

MARLOS DA MATTA AGOSTINI

**MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE
CARRAPATOS VETORES DE AGENTES RICKETTSIAIS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A275m
2008

Agostini, Marlos da Matta, 1980-
Marcadores moleculares para identificação de carrapatos
vetores de agentes rickettsiais / Marlos da Matta Agostini.
– Viçosa, MG, 2008.
xiii, 86f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 62-74.

1. Desenho de *primers*. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Marcadores genéticos. 4. Identificação molecular. 5. Carrapato como transmissor de doenças. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.86

MARLOS DA MATTA AGOSTINI

**MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE
CARRAPATOS VETORES DE AGENTES RICKETTSIAIS**

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

APROVADA: 26 de fevereiro de 2008.

Prof. Jorge Abdala Dergam dos
Santos
(Co-Orientador)

Prof^a. Márcia Rogéria de
Almeida Lamêgo
(Co-Orientadora)

Prof^a. Juliana Lopes Rangel Fietto

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

Prof. Cláudio Lísias Mafra de Siqueira
(Orientador)

“Ao meu pai, José Vasco, pelo exemplo de vida, dedicação, incentivo e apoio”.

“À minha querida Mãe, Santinha, pelo exemplo de vida, amor incondicional, renúncia e dedicação”.
In memoriam

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade.

Ao Prof. Cláudio Mafra, pela orientação, amizade, companheirismo e confiança, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof.^a Márcia Rogéria, pela co-orientação, por disponibilizar o Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) e pelo carinho de sempre.

Ao Prof. Jorge Dergam, pela co-orientação, disponibilidade, amizade e ensinamentos valiosos.

Ao Prof. Sérgio de Paula, pelos ensinamentos, empréstimo de material e amizade.

À Prof.^a Juliana Fietto, pelos ensinamentos, sugestões no desenho dos *primers* e correções.

Aos Professores Marcelo Labruna (USP) e Matias Szabó (UFU), pela gentileza e dedicação no envio das amostras.

Aos queridos amigos Edvaldo, Karla, Luíza, Luciana, Thiago e Wiliane, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários pela excelente convivência, pela força e grande colaboração.

A todos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, professores e funcionários, e em especial ao Eduardo, Reginaldo, Serafim e Adenilson, por toda a ajuda.

Aos colegas do LIMA pela ajuda durante a realização dos experimentos.

Ao Prof. José Lino e ao Vinícius, por disponibilizarem o laboratório para a obtenção das fotografias.

Ao Dr. David H. Walker do *Center for Biodefense and Emerging Infectious Diseases, University of Texas Medical Branch, Galveston - EUA*, pelo apoio financeiro e científico.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Animal, Anderson e Elisa, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos grandes amigos Bruno, Christiano, Juninho, Juliano, Balta, Liquin, Michel, Paulão e Sérgio, por facilitarem a vida em Viçosa e pelos inúmeros momentos de alegria.

À amiga Kênia, pela força, carinho e companheirismo de sempre.

As amigas “antigas” da Bioquímica, Cassiana, Fernanda, Hebréia, Rejane e Thaís, pela torcida de sempre.

Aos amigos da república, da “antiga” e da “nova” geração, por terem sido minha família em Viçosa.

A todos os colegas das disciplinas da pós-graduação, pelos ensinamentos, amizade e companheirismo.

Ao meu pai, José Vasco, e minha querida mãe, Santinha, pelo exemplo de vida, amor incondicional, renúncia e dedicação. Sem o apoio de vocês nada disso seria possível.

Ao Magno, Mozart e Fabiane, pelo apoio, amizade, amor e por sempre zelarem por mim.

Aos meus anjinhos, Giuliano e Gabriela, inspiração para o que eu faço.

À Beatriz, pelo carinho, paciência, incentivo, compreensão, pela importância em minha vida e pelos sonhos que compartilhamos.

A todos os meus familiares e amigos que mesmo distantes, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Acima de tudo, agradeço todas as bênçãos recebidas ao longo da minha vida, as oportunidades concedidas por Deus para realização dos meus objetivos e a força para chegar até aqui.

BIOGRAFIA

MARLOS DA MATTA AGOSTINI, filho de José Vasco Agostini e Maria do Amparo Matta Agostini, nasceu em 06 de dezembro de 1980, em Muriaé, Minas Gerais. Em janeiro de 2005 graduou-se em Bioquímica, pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais – Brasil.

Trabalhou por um período na Monsanto do Brasil Ltda em Uberlândia, Minas Gerais. Em maio de 2006 ingressou no curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa. Durante o curso de mestrado foi monitor da disciplina Bioquímica Prática, defendendo a dissertação em Fevereiro de 2008.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
ABREVIATURAS	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT	XIII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 O Carrapato	5
2.1.1 Aspectos gerais da biologia, classificação e diversidade	5
2.1.2 O carrapato como vetor.....	8
2.1.3 Filogenia, evolução e zoogeografia.....	9
2.1.4 Dificuldades na identificação	11
2.2 Marcadores moleculares aplicados a acarologia.....	13
2.2.1 Aloenzimas	13
2.2.2 Análise direta de proteínas	14
2.2.3 Amplificação de DNA utilizando a PCR	14
2.2.4 Amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD)	15
2.2.5 Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP).....	15
2.2.6 Microsatélites	16
2.2.7 Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)	16
2.2.8 Sequenciamento de fragmentos de DNA	16
2.2.9 DNA mitocondrial.....	17
2.2.10 DNA ribossomal nuclear.....	21
2.3 Armazenamento de espécimes	24
2.4 Extração de DNA em carrapatos.....	24
2.5 Amplificação de DNA em carrapatos.....	26
2.6 Panorama atual da filogenia e taxonomia molecular em carrapatos.....	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Amostras	29
4.2 Extração de DNA	29
4.3 Amplificação pela PCR	32
4.4 Purificação dos produtos da PCR	33
4.5 Clonagem dos produtos purificados	33
4.5.1 Preparo de células competentes.....	33
4.5.2 Transformação de células competentes.....	34
4.5.3 Triagem das colônias recombinantes.....	34
4.6 Purificação dos plasmídeos recombinantes	35
4.7 Ensaio de restrição.....	36

4.8	Sequenciamento dos fragmentos amplificados por PCR.....	36
4.9	Busca das seqüências em banco de dados.....	36
4.10	Análises das seqüências e desenho dos <i>primers</i>	36
4.11	Padronização e validação da especificidade dos oligonucleotídeos.....	38
4.12	Determinação da sensibilidade do método.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Coleção de carrapatos.....	39
5.3	Obtenção das regiões ITS-2.....	41
5.3.1	Amplificação pela PCR.....	41
5.3.2	Purificação e clonagem dos produtos de PCR.....	42
5.4	Seqüências obtidas em banco de dados.....	43
5.5	Alinhamento múltiplo e desenho dos primers.....	44
5.5.1	Gênero <i>Amblyomma</i>	45
5.5.2	Gênero <i>Dermacentor</i>	48
5.5.3	Gênero <i>Ixodes</i>	48
5.5.4	Gênero <i>Rhipicephalus</i>	48
5.6	Teste e padronização dos primers.....	49
5.6.1	Gênero <i>Amblyomma</i>	50
5.6.2	Gênero <i>Dermacentor</i>	55
5.6.3	Gênero <i>Ixodes</i>	56
5.6.4	Gênero <i>Rhipicephalus</i>	56
5.7	Sensibilidade do método.....	57
5.8	Considerações finais.....	58
6	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
	APÊNDICE I.....	75
	APÊNDICE II	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Oligonucleotídeos iniciadores usados para amplificar DNA de carrapatos ixodídeos.....	20
Tabela 2 - Acervo de carrapatos construído durante a pesquisa.....	30
Tabela 3 – Número de acesso das seqüências utilizadas no alinhamento múltiplo	43
Tabela 4 – Oligonucleotídeos iniciadores desenhados.....	44
Tabela 5 – Oligonucleotídeos iniciadores para o gênero <i>Amblyomma</i>	45
Tabela 6 – Oligonucleotídeos iniciadores para <i>Amblyomma dubitatum</i>	46
Tabela 7 – Oligonucleotídeos iniciadores para <i>Amblyomma triste</i>	46
Tabela 8– Oligonucleotídeos iniciadores para <i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	46
Tabela 9– Oligonucleotídeos iniciadores para <i>Amblyomma cajennense</i>	47
Tabela 10– Oligonucleotídeos iniciadores para <i>Amblyomma parvum</i>	47
Tabela 11– Oligonucleotídeos iniciadores para <i>Amblyomma scalpturatum</i>	47
Tabela 12– Oligonucleotídeos iniciadores para <i>Amblyomma aureolatum</i>	47
Tabela 13– Oligonucleotídeos iniciadores para o gênero <i>Dermacentor</i>	48
Tabela 14– Oligonucleotídeos iniciadores para o gênero <i>Ixodes</i>	48
Tabela 15– Oligonucleotídeos iniciadores para o gênero <i>Rhipicephalus</i>	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação dos Carrapatos	1
Figura 2 - Representação esquemática dos genes ribossomais nucleares eucarióticos.	22
Figura 3 - Carrapatos do gênero <i>Amblyomma</i> usados neste trabalho.....	39
Figura 4 - Carrapatos pertencentes aos gêneros <i>Antricola</i> , <i>Argas</i> , <i>Dermacentor</i> , <i>Haemaphysalis</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Ornithodoros</i> e <i>Rhipicephalus</i>	40
Figura 5 - Resultado da PCR com os <i>primers</i> RIB4 e ITS1-2.	41
Figura 6 - Resultado da PCR com os <i>primers</i> A7 e A8.....	50
Figura 7 - Resultado da PCR com os <i>primers</i> A8 e A9..	51
Figura 8 - Resultado da PCR com os <i>primers</i> A10 e A8.	51
Figura 9 - Resultado da PCR com os <i>primers</i> A11 e A8.....	52
Figura 10 - Resultado da PCR com os <i>primers</i> A12 e A8.....	53
Figura 11 - Resultado da PCR com os <i>primers</i> A13 e A7.....	54
Figura 12 - Resultado da PCR com os <i>primers</i> A7 e A14.....	54
Figura 13 - PCR com os <i>primers</i> A12 e A8.....	55
Figura 14 - PCR com os <i>primers</i> R1 e R2..	57
Figura 15 - Produtos da PCR com os <i>primers</i> A12, A8 e amostra 19 e suas sucessivas diluições..	58

ABREVIATURAS

µg: microgramas	Mpb: mega pares de bases
µL: microlitros	mRNA: RNA mensageiro
A: Adenina	mtRNA: RNA mitocondrial
BIOAGRO: Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária	pb: pares de bases
BSA: soro albumina bovina	PBS: Tampão fosfato
C: Citosina	PCR: Reação da Polimerase em Cadeia
D.O.: densidade óptica	q.s.p.: quantidade suficiente para
DMSO: dimetil sulfóxido	RNA: Ácido ribonucléico
DNA: Ácido desoxirribonucléico	rpm: rotação por minuto
dNTP: desoxirribonucleotideo trifosfatado	rRNA: RNA ribossômico
EDTA: ácido etileno diamino tetracético	S: coeficiente de sedimentação (unidade: Svedberg)
G: Guanina	SDS: dodecil sulfato de sódio
ITS2: Espaçador Interno Transcrito Secundário	T: Timina
LB: Luria-Bertani	TE: Tris-EDTA
LBBMAIP: Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários	Tm: temperatura de fusão do DNA
LIMA: Laboratório de Infectologia Molecular Animal	UFU: Universidade Federal de Uberlândia
MEM: Meio Essencial Mínimo	USP: Universidade de São Paulo
	UTMB: <i>University of Texas Medical Branch</i>
	g: unidade de força centrífuga relativa

RESUMO

AGOSTINI, Marlos Da Matta, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Marcadores moleculares para identificação de carrapatos vetores de agentes rickettsiais.** Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Co-Orientadores: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo, Jorge Abdala Dergam dos Santos e Márcio Antônio Moreira Galvão.

A importância parasitológica dos carrapatos reside não somente na sua ação espoliativa sobre o hospedeiro, como também na grande capacidade de atuar como vetores de agentes patogênicos, entre os quais se incluem vírus, bactérias, protozoários e nematóides. Tradicionalmente, a identificação de carrapatos baseada em características morfológicas é uma atividade extremamente trabalhosa, demorada, passível de dúvidas, dependente de pessoal especializado e com limitação quanto à sua possibilidade de realização, dependendo do estado de conservação e do estágio de desenvolvimento do espécime. Assim, o presente trabalho é pioneiro no Brasil, no sentido de adotar uma estratégia molecular para a identificação de carrapatos. Os objetivos foram buscar marcadores moleculares capazes de identificar e distinguir diferentes gêneros e espécies de carrapatos, envolvendo amplificação dos espaçadores internos transcritos secundários (ITS2) e seqüenciamento dos mesmos. Além disso, objetivou-se o desenho de *primers* específicos e a padronização de PCRs direcionadas às espécies de maior importância epidemiológica. Foi observado que os ITS2 são regiões úteis para a identificação molecular por apresentarem baixa variabilidade intraespecífica. Três dos quatro conjuntos de *primers* desenhados para gêneros demonstraram ser eficientes para identificação, enquanto que nos ensaios para *primers* espécie-específicos foi obtido êxito para três espécies do gênero *Amblyomma*, resultando em *amplicons* de 404 pb, 389 pb e 320 pb característicos para as espécies *A. cajennense*, *A. oblongoguttatum* e *A. parvum*, respectivamente. Estes resultados contribuem para a identificação molecular de carrapatos, já que, de forma inédita, foram caracterizadas seqüências gênicas que permitem identificar e/ou diferenciar carrapatos de grande importância nacional.

ABSTRACT

AGOSTINI, Marlos Da Matta, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2008. **Molecular markers for identification of ticks vectors of rickettsial agents.** Adviser: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Co-Advisers: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo, Jorge Abdala Dergam dos Santos and Márcio Antônio Moreira Galvão.

The relevance of ticks as parasites lies not only on their effects on their hosts, but also the great ability to act as vectors of pathogens, which include viruses, bacteria, protozoa and nematodes. Traditionally, identification of ticks was based on morphological characters and it is labor intensive, and depended on the expertise of specialists, the state of preservation of the material and the stage of development of the specimen. Because it adopts molecular identification of ticks, this work represents a pioneering effort in Brazil. Sequence analyses involving amplification of the second internal transcribed spacers (ITS2) of rDNA were performed for identification of genera and species of ticks. The design of specific primers and PCR standardization was carried on for species considered as major epidemiological issues. ITS2 regions were considered as useful for molecular identification and showed low intraspecific variation. Three out of four designed sets of primers were effective for genera identification. Trials for species-specific primers were successful for three species of *Amblyomma*, resulting in amplicons of 404 bp, 389 bp and 320 bp for *A. cajennense*, *A. oblongoguttatum* and *A. parvum*, respectively. Sensitivity of the species-specific primers was successfully tested in *A. cajennense*. It was concluded that these results contributed to the efficient molecular identification of ticks species that are of great national relevance.

1 INTRODUÇÃO

De todas as doenças que afligem o homem, as doenças riquetsiais, situam-se entre aquelas que mais causaram sofrimento e morte, inclusive para pesquisadores envolvidos em seu estudo, principalmente os pioneiros na determinação do seu diagnóstico (Galvão,1996).

Apesar de sua baixa prevalência, as rickettsioses, no Brasil em especial a febre maculosa brasileira, uma das doenças mais importantes do grupo, alia sua alta letalidade ao fato de ocorrer com frequência sob a forma epidêmica, atingindo núcleos familiares em comunidades desassistidas do ponto de vista sócio econômico e de serviços de atenção à saúde. Tal fato, empresta à mesma um caráter de prioridade de intervenção entre as ações de saúde em regiões afetadas pela doença.

Estes agentes rickettsiais, que possuem como vetores carrapatos ixodídeos, adquirem elevada importância junto à saúde pública animal e humana, situação esta agravada pelo pouco conhecimento sobre espécies vetoras, hospedeiros vertebrados (domésticos e silvestres) e invertebrados, condições epidemiológicas e ecossistemas, e inclusive quanto à ocorrência de enfermidades emergentes causadas por estes e outros agentes veiculados por carrapatos.

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas hematófagos, da classe Arachnida, de distribuição mundial, parasitando vertebrados terrestres, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, representando os mais eficientes vetores de doenças humanas e animais, ficando atrás apenas dos mosquitos em número de patógenos transmitidos (Sonenshine, 1993, citado por Mulenga *et al.*, 2004; Baldrige *et al.*, 2004; Alarcon-Chaidez *et al.*, 2007). Entre os patógenos transmitidos por carrapatos estão os membros dos gêneros *Anaplasma* (Dumler *et al.*, 2001), *Babesia* (Stiller *et al.*, 2002),

Borrelia (Schwan e Piesman, 2002), *Ehrlichia* (Calic *et al.*, 2004) e *Rickettsia* (Oliveira *et al.*, 2002).

Uma taxonomia incerta é um impedimento importante para o entendimento do ciclo de vida dos carrapatos e da epidemiologia das doenças por eles veiculadas. De acordo com Keirans (1992) e Hoogstraal (1973a), a taxonomia de *Amblyomma* e *Haemaphysalis* na região Neotropical¹ é especialmente pobre, e a mesma conclusão é válida para os outros gêneros. A necessidade de reverter essa situação é acentuada pelo fato de que 26 e 12 das espécies Neotropicais de *Amblyomma* e *Ornithodoros*, respectivamente, já foram encontradas em humanos. Até o momento, poucas espécies do gênero *Amblyomma* têm recebido atenção significativa dos pesquisadores, entre estas, a principal é o *Amblyomma cajennense*. No entanto, espécies pobremente conhecidas, como o *Amblyomma triste*, podem infestar severamente tanto humanos como animais e necessitam de maiores investigações.

Tradicionalmente, apenas as características morfológicas são utilizadas na identificação de carrapatos, no entanto, freqüentemente, tais características são ambíguas e restritas a estágios particulares de desenvolvimento. A aparência do estágio adulto desses carrapatos fornece o principal critério da distinção de espécies (Keirans e Clifford, 1976). Os estágios de larva e ninfa nem sempre podem ser diferenciados (Clifford *et al.*, 1961), porque muitas destas distinções não podem ser evidenciadas, ou também por falta de profissionais capacitados na área.

De fato, há uma carência mundial de técnicos e profissionais treinados em taxonomia de carrapatos, sendo acentuada nos países da América Latina, o que explica, pelo menos em parte, a dificuldade existente na obtenção de informações a respeito da distribuição de carrapatos e de seus hospedeiros na região Neotropical. Daí a necessidade da criação de um sistema operacional que permita uma classificação rápida e eficiente desses organismos, para que possamos compreender a situação taxonômica dos carrapatos e dos patógenos por eles transmitidos.

¹ A região zoogeográfica Neotropical compreende as ilhas Caribenhas, sul do México, Américas Central e do Sul.

Por outro lado, a identificação de espécies usando chaves dicotômicas, baseadas em caracteres morfológicos, é uma prática bem desenvolvida, entretanto, carrapatos são impossíveis de identificar sem uma análise microscópica de caracteres. Além disso, chaves diferentes devem ser usadas para larvas (Clifford *et al.*, 1961), ninfas (Durden e Keirans, 1996), fêmeas e machos adultos (Keirans e Clifford, 1978). Adicionalmente, o aparelho bucal e estruturas adjacentes, que são usualmente essenciais para identificação, podem estar danificados pela remoção do carrapato do corpo do hospedeiro.

Algumas destas dificuldades podem ser contornadas pela utilização de chaves baseadas em marcadores de genética molecular. Essas técnicas estão sendo cada vez mais usadas para identificar artrópodes de importância médica (Scott *et al.*, 1993; Munstermann e Conn, 1997).

Do mesmo modo, Klompen e colaboradores (1996), citam que a abordagem genômica tem sido amplamente utilizada em estudos de artrópodes hematófagos devido à sua importância como vetores de agentes infecciosos e a necessidade de desenvolver métodos para suprimir tanto os vetores quanto os agentes patológicos.

Diante de tal situação, ou seja, a base molecular que permita a identificação e distinção de carrapatos ixodídeos vetores de Rickettsias, torna-se relevante a busca de marcadores moleculares capazes de desempenhar tal tarefa.

Na literatura nacional, constata-se que alguns trabalhos já foram realizados na área de biologia molecular de carrapatos analisando seqüências do segundo espaçador interno transcrito (ITS-2), com destaque para o realizado por Marrelli e colaboradores (2007). Todavia, a referida pesquisa destinou-se a avaliar as relações filogenéticas entre os diferentes carrapatos, sem que tenha havido, portanto, oportunidade de identificar marcadores moleculares que permitissem a identificação e/ou diferenciação de espécies e gêneros de carrapatos. Assim, há importante espaço de pesquisa para avançar e contribuir com a análise inicialmente realizada em termos de identificação das seqüências de ITS-2.

A região do genoma selecionada para a análise, ITS-2, compreende um segmento dos genes ribossomais nucleares, que possuem regiões

flanqueadoras altamente conservadas ao longo da evolução e que possuem seqüências variáveis, as quais estão sob a ação de uma baixa pressão evolutiva. Outro aspecto relevante dos genes ribossomais nucleares é a ocorrência de várias cópias idênticas, o que facilita o trabalho de amplificação dessas seqüências através da PCR.

O presente trabalho é pioneiro no Brasil, no sentido de adotar uma estratégia molecular para a identificação de alguns gêneros e espécies de carrapatos, de forma semelhante à aplicada nos Estados Unidos, por Poucher e colaboradores (1999), com o gênero *Ixodes* para vetores da doença de Lyme.

Assim, esta pesquisa consiste na busca por marcadores moleculares capazes de identificar e distinguir diferentes gêneros e espécies de carrapatos ixodídeos, através de análises seqüenciais envolvendo amplificação de segmentos de DNA. Para tanto, foi realizado o desenho de *primers* específicos, a padronização de reações de PCR e o seqüenciamento de seqüências nucleotídicas, direcionados às espécies de maior interesse epidemiológico.

Além disso, buscou-se construir um acervo dos exemplares e de fotografias das espécies utilizadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Carrapato

2.1.1 Aspectos gerais da biologia, classificação e diversidade

Artrópodes pertencentes à Classe Arachnida, os carrapatos são ectoparasitas hematófagos obrigatórios, parasitando vertebrados terrestres, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Os mesmos podem permanecer fixados à pele do hospedeiro por dias ou semanas, secretando uma saliva que impede a coagulação sangüínea e as reações de defesa do organismo no local de fixação. A saliva possui substâncias vasoativas, que induzem a vasodilatação local, facilitando a ingestão de sangue (Oliveira, 2000; Labruna, 2000).

Além de serem hematófagos, também se alimentam de linfa e restos tissulares presentes na pele do hospedeiro. Tal fato ocorre devido à alta especialização destes artrópodes ao parasitismo por possuírem peças bucais adaptadas que perfuram e penetram na pele, a fim de obter o alimento. Dadas as particularidades de seus hábitos alimentares, constituem hoje o segundo grupo em importância de vetores de doenças infecciosas para animais e humanos, atrás apenas dos mosquitos (Labruna, 2000).

Os carrapatos pertencem a Ordem Ixodida, sendo únicos dentre os ácaros a possuir um tamanho corporal grande (2-30 mm), aparelhos bucais especializados e órgão de Haller². O grupo é relativamente pequeno, consistindo em aproximadamente 860 espécies divididas em três famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (Oliver, 1989; Keirans *et al.*, 1992). A família Ixodidae compreende os carrapatos popularmente conhecidos como carrapatos duros, com aproximadamente 680 espécies descritas. A família Argasidae inclui os carrapatos moles, com 183 espécies; e a família

² Estrutura quimiorreceptora localizada no primeiro par de pernas.

Nuttalliellidae, com características morfológicas intermediárias entre as duas primeiras, é representada por uma única espécie, *Nuttallieila namaqua* Bedford, 1931. Argasidae e Ixodidae distribuem-se amplamente em todos os continentes, enquanto que a família Nuttalliellidae é restrita ao continente africano (Barros-Battesti, 2006).

A família Ixodidae, foco desta pesquisa, é dividida em Prostriata e Metastriata. O grupo Prostriata é representado pela subfamília Ixodinae, que compreende cerca de 240 espécies em único gênero, *Ixodes*. O grupo Metastriata é dividido em quatro subfamílias: Amblyomminae (125 espécies em dois gêneros), Haemaphysalinae (147 espécies), Hyalomminae (22 espécies) e Rhipicephalinae (119 espécies em oito gêneros). Por sua vez, a família Argasidae contém cerca de 170 espécies divididas em quatro subfamílias, Argasinae (56 espécies), Ornithodorinae (114 espécies em três gêneros), Antricolinae e Nothoaspininae, as quais são representadas por poucas espécies (Hoogstraal, 1985). A Figura 1 mostra de forma detalhada a classificação dos carrapatos.

No Brasil, foi publicada uma lista, por Aragão e Fonseca (1961), de 57 espécies da família Ixodidae (ixodídeos), distribuídos em 10 gêneros, como parasitos de animais domésticos e silvestres. Guimarães e colaboradores (2001) relataram a presença de 54 espécies válidas no território brasileiro, 32 das quais pertencentes ao gênero *Amblyomma*.

Considerando que na última década houve um avanço significativo nas pesquisas taxonômicas de carrapatos, a fauna brasileira de Ixodida está atualmente representada por 61 espécies, sendo 9 espécies de *Ornithodoros*, 3 de *Antricola*, 1 de *Argas*, 33 de *Amblyomma*, 9 de *Ixodes*, 3 de *Haemaphysalis*, 2 de *Rhipicephalus* e 1 de *Dermacentor* (Barros-Battesti, 2006). Este número, certamente deverá aumentar no próximos anos, uma vez que os estudos de biodiversidade têm recebido grande apoio das instituições financeiras.

