

RAFAEL MAZIOLI BARCELOS

**ANÁLISE FILOGEOGRÁFICA E FILOGENÉTICA DO CARRAPATO**  
***Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787)**

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  
2013

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

T

B242a  
2013

Barcelos, Rafael Mazioli, 1985-  
Análise filogeográfica e filogenética do carrapato  
*Amblyomma cajannense* ( Fabricius, 1787) / Rafael Mazioli  
Barcelos. – Viçosa, MG, 2013.  
x, 43f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 34 - 41.

1. *Amblyomma cajannense* - Filogenia.
2. *Amblyomma cajannense* - Distribuição geográfica.
3. *Amblyomma cajannense* - Classificação. 4. Carrapato.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação  
em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 595.42

RAFAEL MAZIOLI BARCELOS

**ANÁLISE FILOGEOGRÁFICA E FILOGENÉTICA DO CARRAPATO**  
***Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787)**

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: 25 de fevereiro de 2013

---

Simone Eliza Facioni Guimarães

---

Jorge Abdala Dergam dos Santos  
(Coorientador)

---

Cláudio Lísias Mafra de Siqueira  
(Orientador)

*“As coisas são semelhantes: isto faz a Ciência possível;  
as coisas são diferentes: isto faz a Ciência necessária.”*  
(Levins e Lewontin, 1985)

## AGRADECIMENTOS

Pela realização deste trabalho, gostaria de agradecer:

- A Deus, por ter guiado e abençoado todo o meu caminho até aqui;
- À minha mãe, Eliana, e ao meu pai, Gerônimo, eternos amigos e companheiros responsáveis por toda a minha determinação, caráter e inspiração. Pelo apoio incondicional nos momentos difíceis durante a realização deste trabalho;
- Aos meus irmãos, Guilherme e Nathália, pelo apoio, torcida e amizade que levarei durante toda a minha vida;
- Ao Prof. Dr. Cláudio Mafra, pela amizade e sabedoria. Por ter proporcionado toda a infra-estrutura para a realização e conclusão deste trabalho. Por ter auxiliado em todas as etapas com idéias, orientação e sábias palavras de motivação.
- Aos amigos do LAPEM, em especial Higo, Natasha, Carlos, Gabriel, Adriano e Cynthia pela amizade, trocas de experiências profissionais e pelos “insights”.
- À família Barcelos e Mazioli, pelo apoio e torcida;
- Aos professores Dr. Jorge Dergam (DBA/UFV) pela coorientação e Dra. Simone Facioni (DZO/UFV) que, solicitamente, aceitaram fazer parte da banca examinadora desta dissertação de mestrado;
- Aos amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial a Larissa, pela amizade e troca de experiências profissionais;
- À CAPES, pela bolsa de incentivo para realização deste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Matias Szabó e Dra. Márcia Arzua e demais pessoas que forneceram carrapatos para as análises do trabalho;
- Aos demais amigos e familiares que, de uma forma ou de outra, me acompanharam e apoiaram durante a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Rafael Mazioli Barcelos, nascido em 20 de dezembro de 1985, na cidade de Colatina, Espírito Santo, Brasil, filho de Gerônimo Guilherme Barcelos e Eliana Mazioli Barcelos.

No ano de 2005, ingressou no Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto, obtendo o título de Bacharel em Ciências Biológicas em 5 de fevereiro de 2010. Durante a graduação, exerceu diversas atividades nos laboratórios de Zoologia dos Vertebrados, Microbiologia e Epidemiologia Molecular este último onde concluiu a monografia.

Durante o segundo semestre do ano de 2010 ingressou no Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular exercendo atividades voluntárias e como aluno não-vinculado no Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. Em fevereiro de 2011, iniciou suas atividades do mestrado no Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola.

## SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1. Aspectos morfológicos e taxonômicos dos carrapatos .....	2
2.2. Ciclo de três hospedeiros (carrapatos trioxenos) .....	3
2.3. Classificação taxonômica do <i>A. cajennense</i> .....	4
2.4. A filogeografia no estudo genealógico das espécies .....	5
2.5. <i>High-Resolution Melt</i> (HRM).....	6
3. OBJETIVOS .....	8
3.1. Objetivo Geral.....	8
3.2. Objetivos Específicos .....	8
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	9
4.1. Obtenção de carrapatos e identificação taxonômica .....	9
4.2. Extração de DNA e PCR em tempo real .....	11
4.3. Análise de <i>High Resolution Melting</i> (HRM) .....	13
4.4. Análise filogeográfica.....	13
4.5. Análise filogenética.....	13
4.6. Análises estatísticas dos haplótipos.....	14
5. RESULTADOS.....	15
5.1. Análise de <i>High Resolution Melt</i> (HRM) .....	15
5.2. Análise filogenética.....	17
5.3. Análise de haplótipos.....	24
5.4. Análise filogeográfica.....	28
6. DISCUSSÃO .....	30
7. CONCLUSÕES .....	33
8. REFERÊNCIAS.....	34
9. ANEXOS .....	42

**LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS**

<b>FMB</b>	Febre Maculosa Brasileira
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleotídeo
<b>mtDNA</b>	Ácido desoxirribonucleotídeo mitocondrial
<b>HRM</b>	<i>High Resolution Melt</i>
<b>dsDNA</b>	Ácido desoxirribonucleotídeo de dupla fita
<b>PCR</b>	Reação da Polimerase em Cadeia
<b>qPCR</b>	Reação da Polimerase em Cadeia quantitativa
<b>12S</b>	gene ribossomal mitocondrial subunidade 12S
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>TRIS-HCl</b>	Hidrocloreto de 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
<b>pH</b>	potencial Hidrogeniônico
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>MEGA</b>	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
<b>ML</b>	Máxima Verossimilhança
<b>IB</b>	Inferência Bayesiana
<b>AMOVA</b>	Análise de Variância Molecular
<b>AIC</b>	<i>Akaike Information Criterion</i>
<b>GTR+I+G</b>	<i>General Time Reversible + Proportion Invariant + Gamma</i>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização dos pontos de coleta dos carrapatos *Amblyomma cajennense*. Códigos: Verde: Mata Atlântica; Amarelo: Cerrado; Cinza claro: Pantanal. .... 10
- Figura 2.** Gráfico de curvas de dissociações alinhadas (A) e de diferença (B) gerado pelo High Resolution Melt Software demonstrando os cinco haplótipos reconhecidos nas populações de *A. cajennense* estudadas. .... 16
- Figura 3.** Sítios polimórficos (números na parte superior) entre os cinco haplótipos encontrados no estudo..... 17
- Figura 4.** Árvore resultante da análise de Inferência Bayesiana pelo aplicativo MrBayes 3.2 e amostras coletadas em diferentes biomas após 5.000.000 gerações. Os números nos ramos representam probabilidade posterior. Em vermelho está indicado o Clado 1 e em azul o Clado 2..... 18
- Figura 5.** Árvore filogenética construída pela análise de Inferência Bayesiana baseada no gene 12S mitocondrial após 3.000.000 de gerações. Os números nos ramos demonstram a probabilidade posterior. Os ramos em vermelho representam os haplótipos encontrados no presente estudo. .... 22
- Figura 6.** Mapa contendo América do Sul, América Central e México indicando a localização dos cladogramas resultantes da árvore filogenética pela análise de Inferência Bayesiana. Códigos: Vermelho: Clado 1; Azul: Clado 2; Verde: Clado 3; Laranja: Clado 4..... 23
- Figura 7.** Distribuição dos cinco haplótipos encontrados no presente estudo de acordo com o bioma e cidade de origem. Os números no interior dos gráficos indicam a frequência dos haplótipos. Códigos: Azul: haplótipo II; Vermelho: haplótipo I; Amarelo: haplótipo III; Preto: haplótipo V; Laranja: haplótipo IV. Biomas: Mata Atlântica em verde claro; Cerrado em amarelo; Pantanal em azul claro. .... 25
- Figura 8.** Análise de distribuição de mismatch das variações haplotípicas das diferentes populações de *A. cajennense* demonstrando a presença de um único pico os 2 cladogramas. .... 28
- Figura 9.** Rede de haplótipos gerada pelo aplicativo *Network* pelo algoritmo *Median Joining*. Os pontos pretos significam informações faltantes ou amostragem não realizada. Códigos: ARA: Araguapaz; UBA: Ubá; VIC: Viçosa; LON: Londrina; OLI: Oliveira; TIR: Tiradentes; POC: Poconé; TO: Teófilo Otoni; SPF: São Pedro dos Ferros; OP: Ouro Preto. .... 29
- Anexo 1.** Árvore resultante da análise de Máxima Verossimilhança pelo aplicativo MEGA 5 e de sequências de *A. cajennense* depositadas no GenBank bem como as amostras coletadas no presente estudo (ramos em vermelho). Os números nos ramos representam os valores de bootstrap..... 42
- Anexo 2.** Árvore resultante da análise de Máxima Verossimilhança pelo aplicativo MEGA 5 das amostras coletadas no presente estudo. Os números nos ramos representam os valores de bootstrap. Em vermelho está indicado o Clado 1 e em azul o Clado 2..... 43

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Número de carrapatos coletados de acordo com bioma, cidade e estado de origem. ....	9
<b>Tabela 2.</b> Países e regiões das sequências do gene 12S de <i>A. cajennense</i> depositadas no GenBank utilizadas nas análises. ....	20
<b>Tabela 3.</b> Distribuição dos haplótipos nos biomas e nas respectivas cidades de origem. ...	24
<b>Tabela 4.</b> Análise de variância molecular (AMOVA) para os grupos e populações de haplótipos de <i>A. cajennense</i> nos biomas de Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal no Brasil. AMOVA realizada com 1.000 permutações. ....	26
<b>Tabela 5.</b> Análise de variância molecular (AMOVA) para os grupos e populações de haplótipos de <i>A. cajennense</i> das Américas realizado com 1.000 permutações. ....	26
<b>Tabela 6.</b> Estatísticas descritivas dos haplótipos de <i>A. cajennense</i> estudadas. ....	27

## RESUMO

BARCELOS, Rafael Mazioli, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Análise filogeográfica e filogenética do carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)**. Orientador: Claudio Lísias Mafra de Siqueira. Coorientadores: Jorge Abdala Dergam dos Santos e Luis Claudio Vieira da Cunha.

A espécie de carrapato *Amblyomma cajennense*, regularmente conhecido como carrapato-estrela, está amplamente distribuído em todo o continente americano. No Brasil possui ocorrência em quase todos os estados. Aspectos epidemiológicos podem estar relacionados com a existência de um complexo de espécies do táxon *A. cajennense*. No presente estudo foi analisada uma porção de 340 pares de base do gene ribossomal mitocondrial 12S de carrapatos da espécie *A. cajennense*, utilizando a técnica de *High Resolution Melt* (HRM). Foram processados 199 espécimes oriundos dos biomas Mata Atlântica, Cerrado e Pantanal. Após a identificação dos haplótipos, estes foram sequenciados a fim de obter suas sequências nucleotídicas, sendo a seguir submetidos à análises de filogenia e filogeografia. As análises filogeográficas indicaram que as populações localizadas nos biomas Mata Atlântica, Cerrado e Pantanal encontram-se em simpatria. A filogenia demonstrou que espécimes pertencentes ao Yungas argentino e da Mata Atlântica brasileira estão filogeneticamente relacionados, assim como os indivíduos do Chaco Serrano e Chaco Ocidental; Florestas montanhosas reais da Cordilheira dos Andes, florestas úmidas da Costa Rica, Guatemala, Equador, Guiana Francesa, México e florestas temperadas dos Estados Unidos da América. A existência de incompatibilidade reprodutiva e a forte estruturação genética nas Américas sugerem que o táxon *A. cajennense* é um de complexo de espécies. Este achado é extremamente importante uma vez que a prevalência de doenças estão diretamente ligadas aos seus vetores.

## ABSTRACT

BARCELOS, Rafael Mazioli, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Phylogenetic and phylogeographic analysis of the cayenne tick *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)**. Adviser: Claudio Lísias Mafra de Siqueira. Co-advisers: Jorge Abdala Dergam dos Santos and Luis Claudio Vieira da Cunha.

The Cayenne tick *Amblyomma cajennense* is widely dispersed throughout the Americas. In Brazil, this ectoparasite is distributed in almost all states. Epidemiological aspects may be related to the existence of a species complex of the taxon *A. cajennense*. The present study examined a portion of 340 base pairs of the mitochondrial 12S ribosomal gene of ticks of the specie *A. cajennense* using the technique of High Resolution Melt (HRM). One hundred ninety nine specimens were analyzed from Atlantic Forest, Cerrado and Pantanal biomes. After identification of the haplotypes, these were sequenced in order to obtain their nucleotide sequences, and then subjected to phylogenetic and philogeography analyses. The phylogeographic analysis indicated that the populations located in the Atlantic Forest, Cerrado and Pantanal biomes are sympatric. The phylogeny showed that specimens belonging to the argentine Yungas and the Brazilian Atlantic Forest are phylogenetically related, as well as individuals of Serrano Chaco and West Chaco; actual mountain forests of the Andes, the rainforests of Costa Rica, Guatemala, Ecuador, French Guiana, Mexico and temperate forests of the United States of America. The existence of reproductive incompatibility and strong genetic structure in the Americas suggest that the taxon *A. cajennense* is a complex of species. This finding is extremely important since the prevalence of diseases are directly linked to their vectors.

