628-7629 / 7632-7633	A	COX2
EcoRI	8551-8552 / 8555-8556	A	ATP6
BamHI	9611-9612 / 9615-9616	A	ND3
EcoRI	12064-12065 / 12068-12069	A	ND5
XbaI	13416-13417 / 13420-13421	A	ND5
BglII	14221-14222 / 14225-14226	A	CYB
EcoRV	15783-15784	B	CYB / tRNA-Phe ^(RC)

Nota: A - simetricamente situada ao redor do eixo de simetria; B - no eixo de simetria; RC - Região Controle.

Depósito no GenBank: Genoma Mitocondrial de *Pteronotus* sp. PV-RO-BRA

LOCUS *Pteronotus*_sp._PV-RO-BRA_(KX819316) 16605 bp DNA circular UNA 01-SEP-2016

DEFINITION *Pteronotus* sp. mitochondrion, complete genome.

KEYWORDS .

SOURCE *Pteronotus* (unknown)

ORGANISM *Pteronotus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Chiroptera; Microchiroptera;
Mormoopidae; *Pteronotus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 16605)

AUTHORS Lima,P.H.C., Vidigal,P.M.P., Barcelos,R.M., Klein,R.C.,
Fabres-Klein,M.H., Dergam,J.A. and Mafra,C.

TITLE The complete mitochondrial genome of an unknown specie of
Pteronotus genus

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 16605)

AUTHORS Lima,P.H.C., Vidigal,P.M.P., Barcelos,R.M., Klein,R.C.,
Fabres-Klein,M.H., Dergam,J.A. and Mafra,C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (01-SEP-2016) Biochemistry and Molecular Biology, Federal
University of Vicosa, Av PH Rolfs, s/n. Campus da UFV., Vicosa, MG
36570-900, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers

tRNA 1..69

/product="tRNA-Phe"

source 1..16605

/organism="Pteronotus"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

gene 71..1026

/gene="rrn12"

rRNA 71..1026

/gene="rrn12"

/product="12S ribosomal RNA"

tRNA 1034..1102

/product="tRNA-Val"

gene 1111..2665

/gene="rrn16"

rRNA 1111..2665

/gene="rrn16"

/product="16S ribosomal RNA"

tRNA 2672..2747

/product="tRNA-Leu"

CDS 2750..3706

/gene="NAD1"

/codon_start=1

/transl_table=2

/product="NADH dehydrogenase subunit 1"

/translation="MFLINLLSMIVPILLAVFLTLVERKILGYMQLRKGPNVVGPHG

LLQPIADAVKLFKEPLRPLTSSITMFIIPALTLTALTMWVPLPMPHPLINMNLVS

LFMLAMSSLAVYAILWSGWASNSKYALIGALRAVAQTISYEVTLAIILSVLLMNGSY

TLSTLITTQEYMWLIIPAWPLAMMWFISTLAETNRAPFDLTEGESELVSGFNVEYAGG

PFALFFLAEYANIIMMNALTTILFLGAYNNPIMPELYTTNFMVKLLLLTMSFLWIRAS

YPRFRYDQLMHLLWKNFLPLTLALCMWHVTVPIITAGIPPQT"

gene 2750..3706

/gene="NAD1"

tRNA 3706..3774

/product="tRNA-Ile"

tRNA complement(3772..3844)

/product="tRNA-Gln"

tRNA 3845..3913

/product="tRNA-Met"

CDS 3860..4957

/gene="NAD2"

/codon_start=1

```

/transl_table=2
/product="NADH dehydrogenase subunit 2"
/translation="MSYRAHTPKMLVYILPVLMPNPIIFSMIMSTIILGLTIVMTSSHW
LSVWVMGFEMNMLAIIPILMKNHHPRSTEAAATKYFLTQATASMLLMLAVIINLMYSGQW
STTKIFNPMASIIIMTLALTMKLGSPFHFVWPEVTQGVPLSAGLILLTWQKLAPLAVL
YTIAPSINPELLITLSMISVMIGGWGGLNQTQLRKIMAYSSIAHMGWMTAILTYNPTM
TILNLIYILMTTTFMFLLIHTSATTTLSLHMWNKTPLIITMILTIVLLSLGGLPPLT
GFVPKWMIQELTKNESLILPTMMAITALLNLYFYMRLTYATSLTMFPPTTNTKIKWH
FETTKRTACLPLIIISTMILPLTPMMAVLY"
gene      3860..4957
          /gene="NAD2"
tRNA      4956..5024
          /product="tRNA-Trp"
tRNA      complement(5027..5095)
          /product="tRNA-Ala"
tRNA      complement(5097..5169)
          /product="tRNA-Asn"
tRNA      complement(5204..5269)
          /product="tRNA-Cys"
tRNA      complement(5270..5336)
          /product="tRNA-Tyr"
CDS       5329..6882
          /gene="COX1"
          /codon_start=1
          /transl_table=2
          /product="cytochrome c oxidase subunit 1"
          /translation="MLPMFVTRWLFSTNHKDIGTLYLLFGAWAGMVGTAALLIRAE
L
GQPGALLGDDQIYNVVVTAHAFVMIFFVMPIIMIGGFNWLVPMLIGAPDMAFPRMNN
MSFWLLPPSFLLLLASSMVEAGAGTGWTVYPPPLAGNLAHAGASVDLTIIFSLHLAGVSS
ILGAINFITIINMKPPALSQYQTPLFVWSVLITAVLLLLSLPVAAGITMLLTDRNL
NTTFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEVYILILPGFGIISHIVTYYSKGKKEPFYMGGM
VWAMMSIGFLGFIVWAHHMFTVGMVDVTRAYFTSATMIIAIPGKVFVSWLATLHGGN
IKWSPAMLWALGFIFLFTVGGLTGIVLANSSLDIVLHDTYYVAHFHYVLSMGAVFAI
MGGFVHWFPPLFTGYTLNMTWAKIHFLVMFVGVNMTFFPQHFLGLSGMPPRYSDYPPDAY
TTWNTVSSMGSFISLTAVMLMVFMIWEAFAAKREVSLVELTTTINLEWLHGCPPPYHTF
EEPTYVNP"
gene      5329..6882
          /gene="COX1"
tRNA      complement(6884..6952)
          /product="tRNA-Ser"
tRNA      6960..7027
          /product="tRNA-Asp"
CDS       7028..7711
          /gene="COX2"
          /codon_start=1
          /transl_table=2
          /product="cytochrome c oxidase subunit 2"
          /translation="MAYPFQLGFQDATSPIIMEELLHFHDHTLMIVFLISSLVLYIIS
S
MLTTTLTHTSTMDAQEVETIWTILPAIILITIALPSLRILYMMDEINNPSMTIKTMGH
QWYWSYEYTDYSDLCFDSYMIPTSDLKPGELRLLEVDNRVLPMENTIRMLISSDVL
HSWAVPSLGLKTAIPGRLNQTLLSTRPGLFYGQCSEICGSNHSFMPIVLEVVPLEY
FEKWSASML"
gene      7028..7711
          /gene="COX2"
tRNA      7715..7782
          /product="tRNA-Lys"
CDS       7784..7987
          /gene="ATP8"
          /codon_start=1
          /transl_table=2
          /product="ATP synthase subunit 8"
          /translation="MPQLDTSTWFITIVSTLLTLFIIMQLKVSSHYYHSTPEPTLTKT
TKLSTPWETKWTKIYSLLSLPLR"
gene      7784..7987
          /gene="ATP8"
CDS       7945..8625
          /gene="ATP6"