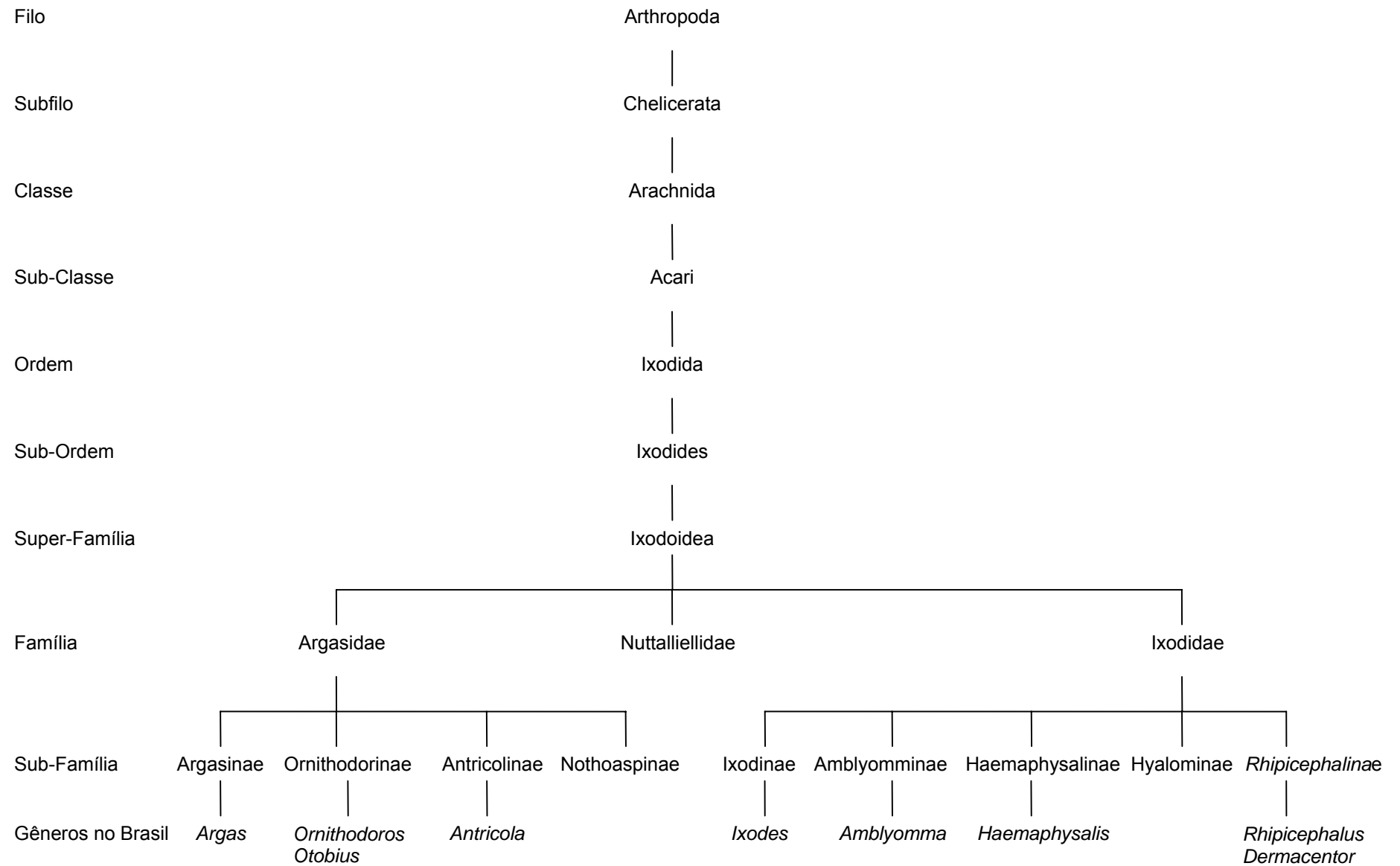


Figura 1- Classificação dos Carrapatos

Fonte: Adaptado de Oliver, 1989; Keirans, 1992; Klompen *et al.*, 1996; Camicas *et al.*, 1998; Barros-Battesti, 2006.

2.1.2 O carrapato como vetor

Os carrapatos são ectoparasitos importantes para a Saúde Pública e Animal por transmitirem agentes infecciosos e causarem injúrias a seus hospedeiros durante a hematofagia.

Em se tratando de vetores de doenças, os carrapatos ixodídeos representam os mais eficientes vetores de enfermidades humanas e animais, perdendo apenas para os mosquitos em número de patógenos transmitidos (Sonenshine, 1993, citado por Alarcon-Chaidez *et al.*, 2007). Entre os patógenos humanos transmitidos por carrapatos estão os membros dos gêneros *Anaplasma* (Dumler *et al.*, 2001), *Babesia* (Stiller *et al.*, 2002), *Borrelia* (Schwan e Piesman, 2002), *Ehrlichia* (Calic *et al.*, 2004) e *Rickettsia* (Oliveira *et al.*, 2002).

Podem ser citadas, como doenças causadas pelos patógenos descritos acima, a anaplasmoze bovina, a babesiose (humana, bovina, canina e eqüina), a Doença de Lyme-Símile, a erliquiose monocítica canina e a Febre Maculosa Brasileira - FMB (Barros-Battesti, 2006).

No Brasil, a FMB vem se consolidando como uma zoonose de difícil controle, significativa morbidade e elevada letalidade (Angerami, 2004). De caráter emergente, a doença é considerada, desde o ano de 2001, um agravo de notificação compulsória, conforme Portaria MS nº 1.943, de 18/10/01. Os sintomas envolvem febre alta, cefaléia, mialgias e prostração, seguidos de exantema máculo papular, com predominância nos membros, atingindo as palmas das mãos e plantas dos pés, podendo evoluir para petéquias, equimoses e hemorragias (Melles *et al.*, 1992).

A *Rickettsia rickettsii*, bactéria causadora da febre maculosa, apresenta como os principais vetores e reservatórios, os carrapatos ixodídeos, os quais são contaminados durante a alimentação em hospedeiros vertebrados rickettsêmicos ou através da passagem transovariana e transestadial (Raoult e Roux, 1997; Macaluso *et al.*, 2002). A primeira forma de transmissão descrita é conhecida como transmissão horizontal, enquanto que a segunda é denominada transmissão vertical.

Carrapatos do gênero *Amblyomma* (*A. cajennense*, *A. aureolatum* e *A. dubitatum*), têm sido responsabilizados pela manutenção enzoótica e

veiculação da *R. rickettsii* (Lima *et al.*, 1995; Galvão, 2004; Labruna *et al.*, 2005). A *Rickettsia* é mantida no carrapato vetor mesmo estando este em prolongada ausência de hematofagia, porém em forma avirulenta, tendo sua virulência reativada por fatores nutricionais presentes no sangue, ou quando da exposição à temperatura adequada (Walker, 1989; Raoult e Roux, 1997).

Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia são os estados brasileiros onde a FMB tem sido reportada. Além das questões de saúde pública humana, o controle de carrapatos é fator limitante na produção animal em todo mundo, assim, falhas no controle desses artrópodes e das doenças por eles veiculadas, acarretam prejuízos consideráveis.

2.1.3 Filogenia, evolução e zoogeografia

É fundamental estabelecer as relações entre os seres vivos e seus ancestrais para compreender a imensa diversidade de formas e funções existentes. Dada a impossibilidade de observar-se diretamente o processo evolutivo, as árvores filogenéticas permitem inferir as etapas da evolução.

Os pesquisadores que introduziram a árvore genealógica dos carrapatos foram Hoogstraal e Aeschlimann (1982). Para tal inferência filogenética foi utilizada a intuição sobre os parentes primitivos, ciclos de vida e morfologia dos carrapatos, além de seus hospedeiros. Uma filogenia alternativa foi proposta por Filippova (1993, 1994), no entanto as árvores de ambos os estudos não foram testadas até meados da década de 90, quando duas equipes (Black, da Universidade do Colorado nos Estados Unidos e Barker, da Universidade de Queensland na Austrália) iniciaram os estudos filogenéticos dos carrapatos baseados em características moleculares.

A partir de então, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos com filogenia molecular e evolução dos carrapatos, dentre esses pode-se citar: Black e Piesman (1994); Black *et al.* (1997); Black e Roehrdanz (1998); Dobson e Barker (1999); Klompen *et al.* (2000) e Murrell *et al.* (1999, 2000, 2001a,b). Concomitantemente, a utilização de morfologia para inferência filogenética e evolutiva dos carrapatos foi desenvolvida. Como exemplo de publicações nessa linha de abordagem, tem-se: Klompen (1992); Hutcheson

et al. (1995); Klompen *et al.* (2000); Beati e Keirans (2001) e Murrell *et al.* (2001a).

Mesmo após várias investigações e algumas mudanças, a filogenia mais comumente citada dentre as famílias, subfamílias e gêneros de carrapatos é a proposta por Hoogstraal e Aeschlimann (1982), a qual combina um longo período de evolução dos carrapatos com um cenário de ampla co-especiação em hospedeiros específicos, considerando ainda que os carrapatos são um grupo de derivação antiga.

Hoogstraal (1985) sugere ainda que os ancestrais dos carrapatos, recordam a atual família Argasidae, a qual surgiu no final do Paleozóico ou início do Mesozóico. O Prostriata (um dos grupos da família Ixodidae) estava dentre as primeiras diferenciações daquelas formas ancestrais. Dentro do Metastriata (o outro grupo da família Ixodidae), Hoogstraal propôs que a Amblyomminae, surgiu nos répteis no final do Permiano e irradiou-se nestes hospedeiros durante o Triássico e Jurássico. A Haemaphysalinae apareceu nos répteis no final do Triássico, enquanto que os Hyalomminae desenvolveram-se nos mamíferos primitivos no final do Cretáceo. Os Rhipicephalinae não surgiram antes do Terciário e, como os Hyalomminae, evoluíram primeiramente nos mamíferos.

Evidências diretas, com relação ao período de origem dos carrapatos, são ausentes, assim cenários que variam marcadamente de Hoogstraal foram propostos, conforme trabalho de Oliver (1989).

Mais recentemente, duas hipóteses principais têm sido propostas para direcionar esta questão. Por um lado, Dobson e Barker (1999), propuseram que os carrapatos “duros”, ou mesmo todos os carrapatos, tivessem evoluído na Austrália, ou mais precisamente na parte da Gondwana que se transformou em Austrália, nos primeiros anfíbios do Devoniano, aproximadamente 390 milhões de anos atrás. Por outro lado, Klompen e colaboradores (2000) propuseram que os primeiros carrapatos “duros” apareceram muito depois (120 milhões de anos), após a Austrália ter se tornado relativamente isolada.

Felizmente, tem havido muito progresso no entendimento da evolução dos carrapatos desde meados dos anos 90, quando técnicas modernas foram aplicadas para o estudo da filogenia. Há um consenso dentre muitos

pesquisadores, no âmbito de vários clados de carrapatos, como por exemplo, que a Hyalomminae é embutida na Rhipicephalinae e que algumas espécies de *Rhipicephalus* são mais proximamente relacionadas com as espécies *Boophilus* do que com as espécies de *Rhipicephalus* (Barker e Murrel, 2002).

É evidente que a comunidade de acarologia tem desenvolvido um kit de ferramentas apropriado para estudos com ácaros e carrapatos. Estas ações surgem da dificuldade encontrada em comparar e combinar resultados de pesquisas realizadas por diferentes grupos de pesquisadores utilizando distintos marcadores moleculares. Dessa forma, a proposta do presente trabalho foi justamente minimizar tais dificuldades e desenvolver soluções para taxonomia molecular de algumas espécies de carrapatos com importância para saúde humana e animal.

2.1.4 Dificuldades na identificação

O reconhecimento de diferentes espécies de carrapatos consiste numa tarefa complexa, envolvendo pesquisas com a utilização de diferentes métodos, como o uso de caracteres abrangendo forma (morfologia) e função (biologia, comportamento etc.). Pode-se destacar várias dificuldades encontradas nessa identificação, dentre as quais pode-se citar algumas.

Primeiramente, observa-se que cada um dos estágios biológicos ativos apresenta caracteres morfológicos específicos que os diferencia intraespecificamente. Assim sendo, em relação aos ixodídeos, há poucas chaves dicotômicas disponíveis e restringem-se aos carrapatos adultos, à exceção de uma chave parcial e regional para larvas de *Amblyomma* e outra para *Ixodes* (Amorim *et al.*, 1999). Em relação à identificação de Argasidae, há chaves dicotômicas de larvas e adultos de espécies neárticas, porém, somente algumas que ocorrem no neotrópico estão incluídas (Barros-Battesti, 2006). Portanto, o pesquisador deve fazer uso, sempre que possível, das descrições originais.

Vale ressaltar que as chaves dicotômicas são instrumentos produzidos e utilizados por pesquisadores, e desse modo, uma coleção de

referência é fundamental para elucidar qualquer dúvida que, por acaso, apareça durante a utilização das chaves dicotômicas.

Outra dificuldade encontrada é quanto ao número de hospedeiros. Nas espécies em que todas as fases do ciclo biológico utilizam um único hospedeiro, como ocorre com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, a identificação é facilitada, já que as fases do ciclo geralmente se sobrepõem, fazendo com que infestações com novas larvas ocorram antes do desprendimento das primeiras fêmeas ingurgitadas. Deste modo, a identificação dos adultos, geralmente é suficiente (Barros-Battesti, 2006).

Nos carrapatos que utilizam mais de um hospedeiro, como ocorre com a maioria das espécies do gênero *Amblyomma*, por exemplo, *A. cajennense*, a situação é mais complexa, pois cada fase pode ser encontrada em hospedeiros diferentes. Em geral, as formas imaturas, menos específicas, parasitam uma maior variedade de hospedeiros do que a fase adulta, mais específica (Sonenshine, 1991).

De acordo com Barros-Battesti (2006), existem ainda outros fatores que dificultam a identificação dos carrapatos, como a baixa especificidade de algumas espécies por seus hospedeiros, a sazonalidade, a distribuição geográfica e o ingurgitamento. Espécies com distribuição mais ampla tendem a apresentar variações de forma e função mais acentuadas, resultantes de adaptações às condições abióticas e bióticas encontradas ao longo de suas áreas de ocorrência. Nesse cenário, erros na identificação podem ocorrer em duas direções: espécies diferentes podem ser consideradas como sendo uma única espécie ou vice versa.

Em síntese, apesar de todos os métodos e meios à disposição dos especialistas para identificação dos carrapatos, existem ainda limitações que dificultam tal tarefa. No intuito de contornar as referidas dificuldades, a busca de marcadores moleculares torna-se um alternativa relevante, visto que possibilita uma identificação precisa, independente da fase de vida do carrapato, e passível de ser realizada não só por especialistas, mas também por qualquer pessoa que tenha conhecimentos de técnicas moleculares.

2.2 Marcadores moleculares aplicados a acarologia

Métodos moleculares têm revolucionado a sistemática de insetos (Roderick, 1996; Caterino *et al.*, 2000) e foram utilizados para ácaros e carrapatos (Navajas e Fenton, 2000).

No final do século 20, o advento das técnicas moleculares possibilitou a investigação do DNA em nível de pares de bases individuais. A partir de então, aplicações de marcadores moleculares para descrever a diversidade genética em ácaros foram relatadas, tanto em nível inter-específico como também intra-específico (Navajas e Fenton, 2000).

As técnicas de biologia molecular baseadas no DNA têm sido aplicadas na grande maioria das vezes em ácaros de importância econômica nas ciências agrárias, médicas e veterinárias. Nestas últimas o conhecimento da diversidade genética da família Ixodidae tem sido consideravelmente aumentado pela aplicação das técnicas moleculares.

Desde o aparecimento de uma das primeiras compilações de técnicas de biologia molecular aplicadas a insetos e ácaros (Hoy, 1994), o painel de metodologias disponíveis tem aumentado substancialmente. Essas técnicas podem ser usadas tanto para estudos de sistemática molecular, como também para genética evolucionária³. A seguir, estão descritas, de forma sucinta, aquelas que são comumente usadas, ou são potenciais, na determinação de polimorfismo genético.

2.2.1 Aloenzimas

A técnica de eletroforese de proteínas foi efetiva para detecção de polimorfismo genético por mais de três décadas (Pasteur *et al.*, 1988). O polimorfismo enzimático detectado por tal técnica foi amplamente usado em ácaros e carrapatos, nestes, vários sistemas enzimáticos podem ser resolvidos, no entanto, nesses estudos foram reportados um baixo polimorfismo dos loci estudados (Delaye *et al.* 1997; Kain *et al.* 1997).

Embora a eletroforese de proteínas tenha sido uma técnica usual para o estudo de polimorfismo genético (Lewontin, 1991), ela apresenta limitações relevantes, dentre as quais destaca-se a necessidade do material

³ Uma visão mais detalhada das técnicas de DNA e análise de dados aplicados a sistemática molecular pode ser encontrada em Hillis e colaboradores (1996).

biológico ser coletado *in vivo* ou ser congelado até o uso, e em um dado locus, a técnica revela somente uma fração da variação genética. Além do mais, o reduzido tamanho de muitas espécies limita o número de sistemas enzimáticos que podem ser detectados (Navajas *et al.*, 2001).

2.2.2 Análise direta de proteínas

Técnicas altamente sensíveis para separação de proteínas, tal como eletroforese bidimensional (O'Farrell, 1975) ainda não foram aplicadas amplamente ao estudo de carrapatos e ácaros. Entretanto, existem alguns usos de SDS-PAGE⁴ combinada com proteínas gerais para investigar diferenças quantitativas em proteínas entre populações de *Boophilus microplus* resistentes e sensíveis à organofosfatos (Rosario-Cruz *et al.*, 1997).

2.2.3 Amplificação de DNA utilizando a PCR

Dados enzimáticos são atualmente substituídos por vários tipos de informações baseadas no DNA. O advento da PCR (Mullis e Faloona, 1987) tornou possível a aplicação da técnica a pequenos animais já que minúsculas quantidades de material são requeridas. Dessa forma, a maioria das técnicas usadas para examinar variações de nucleotídeos é baseada na PCR⁵ para amplificar quantidades suficientes de DNA.

A PCR é uma técnica que permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA, utilizando-se duas seqüências de nucleotídeos iniciadores (*primers*) que hibridam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Três eventos distintos ocorrem durante um ciclo de PCR: o DNA é desnaturado, os *primers* hibridam com as fitas do DNA e a síntese do DNA complementar à fita-molde de DNA é realizada pela polimerase termoestável com a incorporação de desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs) (Hillis, 1996).

A repetição dessas 3 etapas, por 20 a 30 ciclos permite a amplificação de um segmento de DNA de fita dupla cujo término é definido pela terminação 5' do *primer* oligonucleotídeo e cujo comprimento é definido pela

⁴ Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes.

⁵ Maiores detalhes da aplicação desta técnica em carrapatos estão descritos no item 2.5.

distância entre os *primers*. Como os produtos de um ciclo de amplificação servem como molde para o próximo, cada ciclo sucessivo aumenta exponencialmente a quantidade do produto do DNA desejado.

2.2.4 Amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD)

A técnica de RAPD usa os princípios da PCR para amplificar seqüências de DNA aleatoriamente (Williams *et al.*, 1990). Vários fragmentos de DNA são usualmente amplificados e alguns destes podem estar presentes em uma proporção de indivíduos em uma população. Um amplo conjunto de *primers* tem a vantagem de promover uma varredura em todo o genoma. Entretanto, a interpretação dos dados de RAPD é muitas vezes limitada por uma baixa repetibilidade dos resultados (Black, 1993), com o problema agravado no caso de espécimes pequenos, nos quais a quantidade de DNA obtida é reduzida, prevenindo assim uma análise acurada da concentração de DNA.

Outro limite destes marcadores é que a técnica revela dominância, não identificando heterozigotos. Apesar disso tudo, a técnica de RAPD é freqüentemente usada como a primeira fonte de informações, já que os resultados são gerados fácil e rapidamente. Através da clonagem e seqüenciamento dos produtos da RAPD também é possível desenhar novos *primers* mais específicos, os quais serão mais confiáveis (Yli-Mattila *et al.*, 2000).

2.2.5 Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)

Regiões de DNA genômico isolados por PCR ou por outro método podem ser digeridas por enzimas de restrição que geram um padrão de RFLP. Esta técnica foi usada para detectar variabilidade genômica em diferentes populações de *B. microplus* (Passos *et al.*, 1999). RFLP dos produtos de PCR também são usados com o propósito de diagnosticar espécies (Poucher *et al.*, 1999).

2.2.6 Microsatélites

Microsatélites são definidos como pequenos fragmentos de DNA, com aproximadamente cem pares de bases, contendo padrões de repetição em seqüência de dois a seis pares de bases. Os mesmos são marcadores co-dominantes, possibilitando a detecção do polimorfismo dos loci analisados de uma maneira simples, avaliando o tamanho dos fragmentos amplificados na PCR. Loci de microsatélites estão disponíveis para um número crescente de organismos e este novo tipo de informação estimulou o desenvolvimento de métodos estatísticos concisos, como também programas computacionais para análise de dados de freqüência alélica (Luikart e England, 1999). Os microsatélites são de fato excelentes para o estudo de genética de populações (Jarne e Lagoda, 1996; Goldstein e Schlötterer, 1999).

Apesar dos microsatélites serem considerados presentes em todos os genomas eucarióticos (Hamada e Kakunaga, 1982), Navajas (1998) demonstrou que eles são extremamente raros em ácaros, não sendo, portanto, aplicados aos carrapatos.

2.2.7 Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)

A técnica de AFLP seleciona fragmentos de restrição. Após a digestão completa do DNA genômico os fragmentos são amplificados por PCR (Vos *et al.*, 1995). Usando este método, conjuntos de fragmentos de restrição podem ser visualizados por PCR sem um conhecimento prévio do genoma da espécie em questão. A técnica permite acesso a um número quase ilimitado de marcadores genéticos. Entretanto, na AFLP os genótipos heterozigotos não podem ser distinguidos dos homozigotos, e assim como para RAPD, isto limita o uso destes marcadores para o estudo de genética de populações. O método de AFLP foi usado pela primeira vez em ácaros por Weeks *et al.* (2000).

2.2.8 Seqüenciamento de fragmentos de DNA

O polimorfismo dos fragmentos de DNA amplificados por PCR, método mais utilizado atualmente, pode ser analisado tanto por clivagem através de enzimas de restrição (RFLP), como por seqüenciamento, através de técnicas que atualmente tornaram-se rotineiras.

As seqüências de DNA são coletadas e armazenadas em banco de dados usados universalmente (por exemplo, EMBL e GenBank). Através de busca por similaridade de seqüências por ferramentas como BLAST (Karlin e Altschul, 1993), seqüências desconhecidas são identificadas. O seqüenciamento pode ser feito diretamente (Navajas *et al.*, 1998) ou após clonagens em vetores plasmidiais (Fenton *et al.*, 1997), sendo este método mais trabalhoso e dispendioso, no entanto importante quando se investiga variação intra-específica em genes ribossomais.

As seqüências de DNA são usadas para verificar a diferença entre táxons e indivíduos, além de permitir a reconstrução das relações filogenéticas entre as entidades taxonômicas estudadas. A inferência da filogenia, através de dados moleculares, requer a seleção de métodos apropriados entre os disponíveis (Swofford *et al.* 1996), como também o uso de programas e softwares adequados. Vários programas computacionais são destinados ao alinhamento múltiplo de seqüências nucleotídicas, entre eles, o mais popular é o ClustalW (Thompson *et al.*, 1994).

Diferentes regiões do genoma podem ser analisadas, as quais podem ter distintas taxas de evolução e/ou distintos modos de hereditariedade (maternal ou Mendeliana). Genes que sofrem mutação com maior freqüência são usados para comparação entre táxons estritamente relacionados, já os genes que evoluem mais lentamente são usados para comparações entre táxons mais distantes. Entre os mais populares marcadores usados em taxonomia e evolução molecular estão o DNA mitocondrial (mtDNA) e o DNA ribossomal nuclear (rDNA). Nos últimos anos, informações para ácaros em ambas as regiões genômicas foram cumulativamente armazenadas em banco de dados genéticos (Navajas e Fenton, 2000).

A seguir estão descritos alguns estudos de caracterização genômica e suas principais conclusões, tanto com o uso do mtDNA, como também o rDNA

2.2.9 DNA mitocondrial

As mitocôndrias das células eucarióticas possuem um genoma próprio e independente do genoma nuclear. O mtDNA dos carrapatos é pequeno e compacto, com comprimento de 14 a 15 Kb e é formado por uma seqüência

de 37 genes, dispostos ao longo de uma dupla cadeia de nucleotídeos em forma circular. Está constituído por dois genes que codificam os RNA ribossômicos, 22 genes que codificam os RNA de transferência e 13 genes que codificam os RNA mensageiros correspondentes às subunidades das enzimas mitocondriais (Campbell e Barker, 1999).

Segundo Hillis e colaboradores (1996), o mtDNA é muito variável e, em geral, se desenvolve mais rapidamente do que o DNA nuclear. A maioria das permutações genéticas são simples substituições de bases, algumas são pequenas adições ou supressões de um ou poucos nucleotídeos. Por último, e talvez a característica mais importante do mtDNA dos animais, com raras exceções, é que são herdados da mãe. Por consequência, diferentemente do que ocorre com o DNA nuclear, as mutações produzidas em um indivíduo não se recombina durante a reprodução sexual e são herdadas pelos filhos.

Ainda de acordo com Hillis e colaboradores (1996) o mtDNA reúne quase todas as características desejáveis que devem possuir um marcador evolutivo, por isso, tem sido amplamente utilizado para analisar as relações evolutivas entre espécies e a dinâmica das trocas que se produzem em níveis micro e macro-evolutivos.

O alto número de cópias torna os genes mitocondriais mais fáceis de serem utilizados do que os genes nucleares de cópia única. Outra característica importante é a capacidade de uso para estudos infraespecíficos. Entretanto um dos problemas potenciais é a transferência desses genes da mitocôndria para o núcleo, formando pseudogenes mitocondriais, os quais podem ser amplificados e seqüenciados erroneamente, resultando em análises filogenéticas equivocadas (Cruickshank, 2002).

Os genes mitocondriais são divididos em duas categorias: genes ribossomais e genes codificadores de proteínas. Os carrapatos possuem somente dois genes ribossomais mitocondriais que, de acordo com seu peso molecular, denominam-se 12S ou unidade pequena e 16S ou unidade grande, os quais não são separados por espaçadores internos transcritos. Já como exemplo de um gene codificador de proteína pode-se citar o gene da subunidade I da citocromo oxidase (COI), que parece evoluir muito

rapidamente e já foi usado em alguns estudos envolvendo ácaros (Navajas *et al.*, 1996; Anderson e Trueman, 2000).