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie de carrapato *Amblyomma cajennense*, regularmente conhecido como carrapato-estrela, está distribuída desde o sul dos Estados Unidos da América até a Argentina ao longo da costa atlântica (ESTRADA-PEÑA et al., 2004). É responsável pela transmissão de diversos microrganismos patogênicos tais como *Rickettsia rickettsii*, agente causador da Febre Maculosa Brasileira (FMB) (DIAS & MARTINS, 1939); *Ehrlichia ruminantium* (BARRÉ et al., 1987); arbovírus (LINTHICUM et al., 1991) e; microsporídio *Encephalitozoon-like* (RIBEIRO & GUIMARÃES, 1998). No Brasil, este ectoparasito está distribuído em quase todos os estados brasileiros sendo o carrapato mais comum parasitando humanos (GUGLIELMONE et al., 2006).

Atualmente, tem-se indícios evolutivos de que esta espécie de carrapato seja composta por um complexo de espécies (ARAGÃO & FONSECA, 1953), as quais encontram-se agrupadas desde a década de 1950 sob um mesmo táxon: *Amblyomma cajennense*. Neste estudo, Aragão & Fonseca descrevem os problemas persistentes quanto a identificação de vários carrapatos do gênero *Amblyomma*. Várias sinonímias do *A. cajennense* foram criadas, pois a identificação morfológica deste carrapato era problemática uma vez que diferentes hospedeiros geravam diferentes tamanhos para os ectoparasitos. Como solução do problema todas essas sinonímias foram agrupadas sob o mesmo táxon, o *A. cajennense* o que aumenta os indícios de que este táxon é um complexo.

Dentre estudos evidenciando estes indícios, temos os cruzamentos entre populações de *A. cajennense* provenientes de diferentes regiões geográficas (Salta, Argentina; Villeta, Colômbia e; São Paulo e Rondônia, Brasil), verificou-se baixo sucesso do nascimento de larvas (MASTROPAOLO et al., 2011; LABRUNA et al., 2011), sendo esta situação considerada como bastante peculiar uma vez que a incompatibilidade reprodutiva em animais de mesma espécie é incomum.

Avaliando-se por análise molecular, foi observado que algumas amostras de *A. cajennense* de diferentes origens geográficas possuíram marcada divergência genética quando comparadas a espécimes originados do

continente americano e mesmo entre espécimes brasileiros provenientes de estados distintos da federação, fortalecendo a hipótese de complexo de espécies (BURKMAN, 2009).

Apesar de existirem estudos sobre a dinâmica sazonal de *A. cajennense* (GUGLIELMONE et al., 1992a; OLIVEIRA et al., 2000) pouco se sabe sobre a estrutura genética populacional deste carrapato. Desta forma, a filogeografia, ciência que estuda a distribuição genealógica entre e dentre espécies relacionadas, apresenta-se como ferramenta para traçar o perfil evolutivo e histórico das populações de *A. cajennense* distribuídas no Brasil.

Dessa forma, visando-se a expansão do conhecimento da biologia bem como quanto a situação taxonômica deste carrapato, propõe-se, por meio da utilização de filogeografia e filogenia, a verificação da existência de um complexo de espécies do taxon *A. cajennense* em amostras provenientes de diferentes populações situadas em distintos biomas brasileiros.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Aspectos morfológicos e taxonômicos dos carrapatos**

Carrapatos são artrópodes hematófagos obrigatórios pertencentes à classe Arachnida, subclasse Acarina e ordem Ixodida (DANTAS-TORRES et al., 2009). Segundo Guglielmon e cols. (2010), em todo o mundo, até o ano de 2010, foram descritas 896 espécies, distribuídas em 3 famílias: Ixodidae, com cerca de 702 espécies, compreendendo espécies popularmente conhecidas como carrapatos duros; Argasidae, que abrange 193 espécies conhecidas como carrapatos moles; e Nuttalliellidae, representada por apenas 1 espécie, *Nuttalliella namaqua*, existente apenas no continente africano, com características intermediárias entre as famílias Argasidae e Ixodidae.

No território brasileiro foram descritas como endêmicas ou estabelecidas 64 espécies de carrapatos, sendo 44 ixodídeos e 20 argasídeos (DANTAS-TORRES et al., 2009, 2012; LABRUNA & VENZAL, 2009; NAVA et al., 2010).

## 2.2. Ciclo de três hospedeiros (carrapatos trioxenos)

*Amblyomma cajennense* é classificado como um carrapato trioxeno, necessitando de três hospedeiros para completar seu ciclo de vida. Tal característica, aliado a sua baixa especificidade parasitária, contribui para que este carrapato desempenhe papel central na transmissão de patógenos de potenciais reservatórios silvestres ao homem, o que confere a esta espécie grande importância zoonótica para a saúde pública (GUGLIELMONE et al., 2004). Do ponto de vista epidemiológico, é a espécie mais importante que apresenta este ciclo, o que explica, em parte, o seu papel como principal transmissor da febre maculosa e de outras zoonoses de importância médico-veterinária. Dado a sua versatilidade parasitária, podendo alimentar-se em uma ampla gama de vertebrados silvestres, domésticos e, inclusive, no homem, este carrapato desempenha papel central na disseminação de zoonoses (BARROS-BATTESTTI et al., 2006).

Do ponto de vista da reprodução desta espécie, uma única fêmea ingurgitada pode ovipor entre 5.000 a 10.000 ovos, que após 30 dias eclodirão, gerando entre 5.000 e 10.000 larvas (GUGLIELMONE et al., 2004).

O *A. cajennense*, especialmente nos estágios imaturos, possui alta predileção pelo parasitismo em humanos. Alguns dias após a eclosão das larvas no solo, tão logo ocorra a maturação do seu exoesqueleto, estas sobem nas folhas do capim, formando aglomerados numerosos de larvas, a espera da passagem de um hospedeiro vertebrado. Devido a esta característica, o *A. cajennense* neste estágio é popularmente conhecido como micuim. Uma vez no hospedeiro, as larvas alimentam-se em um período de 3 a 7 dias. Após este período, estas caem de volta no solo, onde realizaram a muda ou ecdise para o estágio de ninfa. O período de pré-muda pode levar de 4 a 8 semanas. Após 15 dias da muda, estarão ativas na vegetação em busca de um novo hospedeiro (GUGLIELMONE et al., 2004). No momento em que infestam um novo hospedeiro, as ninfas alimentam-se novamente por um período de 3 a 7 dias, caindo ao solo onde transformam-

se em adultos após um período de 4 a 8 semanas. Assim que ocorre o endurecimento do exoesqueleto (aproximadamente 2 semanas após a muda), os adultos estão aptos a infestarem outro hospedeiro vertebrado, geralmente de grande porte, mas também preparados para permanecerem vários meses sem se alimentarem. Uma vez fecundada, a fêmea inicia o ingurgitamento, caindo logo após ao solo para a realização da oviposição, a qual, após um período aproximado de 30 dias, verifica-se a eclosão dos ovos e a geração das larvas fechando o ciclo do *A. cajennense*. Os machos continuam sobre o hospedeiro vertebrado por 3 a 4 semanas se alimentando e fecundando outras fêmeas (GUGLIELMONE et al., 2004).