```


tRNA 11691..11760
/product="tRNA-Leu"

CDS 11752..13581
/gene="NAD5"
/codon_start=1
/transl_table=2
/product="NADH dehydrogenase subunit 6"
/translation="MKVMNMFSSTMLMSLIILTIPIMMTASNRHNPHTYPNYVKTMIS
YSFMISIIPTMIFIYTGQEA VVTNWNWMTIQTMKISLSFKLDFFSMLFMPVALFVWTWS
IMEFSMWYMHSDPNINRFFKYLLMFLITMMILVTANNLFQLFIGWEGV GIMSFLLI GW
WYGRADANTAALQAILYNRIGDIGFILSMAWFLANSNTWELQQIFMLNNTTSTNLPLAG
LLLAAATGKSAQFGLHPWLP SAMEGPTPVSALLHSSTMV VAGV FLLIRFYPLMENNQTM
QTATLCLGAMTTLTAVCAL TQNDIKKIVAFSTSSQLGLMMVTIGINQPHLAF LHICT
HAFFKAMLFMCSGSIIHSLNDEQDIRKMGGLYKTM PFTTTALT VGS LALT GMPFLTGF
YSKDLIEAANTS YTNAWALLITLIATSLTAVYSTRIIFFALLNQPRFP TLVINENN
PLLMSIKRLMIGSIFAGFLISNNIPPTIPQMTMPLYLKTALIVTLTG FALALELN
TAALNLFKFNPPSHSTKFS TLLGYFPTIMHRLPPMTSLSMSQKSASLLLDLTWLEATLP
KLI AHLQLKSSTLV TNQKGMIKLYFLSFLITLTLATTM FNFHE"

gene 11752..13581
/gene="NAD5"

CDS complement(13565..14092)
/gene="NAD6"
/codon_start=1
/transl_table=2
/product="NADH dehydrogenase subunit 6"
/translation="MAAYVVFVLSVIFVIGFVGFSSKPSPIYGGLIVSGGVGCGII
MNYSGSFLGLMVFLIYLGGMLVVFYTTAMATEQYPEVWVSNKTVLGAFIVGMLMEAS
LVFVVLEGMELEVIFKFNDMGDWVFDVDFGVVSNEMAGVAGLYSYGWV FVMITGWS
LLMAVVVIMEVTRGN"

gene complement(13565..14092)
/gene="NAD6"

tRNA complement(14093..14160)
/product="tRNA-Glu"

CDS 14165..15304
/gene="CYB"
/codon_start=1
/transl_table=2
/product="cytochrome b"
/translation="MTNIRKTHPLLKIVNESLVDLPVPSSVSSWWNFGSLLAACLAVQ
ILTGLFLAMHYTSDTATAFNSVTHICRDVNYGWILRYLHANGAS MFFICLYIHIGRGM
YYGSYMYSETWNIGIILLFAVMATAFMGYVLPWGQMSFWGATVITNLLSAIPYIGTDL
VQWIWGGFSVDKATLTRFFAFHLLPFIIAALVVHLLFLHETGSSNPTGIPSDSDMV
PFHPYHTIKDILGILAMLTLSTLVLFSPDLLGDPDNYIPANPLNTPPHIKPEWYFLF
AYAILRSIPNKLGGVLALVLSILVLA VIPLLH TSKQRTMMFRPISQCLFWLLVADLLT
LTWIGGQPVEHPYIIIGQMASIMYFTIILV LMPATSM MENHLLKW"

gene 14165..15304
/gene="CYB"

tRNA 15305..15371
/product="tRNA-Thr"

tRNA complement(15371..15436)
/product="tRNA-Pro"

D-loop 15437..16605
/note="Control region"