Simon e colaboradores (1994) salientam que são vários os genes do genoma mitocondrial usados progressivamente para avaliar as relações filogenéticas entre táxons animais. No entanto, estudos evolucionários em ácaros têm avaliado principalmente o gene COI, enquanto que, nos estudos em carrapatos, o uso do ribossomo 16S é mais comum.

Em um baixo nível taxonômico, as seqüências 16S mitocondriais foram usadas para examinar as relações filogenéticas no gênero *Dermacentor* (Crosbie *et al.*, 1998) e *Rhipicephalus* (Mangold *et al.*, 1998a). Em um trabalho relativamente recente, voltado principalmente para a detecção molecular de DNA patogênico em carrapatos, Sparagano e colaboradores (1999) apresentam uma compilação dos *primers* publicados para uso em amplificação de DNA de ixodídeos na PCR (Tabela 1).

Tabela 1- Oligonucleotídeos iniciadores usados para amplificar DNA de carrapatos ixodídeos

Alvo	Primer	Tamanho do produto (pb)	Referência
Tick 16S mt rRNA	16S11: 5' CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG	460	Black and Piesman, 1994
	16S-1: 5' CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT		
	16S-2: 5' TTACGCTGTTATCCCTAGAG		
	16S+2: 5' TTGGGCAAGAAGACCCTAT		
Tick ITS2 rDNA	MJH3: 5' AAATTAAGGACAAGAAGACCC	180	Hubbard <i>et al.</i> , 1995
	MJH4: 5' GGGATAACAGCGTTATATTTT		
Tick ITS1 rDNA	RIB-3: 5' cgGGATCCTTC(A,G)CTCGCCG(C,T)TACT	800– 2000	Zahler <i>et al.</i> , 1995
	RIB-4: 5' CCATCGATGTGAA(C,T)TGCAGGACA		
Tick 18S rDNA	1: 5' GTAAGCTTCCTTTGTACACACCGCCCGT	350	McLain <i>et al.</i> , 1995
	2: 5' GTGAATTCTATGCTTAAATTCAGGGGGT		
Tick 12S gene	A: 5' AACCTGGTTGATCCTGCCA	172	Mangold <i>et al.</i> , 1998b
	B: 5' GCATGTATTAGCTCTAG		
	A: 5' AACCTGGTTGATCCTGCCA	653	
	C: 5' CTGAGATCCAACACTACGAGCTT		
	D: 5' GGCCCCGTAATTGGAATGAGTA	776	
	E: 5' CACCACCCACCGAATCAAGAAA		
	F: 5' GCAGCTTCCGGGAAACCAAAGT	726	
	G: 5' TGATCCTTCCGCAGGTTACCT		
Tick 12S gene	H: 5' CTGCCCTTTGTACACACCG	180	Norris <i>et al.</i> , 1996
	G: 5' TGATCCTTCCGCAGGTTACCT		
Tick 12S gene	1: 5' AAC(AG)CC(AGT)(AG)(AT)ATCTTACT	420	Norris <i>et al.</i> , 1996
	2: 5' AAAGTAATGTAATTCACCTTCA		

Fonte: Sparagano e colaboradores (1999).

2.2.10 DNA ribossomal nuclear

O DNA ribossomal nuclear (rDNA) continua sendo uma das mais completas ferramentas para as investigações moleculares. Apesar de mais difíceis para alinhar, os genes ribossomais apresentam mais sítios informativos quando comparados aos genes codificadores de proteínas.

As seqüências de rDNA são responsáveis pela síntese de uma importante classe de moléculas, os RNAs ribossômicos (rRNAs), os quais são estruturas remanescentes dos primórdios da vida na terra, demonstrando serem componentes essenciais na fisiologia celular, que interagem de modo específico com as proteínas ribossômicas para formar as unidades ribossomais que atuam na síntese de proteína. Portanto, os rRNAs são o principal produto da transcrição em qualquer célula, constituindo em torno de 80 a 90% da massa de RNA total dos procariontes e eucariontes (Alberts *et al*, 2004).

De acordo com Matioli (2001), os genes que codificam para rRNA são repetidos, ocorrendo em número variável nos diversos organismos estudados. Nos eucariontes, estas cópias estão organizadas em tandem e agrupadas em uma ou mais regiões cromossômicas. Os RNAs ribossômicos são classificados conforme seu coeficiente de sedimentação sob campo centrífugo, que depende tanto do tamanho, assim como da densidade da molécula, na unidade Svedberg (S).

O principal lócus ribossomal em organismos eucarióticos consiste de três genes: 18S rDNA, 5.8S rDNA e 28S rDNA, os quais codificam, respectivamente, as subunidades ribossomais 18S, 5.8S e 28S. Estes três genes são transcritos em um único RNA, separados por duas regiões: os espaçadores internos transcritos (ITS) – ITS-1, entre os genes das subunidades 18S e 5.8S, e ITS-2, entre os genes das subunidades 5.8S e 28S - (Hillis e Dixon, 1991). Os três genes estão repetidos em seqüência, e entre cada grupo situa-se o espaçador intergênico (Figura 2).

Após o processamento do RNA, são formadas as três subunidades ribossomais que atuam na maquinaria de síntese protéica da célula, e as regiões ITS-1 e ITS-2 são removidas, não possuindo funções sabidamente úteis até recentemente (Cruickshank, 2002).

Estima-se que existam mais de cem cópias dos genes ribossomais em um cromossomo e eles devem ser encontrados em mais de um cromossomo (Wen *et al.*, 1974). A repetição é essencialmente uma etapa de pré-amplificação, a qual permite detectar esses genes facilmente em relação aos que estão presentes em cópia única.

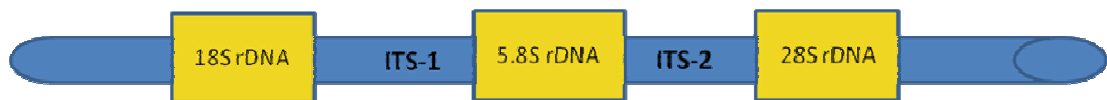


Figura 2- Representação esquemática dos genes ribossomais nucleares eucarióticos.

Fonte: Adaptado de Hillis e Dixon, 1991.

Os genes ribossomais reúnem muitas características ideais de um marcador evolutivo, motivos pelos quais têm sido utilizados para analisar as relações em uma ampla categoria de táxons e níveis de divergências. Entretanto, também apresentam algumas características indesejáveis que podem afetar as análises filogenéticas e que devem ser levadas em conta. Entre elas, observa-se a variabilidade na taxa evolutiva entre táxons e entre os genes, as limitações estruturais e funcionais que geram diferenças na frequência das substituições entre as regiões dos genes, a ocorrência de mutações múltiplas em uma mesma região, que ocultam o caráter filogenético e o processo de recombinação genética durante a mitose das células germinativas (Hillis *et al.*, 1996).

Ainda de acordo com Hillis e colaboradores (1996), a semelhança observada em nível intraindividual indica que existe um mecanismo de homogeneização das múltiplas cópias dos genes ribossomais, chamado evolução estabelecida. Como este tipo de evolução também atua fixando as mutações dentro das unidades reprodutivas, um só indivíduo deveria ser típico de um grupo fechado onde se reproduzem entre si. O fato de que tampouco se observa variação intraespecífica, constitui uma vantagem adicional, já que não é necessário sequenciar o DNA de vários indivíduos para se obter informações representativas de uma espécie.

Em geral, se considera que para resolver processos evolutivos em níveis profundos de divergência, são mais apropriados os genes 5,8S e 18S

rRNA e as regiões mais conservadas das seqüências do gene 28S. Para estudar níveis intermediários de divergência parece mais útil o gene 28S (regiões conservadas e segmentos de expansão) e, em alguns casos, as regiões variáveis do gene 18S. Finalmente, para estudar espécies estreitamente relacionadas e populações, seriam suficientemente informativas as regiões variáveis do gene 28S rRNA e os espaçadores internos (Hillis *et al*, 1996).

O ITS-2 é reportado pela literatura como uma das regiões não codificantes mais usadas em estudos que investigam variações dentro de espécies ou entre espécies intimamente relacionadas de ácaros, já que estas regiões sofrem uma baixa pressão seletiva e portanto tendem a acumular substituições muito rapidamente (Cruickshank, 2002).

Para caracterizar as regiões ITS é possível desenhar *primers* para PCR baseados nos genes mais conservados (28S, 5.8S e 18S) que flanqueiam os ITs. As seqüências amplificadas por esses iniciadores podem ser úteis para comparações filogenéticas entre táxons distantes, no entanto, as regiões ITS são muito úteis para distinção entre táxons muito próximos, já que evoluem mais rapidamente do que as regiões codificadoras (Hillis e Dixon, 1991).

A partir do momento que uma região ITS tenha sido amplificada com sucesso, esta pode ser analisada por técnicas adicionais, possibilitando dessa forma as análises necessárias ao entendimento da similaridade ou divergência entre indivíduos.

Até o momento existem poucos, no entanto, significantes trabalhos demonstrando que a natureza repetitiva dos genes ribossomais resulta em cópias de regiões ITS com potencial de variação dentro e entre os indivíduos. Isto permite um levantamento da diversidade intra-específica das seqüências ITS, Alguns desses trabalhos realizados com carrapatos são McLain *et al.* (1995); Rich *et al.* (1997); Poucher *et al.* (1999); Anderson *et al.* (2004); Shone *et al.* (2006) e Marrelli *et al.* (2007).

2.3 Armazenamento de espécimes

Algumas evidências de trabalhos com insetos sugerem que o método mais efetivo para preservação de espécimes que serão usados para análises moleculares é o ultracongelamento ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) dos organismos vivos (Post *et al.*, 1993; Reiss *et al.*, 1995; Dillon *et al.*, 1996), entretanto, isto nem sempre é praticável. Uma alternativa acessível é o armazenamento em etanol 100% a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4 Extração de DNA em carrapatos

Para obter a seqüência de nucleotídeos de um ou mais genes de interesse, deve ser seguida uma série de passos que vão desde a extração de DNA genômico e mitocondrial do espécime de carrapato, até o seqüenciamento propriamente dito.

Antes do preparo dos carrapatos para a PCR é necessário primeiro extrair os ácidos nucléicos. Esses artrópodes possuem um exoesqueleto de quitina muito duro, portanto a extração de ácidos nucléicos pode necessitar de várias etapas. O DNA de organismos não alvos do estudo, presentes na superfície dos carrapatos pode também ser amplificado por alguns *primers* durante a PCR, para prevenir esta contaminação, a superfície dos carrapatos deve ser esterilizada através da lavagem em etanol 70% e limpa com água esterilizada (Higgins e Azad, 1995). Outros pesquisadores têm obtido sucesso adotando meios de esterilização contendo iodo (Takada *et al.*, 1994), hipoclorito de sódio (Higgins e Azad, 1995) ou peróxido de hidrogênio (Livesley *et al.*, 1994). Outro problema na execução da PCR pode ser ainda a presença de resíduos de pigmentos sanguíneos ou mesmo outras impurezas.

Várias técnicas foram publicadas a respeito da extração de DNA de carrapatos e os patógenos por eles veiculados. Zahler e colaboradores (1995) isolaram DNA de *D. reticulatus* através de maceração dos ovos, larvas, ou ninfas de carrapatos em tubos de microcentrífuga usando pistilos descartáveis. DNA de carrapato também foi isolado por Black e Piesman (1994) pelo congelamento e maceração de carrapatos individuais em um tampão de homogeneização. Crampton e colaboradores (1996) extraíram

DNA através de um rápido congelamento em nitrogênio e posteriormente maceração.

Hubbard e colaboradores (1995) desenvolveram um método de extração empregando uma suspensão de pó de diatomáceas em carrapatos preservados no álcool, eliminando dessa forma constituintes sangüíneos que inibem a PCR (Panaccio e Lew, 1991). Várias técnicas utilizadas para a extração, com suas respectivas referências podem ser encontradas em Sparagano e colaboradores (1999).

De acordo com Marrelli e colaboradores (2007), pode ser utilizada a técnica clássica que consiste em uma digestão proteolítica com proteinase K e em seguida purificar os ácidos nucléicos utilizando solventes orgânicos (fenol e clorofórmio) e precipitá-los com etanol absoluto. Existem também diferentes kits comerciais que permitem a obtenção de DNA de boa qualidade.

Em relação à quantidade de material, segundo Klompen (2000), são necessários de dois a cinco indivíduos para cada extração, enquanto Anderson e Trueman (2000) usaram apenas tecido dissecado das pernas de um único ácaro. Se possível, é preferível extrair DNA de um único indivíduo para prevenir mistura de genótipos distintos, particularmente se existe algum questionamento a respeito da identidade do espécime. O DNA extraído deve ser estocado a -80 °C.

Ao realizar uma extração usualmente deixa-se algum indivíduo como testemunha, para que possa servir para análises subseqüentes ao seqüenciamento de DNA caso seja necessário (Ruedas *et al.*, 2000). Idealmente, o espécime testemunha deve ser o mesmo que será seqüenciado, porém, normalmente este indivíduo é completamente destruído durante a extração. No entanto, métodos não destrutivos estão disponíveis, como por exemplo, o de Cruickshank e colaboradores (2001), que adaptaram o *DNeasy Tissue Kit* da Qiagen® para uma extração não destrutiva, aumentando o tempo da etapa de lise. Após a extração os espécimes foram perfeitamente identificados, entretanto, houve uma perda considerável no rendimento de DNA.

2.5 Amplificação de DNA em carrapatos

Black e Piesman (1994) definiram um conjunto de *primers* (16S+1 e 16S-1) derivados de um 16S RNA (mt rRNA) codificado pela seqüência do gene mitocondrial ribossomal de *Ixodes ricinus*. Estes *primers* foram usados para amplificar um fragmento de aproximadamente 460 pb de 36 espécies de carrapatos com o objetivo de construir uma árvore filogenética.

Os referidos *primers* também foram usados como controles para analisar a qualidade do DNA extraído de alguns carrapatos, mas não permitiram uma amplificação de produtos em todas as espécies de carrapatos. No entanto, um conjunto de *primers* 16S+1 com 16S-2, e 16S-1 com 16S+2 foi usado com sucesso na amplificação de dois fragmentos complementares do mesmo gene de uma ampla variedade de carrapatos. (Shone *et al.*, 2006). Outros *primers* 16S mt rDNA, específicos para carrapatos, que amplificam um fragmento de aproximadamente 180 pb nos gêneros *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Argas* foram desenhados por Hubbard e colaboradores (1995).

Primers baseados no ITS-2 foram construídos por Zahler e colaboradores (1995). Usando os *primers* RIB-3 e RIB-4 eles obtiveram produtos da PCR de 1.2 Kb de diferentes estágios de vida do carrapato *Dermacentor reticulatus*. Usando os mesmos *primers*, também foram obtidos fragmentos na amplificação de *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, e *Argas* spp.

Posteriormente, Norris e colaboradores (1996) e Mangold e colaboradores (1998a, 1998b) trabalharam respectivamente com os genes 12S, 16S e 18S de carrapatos para desenvolver uma nova filogenia dentro da família Ixodidae e entre populações de *Ixodes scapularis*. Finalmente, Hernandez e colaboradores (1998) usaram 120 *primers* em uma análise por RAPD para identificar regiões genômicas, objetivando o desenvolvimento de sondas para detecção resistência a acaricida. Foram observadas variações nos perfis de RAPD entre *B. microplus* susceptíveis e resistentes.

2.6 Panorama atual da filogenia e taxonomia molecular em carrapatos

Alguns trabalhos na área de filogenia e taxonomia molecular de carrapatos têm sido desenvolvidos com análises de seqüências gênicas (Poucher *et al*, 1999; Anderson *et al*, 2004; Shone *et al*, 2006; Marrelli *et al*, 2007). Dentre esses, alguns são focados na identificação molecular de espécies de interesse médico baseados em ITS-2, como por exemplo, uma chave molecular desenvolvida por Poucher e colaboradores (1999) que permite a identificação de dezessete espécies do gênero *Ixodes* de grande importância médica nos EUA.

Também no mesmo país, Shone e colaboradores (2006) desenvolveram um conjunto de *primers* e suas respectivas sondas que permitiram a identificação de cinco espécies de importância médica, através da PCR em tempo real. Anderson e colaboradores (2004) investigaram a possibilidade de diferenciação entre carrapatos, porém usando o gene ribossomal 16S como alvo.

Recentemente, no Brasil, Marrelli e colaboradores (2007) estudaram as relações filogenéticas entre quinze espécies neotropicais do gênero *Amblyomma*, este estudo também foi baseado nas regiões ITS-2, estando todas essas seqüências depositadas em banco de dados. Neste estudo foi comprovada a importância das regiões ITS-2 para a taxonomia molecular de carrapatos, permitindo o uso da PCR e/ou RFLP para identificação das espécies. No entanto não foi construído nenhum oligonucleotídeo iniciador espécie-específico como proposto nesta pesquisa.

Diante desses estudos, nota-se que entre os vários marcadores moleculares, os ITS-2 de rDNA têm sido valiosos para estudos taxonômicos e filogenéticos. Inserções e deleções de diferentes tamanhos, precedidas e/ou seguidas por variações nas seqüências nucleotídicas podem ser usuais para o propósito de identificação de espécies (Marrelli *et al.*, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho consistiu na busca de marcadores moleculares para identificação e diferenciação de gêneros e espécies de carrapatos ixodídeos.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos compreenderam:

- a) A construção de um acervo de carrapatos e obtenção de fotografias dos mesmos;
- b) A comparação de dois métodos para extração de DNA de carrapatos;
- c) A identificação de marcadores moleculares para ixodídeos dos gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes*, *Rhipicephalus* e *Haemaphysalis*;
- d) O desenho de *primers* específicos para gêneros e espécies;
- e) A identificação molecular de espécies pertencentes ao gênero *Amblyomma*;
- f) A padronização de reações de PCR, direcionadas às espécies de maior interesse epidemiológico;
- g) A determinação da sensibilidade do método;
- h) A verificação de variações de seqüências em populações de carrapatos de diferentes regiões geográficas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram utilizados exemplares (machos, fêmeas, larvas e ninfas) de várias espécies de carrapatos ixodídeos, compreendendo vários gêneros. Foram utilizados também alguns carrapatos da família Argasidea como grupos externos, como *Antricola delacruzii*, *Antricola guglielmonei*, *Argas miniatus*, *Ornithodoros fonsecai*. Todos os exemplares foram mantidos em álcool isopropílico e estão listados na Tabela 2.

Grande parte dos referidos carrapatos foram gentilmente cedidos, previamente identificados morfológicamente, pelos Drs. Marcelo B. Labruna da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e Mathias P. J. Szabó da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Antes da extração de DNA, os carrapatos foram fotografados em microscópio estereoscópio e para todas as amostras foram guardados espécimes testemunhos para futuras confirmações morfológicas caso necessário.

4.2 Extração de DNA

Foi utilizado o método fenol-clorofórmio, de acordo com o protocolo descrito por Billings e colaboradores (1998). Os artrópodes foram colocados individualmente em tubos de microcentrífuga com etanol absoluto por um período aproximado de 20-30 minutos, posteriormente lavados com PBS e em seguida adicionados 300 μ L deste tampão para serem triturados com o auxílio de um bastão apropriado. Deste macerado foram removidos 200 μ L para o processo de extração de DNA.

Para a extração do DNA, foram adicionados SDS 20% v/v e proteinase K (200 mg/ml) para uma concentração final de 1%. A seguir adicionou-se à amostra digerida 200 μ L de fenol/clorofórmio (1:1). Esta

Tabela 2 - Acervo de carrapatos do LBBMAIP construído durante a pesquisa.

Amostra	Espécie	Estágio	Origem
1	<i>Amblyomma naponense</i>	L	Teodoro Sampaio - SP
2	<i>Amblyomma naponense</i>	A	Monte Negro - RO
3	<i>Ornithodoros fonsecai</i>	A	NC
4	<i>Antricola guglielmonei</i>	A	Porto Velho - RO
5	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	A	Monte Negro - RO
6	<i>Antricola delacruzii</i>	A	Porto Velho - RO
7	<i>Ixodes luciae</i>	N	Monte Negro - RO
8	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	A	Monte Negro - RO
9	<i>Amblyomma pacaе</i>	L	Monte Negro - RO
10	<i>Amblyomma pacaе</i>	N	Monte Negro - RO
11	<i>Amblyomma pacaе</i>	A	Monte Negro - RO
12	<i>Argas miniatus</i>	N	NC
13	<i>Argas miniatus</i>	A	NC
14	<i>Amblyomma ovale</i>	L	Monte Negro - RO
15	<i>Amblyomma ovale</i>	N	Monte Negro - RO
16	<i>Amblyomma ovale</i>	A	Monte Negro - RO
17	<i>Amblyomma cajennense</i>	L	NC
18	<i>Amblyomma cajennense</i>	N	NC
19	<i>Amblyomma cajennense</i>	A	NC
20	<i>Amblyomma parvum</i>	L	NC
21	<i>Amblyomma parvum</i>	N	NC
22	<i>Amblyomma parvum</i>	A	NC
23	<i>Amblyomma triste</i>	N	NC
24	<i>Amblyomma triste</i>	A	NC
25	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	L	Uberlândia - MG
26	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	N	Uberlândia - MG
27	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	A	Uberlândia - MG
28	<i>Anocentor nitens</i>	A	NC
29	<i>Haemaphysalis leporispalustris</i>	A	Colônia UFRRJ
30	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	A	Santo Antonio do Glória - MG
31	<i>Amblyomma cajennense</i>	A	Santo Antonio do Glória - MG
32	<i>Amblyomma americanum</i>	A	Texas - USA
33	<i>Amblyomma cajennense</i>	A	Texas - USA
34	<i>Amblyomma maculatum</i>	A	Texas - USA
35	<i>Amblyomma aureolatum</i>	A	Intervales - SP
36	<i>Amblyomma dubitatum</i>	A	Uberlândia - MG
37	<i>Amblyomma incisum</i>	A	NC
38	<i>Amblyomma nodosum</i>	A	Uberlândia - MG
39	<i>Amblyomma cajennense</i>	A	NC
40	<i>Ixodes loricatus</i>	A	Jaboticabal - SP

A = adulto, L = larva, N = ninfa, NC = não confirmado

mistura foi centrifugada a 15300 xg por 3 minutos, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo. Após a repetição deste procedimento por até oito vezes, dependendo da presença de resíduos de proteína no material, foram adicionados ao sobrenadante 200 μ L de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) seguido de agitação e centrifugação. Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de microcentrifuga, onde foram adicionados 22 μ L de NaCl 2M, seguido de dois volumes de etanol 100% gelado.

Este material foi então submetido a uma temperatura de -70 °C por 15 minutos e centrifugado a 11000 xg sob temperatura de 4 °C por 15 minutos. Sobre o sedimento obtido foram adicionados 200 μ L de etanol 70% e então novamente centrifugado a 11000 xg sob temperatura de 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento composto pelo DNA foi dessecado, e posteriormente ressuspendido em água deionizada esterilizada para ser utilizado como molde na PCR.

A fim de otimizarmos a melhor técnica de extração de DNA para a utilização na PCR, além do método fenol-clorofórmio descrito acima, utilizamos também o *QIAamp[®] DNA Mini Kit* (QIAGEN[®], USA) na extração de DNA dos carrapatos.

Esta técnica utiliza uma coluna com sílica gel com afinidade para DNA. Para tanto, 125 mg de tecido de cada amostra foram lisadas por 180 μ L de tampão ATL e 20 μ L de proteinase K durante 3 horas a 56 °C. Em seguida, foram adicionados 4 μ L de RNase A (100 mg/mL) e incubado por 2 minutos a 25 °C. Após a lise, as amostras foram acrescidas de 200 μ L de tampão AL e 200 μ L de etanol 100% e então aplicadas a uma coluna com afinidade para DNA, as quais foram submetidas a uma centrifugação de 5000 xg por 1 minuto. Após centrifugação, as amostras foram lavadas duas vezes, uma com 500 μ L do tampão AW1 e outra com 500 μ L do tampão AW2. Terminada a lavagem, os DNAs foram eluídos das colunas com 150 μ L do tampão AE a 5000 xg e estocados a -20 °C.

Para verificar a qualidade do DNA, 1 μ L de cada amostra foi aplicado em gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) 0,8%, corado em solução com

brometo de etídio 1µg/mL (SIGMA-ALDRICH) e visualizado em luz ultravioleta.

A quantificação do DNA de algumas amostras foi realizado em espectrofotômetro (BioRad®), medindo-se a absorbância no comprimento de onda de 260 nm. Para estimar a concentração do DNA total utilizou-se o conceito padrão de que uma unidade de absorbância na densidade óptica a 260 nm equivale a 50 µg de DNA por mL de solução (Sambrook *et al.* 1989).

4.3 Amplificação pela PCR

Para evitar o risco de contaminação na PCR, todas as reações foram realizadas em capela de fluxo laminar previamente limpa com solução de hipoclorito de sódio 1%, água ultrapura e etanol 70%. Foram utilizadas somente ponteiras com filtro e as pipetas utilizadas eram limpas antes de cada reação com etanol 70%. Todo o material utilizado era esterilizado, antes de cada reação, com luz ultravioleta por 15 minutos dentro da capela de fluxo laminar.

Para a amplificação do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) de 800 a 1300 pb para ixodídeos, a PCR foi realizada nas condições previamente descritas por Zahler e colaboradores (1995) com algumas modificações.

Foram utilizados os iniciadores direcionados para região ITS2, *primer* RIB4 (5'-CCATCGATGTGAA(C,T)TGCAGGACA-3') que se anela no 5.8S rDNA (Zahler *et al.* 1995) e *primer* ITS1-2 (5'-GTGAATTCTATGCTTAAATTCAGGGGGT-3') que pareia com o 28S rDNA (McLain *et al.* 1995).

As reações (25 µL) foram feitas usando-se o *Kit Taq PCR Master Mix* (QIAGEN®, USA), contendo tampão PCR 1X, 0,4 µM de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 1,25 U de Taq DNA Polimerase, água ultrapura e como molde 2,5 µL do DNA de cada amostra.

Estas reações foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94° C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos a 95 °C por 45 segundos, 53 °C por 1 minuto, 72 °C por 1,5 minutos e uma etapa de extensão final a 72 °C durante 5 minutos. Após a PCR, uma alíquota do produto amplificado foi submetida à eletroforese em gel de

agarose 1,2% e posteriormente corado com brometo de etídio 1 µg/ml para visualização em transiluminador sob luz ultravioleta para identificação das bandas e digitalização pelo Eagle Eye™ II (Stratagene).