### **2.3. Classificação taxonômica do *A. cajennense***

Em 1953, em trabalho realizado por Aragão & Fonseca, foram agrupadas na espécie *A. cajennense* vários indivíduos morfologicamente similares como sinônimas, sendo este desde então um consenso entre os acarologistas. No entanto, diferenças ecológicas não foram avaliadas à época deste trabalho, o que pode indicar que esta espécie de carrapato incluía populações (subespécies) geneticamente diversas (GUGLIELMONE et al., 1992b), podendo significar diferentes sinônimas existentes dentro desta espécie, caracterizando assim um complexo de espécies. Com isto, diferentes espécies e, conseqüentemente diferenças genéticas abrangeriam este complexo atualmente conhecido apenas como *A. cajennense*.

Mastropaolo e cols. (2011) realizaram na Argentina um ensaio reprodutivo, o qual consistiu em cruzar duas populações geograficamente distintas (Parque Nacional El Rey na Província de Salta e Parque Nacional Copo na Província Santiago del Estero) para analisar a compatibilidade reprodutiva desta espécie. Foi observado que o nascimento de larvas foi extremamente baixo quando machos e fêmeas das diferentes populações eram cruzados. Em trabalho similar, Labruna e cols. (2011) realizaram testes com populações de *A. cajennense* provenientes da Colômbia (Villeta, Cundinamarca), Argentina (Parque Nacional El Rey, província de Salta) e do Brasil (estados de São Paulo e Rondônia) alcançando resultados semelhantes com as populações

da Colômbia e dos dois estados brasileiros apresentando baixa fertilidade quando cruzados entre si.

Por análises moleculares em genes mitocondriais, Burkman (2009) e Beati e cols. (2007), observaram uma estruturação genética do *A. cajennense* em amostras, na maioria, dos países América do Sul e alguns da América do Norte e Central sob diferentes habitats e vegetação característica do local. Assim como nos ensaios de reprodução, foi sugerido que o carrapato *A. cajennense* seria um complexo possuindo mais de uma espécie, visto a presença de vários haplótipos distintos nas diferentes regiões em que este carrapato foi coletado. Apesar destes esforços, pouco se sabe da situação genética e filogenética das populações de *A. cajennense* no Brasil.

#### **2.4. A filogeografia no estudo genealógico das espécies**

A filogeografia tem como objetivo o estudo da história evolutiva dos organismos assim como a dispersão genealógica. É uma das ferramentas que auxiliam na predição e distinção da relação entre espécies com diferentes (sub)populações, sendo um campo de estudo que permite estudar a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente dentro e entre espécies relacionadas. Neste contexto, a interpretação da distribuição de genes requer análises interdisciplinares como genética molecular, genética de populações, etologia, demografia, filogenia, paleontologia, geologia e geografia histórica, o que viria a permitir a avaliação da comunicação entre micro e macro-evolução de uma espécie (AVISE et al., 1987).

A infraestrutura inicial e ainda predominante para esta ponte tem sido a análise do DNA mitocondrial (mtDNA), o que tem permitido rastrear traços genealógicos através dos limites genéticos entre populações, espécies e níveis taxonômicos mais elevados (BERMINGHAM & MORITZ, 1998). Esta facilidade é devido a várias características intrínsecas ao mtDNA tais como não sofrer recombinação (salvo exceções), apresentar origem matrilineal, podendo apresentar altas taxas de substituição nucleotídica devido à ineficiente maquinaria de reparo do DNA, a exposição à radicais livres

oxidativos provenientes do metabolismo mitocondrial ou pela rápida replicação dentro das linhagens celulares (AVISE et al., 1987). Sendo o mtDNA desprovido de histonas, as quais são evolutivamente preservadas por proteger a evolução do DNA genômico, esse não possui a capacidade de codificar proteínas envolvidas diretamente em sua replicação ou transcrição, possuindo apenas 13 tipos de peptídeos com baixa precisão para tradução (WILSON et al., 1985; GILLESPIE, 1986; RICHTER, 1992; LI, 1981; NEDBAL & FLYNN, 1998). Atualmente poucos são os estudos filogeográficos envolvendo carrapatos o que torna mais difícil o conhecimento da história evolutiva destes aracnídeos. Dentre estes, destacamos: estudos de filogeografia de *Amblyomma variagatum* (BEATI et al., 2012), *Ixodes persulcatus* (KOVALEV & MUKHACHEVA, 2012), *Ixodes holocyclus* e *Ixodes cornuatus* (SONG et al., 2011) e *Ixodes scapularis* (TROUT et al., 2009). Avise (1998), documentou aumento explosivo dos estudos em filogeografia, com este conceito, promovendo ligação empírica e conceitual entre a sistemática e a genética de populações.

Estes estudos em filogeografia para análises comparativas tem permitido aprimorar a compreensão quanto a distribuição geográfica, as relações filogenéticas e as distâncias genéticas entre linhagens evolucionárias de diversas espécies animais, levando a um melhor entendimento quanto suas biogeografia e áreas de endemismo. Por isso foi escolhido o gene ribossomal mitocondrial 12S comprovado por resolver problemas intraespecíficos (NORRIS et al., 1999).

### **2.5. High-Resolution Melt (HRM)**

A técnica de *High-Resolution Melt* (HRM) é baseada na qPCR, sendo considerada como um método muito sensível para genotipagem. Baseando-se nas características termais de desnaturação dos amplicons analisando suas variações, a HRM tornou-se uma ferramenta de diagnóstico molecular (WITTEWATER et al., 2003), permitindo uma performance não atingida pelas clássicas análises de curvas de *melting* (dissociação) de DNA.

Usando um corante fluorescente que intercala cada nucleotídeo da fita dupla de DNA (dsDNA), o HRM pode ser usado em condições completamente saturadas (CHATEIGNER-BOUTIN & SMALL, 2007; WITTEWER et al., 2003). O *amplicon* obtido é analisado por desnaturação gradual recorrente do aumento da temperatura e o decréscimo da fluorescência causada pelo corante intercalado no dsDNA, sendo a temperatura de *melting* ( $T_m$ ) e a sua peculiar curva reflexo da sequência do DNA, do conteúdo GC e do comprimento do *amplicon* (WITTEWER, 2009; VOSSSEN et al., 2009), comparando-se como uma ótima ferramenta para obter genótipos espécies-específicos.