Após a obtenção dos fragmentos de DNA amplificados pela PCR, três caminhos diferentes foram seguidos. O primeiro foi a purificação dos fragmentos amplificados diretamente do gel com o auxílio de um Kit, para que dessa forma pudessem ser seqüenciados e permitir análises subseqüentes. O segundo caminho foi a purificação dos fragmentos clonados a partir de vetores plasmidiais. Já o terceiro foi a busca de seqüências semelhantes às amplificadas já depositadas em banco de dados genéticos.

4.4 Purificação dos produtos da PCR

As amostras que apresentaram uma maior concentração dos segmentos de DNA oriundos da PCR foram purificadas diretamente do gel para serem submetidas ao seqüenciamento. Para a purificação foi utilizado o *Kit QIAquick® Gel Extraction* (QIAGEN®, USA), conforme a recomendação do fabricante. O DNA purificado foi quantificado em gel de agarose 1,2%, corado em solução de brometo de etídio e visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta.

Já as amostras que não apresentaram uma quantidade satisfatória de DNA para seqüenciamento, os fragmentos de DNA de interesse foram clonados em vetores plasmidiais e então enviados para a reação de seqüenciamento.

4.5 Clonagem dos produtos purificados

4.5.1 Preparo de células competentes

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Infectologia Molecular Animal/BIOAGRO/UFV.

Células DH5α foram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido (Apêndice I) e crescidas a 37°C por aproximadamente 16 h sob agitação (180 rpm). Após esta etapa, o inóculo foi transferido para 100 mL de meio LB líquido e colocados novamente para crescer nas mesmas condições

anteriores até obter uma OD= 0,6. As células foram então transferidas para tubos tipo Falcon e incubadas no gelo por 10 minutos. Após este tempo, os tubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada (4°C) a 2500xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* cuidadosamente ressuspenso em 10 mL de CaCl₂ 0,1 M preparado em água ultrapura e filtrado em membrana de nitrocelulose (MILLIPORE®) com 0,22 µm de poro. Os tubos foram deixados por 10 minutos no gelo e depois centrifugados a 4°C por 10 minutos a 1250xg. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 2 mL de CaCl₂ 0,1 M gelado. Foram adicionados 300 µL de glicerol (Isofar®) e alíquotas de 100 µL de células em tubos de 1,5 mL foram preparadas e estocadas a -80°C.

4.5.2 Transformação de células competentes

Para a clonagem dos produtos da PCR purificados foi utilizado o vetor de clonagem *pGEM T Easy Vector System* (Promega®). A reação de ligação foi preparada conforme as instruções do fabricante e deixadas a 25°C por aproximadamente duas horas.

A reação de ligação foi transferida para um tubo com células competentes DH5α, previamente descongeladas no gelo. As células foram incubadas por 30 minutos no gelo com a reação de ligação. A seguir, as células foram incubadas a 42°C por 1 minuto e depois no gelo por 2 minutos. Foram adicionados 800 µL de meio LB líquido e as células foram colocadas sob agitação a 150 rpm por 1 h a 37°C. Após este tempo, 200 µL das células foram plaqueadas em placas contendo meio LB sólido (Apêndice I) com ampicilina (SIGMA-ALDRICH®) (50 µg/mL de meio) e 40 µL de X-GAL (40 mg/mL) (SIGMA-ALDRICH®).

As placas foram incubadas a 37°C por 16-20 horas.

4.5.3 Triagem das colônias recombinantes

A triagem das colônias recombinantes foi feita visualmente. As colônias brancas (recombinantes) que surgiram após a transformação foram transferidas para um tubo contendo 4 mL de meio LB líquido e ampicilina (50

µg/mL de meio). Estes tubos foram mantidos a 37°C, sob agitação de 150 rpm, por 16-20 horas, para o crescimento das colônias.

4.6 Purificação dos plasmídeos recombinantes

Para a extração de DNA plasmidial, foi utilizado o protocolo: “Preparação de DNA plasmidial por lise alcalina com SDS: minipreparação” (Sambrook *et al.*, 1989), com algumas modificações.

Foram transferidos 1,5 mL da suspensão de bactérias para tubos novos e estes foram centrifugados por 2 minutos a 11000xg. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 200 µL de Solução I (Apêndice I) gelada. Os tubos foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente e a seguir foram adicionados 200 µL da Solução II (Apêndice I). Os tubos foram incubados por 5 minutos no gelo e após este tempo foram adicionados 150 µL da Solução III gelada (Apêndice I). Os tubos foram misturados por inversão e incubados por 5 minutos no gelo. O sobrenadante foi transferido para tubos novos onde foram adicionados 5 µL de RNase A (10 mg/mL) (SIGMA-ALDRICH). Os tubos foram incubados por 30 minutos a 37°C. A seguir, foram adicionados 225 µL de fenol e 225 µL de clorofórmio. Os tubos foram misturados por inversão e centrifugados a 5000xg por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e repetiu-se este último passo. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo onde foram adicionados 550 µL de clorofórmio. Os tubos foram centrifugados a 5000xg por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e foram adicionados 550 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram invertidos suavemente e deixados a -20°C por 1 h. Após este tempo, os tubos foram centrifugados a 11000xg por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 500 µL de etanol 70% e os tubos centrifugados a 11000xg por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e após o *pellet* ter sido seco à temperatura ambiente, ele foi ressuspendido em 20 µL de água ultrapura autoclavada.

O DNA plasmidial extraído foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado em solução de brometo de etídeo e visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta.

4.7 Ensaio de restrição

Para confirmar a presença do inserto do tamanho esperado foi realizado um ensaio de restrição. A reação (20 µL) continha 1 µL do DNA plasmidial, tampão da enzima de restrição 1X (Fermentas), 1 U da enzima *EcoRI* (Fermentas) e água ultrapura para completar o volume.

A reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 30 minutos e depois a 80°C por 5 minutos para inativação da enzima.

O ensaio de restrição foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado em solução de brometo de etídeo e visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta.

4.8 Seqüenciamento dos fragmentos amplificados por PCR

Os plasmídeos contendo o inserto desejado foram submetidos ao seqüenciamento no Núcleo de Análise Genômica e Expressão Gênica (NAGE) da Universidade Federal de Minas Gerais. O seqüenciamento foi realizado com os *primers* RIB4 e ITS1-2.

4.9 Busca das seqüências em banco de dados

Como a diversidade de espécies que trabalhamos, para alguns gêneros, não foi tão grande, não seria possível estabelecer comparações que permitissem o desenho de *primers* para estes gêneros. Portanto, foi realizado uma vasta busca de seqüências correspondentes a ITS-2 de carrapatos já depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), preferencialmente para espécies presentes no Brasil. Essas seqüências foram então usadas para a realização do alinhamento múltiplo e análises subseqüentes.

4.10 Análises das seqüências e desenho dos *primers*

Programas específicos e ferramentas de bioinformática foram usados para análise das seqüências de nucleotídeos obtidas, objetivando-se a construção de *primers* mais específicos para gêneros e espécies dos carrapatos analisados.

As seqüências foram separadas por gêneros de carrapatos, editadas e alinhadas utilizando o programa de alinhamento múltiplo ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw). Posteriormente, os *primers* foram desenhados manualmente baseados nos resultados do alinhamento múltiplo e analisados pelo *software* DNAMAN para verificação de autocomplementaridade, Tm e conteúdo de GC. *Primers* para gêneros foram desenhados baseados em regiões que apresentavam alta similaridade, já os *primers* espécie-específicos foram baseados em regiões divergentes. Os *primers* foram ainda comparados com seqüências já depositadas no GenBank, pelo *MegaBlast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para análise de similaridade e conseqüentemente da especificidade do *primer*.

Vários critérios foram levados em consideração, para o desenho dos *primers*, como o tamanho, Tm, autocomplementaridade, conteúdo GC, bases presentes na região 5' e principalmente 3'. Procurou-se sempre *primers* entre 17 a 22 bases e que apresentaram o Tm mais próximo possível para o par. Também foi buscado a mínima autocomplementaridade e um conteúdo GC variando de 55% a 65%.

Os *primers* foram desenhados fazendo-se uma cópia de uma das extremidades da região alvo no sentido 5' para 3', para o *primer* senso e fazendo-se uma seqüência complementar no sentido 3' para 5' (complementar reversa) da outra extremidade da seqüência alvo para o *primer* antisenso.

Outro cuidado tomado foi o de procurar *primers* onde a região 5' sempre iniciasse com GC ou pelo menos CG e que a região 3' terminasse em G ou C, sempre que possível. Foi evitado a presença apenas de C ou G nas últimas quatro bases da região 3', para que não houvesse excesso de interações fortes entre o *primer* e o DNA molde e, portanto, pareamento em regiões não desejadas.

Após a decisão de quais *primers* utilizar, os mesmos foram sintetizados pela *Integrated DNA Technology* (IDT®).

4.11 Padronização e validação da especificidade dos oligonucleotídeos

Logo após o desenvolvimento das ferramentas moleculares de identificação, foram realizados vários testes com as amostras de DNA obtidas no item 4.2 para verificar a funcionalidade e especificidade dos oligonucleotídeos desenhados com o objetivo de localizar regiões específicas do genoma dos carrapatos. Foram feitos alguns testes variando-se o protocolo de execução da PCR, como a temperatura de anelamento, tempo de extensão, número de ciclos, concentração de *primers* e de DNA molde.

4.12 Determinação da sensibilidade do método

Foram feitos testes com algumas diluições do DNA total dos carrapatos para um conjunto dos marcadores espécie-específicos desenvolvidos, para que pudéssemos, dessa forma, determinar o limite de detecção da técnica. A amostra contendo DNA genômico utilizada foi a amostra 19, correspondente ao carrapato *A. cajennense*, com 6 diluições.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleção de carrapatos

Antes da extração de DNA, os carrapatos adultos foram fotografados para, juntamente com os espécimes testemunhos, auxiliarem as futuras confirmações morfológicas, caso necessário. Para tanto, vale ressaltar que, além das fotos aqui apresentadas, existem ainda várias outras com detalhes do ventre, da região genital, da inserção de patas, da ornamentação e dos festões. Estão mostradas a seguir as fotos dorsais de todos os representantes do gênero *Amblyomma* utilizados nesta pesquisa (Figura 3), como também representantes de alguns outros gêneros (Figura 4).

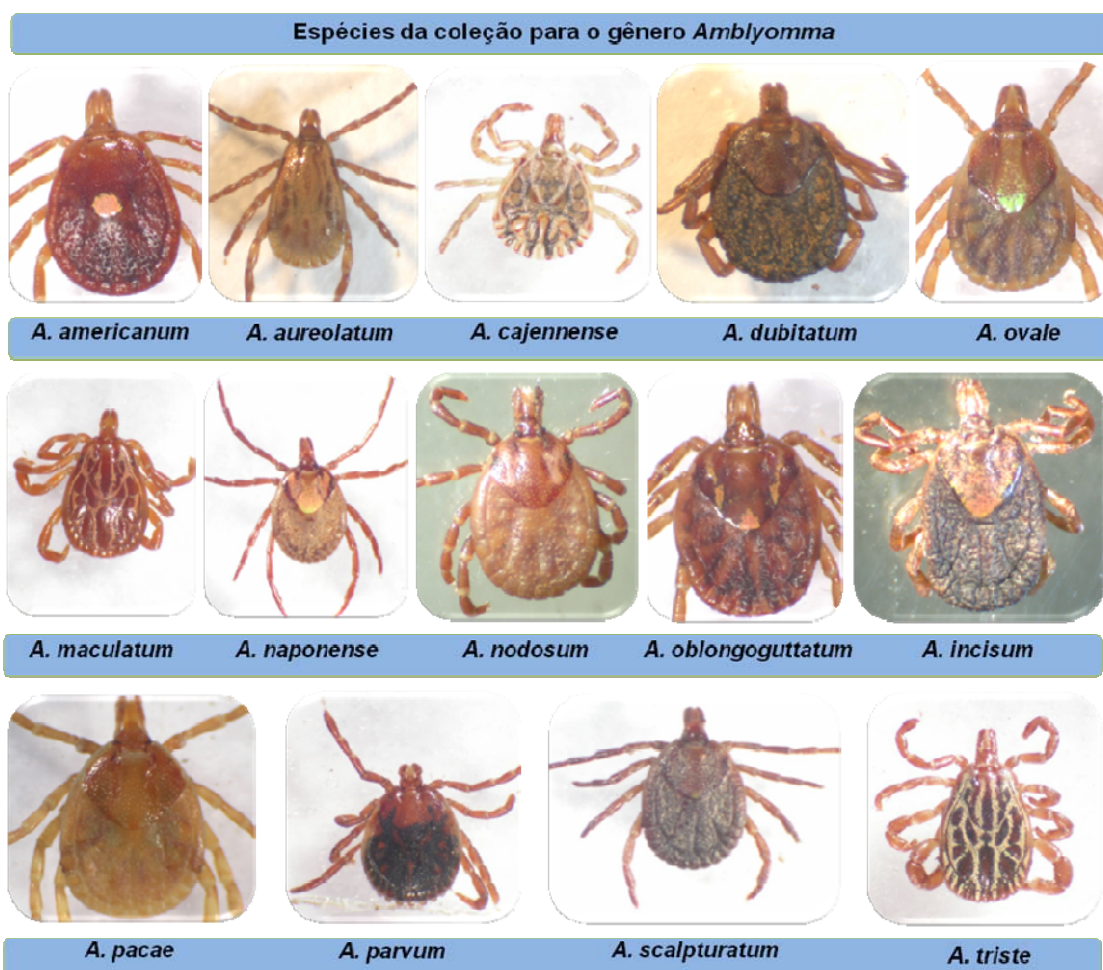


Figura 3 – Carrapatos do gênero *Amblyomma* usados neste trabalho. Câmera digital Nikon Coolpix 4500 acoplada à lupa Olympus SZ40.

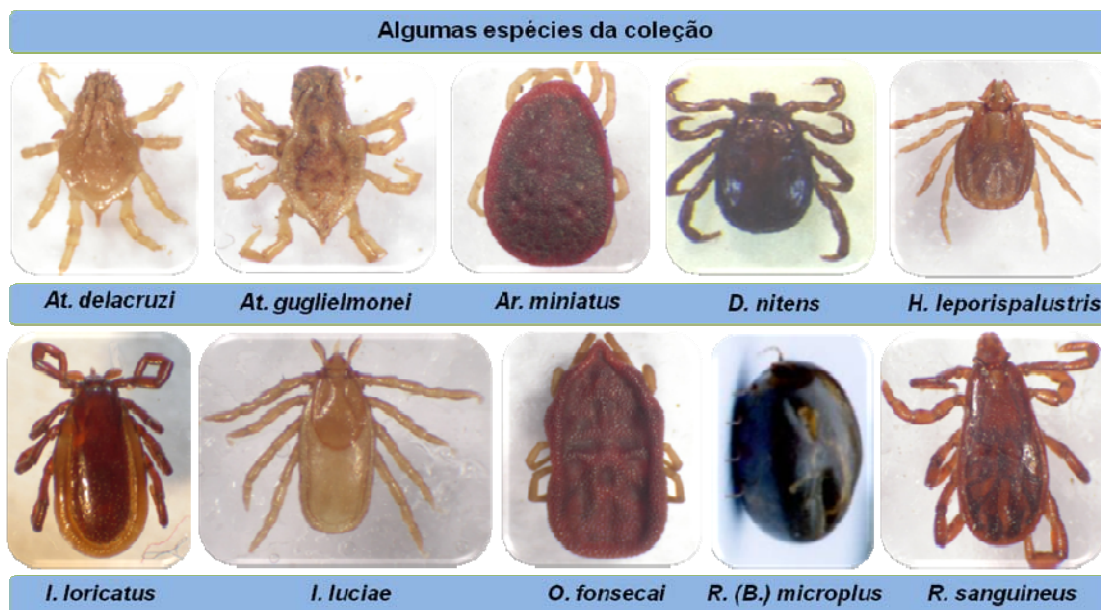


Figura 4 – Carrapatos pertencentes aos gêneros *Antricola* (*At*), *Argas* (*Ar*), *Dermacentor* (*D*), *Haemaphysalis* (*H*), *Ixodes* (*I*), *Ornithodoros* (*O*) e *Rhipicephalus* (*R*). *B*= *Boophilus*. Câmera digital Nikon Coolpix 4500 acoplada à lupa Olympus SZ40.

5.2 Padronização da técnica de extração de DNA

Primeiramente foi utilizado para a extração de DNA o método fenol-clorofórmio (Billings *et al.*,1998), o qual resultou em purificações satisfatórias de DNA, no entanto, revelou ser bem mais trabalhoso que o segundo método utilizado, a extração pelo *QIAamp*[®] *DNA Mini Kit* (QIAGEN[®], EUA).

O primeiro método ofereceu vantagem para as amostras que continham carrapatos ingurgitados com um grande volume de sangue, pois permitiu retirar impurezas já que puderam ser feitas várias extrações com fenol/clorofórmio (1:1), resultando em DNAs de melhor qualidade para a realização das PCRs subsequentes.

No entanto, a extração por meio do kit comercial pôde ser realizada em um tempo mais curto e produziu um DNA de ótima qualidade para as amostras não ingurgitadas. Assim sendo, adotamos este método para a extração de todas as amostras.

Após a aplicação de 1 µL de cada amostra em gel de agarose 0,8%, foram verificadas bandas de DNA para quase todas as amostras, exceto para as de número 6, 11, 15 e 37, correspondentes aos carrapatos *Antricola*

delacruzii, *Amblyomma pacaie*, *Amblyomma ovale* e *Amblyomma incisum*, respectivamente. Para essas amostras este resultado já era esperado, pois foi utilizado apenas um exemplar de tamanho muito pequeno de cada amostra.

Na quantificação realizada para algumas das amostras, obtivemos valores de concentração variando de 332 a 670 µg/mL de DNA.

5.3 Obtenção das regiões ITS-2

5.3.1 Amplificação pela PCR

A amplificação do segundo espaçador interno transcrito foi bem sucedida para a maioria das amostras, resultando em fragmentos que variaram em torno de 800 pb em *Ixodes loricatus* a 2000 pb para *Argas miniatus* (Figura 5), coincidindo com os tamanhos de fragmentos encontrados por Marrelli e colaboradores (2007), que obtiveram um ITS-2 de 1207 pb para *A. parvum* e também coincidindo com os resultados já obtidos para o gênero *Ixodes* (Hlinka *et al.*, 2002). Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho envolvendo amplificação de ITS-2 de *Argas miniatus*, sendo este, possivelmente o primeiro achado referente ao tamanho desta região para esta espécie.

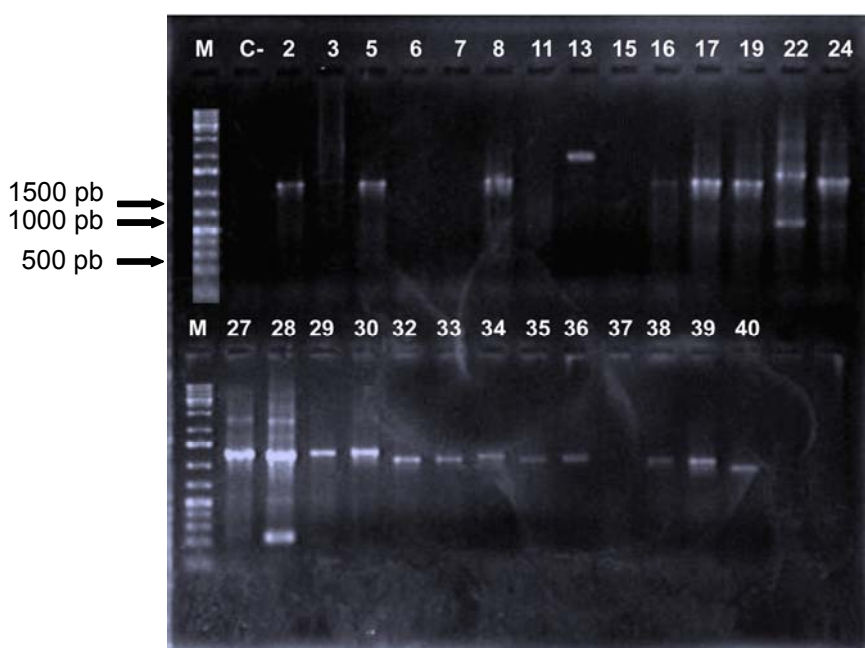


Figura 5 - Gel de agarose 1,2%. Resultado da PCR com os *primers* RIB4 e ITS1-2. M: DNA Ladder 1kb (Fermentas). C-: Controle negativo. 2 a 40: Resultado da amplificação para as amostras. Numeração conforme Tabela 2.

Apenas para as amostras 6, 7, 11, 15 e 37 não houve amplificação. Para as amostras 6, 11, 15 e 37 o insucesso deveu-se a extração insatisfatória de DNA, como já dito anteriormente.

Já para a amostra 7, apesar destas seqüências gênicas apresentarem sítios de ligação para os *primers* usados na amplificação das regiões ITS-2 (Zahler *et al.*, 1997; Fukunaga *et al.*, 2000) ainda é possível que pequenas mudanças em uma ou duas bases tenham impedido a amplificação, como comprovado por Fenton e colaboradores (1997).

5.3.2 Purificação e clonagem dos produtos de PCR

Para as amostras 2, 5, 24, 27, 32, 33 e 34, as quais apresentaram visualmente concentração superior a 70 ng/ μ L, as bandas referentes aos ITS-2 foram purificadas diretamente do gel e sequenciadas. As demais amostras foram clonadas em vetores plasmidiais, purificadas e então enviadas ao sequenciamento. Optamos por não seqüenciar diferentes clones, já que Marrelli e colaboradores (2007), não encontraram variabilidade intraindividual para algumas espécies testadas.

Embora existam muitas cópias dos genes que codificam para rRNA nuclear, eles tipicamente desenvolvem-se em harmonia, e portanto, são gradualmente homogeneizados à medida que uma mudança é introduzida em um deles (Gerbi, 1986, citado por Murrell *et al.*, 2001b). Os mecanismos mais importantes dessa evolução em concerto parecem ser *crossing over* desigual e conversão gênica, mas a contribuição relativa de cada um não foi ainda estudada para a maioria dos organismos (Murrell *et al.*, 2001b).

O seqüenciamento das seqüências ITS-2 ainda está em processo, portanto, não foi possível determinar o conteúdo de GC e estabelecer relações filogenéticas entre algumas das espécies trabalhadas, como previsto inicialmente para indivíduos pertencentes à mesma espécie, mas de diferentes regiões geográficas.

Apesar da ausência de dados do seqüenciamento, o trabalho não foi comprometido, já que foram encontradas diversas seqüências ITS-2 correspondentes a várias espécies de carrapatos, no *GenBank*, e estas sim, foram utilizadas para o alinhamento múltiplo e desenho dos *primers*.

5.4 Seqüências obtidas em banco de dados

Para a realização do alinhamento múltiplo e seleção das regiões para construção dos *primers*, foram utilizadas as seqüências listadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Número de acesso das seqüências utilizadas no alinhamento múltiplo

Número de acesso	Espécie
AF469605	<i>Amblyomma cajennense</i>
AY887115	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>
AY887116	<i>Amblyomma dubitatum</i>
AY887110	<i>Amblyomma coelebs</i>
AF469611	<i>Amblyomma aureolatum</i>
AY887112	<i>Amblyomma rotundatum</i>
AY887111	<i>Amblyomma humerale</i>
AY887117	<i>Amblyomma varium</i>
AY887119	<i>Amblyomma ovale</i>
AY887120	<i>Amblyomma longirostre</i>
AY887121	<i>Amblyomma naponense</i>
AY887113	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
AY887114	<i>Amblyomma triste</i>
AY995180	<i>Amblyomma pseudoconcolor</i>
AY887118	<i>Amblyomma parvum</i>
AM498351	<i>Dermacentor andersoni</i>
AM498350	<i>Dermacentor andersoni</i>
AM498348	<i>Dermacentor albipictus</i>
AM498349	<i>Dermacentor variabilis</i>
AF199114	<i>Dermacentor sp.</i>
AF271280	<i>Dermacentor rhinocerinus</i>
AF271274	<i>Dermacentor nitens</i>
AF271285	<i>Haemaphysalis longicornis</i>
AH010817	<i>Haemaphysalis longicornis</i>
AF199115	<i>Haemaphysalis humerosa</i>
AF271286	<i>Haemaphysalis longicornis</i>
X63868	<i>Ixodes scapularis</i>
L22271	<i>Ixodes dammini</i>
L22276	<i>Ixodes scapularis</i>
L22272	<i>Ixodes dammini</i>
L22280	<i>Ixodes pacificus</i>
L22279	<i>Ixodes pacificus</i>
U97712	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
U97715	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
U97714	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
AF271272	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
U97709	<i>Rhipicephalus zambeziensis</i>
DQ849273	<i>Rhipicephalus zambeziensis</i>
U97704	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
DQ901355	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
DQ849268	<i>Rhipicephalus turanicus</i>
AF271271	<i>Rhipicephalus turanicus</i>
AF271283	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
AF271284	<i>Rhipicephalus simus</i>
AF271276	<i>Rhipicephalus compositus</i>
AF271282	<i>Rhipicephalus pumilio</i>
AF271281	<i>Rhipicephalus maculatus</i>
AF271273	<i>Rhipicephalus (Boophilus) geigy</i>
DQ849266	<i>Rhipicephalus evertsi evertsi</i>
AF271279	<i>Rhipicephalus evertsi mimeticus</i>
AF271278	<i>Rhipicephalus punctatus</i>
AF271275	<i>Rhipicephalus pulchellus</i>

Fonte: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>)

A obtenção das seqüências em banco de dados foi valiosa, pois permitiu analisar uma variedade de seqüências nucleotídicas que não seria possível obter apenas pelo seqüenciamento dos fragmentos amplificados a partir das espécies que possuímos em nosso acervo. Dessa forma, o alinhamento múltiplo e a identificação das possíveis regiões alvos para o anelamento dos *primers* tornou-se possível

5.5 Alinhamento múltiplo e desenho dos *primers*

O alinhamento múltiplo obtido com o programa ClustalW está disposto no Apêndice II. Das várias regiões encontradas, algumas foram escolhidas para o desenho manual dos *primers*, as quais se encontram destacadas no Apêndice II.

A seguir, estão apresentados todos os oligonucleotídeos iniciadores escolhidos para síntese e suas respectivas propriedades (Tabela 4).

Tabela 4 – Oligonucleotídeos iniciadores desenhados

<i>Primer</i>	Seqüência (5' → 3')	GC %	T _m °C
A5	GTC CGC CGT CGG TCT AAG	66,6	58,0
A7	CTG GGC CAC TCC AGT TGG	66,6	58,6
A8	GAG CGA GAC TGG AAG GC	64,7	55,6
A9	GTC GGA TCA AGA GAG ACG	55,5	52,0
A10	CGC CAC GCT TTG TGC C	68,7	58,4
A11	CTG CCA ACG CTG CGT GAA AC	60,0	60,1
A12	TGTGCGCAGCACAGTTTGG	57,8	59,4
A13	TCT ATC GGC TAG CAG CAG C	57,8	56,9
A14	GCT GCC TGA TCT GAT TTG TG	50,0	54,1
A15	CGG CTA TGC TTA GTC GC	58,8	53,2
A16	GTG GCT TGC TTA GCC GCG	66,7	60,0
D1	GGA CAG TAC GTT GAG CG	58,8	53,0
D2	GCA AAC GTG CGC GCT AC	64,7	58,3
I3	CGG AGA TTT GAA ACG GTT TC	45,0	51,9
I4	CTT AGA CTG ACG GAA GGC	55,5	52,3
R1	AAG TGC TTC GCA GTT CCC	55,5	55,7
R2	CGT GCG TCG TCC GAG CAG	72,2	61,6

Para o gênero *Haemaphysalis* não foi possível desenhar *primers* que identificassem este gênero, pois o alinhamento múltiplo foi feito usando-se as seqüências ITS-2 disponíveis em banco de dados, as quais não eram completas e possuíam diferentes tamanhos, impossibilitado dessa forma um alinhamento que permitisse a localização de regiões conservadas para o gênero.

Para os demais gêneros, segue os pares de *primers* desenhados com suas respectivas propriedades.

5.5.1 Gênero *Amblyomma*

Para a identificação do gênero *Amblyomma* foram escolhidos os *primers* A7 e A8, mostrados na Tabela 5. Na busca de similaridade realizada, o *primer* A7 não apresentou especificidade exclusiva para o gênero em questão, no entanto, foi escolhido, já que o *primer* A8 revelou-se altamente específico.

Tabela 5 – Oligonucleotídeos iniciadores para o gênero *Amblyomma*

<i>Primer</i>	Seqüência (5' → 3')	Tamanho (b)	Posição*	GC %	Tm °C
A7	CTG GGC CAC TCC AGT TGG	18	746 a 763	66,6	58,6
A8	GAG CGA GAC TGG AAG GC	17	955 a 971	64,7	55,6

*Posição relativa, referente à seqüência do *Amblyomma parvum*.

5.5.1.1 *Amblyomma dubitatum*

Foram usados os *primers* A9 e A8 (Tabela 6). Apenas o A9 é específico para esta espécie, pois o *primer* A8 foi desenhado para todos os representantes do gênero *Amblyomma*. Este procedimento de usar um *primer* conservado para o gênero (A8 ou A7) e outro específico para espécie, foi feito para todas as espécies, já que esta foi uma investigação inicial da possibilidade de identificação taxonômica através de métodos moleculares. Assim sendo, evitou-se desenhar e sintetizar vários *primers* ao mesmo tempo, buscando primeiro realizar testes preliminares.

Tabela 6 – Oligonucleotídeos iniciadores para *Amblyomma dubitatum*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Tamanho (b)	Posição*	GC %	Tm °C
A8	GAG CGA GAC TGG AAG GC	17	874 a 890	64,7	55,6
A9	GTC GGA TCA AGA GAG ACG	18	33 a 50	55,6	56,0

*Posição referente à seqüência do *Amblyomma dubitatum*.

5.5.1.2 *Amblyomma triste*

Para esta espécie foram usados os *primers* A10 e A8, sendo o A10 altamente específico (Tabela 7).

Tabela 7 – Oligonucleotídeos iniciadores para *Amblyomma triste*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Tamanho (b)	Posição*	GC %	Tm °C
A8	GAG CGA GAC TGG AAG GC	17	843 a 859	64,7	55,6
A10	CGC CAC GCT TTG TGC C	16	227 a 244	68,8	54,0

*Posição referente à seqüência do *Amblyomma triste*.

5.5.1.3 *Amblyomma oblongoguttatum*

Foram usados os *primers* A11 e A8 para esta espécie (Tabela 8). O *primer* A11 foi altamente específico em análise de similaridade realizada.

Tabela 8– Oligonucleotídeos iniciadores para *Amblyomma oblongoguttatum*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Tamanho (b)	Posição*	GC %	Tm °C
A8	GAG CGA GAC TGG AAG GC	17	773 a 789	64,7	55,6
A11	CTG CCA ACG CTG CGT GAA AC	20	400 a 419	60,0	64,0

*Posição referente à seqüência do *Amblyomma oblongoguttatum*.

5.5.1.4 *Amblyomma cajennense*

Para esta espécie foram usados os *primers* A12 e A8, sendo o A12 específico para a espécie (Tabela 9).

Tabela 9– Oligonucleotídeos iniciadores para *Amblyomma cajennense*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Tamanho (b)	Posição*	GC %	Tm °C
A8	GAG CGA GAC TGG AAG GC	17	942 a 958	64,7	55,6
A12	TGT GCG CAG CAC AGT TTG G	19	554 a 573	57,9	60,0

*Posição referente à seqüência do *Amblyomma cajennense*.

5.5.1.5 *Amblyomma parvum*

Foram usados os *primers* A13 e A7 (Tabela 10). O *primer* A13 apresentou alta especificidade em análise de similaridade.

Tabela 10– Oligonucleotídeos iniciadores para *Amblyomma parvum*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Tamanho (b)	Posição*	GC %	Tm °C
A7	CTG GGC CAC TCC AGT TGG	18	746 a 763	66,6	58,6
A13	TCT ATC GGC TAG CAG CAG C	19	1049 a 1067	57,8	56,9

*Posição referente à seqüência do *Amblyomma parvum*.

5.5.1.6 *Amblyomma scalpturatum*

Para esta espécie foram usados os *primers* A7 e A14, sendo este altamente específico (Tabela 11).

Tabela 11– Oligonucleotídeos iniciadores para *Amblyomma scalpturatum*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Tamanho (b)	Posição*	GC %	Tm °C
A7	CTG GGC CAC TCC AGT TGG	18	689 a 706	66,6	58,6
A14	GCT GCC TGA TCT GAT TTG TG	20	1022 a 1041	50,0	60,0

*Posição referente à seqüência do *Amblyomma scalpturatum*.

5.5.1.7 *Amblyomma aureolatum*

Foram utilizados os *primers* A8 e A15 para *A. aureolatum* (Tabela 12). Como todos os demais *primers* espécie-específicos, o *primer* A15 também apresentou grande especificidade na análise de similaridade.

Tabela 12– Oligonucleotídeos iniciadores para *Amblyomma aureolatum*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Tamanho (b)	Posição*	GC %	Tm °C
A8	GAG CGA GAC TGG AAG GC	17	607 a 624	64,7	55,6
A15	CGG CTA TGC TTA GTC GC	17	320 a 336	58,8	54,0

*Posição referente à seqüência do *Amblyomma aureolatum*.

5.5.2 Gênero *Dermacentor*

Para a identificação do gênero *Dermacentor* os *primers* escolhidos foram D1 e D2, mostrados na Tabela 13. Na busca de similaridade realizada ambos mostraram-se altamente específicos para o gênero em questão.

Tabela 13– Oligonucleotídeos iniciadores para o gênero *Dermacentor*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Tamanho (b)	Posição*	GC %	Tm °C
D1	GGA CAG TAC GTT GAG CG	17	75 a 91	58,8	53,0
D2	GCA AAC GTG CGC GCT AC	17	311 a 327	64,7	58,3

*Posição relativa, referente à seqüência do *Dermacentor rhinocerus*.

5.5.3 Gênero *Ixodes*

Para a identificação do gênero *Ixodes* os *primers* usados foram o I3 e I4, os quais apresentaram alta especificidade para este gênero na busca de similaridade realizada (Tabela 14).

Tabela 14– Oligonucleotídeos iniciadores para o gênero *Ixodes*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Tamanho (b)	Posição*	GC %	Tm °C
I3	CGG AGA TTT GAA ACG GTT TC	20	795 a 814	45,0	51,9
I4	CTT AGA CTG ACG GAA GGC	18	1013 a 1030	55,5	52,3

*Posição relativa, referente à seqüência do *Ixodes pacificus*.

5.5.4 Gênero *Rhipicephalus*

Os *primers* escolhidos para a identificação do gênero *Rhipicephalus* foram R1 e R2, mostrados na Tabela 15. Na busca de similaridade realizada ambos mostraram-se altamente específicos para o gênero em questão.

Tabela 15– Oligonucleotídeos iniciadores para o gênero *Rhipicephalus*

<i>Primer</i>	Seqüência (5' → 3')	Tamanho (b)	Posição*	GC %	Tm °C
R1	AAG TGC TTC GCA GTT CCC	18	633 a 650	55,5	55,7
R2	CGT GCG TCG TCC GAG CAG	18	798 a 815	72,2	61,6

*Posição relativa, referente à seqüência do *Rhipicephalus (Boophilus) geigy*

5.6 Teste e padronização dos *primers*

As amostras que foram validadas para a presença de DNA genômico de carrapato pela amplificação dos ITS-2 (Figura 5), foram então utilizadas para os vários testes realizados com os *primers* desenhados.

Inicialmente, todos os *primers* foram testados nas mesmas condições para amplificação dos ITS-2 descritas no item 4.3, variando apenas a temperatura de anelamento de acordo com a temperatura de fusão (Tm) de cada *primer*.

Posteriormente, foram feitas algumas mudanças no protocolo de execução da PCR para alguns dos *primers* que geraram *amplicons* inespecíficos, ou seja, que hibridizaram em regiões não esperadas e amplificaram fragmentos não desejados. Essas bandas inespecíficas, visualizadas no gel podem ter ocorrido por vários motivos, os quais se procurou investigar.

A primeira investigação foi verificar se a temperatura de hibridização dos *primers* era adequada. Posteriormente, optou-se por uma diminuição no número de ciclos de amplificação de 35 para 30 e também uma diminuição no tempo de extensão da Taq Polimerase de 90 para 60 segundos, já que os fragmentos desejados eram sempre relativamente pequenos.

A seguir, estão mostrados, individualmente, os resultados obtidos para cada gênero e espécie.

5.6.1 Gênero *Amblyomma*

Os *primers* A7 e A8 mostraram-se funcionais para identificação de espécimes do gênero *Amblyomma*, produzindo um fragmento de aproximadamente 225 pb, como esperado. No entanto, como mostrado na Figura 6A, houve amplificação também para outros gêneros, como *Argas*, *Haemaphysalis* e *Ixodes*. Mesmo após tentativas de aumentar a especificidade dos *primers*, não foram conseguidos resultados satisfatórios para a identificação específica deste gênero (Figura 6B), restando ainda realizar mais testes, contrastando com outras espécies e gêneros para avaliar a especificidade destes oligonucleotídeos.

Uma possível fonte dessas reações cruzadas para outros gêneros é o fato de que o *primer* A7 não demonstrou especificidade absoluta na análise de similaridade, no entanto, entre as opções disponíveis, ele foi escolhido por se encaixar melhor dentro dos parâmetros levados em consideração no momento do desenho dos *primers*.

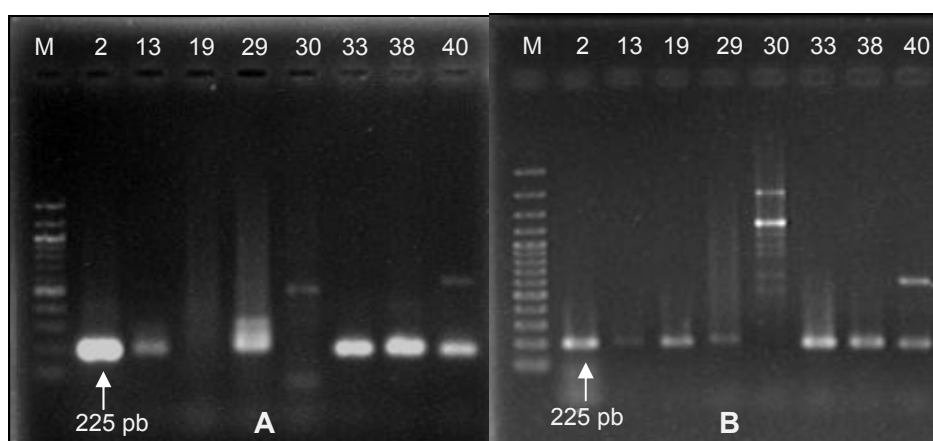


Figura 6 - Gel de agarose 1,5%. Resultado da PCR com os *primers* A7 e A8. M: DNA Ladder 100 pb (Fermentas). 2 a 40: Resultado da amplificação para as amostras. Numeração conforme Tabela 2. **A)** Temperatura de anelamento 52 °C e 35 ciclos de amplificação. **B)** Temperatura de anelamento 58 °C e 30 ciclos de amplificação.

5.6.1.1 *Amblyomma dubitatum*

Os *primers* A9 e A8 não foram eficientes para identificar esta espécie. Usando estes *primers*, não houve amplificação de nenhum fragmento para

esta espécie e houve para outra espécie. A PCR foi realizada com temperatura de anelamento de 48 °C, 35 ciclos de amplificação e 1 minuto de extensão.

Como não apresentou resultado satisfatório em testes preliminares, não foi feita nenhuma tentativa de melhoria de protocolo para esta espécie.

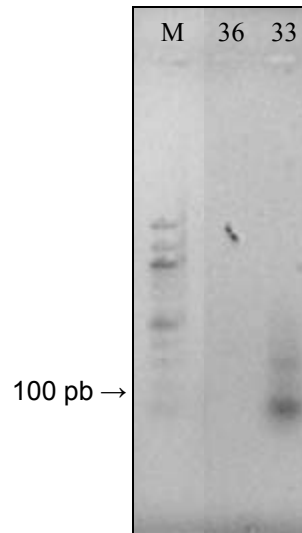


Figura 7 - Gel de agarose 1,5%. Resultado da PCR com os *primers* A8 e A9. M: DNA Ladder 100 pb (Fermentas). 36 e 33: Resultado da amplificação para as espécies *A. dubitatum* e *A. cajennense*, respectivamente.

5.6.1.2 *Amblyomma triste*

Os *primers* A10 e A8 amplificaram um fragmento para *A. triste*, no entanto, de tamanho distinto do esperado, que era em torno de 625 pb. Houve também a amplificação de seqüências não desejadas, necessitando também de maiores investigações (Figura 8).

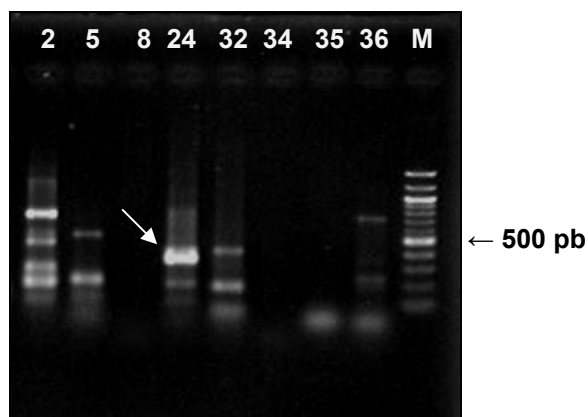


Figura 8 - Gel de agarose 1,5%. Resultado da PCR com os *primers* A10 e A8. M: DNA Ladder 100 pb (Fermentas). 2 a 36: Resultado da amplificação para as amostras. Numeração conforme Tabela 2. A seta indica a banda correspondente ao *A. triste*.

5.6.1.3 *Amblyomma oblongoguttatum*

Para esta espécie os resultados obtidos foram semelhantes aos resultados para a espécie anterior. Os *primers* A11 e A8 amplificaram um segmento único e de tamanho aproximado ao esperado (389 pb) para *A. oblongoguttatum*. No entanto, surgiram algumas bandas para as demais espécies testadas em conjunto, indicando que estes *primers* são promissores, mas necessitam de um protocolo aperfeiçoado para que sejam específicos para a espécie em questão. O resultado da PCR está mostrado na Figura 9.

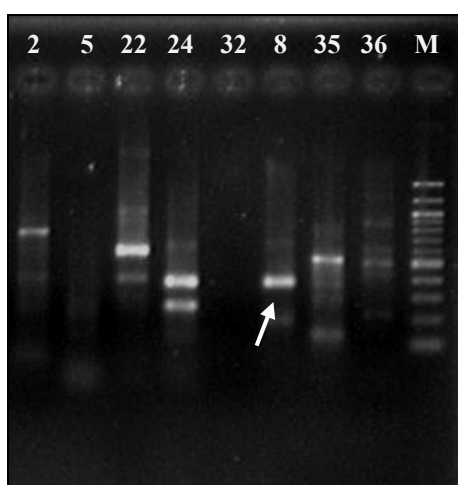


Figura 9 - Gel de agarose 1,5%. Resultado da PCR com os *primers* A11 e A8. M: DNA Ladder 100 pb (Fermentas). 2 a 36: Resultado da amplificação para as amostras. Numeração conforme Tabela 2. A seta indica a banda correspondente ao *A. oblongoguttatum*.

5.6.1.4 *Amblyomma cajennense*

Esta foi a espécie de maior foco, após os testes preliminares. Os *primers* A12 e A8 mostraram-se adequados para a identificação desta espécie. No início, como mostra a Figura 10A, ocorreram amplificações para segmentos de DNA em outras espécies, no entanto, após tentativas de aumentar a especificidade da reação, foi possível verificar que este conjunto de *primers* é válido para a identificação do *A. cajennense* na forma adulta, amostras 19 e 33, e na forma larval, amostra 17 (Figura 10B).

Este foi, sem dúvida, um grande resultado, devido à importância desta espécie na epidemiologia de algumas enfermidades veiculadas por

carrapatos aqui no Brasil e a dificuldade de identificação da mesma nas formas de larvas e ninfas.

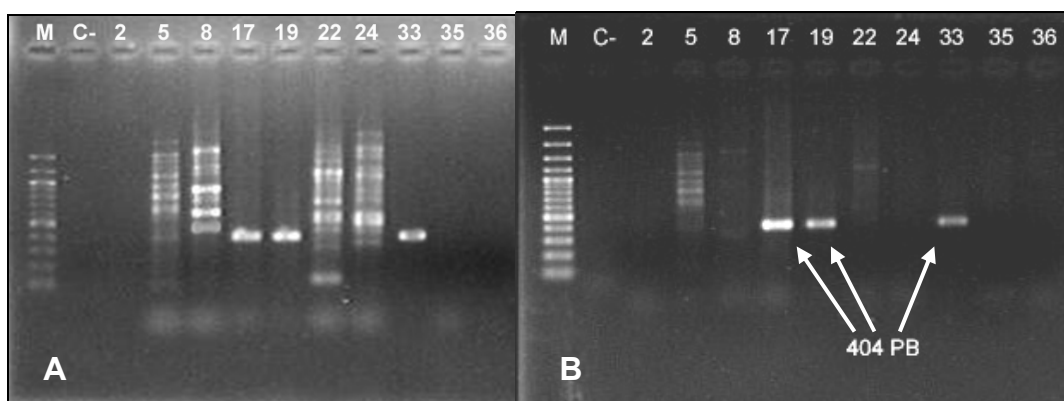


Figura 10 - Gel de agarose 1,5%. Resultado da PCR com os *primers* A12 e A8. M: DNA Ladder 100 pb. C-: Controle negativo. 2 a 36: Resultado da amplificação para as amostras. Numeração conforme Tabela 2. **A)** Temperatura de anelamento 51 °C, 35 ciclos de amplificação e 1,5 min. de extensão. **B)** Temperatura de anelamento 59 °C, 29 ciclos de amplificação e 1 min. de extensão.

O protocolo com o qual se obteve o melhor resultado (Figura 10B) foi similar ao descrito no item 4.3, no entanto, alterando as seguintes condições: temperatura de anelamento (59 °C), número de ciclos amplificadores (29 ciclos) e tempo de extensão da *Taq* DNA polimerase (1 minuto).

Para a amostra 5 (*A. scalpturatum*), houve amplificação mesmo após as mudanças nas condições reacionais, no entanto, as bandas produzidas foram inespecíficas e possuíam um padrão bem diferente das que ocorreram para o *A. cajennense*.

5.6.1.5 *Amblyomma parvum*

Para os *primers* A13 e A7, as condições reacionais foram similares ao descrito no item 4.3, no entanto, alterando a temperatura de anelamento para 51 °C. Na Figura 11, nota-se que a amostra 22, a qual continha DNA de *A. parvum*, produziu uma banda bem definida de aproximadamente 320 pb, exatamente como o esperado.

Assim como já vem sendo demonstrado para outros pares de *primers*, é necessária uma otimização que permita maior especificidade dos *primers* A13 e A7 para a identificação do *A. parvum*. Entretanto, este já é um resultado satisfatório e que já permite diferenciar esta espécie das demais pelo padrão de fragmentos produzidos.

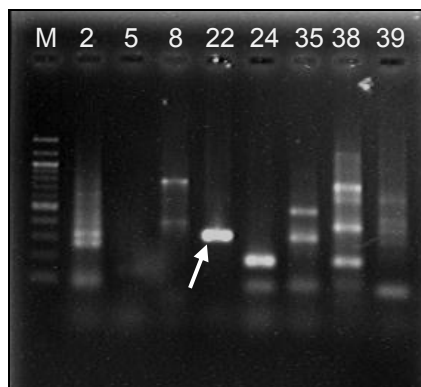


Figura 11 – Gel de agarose 1,5%. Resultado da PCR com os *primers* A13 e A7. M: DNA Ladder 100 pb. 2 a 39: Resultado da amplificação. Numeração conforme Tabela 2. A seta indica a banda específica de aproximadamente 320 pb, oriunda da amostra de *A. parvum*.

5.6.1.6 *Amblyomma scalpturatum*

As reações para os *primers* A7 e A14 falharam para a amostra desejada (amostra 5) e produziram fragmentos para outras duas espécies de *Amblyomma*, demonstrando que esse conjunto de *primers* não foi eficiente para identificação do *A. scalpturatum* (Figura 12).

Entretanto, descartando a hipótese de contaminação das amostras com DNA de outras espécies, testes posteriores podem ser feitos, adaptando esses oligonucleotídeos para confirmar a identificação de *A. parvum*, já que, para esta espécie, houve amplificação.

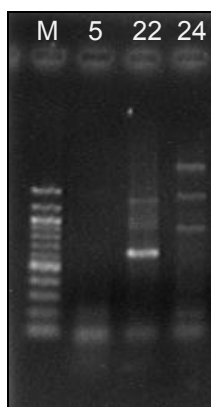


Figura 12 - Gel de agarose 1,5%. Resultado da PCR com os *primers* A7 e A14. M: DNA Ladder 100 pb. 5 = *A. scalpturatum*, 22 = *A. parvum* e 24 = *A. triste*. Temperatura de anelamento 48 °C, 35 ciclos de amplificação e 1,5 min. de extensão.

5.6.1.7 *Amblyomma aureolatum*

Os *primers* A8 e A15 foram testados nas mesmas condições do item anterior, e assim como estes, também não apresentaram resultado satisfatório para a amplificação do fragmento de 304 pb esperado para esta espécie. Novos testes necessitam serem feitos para confirmar a ineficiência destes primers desenhados para *A. aureolatum*.

5.6.2 Gênero *Dermacentor*

Ao testar os *primers* D1 e D2 para o gênero *Dermacentor*, foi utilizado primeiramente um protocolo com menor temperatura de anelamento (51 °C) e maior número de ciclos de amplificação. Este teste resultou na amplificação do fragmento desejado para este gênero, ou seja, um fragmento de 252 pb (Figura 13A).

Assim como para os demais *primers* que funcionaram, foi necessário ajustar as condições reacionais para eliminar bandas não desejadas que foram amplificadas para os outros gêneros testados em conjunto. Portanto, alterou-se a temperatura de anelamento para 58 °C e o número de ciclos amplificadores para 30.

O resultado pode ser visto na Figura 13B, em que não houve amplificação de amplicom de aproximadamente 250 pb para os demais gêneros, comprovando que os oligonucleotídeos D1 e D2 tornaram-se mais específicos nessas condições e que, portanto, são promissores para identificar este gênero, necessitando ainda ajuste de protocolo.

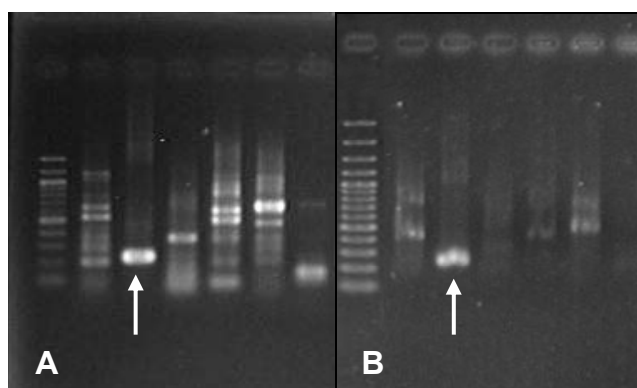


Figura 13 - Gel de agarose 1,5%. PCR com os *primers* A12 e A8. M: DNA Ladder 100 pb. 27 a 40: Resultado da amplificação para as amostras. Numeração conforme Tabela 2. **A)** Temperatura de anelamento 51 °C, 35 ciclos de amplificação. **B)** Temperatura de anelamento 58 °C, 29 ciclos de amplificação. A seta indica fragmento de aproximadamente 250 pb para *Dermacentor nitens*.

5.6.3 Gênero *Ixodes*

Para este gênero, não obtivemos resultados satisfatórios com os *primers* I3 e I4. A amplificação não resultou em bandas específicas. A reação foi realizada com a temperatura de anelamento em 48 °C, no entanto, como este é o par de *primer* que apresenta menores valores de T_m, é interessante que novos testes sejam realizados com uma temperatura de anelamento um pouco mais baixa, em torno de 45 °C.