Devido ao aumento da demanda por análises rápidas, econômicas e de fácil execução, e do desenvolvimento das genotipagens tipo *high-throughput*, a aplicação do HRM tem sido crescente, visto que esta técnica detecta variantes de sequências sem a necessidade de reações de sequenciamento ou procedimentos de hibridização (REED & WITTEWER, 2004; MACKAY et al., 2008; WU et al., 2008; TINDALL et al., 2009), com uma acurácia da dissociação versus temperatura da curva de dissociação de 0,01°C (KRYPUY et al., 2006; PRICE et al., 2007).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Analisar a relação filogenética de populações de carrapatos do táxon *Amblyomma cajennense* de diferentes localidades e origens geográficas quanto à ocorrência de diferentes espécies sob um mesmo táxon, bem como realizar estudos de filogeografia buscando relacionar o histórico da distribuição desses carrapatos nos biomas brasileiros.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Realizar análise filogenética de carrapatos da espécie *A. cajennense* provenientes de diferentes localidades situadas nos biomas Mata Atlântica, Cerrado e Pantanal, juntamente com as sequências disponíveis no GenBank através do gene mitocondrial 12S;
- Avaliar a existência de um complexo de espécies através da filogeografia do carrapato *A. cajennense* no Brasil buscando seu perfil histórico e evolutivo bem como a dinâmica populacional através do gene mitocondrial 12S;
- Analisar novos haplótipos das diferentes populações de *A. cajennense* bem como a rede haplotípica de todas as populações;
- Aumentar quantitativamente as sequências de genes dos carrapatos *A. cajennense* em bancos de dados biológicos de acesso público.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

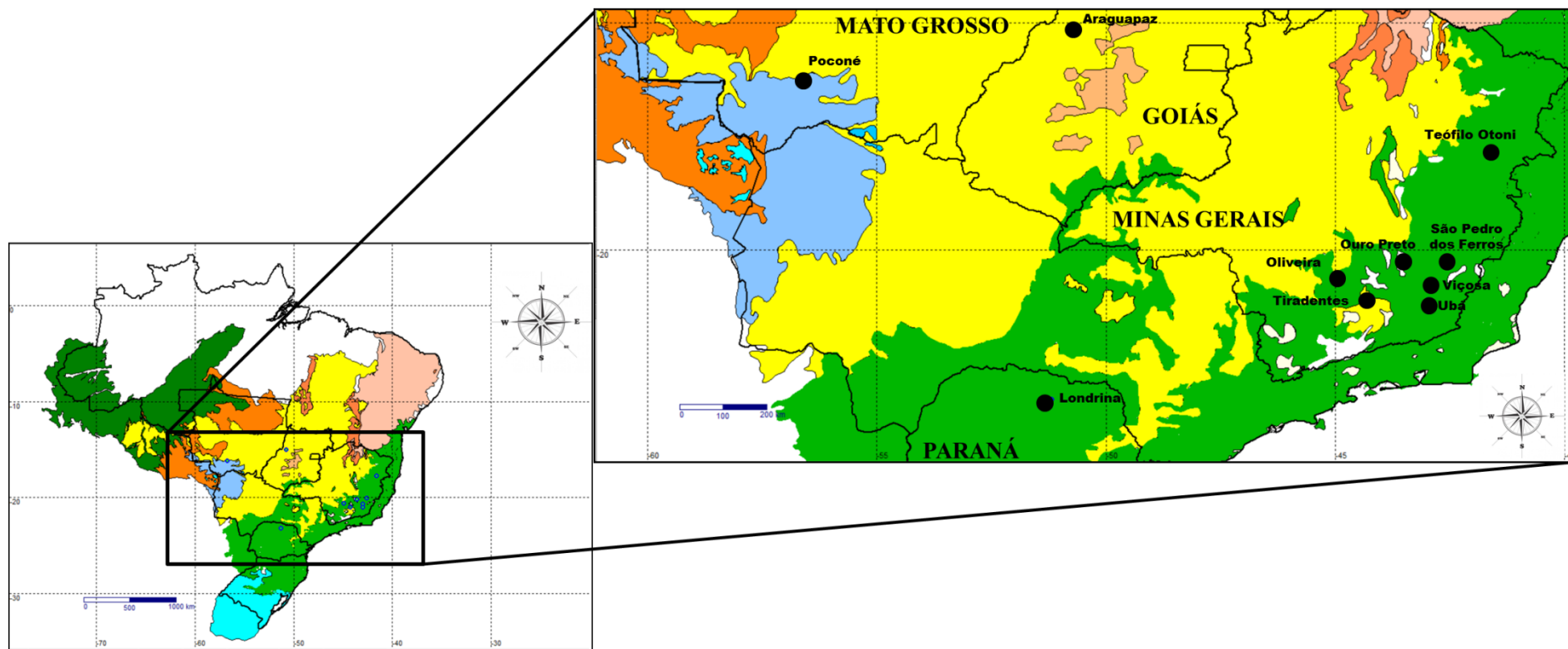
### 4.1. Obtenção de carrapatos e identificação taxonômica

Um total de 199 carrapatos de vida livre e de cavalos foram coletados de diferentes origens geográficas abrangendo os biomas Mata Atlântica, Cerrado e Pantanal (Figura 1 e Tabela 1).

Os carrapatos foram identificados por meio de análise morfológica externa com o auxílio de microscópio estereoscópico, segundo chave taxonômica para adultos de *Amblyomma* (ONOFRIO et al., 2006). Após a identificação taxonômica, os carrapatos foram armazenados a -20°C para posterior extração de DNA.

**Tabela 1.** Número de carrapatos coletados de acordo com bioma, cidade e estado de origem.

<b>Bioma</b>	<b>Cidade</b>	<b>Estado</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>N° Amostras</b>
Mata Atlântica	Teófilo Otoni	MG	17° 51' 28" S 41° 30' 18" O	5
	São Pedro dos Ferros	MG	20° 10' 12" S, 42° 31' 26" O	3
	Viçosa	MG	20° 45' 14" S, 42° 52' 55" O	61
	Ubá	MG	21° 07' 12" S 42° 56' 34" O	17
	Oliveira	MG	20° 41' 45" S 44° 49' 37" O	8
	Ouro Preto	MG	20° 23' 08" S 43° 30' 29" O	1
	Londrina	PR	23° 18' 36" S 51° 09' 46" O	1
Cerrado	Araguapaz	GO	15° 05' 27" S 50° 37' 55" O	85
	Tiradentes	MG	21° 06' 36" S 44° 10' 40" O	7
Pantanal	Poconé	MT	16° 15' 25" S, 56° 37' 22" O	11
<b>TOTAL</b>				<b>199</b>



**Figura 1.** Localização dos pontos de coleta dos carrapatos *Amblyomma cajennense*. Códigos: Verde: Mata Atlântica; Amarelo: Cerrado; Azul claro: Pantanal. Ecorregiões modificadas a partir de Olson et al., 2001.