5.6.4 Gênero *Rhipicephalus*

Para o gênero *Rhipicephalus*, obtivemos amplificação de seqüências específicas satisfatórias para espécimes pertencentes ao gênero utilizando os *primers* R1 e R2, no entanto, houve também amplificação de segmentos inespecíficos para espécimes dos gêneros *Haemaphysalis*, *Amblyomma* e *Ixodes*, demonstrando a necessidade de aperfeiçoamento da técnica (Figura 14A).

Para tanto, foram feitas reações em diferentes condições, procurando elevar a temperatura de anelamento e diminuir o número de ciclos, mesmo assim, as bandas indesejadas para os demais gêneros não desapareceram (Figura 14B).

Barker (1998) relatou uma considerável variação intraespecífica para as seqüências ITS-2 em populações de *Rhipicephalus* e *Boophilus* spp., no entanto, essa variação não prejudicou o funcionamento dos *primers* testados para estes gêneros, que hoje, são considerados como um só gênero: *Rhipicephalus*.

Mesmo havendo amplificação para outros gêneros, as amostras pertencentes ao gênero *Rhipicephalus* são facilmente distinguíveis das demais, apresentando um fragmento único de aproximadamente 180 pb, como esperado (amostras 27 e 30). Dessa forma, os resultados obtidos para este gênero também foram bastante satisfatórios, restando aprimorar a técnica e confrontar estes *primers* com outras amostras.

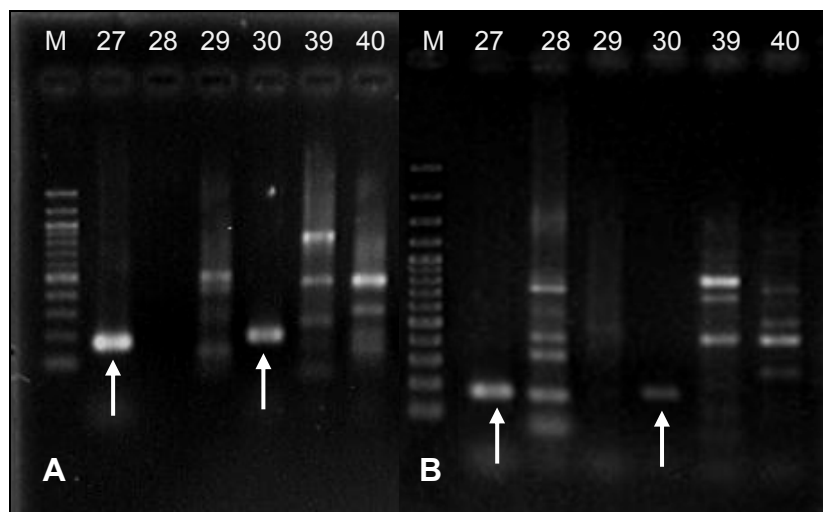


Figura 14 - Gel de agarose 1,5%. PCR com os *primers* R1 e R2. M: DNA Ladder 100 pb. 27 a 40: Resultado da amplificação para as amostras. Numeração conforme Tabela 2. **A)** Temperatura de anelamento 51 °C, 35 ciclos de amplificação. **B)** Temperatura de anelamento 58 °C, 30 ciclos de amplificação. As setas indicam fragmentos de aproximadamente 180 pb, característicos para *Rhipicephalus*.

5.7 Sensibilidade do método

Por fim, foi realizado um teste com algumas diluições do DNA total da amostra 19, a qual continha DNA genômico de *A. cajennense*, para testar a amplificação frente aos marcadores espécie-específicos desenvolvidos para esta espécie.

A PCR foi feita nas condições já definidas anteriormente para esta espécie. Foi usada uma temperatura de anelamento de 59 °C, no entanto foram feitos 35 ciclos de amplificação. Foram testadas 6 diluições: 1/10, 1/25, 1/50, 1/75, 1/100 e 1/200, aplicadas no gel como D1, D2, D3, D4, D5 e D6 respectivamente.

A amplificação das diluições seriadas do DNA resultou em um limite de detecção de 1/100 para a amostra 19 (Figura 15). Como a concentração inicial foi de 536 µg/mL de DNA, o limite detectável para estes *primers*, seguindo o protocolo descrito anteriormente, foi de 5,36 µg/mL. Já que foram utilizados 2,5 µL de DNA molde para cada reação, o limite detectável foi de 13,4 pg de DNA. Este resultado assemelha-se ao obtido por Shone e colaboradores (2006), que encontraram um limite de 1 pg para ninfas e adultos de *A. americanum*.

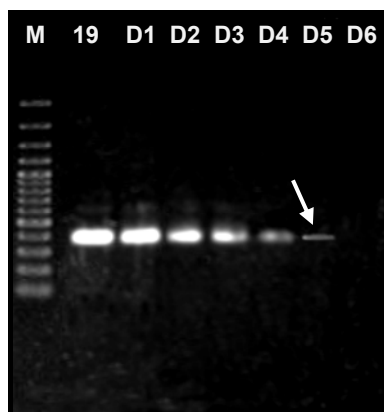


Figura 15 - Gel de agarose 1,5%. Produtos da PCR com os *primers* A12, A8 e amostra 19 e suas sucessivas diluições. M: DNA Ladder 100 pb. A seta evidencia o limite de diluição que possibilitou amplificação dos fragmentos de 404 pb.

5.8 Considerações finais

De acordo com Cruickshank (2002), uma característica desejável de um marcador molecular é que ele se desenvolva a uma velocidade tal, que possam surgir novos caracteres evolutivos durante a vida das espécies. Porém, que apresente curta ou nula variação intraespecífica comparada com a variação interespecífica.

Os resultados aqui alcançados, assim como as suposições feitas por Marrelli e colaboradores (2007), reforçam essa propriedade do ITS-2, a qual vem permitindo a sua aplicação na investigação molecular de carrapatos.

Este estudo é a primeira etapa da busca de um conjunto de métodos que identifica carrapatos, necessitando ainda ser aperfeiçoado. No entanto, os resultados demonstram que a região genômica estudada é realmente útil para identificação taxonômica de espécies, como já previsto por Zahler e colaboradores (1995) desde que desenvolveram *primers* para a amplificação de regiões ITS2 em carrapatos.

O genoma dos carrapatos é estimado ser um grande genoma haplóide, com aproximadamente 1280 Mpb para os Argasídeos e 2670 Mpb para os Ixodídeos (Geraci *et al.*, 2007). Assim sendo, é imenso o número de regiões ainda não seqüenciadas onde os *primers* podem se anelar e produzir fragmentos não desejados, não havendo como prever. Portanto, a inespecificidade inicial de alguns dos *primers* desenhados, é perfeitamente compreendida e já era, de certa forma, esperada.

Para os *primers* que não foram eficientes para a amplificação de fragmentos do DNA alvo, devem ser feitos novos testes e até mesmo o desenho de novos *primers*. São vários os motivos para erro, por exemplo, erros de execução, condições da PCR, concentração dos *primers*, concentração de Mg^{2+} , da enzima, do DNA molde, número insuficiente de ciclos, tempo de extensão, o próprio desenho do *primer*, entre outros.

Já para os *primers* que funcionaram parcialmente, apresentando reações cruzadas com outros gêneros ou espécies, é necessário ainda o ajuste de vários parâmetros que aumentam a fidelidade *primer*-DNA molde.

Como todos os testes foram realizados com o *Taq PCR Master Mix Kit* (QIAGEN®, USA), não foi possível variar a concentração dos íons Mg^{2+} e nem a concentração de dNTPs da solução reacional, no entanto, esta é uma estratégia que deve ser usada na tentativa de melhorias do protocolo para cada conjunto de *primers*.

Além da alteração de vários parâmetros da PCR, poderão ainda ser adotadas as variações da PCR que aperfeiçoam os resultados obtidos. Como alguns exemplos, temos a *Hot Start PCR* e a *Touch-Down PCR*. Uma alternativa futura é tentar adaptar alguns desses *primers* para a realização da PCR em tempo real, como realizado por Shone e colaboradores (2006) para quatro espécies de carrapatos americanos, ou também acoplar a PCR à RFLP e produzir perfis de bandas que sejam característicos para cada espécie como realizado por Poucher e colaboradores (1999).

Outra atividade futura é a investigação dos *primers* escolhidos como funcionais, frente aos DNAs dos patógenos veiculados por carrapatos, para que possamos garantir que não ocorre amplificação para os referidos DNAs, e, portanto, garantir que a identificação não está sendo mascarada pela presença de alguns desses patógenos.

Os resultados para *A. cajennense* sugerem que carrapatos oriundos de diferentes populações, até mesmo de diferentes países (amostra 33), e diferentes estágios de desenvolvimento (amostras 17 e 19) não apresentam variação que impeçam a identificação para o gene em estudo. Comprovando que um método molecular, como proposto neste trabalho, irá facilitar investigações epidemiológicas, podendo ajudar a mapear carrapatos e

doenças veiculadas em uma determinada área, e conseqüentemente intervenções em saúde pública.

Assim, este estudo representa um modelo em desenvolvimento de métodos que utilizam marcadores genéticos na identificação de carrapatos, como uma alternativa às chaves baseadas em caracteres morfológicos.

Após o estabelecimento de alguns *primers* e suas condições reacionais, será possível identificar espécimes danificados ou problemáticos realizando uma simples extração de DNA, PCR e eletroforese em agarose. Processo este, que pode ser feito em um dia e não necessita de um profissional especializado em morfologia de carrapatos.

6 CONCLUSÕES

Em relação à construção de um acervo de carrapatos e obtenção de fotografias dos mesmos, os objetivos foram atingidos satisfatoriamente, já que foram conseguidas vinte e quatro espécies, pertencentes a oito gêneros diferentes.

No que tange a comparação dos métodos para extração de DNA, o método do fenol-clorofórmio revelou-se mais eficiente que a extração pelo *QIAamp[®] DNA Mini Kit* (QIAGEN[®], USA) apenas para amostras ingurgitadas, rendendo DNA de melhor qualidade.

Com relação ao desenho de *primers* específicos, três dos quatro conjuntos de *primers* desenhados, demonstraram ser eficientes para identificação dos gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus*. Os *primers* para o gênero *Ixodes* não funcionaram como esperado, enquanto que para o gênero *Haemaphysalis* não foi possível desenhar *primers*.

Já nos ensaios para *primers* espécie-específicos, foi obtido êxito para três espécies das sete testadas para o gênero *Amblyomma*, resultando em *amplicons* de 404 pb, 389 pb e 320 pb característicos para as espécies *A. cajennense*, *A. oblongoguttatum* e *A. parvum*, respectivamente.

Para as várias tentativas de otimização de protocolo da PCR, obteve-se êxito em algumas, como descrito anteriormente para três espécies do gênero *Amblyomma*.

Na determinação da sensibilidade da técnica para *A. cajennense*, o limite de detecção foi de 13,4 pg de DNA.

Não foi possível estabelecer comparações que permitissem verificar variações de seqüências em populações de carrapatos de diferentes regiões geográficas, já que o resultado do seqüenciamento das regiões ITS-2 ainda não foram concluídos.

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que este trabalho contribui significativamente para a identificação molecular de carrapatos, pois de forma inédita, investigou e encontrou seqüências gênicas que, amplificadas, permitem identificar e/ou diferenciar carrapatos de grande importância na fauna brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcon-Chaidez, F.J.; Sun, J.; Stephen, K. 2007. Wikel Transcriptome analysis of the salivary glands of *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37:48–71.
- Alberts, Bruce. 2004. *Biologia molecular da célula/ Bruce Alberts, Alexander Johnson, Juliana Lewis, Martin Raff, Keith Roberts e Peter Walter. 4ª Ed.* Porto Alegre, Artmed.
- Amorim, M., Serra-Freire, N.M., 1999. Chave dicotômica para identificação de larvas de algumas espécies do gênero *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari:Ixodidae). *Entomologia y Vectores* 6:75-90.
- Anderson, D.L. & Trueman, J.W.H. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24,165-189.
- Anderson, J. M., Ammerman, N. C. e Norris, D. E. 2004. Molecular differentiation of metastriata tick immatures. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 4:334-342.
- Angerami, R.N. 2004. Febre Maculosa no Estado de São Paulo, aspectos clínicos e laboratoriais. In: Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses,. Ouro Preto (MG).
- Aragão, H.B; Fonseca, F. 1961. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 59:115-129.
- Baldrige, G.D.; Burkhardt, N.Y.; Simser, J.A.; Kurtti, T.J.; Munderloh, U.G. 2004. Sequence and expression analysis of the ompA gene of *Rickettsia peacockii*, an endosymbiont of the Rocky Mountain Wood tick, *Dermacentor andersoni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:6628–6636.
- Barker, S. C. 1998. Distinguishing species and populations of *Rhipicephalini* ticks with ITS 2 ribosomal RNA. *Journal of Parasitology*, 84:887-892.

- Barker, S.C. e Murrell, A. 2002. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. *Experimental and Applied Acarology*, 28:55–68.
- Barros-Battesti, D.C. 2006. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um Guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan. 223 pp.
- Beati, L. e Keirans, J.E. 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*. 87:32–48.
- Billings A.N.; Yu X.J.; Teel P.D.; Walker D.H.; 1998. Detection of a spotted fever group Rickettsia in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. *Journal of Medical Entomology*, 35:474-478.
- Black, W.C. e Piesman, J. 1994. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 91:10034–10038.
- Black, W.C., IV e Roehrdanz, R.L. 1998. Mitochondrial gene order is not conserved in Arthropods: Prostriate and Metastriate tick mitochondrial genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 15:1772–1785.
- Black, W.C., IV.1993. PCR with arbitrary *primers*: approach with care. *Insect Molecular Biology*, 2:1–6.
- Black, W.C., Klompen, J.S.H. e Keirans, J.E. 1997. Phylogenetic relationships among tick subfamilies based on the 18S nuclear rDNA gene. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 7:129–144.
- Calic, S. B., Galvão, M. M., Bacellar, F., Rocha, C. M. B. M., Mafra, C. L., Leite, R. C., Walker, D. H. 2004. Human ehrlichiosis in Brazil: first suspect cases. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8:259-262.
- Campbell, N.J.H. e Barker, S.C. 1999. The novel mitochondrial gene arrangement of the cattle tick, *Boophilus microplus*: fivefold tandem repetition of a coding region. *Molecular Biology*, 16:732–740.

- Caterino, M.S., Cho, S. & Sperling, F.A.H. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology*, 45:1-54.
- Clifford, C. M., Anastos, G. e Elbl, A. 1961. The larval ixodid ticks of the Eastern United States (Acarina-Ixodidae). *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*, 2:213-237.
- Crampton, A., McKay, I. e Barker, S.C. 1996. Phylogeny of ticks (Ixodida) inferred from nuclear ribosomal DNA. *International Journal of Parasitology*, 26:511–517.
- Crosbie, P.R., Boyce, W.M. e Rodwell, T.C. 1998. DNA sequence variation in *Dermacentor hunteri* and estimated phylogenies of *Dermacentor* spp. (Acari: Ixodidae) in the New World. *Journal of Medical Entomology*, 35:277–288.
- Cruickshank, R. H. 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic & Applied Acarology*, 7:3-14.
- Cruickshank, R.H., Johnson, K.P., Smith, V.S., Adams, R.J., Clayton, D.H. & Page, R.D.M. 2001. Phylogenetic analysis of partial sequences of elongation factor 1a identifies major groups of lice (Insecta:Pthiraptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19:202-215.
- Delaye, C., Beati, L., Aeschimann, A., Renaud, F. e de Meeus, T. 1997. Population genetic structure of *Ixodes ricinus* in Switzerland from allozymic data: no evidence of divergence between nearby sites. *International Journal for Parasitology*, 27:769–773.
- Dillon, N., Austin, A.D. & Bartowsky, E. 1996. Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect Molecular Biology*, 5:21-24.
- Dobson, S.J. e Barker, S.C. 1999. Phylogeny of the hard ticks (Ixodidae) inferred from 18S rRNA indicates that the genus *Aponomma* is paraphyletic. *Molecular . Phylogenetics Evolution*, 11:288–295.
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F. R., 2001. Reorganization of genera in

the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:2145–2165.

Durden, L. A., e J. E. Keirans. 1996. Nymphs of the genus *Ixodes* (Acari: Ixodidae) of the United States: Taxonomy, identification key, distribution, hosts and medical/veterinary importance. Thomas Say Publications in Entomology. *Entomological Society of America*, Lanham, Maryland, 95 pp.

Fenton, B., Malloch, G., Moxey, E. 1997. Analysis of Eriophyid mite rDNA Internal Transcribed Spacer sequences reveals multiple simple sequence repeats. *Insect Molecular Biology*, 6:23–32.

Filippova, N.A. 1993. Ventral skeleton of male of Ixodid ticks of the subfamily Amblyomminae, its evolution and role for supergeneric taxonomy. *Parazitology*, 27:3–18.

Filippova, N.A. 1994. Classification of the subfamily Amblyomminae (Ixodidae) in connection with re-investigation of chaetotaxy of the anal valve. *Parazitologiya* 28:3–12.

Fukunaga, M., Yabuki, M., Hamase, A., Oliver, J.H. e Nakao, M. 2000. Molecular phylogenetic analysis of ixodid ticks based on the ribosomal DNA spacer, internal transcribed spacer 2, sequences. *Journal of Parasitology*. 86:38–43.

Galvão, M.A.M. 1996. Febre maculosa em Minas Gerais: Um estudo sobre a distribuição da doença no Estado e seu comportamento em área de foco periurbano. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da UFMG, 114 pp. (Tese, Doutorado em Medicina Tropical).

Galvão, M.A.M. 2004. Diagnósticos e inquéritos sorológicos para riquetsioses do gênero *Rickettsia* no Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13 suplemento 1.

- Geraci, N.S., J.S. Johnston, J.P. Robinson, S.K. Wikel, and C.A. Hill. 2007. Variation in genome size of argasid and ixodid ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37:399-408.
- Goldstein, D.B. e Schlötterer, C. 1999. Microsatellites, evolution and applications. Oxford University Press, New York.
- Guimarães, J.H.; Tucci, E.C.; Barros-Battesti, D.M. 2001. Ectoparasitos de importância veterinária. São Paulo: Plêiade, 213pp.
- Hamada, H. e Kakunaga, T. 1982. Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature* 298:396-398.
- Hernandez, R., Chen, A.C., Davey, R.B., Ivie, G.W., Wagner, G.G. e George, J.E. 1998. Comparison of genomic DNA in various strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 35:895-900.
- Higgins, J.A. e Azad, A.F. 1995. Use of polymerase chain reaction to detect bacteria in arthropods: A review. *Journal of Medical Entomology*, 32:213-222.
- Hillis, D.M. e Dixon, M.T. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66:411-429.
- Hillis, D.M., Moritz, C. Mable, B.K. 1996. Molecular Systematics. Sinauer Associates, Massachusetts, USA. 665pp.
- Hlinka, O., A. Murrell, and S. C. Barker. 2002. Evolution of the secondary structure of the rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) in hard tick (Ixodidae, Arthropoda). *Heredity*, 88:275-279.
- Hoogstraal, H. 1985. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Advances in Parasitology*, 24:135-238.
- Hoogstraal, H. e Aeschlimann, A. 1982. Tick-host specificity. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse*, 55:5-32.
- Hoy, M.A. 1994. Insect Molecular Genetics: an Introduction to Principles and Applications. Academic Press, San Diego.

- Hubbard, M.J., Cann, K.J. e Wright, D.J.M. 1995. Validation and rapid extraction of nucleic acids from alcohol-preserved ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 19:473–478.
- Hutcheson, H.J., Oliver Jr., J.H., Houck, M.A. e Strauss, R.E. 1995. Multivariate morphometric discrimination of nymphal and adult forms of the blacklegged tick (Acari: Ixodidae), a principal vector of the agent of Lyme disease in eastern North America. *Journal of Medical Entomology*, 32:827–842.
- Jarne, P. e Lagoda, P. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, 11:424–429.
- Kain, D.E.; Sperling, F.A.; Lane, R.S. 1997. Population genetic structure of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) using allozymes. *Journal of Medical Entomology*, 34:441–450.
- Karlin, S. e Altschul, S.A. 1993. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 90:5873–5877.
- Keirans, J. E., Clifford, C. M., Hoogstraal, H. e Easton, E. R. 1976. Discovery of *Nuttalliella namaqua* Bedford (Acarina: Ixodoidea: Nuttalliellidae) in Tanzania and re-description of the female based on scanning electron microscopy. *Annals of the Entomological Society of America*, 69:926-932.
- Keirans, J. E., e C. M. Clifford. 1978. The genus *Ixodes* in the United States: A scanning electron microscope study and key to the adults. *Journal of Medical Entomology* (Supplement 2): 149 p.
- Keirans, J. E.; Petney, B. H. & Horak, I. G 1992. Tick Vector Biology: Medical and Veterinary Aspects, eds. Fivaz, B. H., Petney, T. N. & Horak, I. G. Springer, Berlin, pp. 1-21.
- Klompen, J.S.H. 1992. Comparative morphology of argasid larvae (Acari: Ixodida: Argasidae), with notes on phylogenetic relationships. *Annals of the Entomological Society of America*. 85:541–560.

- Klompen, J.S.H., Black IV, W.C., Keirans, J.E. e Norris, D.E. 2000. Systematics and biogeography of hard ticks, a total evidence approach. *Cladistics*, 16:79–102.
- Klompen, J.S.H.; Black IV, W.C.; Keirans, J.E. 1996. Evolution of ticks. *Annual Review of Entomology*, 41:141–161.
- Labruna, M. B.; Camargo, L. M.A.; Camargo, E. P.; Walker, D. H. 2005. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondonia, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 27:169–174.
- Labruna, M.B. 2000. Aspectos da biologia e epidemiologia dos carrapatos de eqüinos no Estado de São Paulo. São Paulo. Tese de Doutorado – Curso de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses da USP.
- Lewontin, R.C. 1991. Electrophoresis in the development of evolutionary genetics: milestone or millstone. *Genetics*, 128:657–662.
- Lima, V.L.C.; Figueiredo, A.C.; Pignatti, M.G.; Modolo, M. 1995. Febre Maculosa no Município de Pedreira, Estado de São Paulo, Brasil. Relação entre ocorrência de casos e parasitismo humano por Ixodídeos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 28:135-137.
- Livesley, M.A., Carey, D., Gern, L. e Nuttall, P.A. 1994. Problems of isolating *Borrelia burgdorferi* from ticks collected in United Kingdom foci of Lyme disease. *Medical and Veterinary Entomology*, 8:172–178.
- Luikart, G. e England, P.R. 1999. Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Trends in Ecology and Evolution*, 14:253–255.
- Macaluso, K.R.; Sonenshine, D.E.; Ceraul, S.M.; Azad, A.F. 2002. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari:Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. *Journal of Medical Entomology*, 39(6):809-813.
- Mangold, A.J., Bargues, M.D. e Mas-Coma, S. 1998a. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastrata (Acari, Ixodidae). *Parasitology Research*, 84:478–484.

- Mangold, A.J., Bargues, M.D. e Mas-Coma, S. 1998b. 18S rRNA gene sequences and phylogenetic relationships of European hard-ticks species (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 84:31–37.
- Marrelli, M. T; Souza, L. F; Marques, R. C; Labruna, M. B; Matioli, S. R; Tonon, A. P; Ribolla; P.E.M; Marinotti, O; Schumaker, T.T.S. 2007. Taxonomic and Phylogenetic Relationships Between Neotropical Species of Ticks from Genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) Inferred from Second Internal Transcribed Spacer Sequences of rDNA. *Journal of Medical Entomology*. 44(2):222-228.
- Matioli, S.R. 2001. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto, Holos Editora. 202p.
- McLain, D.K., Wesson, D., Oliver, J.H. e Collins, F. 1995. Variation in ribosomal DNA internal transcribed spacer I among eastern populations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 32:351–360.
- Melles, HH; Colombo, S; Silva, MV 1992. Spotted fever: isolation of *Rickettsia* from a skin biopsy sample. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 34:37-41.
- Mulenga, A.; Simser, J. A.; Macaluso, K. R.; Azad, A. F. 2004. Stress and transcriptional regulation of tick ferritin HC. *Insect Molecular Biology*, 13(4):423–433.
- Mullis, K.B. e Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155:335–350.
- Munstermann, L. E. e J. E. Conn. 1997. Systematics of mosquito disease vectors (Diptera, Culicidae): Impact of molecular biology and cladistic analysis. *Annual Review of Entomology*, 42:351-369.
- Murrell, A., Campbell, N.J.H. e Barker, S.C. 1999. Mitochondrial 12S rDNA indicates that the Rhipicephalinae (Acari: Ixodida) is paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12:83–86.

- Murrell, A., Campbell, N.J.H. e Barker, S.C. 2000. Phylogenetic analyses of the rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16:1–7.
- Murrell, A., Campbell, N.J.H. e Barker, S.C. 2001a. A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21:244–258.
- Murrell, A., Campbell, N.J.H. e Barker, S.C. 2001b. Recurrent gains and losses of large (84–109 bp) repeats in the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) of rhipicephaline ticks. *Insect Molecular Biology*, 10: 587–596.
- Navajas, M. 1998. Host plant associations in the spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): insights from molecular phylogeography. *Experimental and Applied Acarology*, 22:201–214.
- Navajas, M. e Fenton, B. 2000. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology. *Experimental and Applied Acarology*. 24:751–774.
- Navajas, M., Fournier, D., Lagnel, J. e Boursot, P. 1996. Mitochondrial COI sequences in mites: evidence for variation in base composition. *Insect Molecular Biology*, 5:1–5.
- Navajas, M., Thistlewood, H., Lagnel, J., Marshall, D., Tsagkarakou, A. e Pasteur, N. 2001. Field releases of the predatory mite *Neoseiulus fallacis* (Acari: Phytoseiidae) in Canada, monitored by pyrethroid resistance and allozyme markers. *Biological Control*, 20(3):191-198.
- Norris, D.E., Klompen, J.S.H., Keirans, J.E. e Black W.C. IV. 1996. Population genetics of *Ixodes scapularis* based on mitochondrial 16S and 12S genes. *Journal of Medical Entomology*, 33:78–89.
- O'Farrell, P. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250:4007–4021.
- Oliveira R. P; Galvão M.A.M; Mafra C.L; Calic S.B; Chamone C.B; Silva S. U; Walker D.H. 2002. R. felis in *Ctenocephalides spp.* fleas, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 8:317-9.