#### 4.2. Extração de DNA e PCR em tempo real

Os carrapatos coletados foram processados individualmente no Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular (LAPEM), na Universidade Federal de Viçosa – UFV. A maceração dos ectoparasitos foi realizada com ponteira estéril, seguido da purificação com fenol/clorofórmio, de acordo com o protocolo descrito por Billings e cols. (1998) modificado conforme a seguir:

a) Lavagem dos carrapatos com solução de hipoclorito 1%. Vortex da solução seguida de descarte do hipoclorito 1%;

b) Lavagem dos carrapatos com etanol 70%. Vortex da solução seguida de descarte do etanol 70%;

c) Lavagem com água ultra pura três vezes. Vortex e descarte da água após cada lavagem;

d) Foi adicionado 200µL de tampão de lise (NaCl 0,1M; TRIS-HCl 0,21M pH 8,0; EDTA 0,05M e SDS 0,5%) seguida de incubação em banho-maria por 30 minutos a 37°C. Após este processo os carrapatos foram cortados ao meio com auxílio de bisturi estéril e depois macerados com ponteira estéril;

e) Após a incubação, foi adicionado 20µL de proteinase K (20mg/ml) seguida de incubação “overnight” a 55°C;

f) Após a incubação, foi adicionado 200 µL de fenol. Agitou-se por 5 minutos os microtubos por inversão. Após agitação os microtubos foram centrifugados a 14000rpm por 2 minutos;

g) Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante e transferido para um microtubo novo estéril. Neste novo microtubo foram adicionados 100µL de fenol e 100 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Agitou-se por 5 minutos os microtubos por inversão e depois foram centrifugados a 14000rpm por 2 minutos. Este passo foi repetido por 3 vezes para a máxima desproteinização da amostra;

h) Após a transferência do sobrenadante da última etapa de fenol e clorofórmio/álcool isoamílico, foi adicionado apenas clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) (200 µL) para a extração do fenol residual. Centrifugou-se

por 14.000rpm por 2 minutos e o sobrenadante resultante transferido para um novo microtubo de 1,5mL;

i) Precipitou-se o DNA com meio volume de acetato de sódio 7,5M (com relação ao volume adicionado de tampão de lise) e 2 volumes de etanol 100%. A precipitação ocorreu “overnight” a -20°C;

j) Após a precipitação do DNA, as amostras foram retiradas do freezer e centrifugadas a 14.000rpm por 10 minutos;

l) Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi lavado com 400µL de etanol 70%. Após a lavagem e homogeneização por inversão as amostras foram centrifugadas a 14.000rpm por 10 minutos;

m) O etanol 70% foi descartado e o *pellet* foi deixado para secar por 30 minutos. O DNA foi ressuspendido em 30µL de água ultra pura.

Para análise da qualidade do DNA extraído, foi realizada eletroforese com 5µL de DNA de cada amostra em gel de agarose (1,5%), para verificação da presença de bandas de alto peso molecular. Além da eletroforese, foi realizada a quantificação no espectrofotômetro Nanodrop (*Thermo Scientific*, EUA). Após análise da qualidade do DNA, as amostras foram estocadas -20°C para análises posteriores de *High Resolution Melting* (HRM).

A PCR em tempo real que precede a análise das curvas de dissociação (*melting*) foi realizada utilizando o par de *primers* T2A (5'-AAAGAGTGACGGGCGATATGT-3') e T1B (5'-AAACTAGGATTAGATACCCT-3') para o gene mitocondrial 12S (BEATI & KEIRANS, 2001) onde o primer T2A foi modificado com relação ao artigo de origem. O tamanho do produto esperado é de 340 pares de base (bp). Fragmentos de PCR muito grandes não são recomendáveis para a análise de HRM, pois a fluorescência decai a medida que o fragmento aumenta o que torna a captação da fluorescência pobre.

A PCR em tempo real foi realizada no termociclador *StepOne™ Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, EUA) utilizando o kit *MeltDoctor™ HRM Master Mix* (*Applied Biosystems*, EUA). O software utilizado para a análise dos resultados da PCR em tempo real foi o *StepOne Software v2.2* (*Applied Biosystems*, EUA). As amostras foram realizadas em duplicata.

### **4.3. Análise de *High Resolution Melting* (HRM)**

As análises por PCR em tempo real totalizaram 199 amostras. A PCR em tempo real assim como o HRM foram feitas no LAPEM – UFV. Após a identificação das variantes, novas placas de PCR foram realizadas, uma vez que as análises de HRM requerem controles. A identificação destes controles se fez necessária uma vez que os bancos de dados públicos carecem de haplótipos controles aliada ao pioneirismo da técnica e a alta biodiversidade no Brasil, o que dificulta obter controles padrões para todas as populações existentes de *A. cajennense*.

As curvas de dissociações geradas pelo software *StepOne Software v2.2* foram analisadas no aplicativo *High Resolution Melt Software v3.0.1* (*Applied Biosystems*, EUA). As amostras contendo haplótipos diferentes, sinalizados como variantes, foram purificadas utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (EUA) e encaminhadas para sequenciamento pelo método de Sanger na Macrogen, Coréia do Sul. Após recebimento das sequências de DNA, as mesmas foram encaminhadas para as análises filogeográficas e filogenéticas.

### **4.4. Análise filogeográfica**

As sequências foram alinhadas com o auxílio do aplicativo MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Haplótipos diferentes foram considerados através de diferentes variantes resultantes da análise de HRM, sendo as diferentes variantes baseadas na diferença de no mínimo um par de base (indels estão incluídos). A rede haplotípica foi analisada através do aplicativo *Network 4.6.1.1* (*Fluxus Technology*, Inglaterra) baseado no algoritmo *median joining network* (BANDELT et al., 1999; FOULDS et al., 1979).

### **4.5. Análise filogenética**

As sequências de DNA foram analisadas por Máxima Verossimilhança (MV) pelo aplicativo MEGA 5, sendo a Inferência Bayesiana (IB) obtida pelo aplicativo MrBayes 3.2 (RONQUIST et al., 2012). O suporte dos ramos das

árvores filogenéticas geradas foi avaliado pela análise de *bootstrap* (1.000 repetições) e pela probabilidade posterior no MrBayes. Valores de *bootstrap* e de probabilidade posterior acima de 75% foram considerados significativos. O modelo de substituição nucleotídica para MV foi determinado pelo Modeltest incluso no aplicativo MEGA 5. Duas corridas, com quatro cadeias cada para 5.000.000 gerações foram processadas simultaneamente para IB. As árvores foram amostradas a cada 100 iterações. Pela inferência bayesiana, a melhor árvore foi gerada após o valor do desvio padrão médio convergir para um valor menor que 0,01. Vinte e cinco por cento das árvores iniciais geradas foram descartadas. Os arquivos gerados contendo as árvores consensos foram analisados pelo aplicativo *FigTree v1.3.1*. As árvores foram construídas com as sequências obtidas pelo sequenciamento assim como com as sequências do gene 12S rDNA mitocondrial para *A. cajennense* depositadas no GenBank. Como grupo-externo foi usada a sequência do gene rDNA 12S mitocondrial correspondente ao carrapato da espécie *Amblyomma dubitatum* depositada no GenBank sob o número AY342256.1. A escolha desta espécie foi devido ao compartilhamento do mesmo hospedeiro que o *A. cajennense*, a capivara, e, dentro do gênero *Amblyomma*, estão filogeneticamente próximos.