- Oliveira, P.R. 2000. Population dynamics of the free living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 92:295-301.
- Oliver, J. H., Jr. 1989. Biology e systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annual Review of Ecology and Systematics*, 20:397-430.
- Panaccio, M. e Lew, A. 1991. PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. *Nucleic Acids Research*, 19:1151.
- Passos, D.T., da Silva, S.S., Richter, M.F. e Ozaki, L.S. 1999. Detection of genomic variability in different populations of the cattle tick *Boophilus microplus* in southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 87:83–92.
- Pasteur, N., Pasteur, G., Catalan, J. e Bonhome, F. 1988. Practical Isozyme Genetics. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England.
- Post, R.J., Flook, P.K. & Millest, A.L. 1993. Methods for the preservation of insects for DNA studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21:85-92.
- Poucher, K. L., H. J. Hutcheson, J. E. Keirans, L. A. Durden, e W. C. Black, I. V. 1999. Molecular genetic key for the identification of 17 *Ixodes* species of the United States (Acari: Ixodidae): a methods model. *International Journal of Parasitology*, 85:623-629.
- Raoult, D. & Roux, V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 10:694–719.
- Reiss, R.A., Schwartz, D.P. & Ashworth, A.C. 1995. Field preservation of Coleoptera for molecular genetic analyses. *Environmental Entomology*, 24:716-719.
- Rich, S.M., Rosenthal, B.M., Telford, I.S.R., Spielman, A., Hartl, D.L. and Ayala, F.J. 1997. Heterogeneity of the internal transcribed spacer (ITS-2) region within individual deer ticks. *Insect Molecular Biology*, 6:123–129.
- Roderick, G.K. 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology*, 41:325-352.

- Rosario-Cruz, R., Miranda-Miranda, E. e Garcia-Vasquez, Z. 1997. Detection of esterase activity in susceptible and organophosphate resistant strains of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Bulletin of Entomological Research*, 87:197–202.
- Ruedas, L.A., Salazar-Bravo, J., Dragoo, J.W. & Yates, T.L. 2000. The importance of being earnest: what, if anything, constitutes a specimen examined? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17:129-132.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schwan, T.G.; Piesman, J. 2002. Vector interactions and molecular adaptations of Lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. *Emerging Infectious Disease*, 8:115–121.
- Scott, J. A., W. G. Brogdon, e F. H. Collins. 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49:520-529.
- Shone. S.M., Dillon, H.J.; Hom, S.S.; Delgado, N. 2006. A Novel Real-Time PCR assay for the Speciation of Medically Important Ticks. *Vector-Borne Zoonotic Diseases*, 6:152–160.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. e Flook, P. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651–701.
- Sonenshine, D. E. 1991. Biology of Ticks. Oxford University Press. New York. 447p.
- Sparagano, O.A.E., Allsopp, M.T.E.P., Manl, R.A., Rijkema, S.G.T., Figueroa, J.V. e Jongejan, F. 1999. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): A review. *Experimental and Applied Acarology*, 23:929–960.

- Stiller, D., Goff, W.L., Johnson, L.W. e Knowles, D.P. 2002. *Dermacentor variabilis* and *Boophilus microplus* (Acari: Ixididae): Experimental vectors of *Babesia equi* to Equids. *Journal of Medical Entomology*, 39:667–670.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J. e Hillis, D.M., 1996. Phylogenetic inference. In: Molecular Systematics, D.M. Hillis, C.Moritz and B. K.Mable (Eds), Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA, p. 407–514.
- Takada, N., Fujita, H., Yano, Y., Tsuboi, Y. e Mahara, F. 1994. First isolation of a rickettsia closely related to Japanese spotted fever pathogen from a tick in Japan. *Journal of Medical Entomology*, 31:183–185.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. e Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22:4673-4680.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Fritjters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. e Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:4407–4414.
- Walker, D.H. 1989. Rocky Mountain Spotted Fever: A disease in need of microbiological concern. *Clinical Microbiology Reviews*, 2(3):227-240.
- Weeks, A.R., van Opijnen, T. e Breeuwer, J.A.J. 2000. AFLP fingerprinting for assessing intraspecific variation and genome mapping in mites. *Experimental and Applied Acarology*, 24:775–793.
- Wen, W., Leon, P.E. e Hague, D.R. 1974. Multiple gene sites for 5S and 18 + 28S RNA on chromosomes of *Glyptotendipes barbipes* (Staeger). *The Journal of Cell Biology*, 62:132–144.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. e Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531–6535.

- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Fenton, B. and Tuovinen, T. 2000. Species and strain identification of the predatory mite *Euseius finlandicus* by RAPD-PCR and ITS sequences. *Experimental and Applied Acarology*, 24:863–880.
- Zahler, M., Filippova, N.A., Morel, P.C., Gothe, R. e Rinder, H. 1997. Relationships between species of the *Rhipicephalus sanguineus* group: a molecular approach. *Journal of Parasitology*, 83:302–306.
- Zahler, M., Gothe, R. e Rinder, H. 1995. Diagnostic DNA amplification from individual tick eggs, larvae and nymphs. *Experimental Applied Acarology*. 19:731–736.

APÊNDICE I

Meio LB líquido (500 mL)

Triptona	20 mL
Extrato de levedura	2,5 g
NaCl	5,0 g
H ₂ O ultrapura q.s.p	500 mL

Autoclavar o meio logo após o preparo.

Meio LB sólido (500 mL)

Preparar 500 mL de meio LB líquido e acrescentar 10 g de Agar bacteriológico.
Autoclavar o meio logo após o preparo.

Solução I

25 mM de Tris-Cl (pH = 8,0)

10 mM de EDTA (pH = 8,0)

50 mM de glicose

Completar o volume com H₂O ultrapura e autoclavar a solução. Armazenar em geladeira.

Solução II

0,2 N de NaOH

1% SDS

Completar o volume com H₂O ultrapura autoclavada. Esta solução deve ser preparada somente na hora do uso.

Solução III

Acetato de potássio 3 M (pH = 8,0)

Ácido acético glacial 2 M

Completar o volume com H₂O ultrapura e autoclavar a solução. Armazenar em geladeira.

APÊNDICE II

Alinhamento múltiplo de sequências realizado no CLUSTAL W (1.83) para o gênero *Amblyomma*. Os primers desenhados correspondem às regiões assinaladas.

gi		18766873		gb	AF469605.1		
gi		62132143		gb	AY887115.1	<i>Amblyomma cajennense</i>	
gi		62132144		gb	AY887116.1	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	
gi		62132138		gb	AY887110.1	<i>Amblyomma dubitatum</i>	
gi		19073242		gb	AF469611.1	<i>Amblyomma coelebs</i>	
gi		62132140		gb	AY887112.1	<i>Amblyomma aureolatum</i>	
gi		62132139		gb	AY887111.1	<i>Amblyomma rotundatum</i>	
gi		62132145		gb	AY887117.1	<i>Amblyomma humerale</i>	
gi		62132147		gb	AY887119.1	<i>Amblyomma varium</i>	
gi		62132148		gb	AY887120.1	<i>Amblyomma ovale</i>	
gi		62132149		gb	AY887121.1	<i>Amblyomma longirostre</i>	
gi		62132141		gb	AY887113.1	<i>Amblyomma naponense</i>	
gi		62132142		gb	AY887114.1	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	
gi		66390957		gb	AY995180.1	<i>Amblyomma triste</i>	
gi		62132146		gb	AY887118.1	<i>Amblyomma pseudoconcolor</i>	
						<i>Amblyomma parvum</i>	
gi		18766873		gb	AF469605.1	-----CATCCGATGTGAATTGCAGGACACACTGAGCACATGAT	38
gi		62132143		gb	AY887115.1	-----	
gi		62132144		gb	AY887116.1	-----	
gi		62132138		gb	AY887110.1	-----	
gi		19073242		gb	AF469611.1	ACTAGTTCGATTCCATCGATGTGAACTGCAGGACACACTGAGGCCACTGAT	50
gi		62132140		gb	AY887112.1	-----	
gi		62132139		gb	AY887111.1	-----	
gi		62132145		gb	AY887117.1	-----	
gi		62132147		gb	AY887119.1	-----	
gi		62132148		gb	AY887120.1	-----	
gi		62132149		gb	AY887121.1	-----	
gi		62132141		gb	AY887113.1	-----	
gi		62132142		gb	AY887114.1	-----	
gi		66390957		gb	AY995180.1	-----	
gi		62132146		gb	AY887118.1	-----	
gi		18766873		gb	AF469605.1	TCTTCGAACGCACATTGCGCCCTTGGGTCTTCCCTTGGGTTTCGTCTGTCT	88
gi		62132143		gb	AY887115.1	-----TTGGGTCTTCCCTTGGGTTTCGTCTGTCT	28
gi		62132144		gb	AY887116.1	-----TTGGGTCTTCCCTTGGGTTTCGTCTGTCT	28
gi		62132138		gb	AY887110.1	-----TTGGGTCTTCCCTTGGGTTTCGTCTGTCT	28
gi		19073242		gb	AF469611.1	TCTTCGAACGCACATTGCGCCCTTGGGTCTTCCCTTGGGTTTCGTCTGTCT	100
gi		62132140		gb	AY887112.1	-----TTGGGTCTTCCCTTGGGTTTCGTCTGTCT	28
gi		62132139		gb	AY887111.1	-----TTGGGTCTTCCCTTGGGTTTCGTCTGTCT	28
gi		62132145		gb	AY887117.1	-----TTGGGTCTTCCCTTGGGTTTCGTCTGTCT	28
gi		62132147		gb	AY887119.1	-----TTGGGTCTTCCCTTGGGTTTCGTCTGTCT	28
gi		62132148		gb	AY887120.1	-----TTGGGTCTTCCCTTGGGTTTCGTCTGTCT	28
gi		62132149		gb	AY887121.1	-----TTGGGTCTTCCCTTGGGTTTCGTCTGTCT	28
gi		62132141		gb	AY887113.1	-----TTGGGTCTTCCCTTGGGTTTCGTCTGTCT	28
gi		62132142		gb	AY887114.1	-----TTGGGTCTTCCCTTGGGTTTCGTCTGTCT	28
gi		66390957		gb	AY995180.1	-----TTGGGTCTTCCCTTGGGTTTCGTCTGTCT	28
gi		62132146		gb	AY887118.1	-----TTGGGTCTTCCCTTGGGTTTCGTCTGTCT	28
						A9	*****
gi		18766873		gb	AF469605.1	GAGGGTCCGATCATATATCAAGAGAGGCGCCGGCGCCCGGGGATGGCGCG	138
gi		62132143		gb	AY887115.1	GAGGGTCCGATCATATATCAAGAGAGACGCGCCGGCGCCCGGGGATGGCGCG	78
gi		62132144		gb	AY887116.1	GAGGGTCCGATCATATATCAAGAGAGACGCGCCGGCGCCCGGGGATGGCGCG	71
gi		62132138		gb	AY887110.1	GAGGGTCCGATCATATATCAAGAGAGACGCGCCGGCGCCCGGGGATGGCGCG	78
gi		19073242		gb	AF469611.1	GAGGGTCCGATCATATATCAAGAGAGACGCGCCGGCGCCCGGGGATGGAGCG	150
gi		62132140		gb	AY887112.1	GAGGGTCCGATCATATATCAAGAGAGACGCGCCGGCGCCCGGGGATGGCGCG	78
gi		62132139		gb	AY887111.1	GAGGGTCCGATCATATATCAAGAGAGACGCGCCGGCGCCCGGGGATGGCACA	78
gi		62132145		gb	AY887117.1	GAGGGTCCGATCATATATCAAGAGAGACGCGCCGGCGCCCGGGGATGGCGCG	78
gi		62132147		gb	AY887119.1	GAGGGTCCGATCATATATCAAGAGAGGCGCCGGCGCCCGGGGATGGCGCG	78
gi		62132148		gb	AY887120.1	GAGGGTCCGATCATATATCAAGAGAGACGCGCCGGCGCCCGGGGATGGAGCG	78
gi		62132149		gb	AY887121.1	GAGGGTCCGATCATATATCAAGACAGACGCGCCGGCGCCCGGGGATGGCGCG	78
gi		62132141		gb	AY887113.1	GAGGGTCCGATCATATATCAAGAGAGACGCGCCGGCGCCCGGGGATGGCGCG	78
gi		62132142		gb	AY887114.1	GAGGGTCCGATCATATATCAAGAGAGGCGTCGGCGCCCGGGGATGGCGCT	78
gi		66390957		gb	AY995180.1	GAGGGTCCGATCATATATCAAGAGAGACGCGCCGGCGCCCGGGGATGGTGCT	78
gi		62132146		gb	AY887118.1	GAGGGTCCGATCATATATCAAGAGAGACGCGCCGGCGCCCGGGGATGGTGCT	78
						*****	** ** * *****

gi		18766873		gb		AF469605.1		GCCGGCGACTCGTTTTGACCGTGTGCGCATAGA--GGACGGCTCTGT-AC	185
gi		62132143		gb		AY887115.1		GCCGGCGACTCGTTTTGACCGTGTGCGCAAAA--GGACGGCTCTGT-AC	125
gi		62132144		gb		AY887116.1		GCCGGCGACTCGTTTTGACCGTGTGCGCAAAAG-AGGACGGCTCTGA-GC	119
gi		62132138		gb		AY887110.1		GTCGGCGACTCGTTTTGACCGTGTGCGCAAAAG-AGGACGGCTCTGA-GC	126
gi		19073242		gb		AF469611.1		GCCGGCGACTCGTTTTGACCGTGTGCGCAAAACA-AGGACGGCTCTGA-GC	198
gi		62132140		gb		AY887112.1		GCCGGCGACTCGTTTTGACCGTGTGCGCAAAAC--AGGACGGCTCTGA-GA	125
gi		62132139		gb		AY887111.1		GCCGGCGACTCGTTTTGACCGTGTGCGCAAAAC--AGGACGGCTCTGT-AA	125
gi		62132145		gb		AY887117.1		GCCGGCGACTCGTTTTGACCGTGTGCGCAATGA--GGACGGCTCTGT-AC	125
gi		62132147		gb		AY887119.1		GCCGGCGACTCGTTTTGACCGTGTGCGCAATGA--GGACGGCTCTTT-AC	125
gi		62132148		gb		AY887120.1		GCCGGCGACTCGTTTTGACCGTGTGCGCAAAAAAAGGACGGCTCTGT-AC	127
gi		62132149		gb		AY887121.1		GCCGGCGGCTCGTTTTGACCGTGTGCGCAAAGA--GGACGGCTCAGT-AC	124
gi		62132141		gb		AY887113.1		GCCGGCGGCTCGTTTTGACCGTGTGCGCAAAGA--GGACGGCTCTGT-AC	125
gi		62132142		gb		AY887114.1		GCCGGCGACTCGTTTTGACCGTGTGCGCATCAA--GGACGGCTCTGT-AC	125
gi		66390957		gb		AY995180.1		GTCGGCGGCTCGTTTTGACCGTGTGCGCAAAAG-AGGACGGCTCCGTTGC	127
gi		62132146		gb		AY887118.1		GTCGGCGGCTCGTTTTGACCGTGTGCGCAAAAG-AGGACGGCTCCGTTAC	127

* * * * *

gi		18766873		gb		AF469605.1		GG---AATGCCGAAGATCCCT-CGAAAGACTTT---GCGA-AT-----GA	222
gi		62132143		gb		AY887115.1		GA---AACGCCGAAGATCCCT-CGAAAGACTGC---GAAAGAC-----GA	163
gi		62132144		gb		AY887116.1		GTCGAACAGCCGAAGATCCCT-CGAAAGACTTT---GCGAAAAA-----GA	161
gi		62132138		gb		AY887110.1		GTCGAACAGCCGAAGATCCCT-CGAAAGACTTT---GCGAAAAA-----TA	168
gi		19073242		gb		AF469611.1		GTCAAACAGCCGAAGATCCCT-CGAAAGACTTT---GCGAAAAA-----GA	240
gi		62132140		gb		AY887112.1		GAC-----GCCGAAGATCCCT-CGAAAGACTTT---GCGAA-----	157
gi		62132139		gb		AY887111.1		GA---AACGGCCGAAGATCCCT-CGAAAGACTTT---ACGAA--A-----GA	163
gi		62132145		gb		AY887117.1		GA---GACGCCGAAGATCCCT-CGAAAGACTTT---GCGAAT-----GA	162
gi		62132147		gb		AY887119.1		GA---GACGCCGAAGATCCCT-CGAAAGACTTT---GCGAAT-----GA	162
gi		62132148		gb		AY887120.1		GA---GACGCCGAAGATCCCT-CGAAAGACTTTT---GCGAAA-----AA	165
gi		62132149		gb		AY887121.1		GG---GGCGCCGAAGATCCCT-CGAAAGACTTG---GCAAAA-----GA	161
gi		62132141		gb		AY887113.1		CG---GACGCCGAAGATCCCTCGAAAGACTTTT---GCGAAT-----GA	163
gi		62132142		gb		AY887114.1		GA---AACGCCGAAGATCCCT-CGAAAGACTTTGC-GCAAATT-----GA	165
gi		66390957		gb		AY995180.1		GG---AACGCCGAAGATCCCT-CGAAAGACTTT---CAAAAGCCTCTGA	169
gi		62132146		gb		AY887118.1		GG---AACGCCGAAGATCCCT-CGAAAGACTTTTTTTCGAAAGCCTCTGA	173

* * * * *

gi		18766873		gb		AF469605.1		GGA----GAAAAG----CGGGTCGAACCCTT-CAGCCGCGC--GCAAAG	260
gi		62132143		gb		AY887115.1		GGA----GAGGAGA---CTGGGTGCAACCCTT-CAGCCGCGC-TGTAAG	204
gi		62132144		gb		AY887116.1		GGA----GGAGA-----GCGGGTCGAACCCAT-CAGCCGCGC---AGAAG	198
gi		62132138		gb		AY887110.1		GGA----GGAGA-----GCGGGTCGAACCCAT-CAGCCGCGC---AGAAG	205
gi		19073242		gb		AF469611.1		GGA----GGAGA-----GTGGGTGCAACCCAT-CAGCCGCGC---AGAAG	277
gi		62132140		gb		AY887112.1		GGA----GGAGA-----GTGGGTGCAACCCTT-CACCCGCGT---CAAAG	194
gi		62132139		gb		AY887111.1		GGA----GGAGA-----GTGGGTGCAACCCTT-CATCCGCGT---CAAAG	200
gi		62132145		gb		AY887117.1		GGA----GGAGA-----GTGGGTGCAACCCTT-CGCCCGCG---AAAGG	198
gi		62132147		gb		AY887119.1		GGA----GGAGA-----GTGGGTGCAACCCTT-CGTCCGCG---AAATG	198
gi		62132148		gb		AY887120.1		GGA----GGAGA-----GTGGGTGCAACCCTT-CACCCGCG---AAAGG	201
gi		62132149		gb		AY887121.1		GGA----GGAGA-----GTGGGTGCGAGCCCTT-CACCCGCGC---AAAGG	198
gi		62132141		gb		AY887113.1		GGA----GGAGA-----GTGGGTGCAACCCTT-CACCCGTGC---CAGGG	200
gi		62132142		gb		AY887114.1		GGA----GGAGAC-----GTGGGTGCAACCCTTTCGCCCGCGC--GAAAGG	205
gi		66390957		gb		AY995180.1		AAAAACGGAGTAAAAAAGAGTCGAGCCCTT-CAACCCGCGCACAAAAG	218
gi		62132146		gb		AY887118.1		AA---ACGGAGTTC-----GAGTCGAGCCCTT-CAACCCGCGC-ACAAAAG	213

* * * * *

gi		18766873		gb		AF469605.1		CGGCAGAGTCGGG-TCGCCCTGCGCTG---ACGTAACCGGGCCGCGCGG	305
gi		62132143		gb		AY887115.1		CGGCCGAGTCGGG-TCGCCCTGCACTTGACTACGTAACCGGGACGGCGG	253
gi		62132144		gb		AY887116.1		CGGTTCGAGTCGGG-TCGCCCTGCGCTGA----CGTAACTTGGGCCAGCGG	243
gi		62132138		gb		AY887110.1		CGGTTCGAGTCGGG-TCGCCCTGCGCTGA----CGTAACTTGGGCCAGCGG	250
gi		19073242		gb		AF469611.1		CGGTTGGGTTCGGG-TCGCCCTGCGCAGA----CGTAACTTGGGCCCGG	322
gi		62132140		gb		AY887112.1		CGGCTGAGTCGGG-TCGCCCTGCGCTGA----CGTAAACCGGGCCG	239
gi		62132139		gb		AY887111.1		CGGTCGAGTCGGG-TCGCCCTGCGCTGA----CGTAAACGAGGGCCG	245
gi		62132145		gb		AY887117.1		CGGTTGAGTCGGG-TCGCCCTGCTGA----CGTAAACGAGGG-CCGCTG	242
gi		62132147		gb		AY887119.1		CGGTTGAGTCGGG-TCGCCCTGCGCTGA----CGTAAACGAGGG-CCCCTG	242
gi		62132148		gb		AY887120.1		CGGT-GAGTCGGG-TCGCCCTGTGCCAA----CGTAAACGAGGG-CCGACG	244
gi		62132149		gb		AY887121.1		CGGTTGAGTCGGG-TCGCCCTGCGCTGA----CGTAAACGAGGG-CCGACG	242
gi		62132141		gb		AY887113.1		CGGTTGAGTCGGG-TCGCCCTGCGCTGA----CGTAAACGAGGGCCGACG	245
gi		62132142		gb		AY887114.1		CGGTCGAGTCGGGTCGCCCTGCGCCCTGCGCCACGCTTTGTGCCGAGGGCCGCGCA	255
gi		66390957		gb		AY995180.1		CGGTTGAGTCGGG-TCGCCAGCGCAG--ACTTGAACCGGGTCGGCGG	264
gi		62132146		gb		AY887118.1		CGGTTGAGTCGGG-TCGCCCGCGCCGCG-ACTTGAACCGGGTCGGCGG	261

* * * * *

A15

gi		18766873		gb		AF469605.1		C---TGCT---AGCCG-TAGAGCGTCA--CGCCTCAGA---AAGCGACC-	342
gi		62132143		gb		AY887115.1		C---TGCT---AGCCG-TAGAGCGTCT--GGCCTCCGA---AGGCGACC-	290
gi		62132144		gb		AY887116.1		CT---GCTT---TGCCG-CGGAGCGTAC--AGCCTCCGTA--CGACGACC-	282
gi		62132138		gb		AY887110.1		CT---GCTT---TGCCG-CGGAGCGTAC--AGCCTCCGTA--TGACGACC-	289
gi		19073242		gb		AF469611.1		CT-ATGCTT--AGTCG-CGGAGCGTAC--AGCCTCTGAA--TGCGGACC-	363
gi		62132140		gb		AY887112.1		CT--TGCTT--AGCCG-CGAAACGTTCC--AGCCTCTGAA--CGGAGACCC	281
gi		62132139		gb		AY887111.1		CT---GCTT---AGCCG-CATAACGTCC--AGCCTCTGAA--TGCGGACC-	284
gi		62132145		gb		AY887117.1		---CTGCT---AGCCG-CATAGCGTTC--AGCCTCCGA---AAGAGACC-	279
gi		62132147		gb		AY887119.1		---CTGCT---AGCCG-CATAGCGTTC--AGCCTCCGA---AAGAGACC-	279
gi		62132148		gb		AY887120.1		GC-CCGCT---AGCCG-TGTAGCGTTC--AGCCTCCGA---AGGCGACC-	283
gi		62132149		gb		AY887121.1		G--CCGCT---AGCCG-TGTAGCGTT---AGCCTCTGA---AGGTGACC-	279
gi		62132141		gb		AY887113.1		G--CCGCT---AGCCG-TGTAGCGTT---AGCCTCCGT---AGGTGACC-	282
gi		62132142		gb		AY887114.1		GG-CTGCC---AGTTG-CGCGTCGTTCCGGGCTCCGAGAGAGGCGATT-	299
gi		66390957		gb		AY995180.1		CTGCCGCT---AGCCG-TAGAGCGTCT--GGCCTCCGAA--AGTTGACC-	305
gi		62132146		gb		AY887118.1		CTGCTGCTGTAGCCGATAGAGCGTCT--GGCCTCCGAA--AGTTGACC-	306

* * * * * * * *

A16

gi		18766873		gb		AF469605.1		GCCGCAGGA--AGGGATTACCTGCAGGGAAAGAGCGGTCCGACGGGAGAC	390
gi		62132143		gb		AY887115.1		GCCGCAGGA--AGGGATTACCTGCAGGGAAAGTGCGGTTGG---GACCCG	335
gi		62132144		gb		AY887116.1		GCCGCAGGA--AGGGATTACCTGCAGGGAAAGAGCGGCCCG--AAAGGGA	329
gi		62132138		gb		AY887110.1		GCCGCAGGA--AGGGATTACCTGCAGGGAAAGAGCGGCCCG--AAAGGGA	335
gi		19073242		gb		AF469611.1		GTCGCAGGA--AGGGATTACCTGCAGGGAAAGAGCGGTCCCA--AAAGGGA	410
gi		62132140		gb		AY887112.1		GCCGCAGGA--AGGGATTACCTGCAGGGAAAGAGCGGTCCC---GAAGGGA	327
gi		62132139		gb		AY887111.1		GCCGCAGGA--AGGGATTACCTGCAGGGAAAGAGCGGTCCCAAAAGGGA	332
gi		62132145		gb		AY887117.1		GCCGCAGGA--AGGGATTACCTGCAGGGAAAGTGCGGTCTG--AA-GGGA	324
gi		62132147		gb		AY887119.1		GTCGCAGGA--AGGGATTACCTGCAGGGAAAGTGCGGTCCG--AA-GGGA	324
gi		62132148		gb		AY887120.1		GCCGCAGGA--AGGGATTACCTGCAGGGAAAGTGCGGTCCCA--AA-GGGA	328
gi		62132149		gb		AY887121.1		GCCGCAGGA--AGGGATTACCTGCAGGGAAAGAGTGTGTTCCG--AAAGGGA	325
gi		62132141		gb		AY887113.1		GCCGCAGGA--AGGGATTACCTGCCGGGAAAGAGCGGTCCG--AC-GGGA	327
gi		62132142		gb		AY887114.1		GCCGCAGGA--AGGGATTACCTGCAGTGCG---GTCGCTCA--AG--GGA	340
gi		66390957		gb		AY995180.1		TCCGCAGGGGAAGGGATTACCTGCCGGC-----TGTTCTTCAGGGAGAC	349
gi		62132146		gb		AY887118.1		GCCGCAGGA--AGGGATTACCTGCAGGGAAAGTGCGGTTCATCAGGGAGAC	355

***** ** ***** *

gi		18766873		gb		AF469605.1		GAGGCTGTTTGG-ACGGGCGGC-----GAAGCGCTGCCTG----CTGGCCC	431
gi		62132143		gb		AY887115.1		TTGGCCGTTTGG-ACGGGCGGC-----AAAGCATTGCCCG----CTGGCCC	376
gi		62132144		gb		AY887116.1		GACGAGGCAAGGTACGGGTGGC---AGAGCTGTGTC-TG---CTGGTCC	371
gi		62132138		gb		AY887110.1		GACGAGGCAAGGTACGGGTGGC---AGAGCTGCGTC-TG---CTGGTCC	377
gi		19073242		gb		AF469611.1		GATGAGGCAAGGTACGGGTGGC---AGAGCGGTGCTCTG---CTGGCCC	453
gi		62132140		gb		AY887112.1		GACGAGGCAAGGTACGGGTGGC---AGAGCGTTGTC-TG---CTGGCCC	369
gi		62132139		gb		AY887111.1		GAAGAGGCACGGGGCGGTGGCG---AGAGCGTTGCC-CG---CTGGCCC	375
gi		62132145		gb		AY887117.1		GACGAGGCAATTG-A-GAACGA-----AGCGCGTCTGC---TGG-CCC	361
gi		62132147		gb		AY887119.1		GACGAGGCTTTC-A-GAACGA-----AGCGGAGTCTGC---TGGGCCC	362
gi		62132148		gb		AY887120.1		GACGAGGCATTG-A-GAACGAGCGCGGAGCGGCTCTGC---TGG-TCC	372
gi		62132149		gb		AY887121.1		GACGAGGCATTG-ACGAGCGGCAAA---AGCGCGTCTG---CTGGCCC	367
gi		62132141		gb		AY887113.1		GACGAGGCATTG-ACGAGCGGCAAG---GCGGCGTCTGC---CTGGCCC	369
gi		62132142		gb		AY887114.1		GACGAGGC-CCG-AAGGACGAGCGGAGCGGATTTGCGGGTGGCCCT	388
gi		66390957		gb		AY995180.1		GAGGCCGTTCCG-ACGGGCGGCACGAGCGGCGCGCTGC---CGACTGC	395
gi		62132146		gb		AY887118.1		GAGGCCGTTGTTGG-ACGGGCGGCACGTGCGGACGCTCTGC---TGACTTC	401

* * * * *

A11

gi		18766873		gb		AF469605.1		GCGGAGAA---GTAGCCAAACTGCTGC-----GAGAAACGCAG	466
gi		62132143		gb		AY887115.1		GCGGAGAA---GTAGCCAAACTGCTGCTGCCAACGCTGCGTGAAAGGCAG	423
gi		62132144		gb		AY887116.1		TAGGAGAA---GTATCCGAAATCTGCT-----GCGAACCCGCAG	406
gi		62132138		gb		AY887110.1		TTGGAGAA---GTATCCGAAATCTGCT-----GCGAACCCGAA	412
gi		19073242		gb		AF469611.1		TCGGAAAA---GTGTCGAAATTGCT-----GCGAACCCGCAG	488
gi		62132140		gb		AY887112.1		ACGGAGAA---GTATCCAAA--CTGCT-----GCCAACCCGCAG	402
gi		62132139		gb		AY887111.1		ACGGAGAA---GTATCCAAA--CTGCT-----GCACACTGCAG	408
gi		62132145		gb		AY887117.1		CCGGAGAA---GTATCCAAAGTGT-----GCAAACCCGCAG	394
gi		62132147		gb		AY887119.1		CCGGAGAA---GTATCCAAAGCGAT-----GCGAACCCGCAG	395
gi		62132148		gb		AY887120.1		CCGGAGAC---GTATCCAAATTGCT-----GCGAACCCGCAG	405
gi		62132149		gb		AY887121.1		CCGGAGAA---GTGTCGAAATTGCT-----GCGAACCCGCTG	400
gi		62132141		gb		AY887113.1		CCGGAGAA---GTGTCGAAATTGCT-----GCGATCCCGCG	402
gi		62132142		gb		AY887114.1		ACGGAGAGAGTGGAACAAACTTTCCTC-----GCGAACCCGCA	427
gi		66390957		gb		AY995180.1		GCGGAAAGA--GTGGCTTCGAGATGC-----CGTGCAGGAG	430
gi		62132146		gb		AY887118.1		GCGGAAAG--GTGGCCACGAGATGC-----CGTGCAGGAG	435

** * *

gi		18766873		gb		AF469605.1		AGGT-CGTT---CTCTCGAGGGAAAGAGAG---GCGACAGGGAATTTATT	855
gi		62132143		gb		AY887115.1		AGGT-CGCT---CTCTCGAGGGAAAGAGAG---GCGGCAGGGAAC-ATT	800
gi		62132144		gb		AY887116.1		AGGT-CGTTG--CTCTCGAGGGAAAGAGAGCGCGCGCAGGGAATT-ATT	789
gi		62132138		gb		AY887110.1		AGGT-CGTCG--CTCTCGAGGGAAAGAGAG-CGGCGGCAGGGAATT-ATT	790
gi		19073242		gb		AF469611.1		AGGT-CGTTG--CTCTCGAGGGAAAGAGAG-AGACGGCAGGGAATT-ATT	883
gi		62132140		gb		AY887112.1		AGGC-CGTT---CTCTCGAGGGATAGAGAG---ACGGCAGGGAATT-ATT	773
gi		62132139		gb		AY887111.1		AGGC-CGTT---CTGTCTGAGGAAAGAGAG---ACGGCAGGGAATT-ATT	790
gi		62132145		gb		AY887117.1		AGGT-CGT---TCTCTCGAGGGA--AAGAG-AGGCGGCAGGGAATT-ATT	777
gi		62132147		gb		AY887119.1		AGGT-CGT---TCTCTCGAGGGA--AAGAG-AGGCGGCAGGGAATT-ATT	778
gi		62132148		gb		AY887120.1		AGGT-CGC---TCTCTCGAGGGA--AAGAG-GAGCGGCAGGGAATT-ATT	794
gi		62132149		gb		AY887121.1		AGGT-CGT---TCTCTCGAGGGAT-GAGAG-AGGCGGCAGGGAATC-ATT	792
gi		62132141		gb		AY887113.1		TGTTTCGT---CCTCTCGAGGGA--AAGAG-AGGCGACAGGGAATC-ATG	796
gi		62132142		gb		AY887114.1		ACGTTTCGCTCTCGCTCGAGGGAAGGAGAC-GAGAGGC-GGCATTC-AGT	829
gi		66390957		gb		AY995180.1		AGGT-CGTT---CTCTCGAGGGAAAGAGAG---ACGGCAGGGAATT-ATT	834
gi		62132146		gb		AY887118.1		AGGT-CGTT---CTCTCGAGGGAAAGAGAG---ACGGCAGGGAATT-ATT	850

* * * * * * * * * * * * * * *

gi		18766873		gb		AF469605.1		CGGCCGCGCGGTTTCGGGGGTTT-ACACTCTCT-----GCGTTTCAGTGT-	897
gi		62132143		gb		AY887115.1		CGGTTCGCGCGGTCGGGGGTTTCGAAACTCTCT-----GCGTT---TTC-	840
gi		62132144		gb		AY887116.1		TGCCCGCGCGGTCGGGGG-CTCTTACTCTT-----ACGTTTCGTTTCG	831
gi		62132138		gb		AY887110.1		CGGCCGCGCGGTCGGGGG-CTCTTACTCTG-----ACGTTTCGTTTC-	831
gi		19073242		gb		AF469611.1		TGCCCGCGCGGTCGGGGGTTTCATACTCTTG-----AATGTTTCGTTTC-	927
gi		62132140		gb		AY887112.1		CGGTTCGCGCGGTCGGGGG-CTCAT-CTCAA-----ACGTTTCGTTTC-	813
gi		62132139		gb		AY887111.1		CGGCCGCGCGGTTGGGGG-CTC-TACTCA-----ATGTTTCGTTTC-	829
gi		62132145		gb		AY887117.1		CGGTTCGCGCGGTTGGGGGCTCCAA-CTC-T-----GTTTCGTTTC-	815
gi		62132147		gb		AY887119.1		CGGTTCGCGCGGTTGGGGGCTCAAACTC-T-----GTTTCGTTTC-	817
gi		62132148		gb		AY887120.1		CGGCCGCGCGGTTGGGGGCTACAACCTCCAC-----GTTTCGTTTC-	834
gi		62132149		gb		AY887121.1		CGGCCGCGCGGTTGGGGGACGCCACTCAAT-----GTTTCGTTTC-	832
gi		62132141		gb		AY887113.1		CGGCCGCGCGGTCGGGGGCTACCCTCAAT-----GTTTCGTTTC	837
gi		62132142		gb		AY887114.1		CGACCGCGCGGTTGGGGGTTGCTTCTTCTTCTAC-TCATGTTTCGTTTC	878
gi		66390957		gb		AY995180.1		CGGCCGCGCGGTTGGGGGTTTCCAAA-----CTTCTCTCTCGTTTC	877
gi		62132146		gb		AY887118.1		CGGCCGCGCGGTTGGGGGTTCTCAAACCTTTTTTCTCTCTCGTTTC	900

* * * * * * * * * * * * * *

gi		18766873		gb		AF469605.1		-TCCGCGCAACCGAATGC-GCGCC---GTCCCGAGC---GCCGG--T	936
gi		62132143		gb		AY887115.1		-CGCGCAGACCGCATGCGC-GCGCG---GTCCCGAGC---GCCGG--T	879
gi		62132144		gb		AY887116.1		-TGCGCA-ACCG---CATGC-GCGCC---GTCCTTAGC---GCCGG-CC	867
gi		62132138		gb		AY887110.1		-CGCGCA-AACG---CATGC-GCGGC---GTCCTTAGC---GCCGG-CC	867
gi		19073242		gb		AF469611.1		-CGCGCA-ACCG---CATGC-GCGCA---GTCCTTAGC---GCCGG-CC	963
gi		62132140		gb		AY887112.1		-CGCGCA-ACCG---CATGC-GCGCC---GTCCG-AGC---GCCGG-CC	848
gi		62132139		gb		AY887111.1		-GGCGCA-ACCG---CAGGT-GCGCA---GTCCG-AGC---GCTGG-CG	864
gi		62132145		gb		AY887117.1		-TGTGCA-ACCG---CATGT-GCGCT---GTCC-GAGC---GCCGGCA	851
gi		62132147		gb		AY887119.1		-TGTGCA-ACCG---CATGT-GCGCT---GTCCTGAGC---GCCGGAA	854
gi		62132148		gb		AY887120.1		-TGCGCA-ACCG---CATGC-GCGCT---GTCC-GAGC---GCCGG--A	868
gi		62132149		gb		AY887121.1		-TGCGCG-ACAG---CATGC-GCGCC---GTCC-GAGC---GCCGG--T	866
gi		62132141		gb		AY887113.1		-TGCGCA-GCCG---CATGC-GCGCC---GTCC-GAGC---GCCGG--G	871
gi		62132142		gb		AY887114.1		-GGCGCA-ACCGATATGCGC-GCGCC---GTCCCGAGC---GCCGGCCA	918
gi		66390957		gb		AY995180.1		GCGCGCA-ACAGAATTGCGCAGAGCA--GGTCCGGCGGT--GGCCGGCCA	922
gi		62132146		gb		AY887118.1		GCACGCA-ACAGAATTGCGCAGAGCGTGGGTCGGCGGTTGCCGGCC-	948

* * * * * * * * * * * * * *

gi		18766873		gb		AF469605.1		CAGAGGTGCCTTCCAGTCTCGCTCGCA-GTC-GCCGAGGGTGCTGCCGA-	983
gi		62132143		gb		AY887115.1		CAGAGGCGCTTCCAGTCTCGCTCGCA-GTC-GCCGAGGGTGCTGCCGA-	926
gi		62132144		gb		AY887116.1		AGGGG-TGCCTTCCAGTCTCGCTCGCA-GTC-GCCGAGGGTGTTGCCGA-	913
gi		62132138		gb		AY887110.1		AGGGGGTGCCTTCCAGTCTCGCTCGCA-GTC-GCCGAGGGTGTTGCCGA-	914
gi		19073242		gb		AF469611.1		AGCGG-TGCCTTCCAGTCTCGCTCGCA-GTC-GCCGAGGGTGTTGCCGA-	1009
gi		62132140		gb		AY887112.1		TGCCG-TGCCTTCCAGTCTCGCTTGA-GTC-GCCGAGGGTGTTGCCGA-	894
gi		62132139		gb		AY887111.1		AGCGG-TGCCTTCCAGTCTCGCTCGCA-GTC-GACGAGGGTGTTGCCGA-	910
gi		62132145		gb		AY887117.1		AAGCGGTGCCTTCCAGTCTCGCTCACG-GTC-GTCGAGGGTGTTGCCGA-	898
gi		62132147		gb		AY887119.1		AAGCGGTGCCTTCCAGTCTCGCTCACG-GTC-GCCGAGGGTGTTGCCGA-	901
gi		62132148		gb		AY887120.1		TGGCGGTGCCTTCCAGTCTCGCTCACG-GTC-GCCGAGGGTGTTGCCGA-	915
gi		62132149		gb		AY887121.1		CGCCGGTGCCTTCCAGTCTCGCTCACG-GTC-GCCGAGGGTGTTGCCGA-	913
gi		62132141		gb		AY887113.1		CGCGGTGCCTTCCAGTCTCGCTTGT-GTC-GCCGAGGGTGTTGCCGA-	918
gi		62132142		gb		AY887114.1		TG-CGCGCCTTCCAGTCTCGCTCGCACGTC-GCCGAGGGTGTTGCCGA-	965
gi		66390957		gb		AY995180.1		CAGCGGTGCCTTCCAGTCTCGCTCGCAGGTTGACGAGGGTGTTGTCAGA	972
gi		62132146		gb		AY887118.1		-AGCGGTGCCTTCCAGTCTCGCTCGCAGGTC-GACGAGGGTGTTGTCAGA	996

* * * * * * * * * * * * * *

A8

Alinhamento múltiplo de sequências realizado no CLUSTAL W (1.83) para o gênero *Ixodes*.
Os *primers* desenhados correspondem às regiões assinaladas.

```
gi|313709|emb|X63868.1|      Ixodes scapularis
gi|347817|gb|L22271.1|IXORDBNG Ixodes dammini
gi|347822|gb|L22276.1|IXORDBNL Ixodes scapularis
gi|347818|gb|L22272.1|IXORDBNH Ixodes dammini
gi|347826|gb|L22280.1|IXORDBNP Ixodes pacificus
gi|347825|gb|L22279.1|IXORDBNO Ixodes pacificus
```

```
gi|313709|emb|X63868.1|      GCGCTG--TGACGTCGGTGCCTTAGAAA--CGGAGATTTGAAACGGTTTC 803
gi|347817|gb|L22271.1|IXORDBNG GCGCTG--TGACGTCGGTGCCTTAGAAA--CGGAGATTTGAAACGGTTTC 799
gi|347822|gb|L22276.1|IXORDBNL GCGCTG--TGACGTCGGTGCCTTAGAAA--CGGAGATTTGAAACGGTTTC 807
gi|347818|gb|L22272.1|IXORDBNH GCGCTG--TGACGTCGGTGCCTTAGAAA--CGGAGATTTGAAACGGTTTC 799
gi|347826|gb|L22280.1|IXORDBNP GCGCTTGTGACGTCGGTGCCTTGGAAAAACGGAGATTTGAAACGGTTTC 782
gi|347825|gb|L22279.1|IXORDBNO GCGCTTGTGACGTCGGTGCCTTGGAAAAACGGAGATTTGAAACGGTTTC 814
*****      *****      *****      *****
```

↑
I3

```
gi|313709|emb|X63868.1|      GTAGCCTTCCGTCAGTCTAAGACCTTCGCGTCCCCGATGAATACTGGAGC 1021
gi|347817|gb|L22271.1|IXORDBNG GTAGCCTTCCGTCAGTCTAAGACCTTCGCGTCCCCGATGAATACTGGAGC 1016
gi|347822|gb|L22276.1|IXORDBNL GTAGCCTTCCGTCAGTCTAAGTCCTTCGCGTCCCCGATGAATACTGGAGC 1026
gi|347818|gb|L22272.1|IXORDBNH GTAGCCTTCCGTCAGTCTAAGACCTTCGCGTCCCCGATGAATACTGGAGC 1017
gi|347826|gb|L22280.1|IXORDBNP GTAGCCTTCCGTCAGTCTAAGACCTTCGCGTCCCCGATGAATACTGGAGC 1026
gi|347825|gb|L22279.1|IXORDBNO GTAGCCTTCCGTCAGTCTAAGACCTTCGCGTCCCCGATGAATACTGGAGC 1059
*****      *****      *****
```

↑
I4

Alinhamento múltiplo de sequências realizado no CLUSTAL W (1.83) para o gênero *Rhipicephalus*. Os primers desenhados correspondem às regiões assinaladas.

gi 2735611 gb U97712.1 BMU9771	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
gi 2735614 gb U97715.1 BMU9771	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
gi 2735613 gb U97714.1 BMU9771	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
gi 14276722 gb AF271272.1	<i>Rhipicephalus (Boophilus) annulatus</i>
gi 2735608 gb U97709.1 RZU9770	<i>Rhipicephalus zambeziensis</i>
gi 114187512 gb DQ849273.1	<i>Rhipicephalus zambeziensis</i>
gi 2735603 gb U97704.1 RAU9770	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
gi 119444229 gb DQ901355.1	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
gi 114187507 gb DQ849268.1	<i>Rhipicephalus turanicus</i>
gi 14276721 gb AF271271.1	<i>Rhipicephalus turanicus</i>
gi 14276733 gb AF271283.1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
gi 14276734 gb AF271284.1	<i>Rhipicephalus simus</i>
gi 14276726 gb AF271276.1	<i>Rhipicephalus compositus</i>
gi 14276732 gb AF271282.1	<i>Rhipicephalus pumilio</i>
gi 14276731 gb AF271281.1	<i>Rhipicephalus maculatus</i>
gi 14276725 gb AF271275.1	<i>Rhipicephalus pulchellus</i>
gi 114187505 gb DQ849266.1	<i>Rhipicephalus evertsi evertsi</i>
gi 14276729 gb AF271279.1	<i>Rhipicephalus evertsi mimeticus</i>
gi 14276728 gb AF271278.1	<i>Rhipicephalus punctatus</i>
gi 14276723 gb AF271273.1	<i>Rhipicephalus geigy</i>

gi 2735611 gb U97712.1 BMU9771	TA-AGGCGTTCTCGTCGTAGTCCGCCGTCGGTCTAAGTGCTTCGCAGTTC	805
gi 2735614 gb U97715.1 BMU9771	TA-AGGCGTTCTCGTCGTAGTCCGCCGTCGGTCTAAGTGCTTCGCAGTTC	805
gi 2735613 gb U97714.1 BMU9771	TA-AGGCGTTCTCGTCGTAGTCCGCCGTCGGTCTAAGTGCTTCGCAGTTC	809
gi 14276722 gb AF271272.1	TA-AGGCGTTCTCGTCGTAGTCCGCCGTCGGTCTAAGTGCTTCGCAGTTC	709
gi 2735608 gb U97709.1 RZU9770	TG-AAGCGTTCCCCTCGTAGTCCGCCGTCGGTCCAAGTGCTTCGCAGTTC	770
gi 114187512 gb DQ849273.1	TG-AAGCGTTCCCCTCGTAGTCCGCCGTCGGTCCAAGTGCTTCGCAGTTC	715
gi 2735603 gb U97704.1 RAU9770	TC-AAGCGTTCCCCTCGTAGTCCGCCGTCGGTCCAAGTGCTTCGCAGTTC	773
gi 119444229 gb DQ901355.1	TC-AAGCGTTCCCCTCGTAGTCCGCCGTCGGTCCAAGTGCTTCGCAGTTC	669
gi 114187507 gb DQ849268.1	TG-AAGCGTTCC-GTCGTAGTCCGCCGTCGGTCCAAGTGCTTCGCAGTTC	722
gi 14276721 gb AF271271.1	TG-AAGCGTTCC-GTCGTAGTCCGCCGTCGGTCCAAGTGCTTCGCAGTTC	682
gi 14276733 gb AF271283.1	TG-AAGCGTTCC-GTCGTAGTCCGCCGTCGGTCCAAGTGCTTCGCAGTTC	681
gi 14276734 gb AF271284.1	CC-GAGCGTTCC-GTCGTAGTCCGCCGTCGGTCCAAGTGCTTCGCAGTTC	700
gi 14276726 gb AF271276.1	TG-AAGCGTTCC-GTCGTAGTCCGCCGTCGGTCCAAGTGCTTCGCAGTTC	650
gi 14276732 gb AF271282.1	TC-AAGCGTTCC-GTCGTAGTCCGCCGTCGGTCCAAGTGCTTCGCAGTTC	678
gi 14276731 gb AF271281.1	TCCAAGCGTTCC-GTCGTAGTCCGCCGTCGGTCCAAGTGCTTCGCAGTTC	697
gi 14276725 gb AF271275.1	TCCAAGCGTTCC-GTCGTAGTCCGCCGTCGGTCCAAGTGCTTCGCAGTTC	700
gi 114187505 gb DQ849266.1	TC-AGGCGTTCTCGTCGTAGTCCGCCGTCGGTCCAAGTGCTTCGCAGTTC	737
gi 14276729 gb AF271279.1	TC-AGGCGTTCTCGTCGTAGTCCGCCGTCGGTCCAAGTGCTTCGCAGTTC	696
gi 14276728 gb AF271278.1	TC-GGGCGTTCTCGTCGTAGTCCGCCGTCGGTCCAAGTGCTTCGCAGTTC	702
gi 14276723 gb AF271273.1	TC-AGGCGTTCTCGTCGTAGTCCGCCGTCGGTCTAAGTGCTTCGCAGTTC	648

↑

R1

gi 2735611 gb U97712.1 BMU9771	CCGTCCCCTTCAAAAACTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	855
gi 2735614 gb U97715.1 BMU9771	CCGTCCCCTTCAAAAACTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	855
gi 2735613 gb U97714.1 BMU9771	CCGTCCCCTTCAAAAACTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	859
gi 14276722 gb AF271272.1	CCGTCCCCTTCAAAAACTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	759
gi 2735608 gb U97709.1 RZU9770	CCGTCCCCTTCAAAA--CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	818
gi 114187512 gb DQ849273.1	CCGTCCCCTTCAAAA--CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	763
gi 2735603 gb U97704.1 RAU9770	CCGTCCCCTTCAAAA--CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	821
gi 119444229 gb DQ901355.1	CCGTCCCCTTCAAAA--CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	717
gi 114187507 gb DQ849268.1	CCGTCCCCTTCAAAA--CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	770
gi 14276721 gb AF271271.1	CCGTCCCCTTCAAAA--CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	730
gi 14276733 gb AF271283.1	CCGTCCCCTTCAAAA--CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	729
gi 14276734 gb AF271284.1	CCGTCCCCTTCAAAA--CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	748
gi 14276726 gb AF271276.1	CCGCCCCGTGCAAAA--CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	698
gi 14276732 gb AF271282.1	CCGTCCCCTTCAAAA--CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	726
gi 14276731 gb AF271281.1	CCGTCCCCTTCAAAA--CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	745
gi 14276725 gb AF271275.1	CCGTCCCCTTCAAAA--CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	747
gi 114187505 gb DQ849266.1	CCGTCCCCTTCAAAA--CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	786
gi 14276729 gb AF271279.1	CCGTCCCCTTCAAAA--CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	745
gi 14276728 gb AF271278.1	CCGTCCCCTTCAAAA--G-CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	749
gi 14276723 gb AF271273.1	CCGTCCCCTTCAATAA--CTGGGCCACTCCAGTTGGGGCGGGGGCGACGCT	697

*** ***** ** *****

gi 2735611 gb U97712.1 BMU9771	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGAATGCCGCT-G	995
gi 2735614 gb U97715.1 BMU9771	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGAATGCCGCT-G	995
gi 2735613 gb U97714.1 BMU9771	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGAATGCCGCTTG	1000
gi 14276722 gb AF271272.1	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGAATGCCGCTTG	903
gi 2735608 gb U97709.1 RZU9770	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGGTTACCGCT-G	951
gi 114187512 gb DQ849273.1	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGGTTACCGCTTG	897
gi 2735603 gb U97704.1 RAU9770	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGTGCAGCGGGATACCGCT-G	954
gi 119444229 gb DQ901355.1	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGTGCAGCGGGATACCGCTTG	851
gi 114187507 gb DQ849268.1	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGTGCAGCGGGATACCGCTTG	905
gi 14276721 gb AF271271.1	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGTGCAGCGGGATACCGCTTG	865
gi 14276733 gb AF271283.1	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGTGCAGCGGGATACCGCTTG	864
gi 14276734 gb AF271284.1	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGGATACCGCTTG	883
gi 14276726 gb AF271276.1	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGGATACCGCTTG	836
gi 14276732 gb AF271282.1	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGGATACCGCTTG	861
gi 14276731 gb AF271281.1	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGGATACCGCTTG	879
gi 14276725 gb AF271275.1	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGGATACCGCTTG	882
gi 114187505 gb DQ849266.1	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGGATACCGCTTG	923
gi 14276729 gb AF271279.1	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGGATACCGCTTG	882
gi 14276728 gb AF271278.1	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGGATACCGCTTG	887
gi 14276723 gb AF271273.1	TTATCACGCAACTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGGATACCGCTTG	836

*****CTGCTCGGACGACGCACGCGCGCAGCGGGATACCGCTTG***** * ***** *

↑
R2