#### **4.6. Análises estatísticas dos haplótipos**

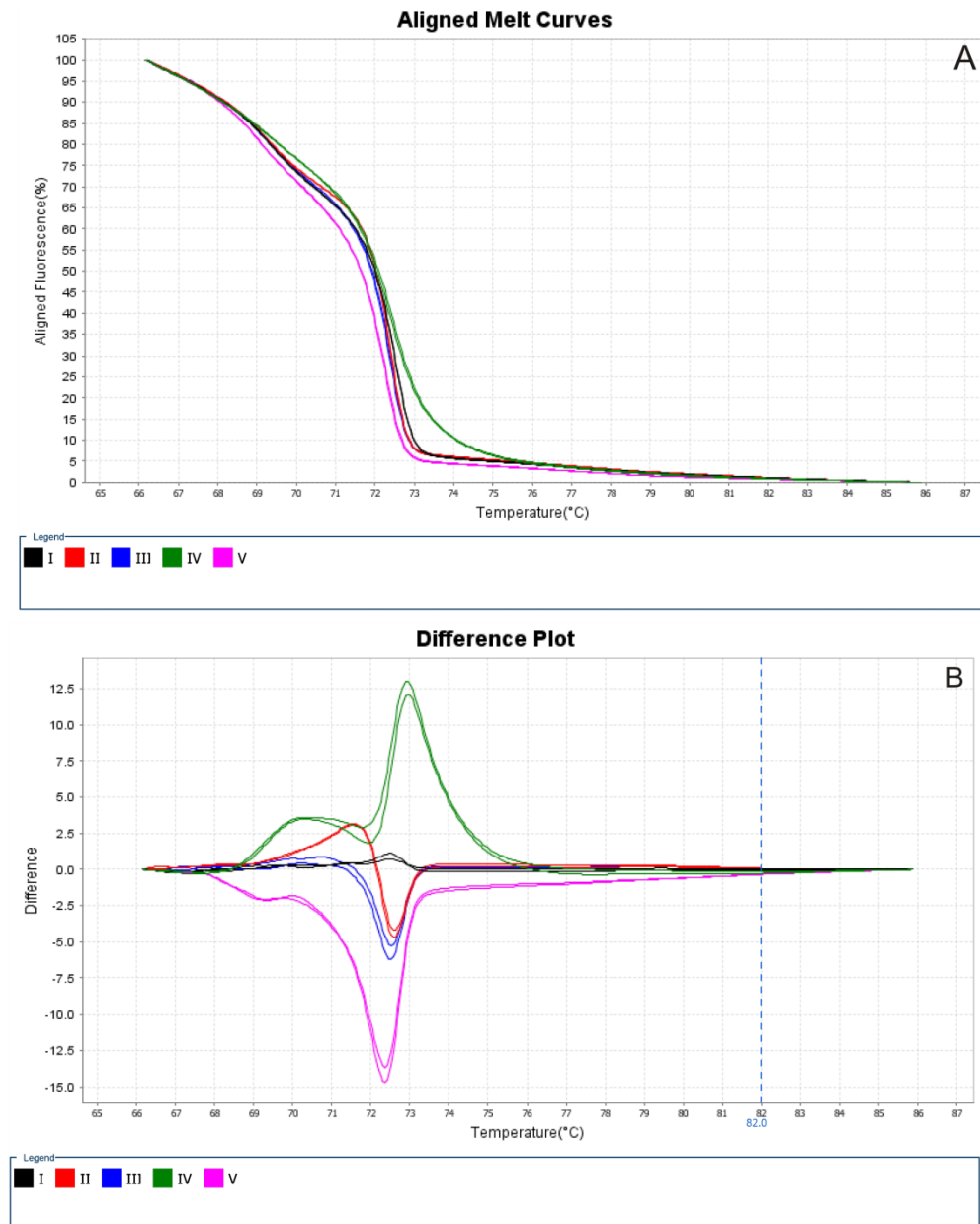
As matrizes de dados foram importados para o aplicativo ARLEQUIN 3.1 (EXCOFFIER et al., 2005), o qual foi utilizado para calcular o número de haplótipos observados/únicos ( $k$ ), o número de sítios segregantes/polimórficos ( $S$ ), a diversidade haplotípica ( $H$ ) e a diversidade nucleotídica por sítio ( $\pi$ ). A neutralidade dos dados foi testada pelos testes  $D$  de Tajima (TAJIMA, 1989) e a estatística de  $F_u$   $F_s$  (Fu, 1997). Estes testes baseiam-se no princípio de que uma expansão populacional repentina associada a um processo não neutro irá mostrar mudança na frequência alélica ou de haplótipos quando comparado a uma população em expansão sob modelo de evolução neutra de Wright-Fisher. A estrutura populacional das amostras foi testada pela análise de variância molecular (AMOVA). A

diferenciação genética par a par da população ( $F_{ST}$ ) foi calculada usando 1000 permutações. Padrões históricos da dinâmica populacional também foram investigados utilizando a distribuição de *mismatch*, na qual compara-se a distribuição observada com a esperada sob um modelo de expansão populacional (ROGERS, 1995). Essa distribuição utiliza o índice de *raggedness* ( $r$ ) como indicativo de quão a curva é suave.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Análise de *High Resolution Melt* (HRM)**

Com o auxílio do aplicativo *High Resolution Melt Software* foram identificadas cinco variantes (haplótipos) visualizadas pelos gráficos de curvas de dissociações alinhadas (Figura 2A) e de diferença (Figura 2B).



**Figura 2.** Gráfico de curvas de dissociações alinhadas (A) e de diferença (B) gerado pelo *High Resolution Melt Software* demonstrando os cinco haplótipos reconhecidos nas populações de *A. cajennense* estudadas.

Os cinco haplótipos foram identificados como I, II, III, IV e V. Após a verificação das variantes, as amostras foram purificadas e enviadas para sequenciamento a fim de obter as sequências nucleotídicas de aproximadamente 340bp. Os sítios polimórficos bem como os *indels* obtidos estão demonstrados na Figura 3.

```

456891118111122222222222233
01206889333344556778800
3290245905348681734

```

```

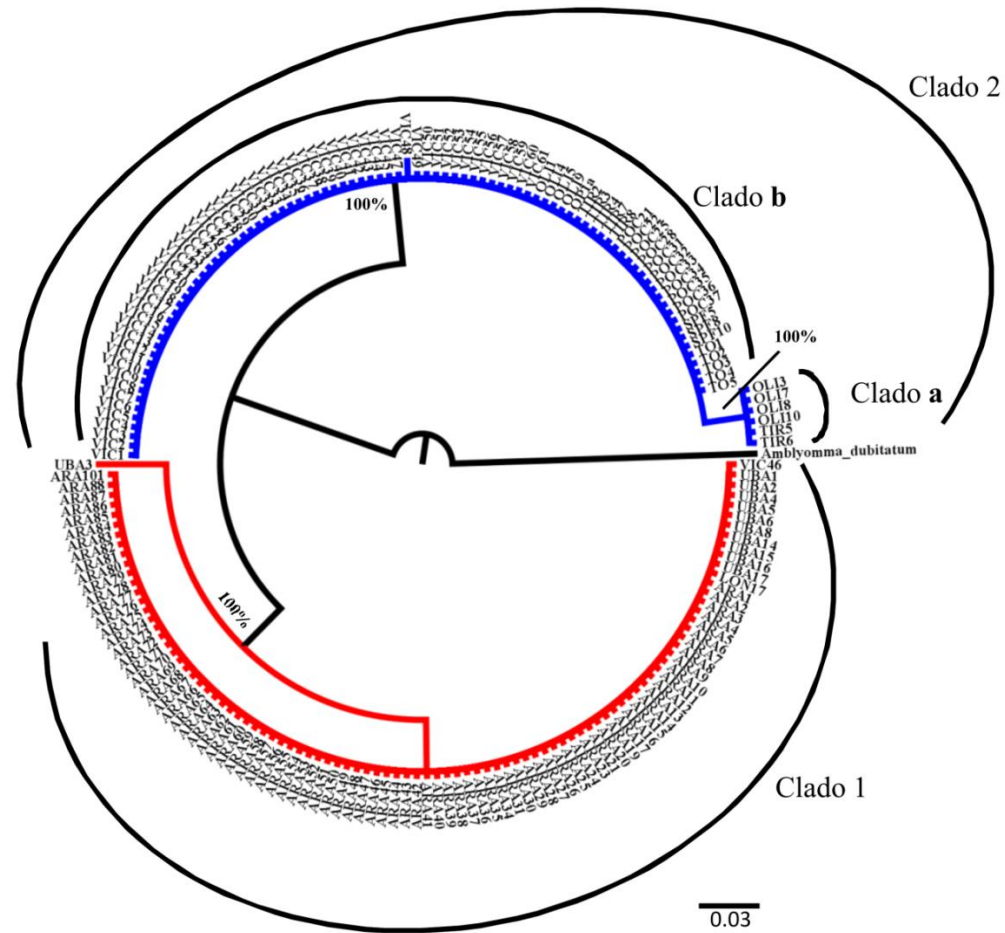
H_I      TTTATAGATGATAAATTTGGGGTGTAGG
H_II     .....G..CAGATGGAAAA..AAAGTAA
H_III    .....C....G...A...A.....
H_IV     A.AT..TGCAGATGGA.AAAAA.A.TAA
H_V      .A.TAT....G...A.....

```

**Figura 3.** Sítios polimórficos (números na parte superior) entre os cinco haplótipos (HI, HII, HIII, HIV e HV) encontrados no estudo. Os pontos indicam bases iguais à primeira sequência referente à HI.

## 5.2. Análise filogenética

A árvore filogenética resultante da IB (Figura 4) permitiu visualizar dois bem suportados clados (100% de probabilidade posterior): o Clado 1 composto por haplótipos de amostras provenientes do Cerrado (Araguapaz em Goiás) e da Mata Atlântica (Ubá, Viçosa em Minas Gerais e Londrina no Paraná) e o Clado 2 composto de amostras situadas no Cerrado (Tiradentes em Minas Gerais), Mata Atlântica (Viçosa, Teófilo Otoni, São Pedro dos Ferros, Ouro Preto, Oliveira em Minas Gerais) e Pantanal (Poconé no Mato Grosso). O modelo de substituição nucleotídica escolhido pelo critério AIC (*Akaike Information Criterion*) foi o GTR. A árvore originada pelo método ML resultou topologia similar à IB e está apresentada no Anexo I.



**Figura 4.** Árvore resultante da análise de Inferência Bayesiana pelo aplicativo MrBayes 3.2 e amostras coletadas em diferentes biomas após 5.000.000 gerações. Os números nos ramos representam probabilidade posterior. Em vermelho está indicado o Clado 1 e em azul o Clado 2. As cidades que compõem o Clado a e o Clado b assim como os biomas estão descritas no texto.

É nítido a divisão em dois subclados dentro do Clado 2: o Clado **a** e o Clado **b**. O Clado a é composto por haplótipos provenientes do Cerrado (cidade de Tiradentes, MG) e da Mata Atlântica (cidade de Oliveira, MG). No Clado b além do Cerrado (Tiradentes, MG) e Mata Atlântica (Viçosa, Oliveira, Ouro Preto e São Pedro dos Ferros em Minas Gerais) observou-se a presença da cidade de Poconé (MT), situada no Pantanal. Dessa forma, duas grandes populações de *A. cajennense* foram formadas sendo o Clado 2 subdividido em duas subpopulações.

A fim de comparar a distribuição de diferentes populações de *A. cajennense* nas Américas, sequências depositadas no GenBank foram utilizadas para comparação filogenética no continente americano. A árvore filogenética resultante pela IB de todas as sequências de *A. cajennense* depositadas no GenBank está demonstrada na Figura 5 incluindo as obtidas neste estudo (números do GenBank em processo de submissão). As sequências utilizadas encontram-se na Tabela 2. O modelo de substituição nucleotídica foi o GTR+I+G escolhido pelo critério AIC.

Observa-se a formação de quatro clados: Clado 1 o mais basal formado apenas por sequências da Argentina situadas nas regiões do Chaco Serrano e Chaco Ocidental com 100% de probabilidade posterior; Clado 2 com probabilidade posterior de 100% formado por sequências da cidade de Jaen no Peru; Clado 3 bem suportado (probabilidade posterior de 90%) contendo a maioria das sequências do Brasil (com exceção da sequência Isolate\_BRRO proveniente do estado de Rondônia) e duas sequências da Argentina (Isolate\_AR8 e Isolate\_AR10) provenientes da região de Yungas argentino; Clado 4 formado por sequências provenientes da Costa Rica (cidade de Guanacaste), Guatemala, países pertencentes da América Central, México (cidade de Veracruz) e Estados Unidos da América (Oakland) na América do Norte, e Equador (Quito) e Brasil (estado de Rondônia) da América do Sul. Na Figura 6 mostra-se a região onde os clados se encontram no continente americano.

**Tabela 2.** Países e regiões das sequências do gene 12S de *A. cajennense* depositadas no GenBank utilizadas nas análises.

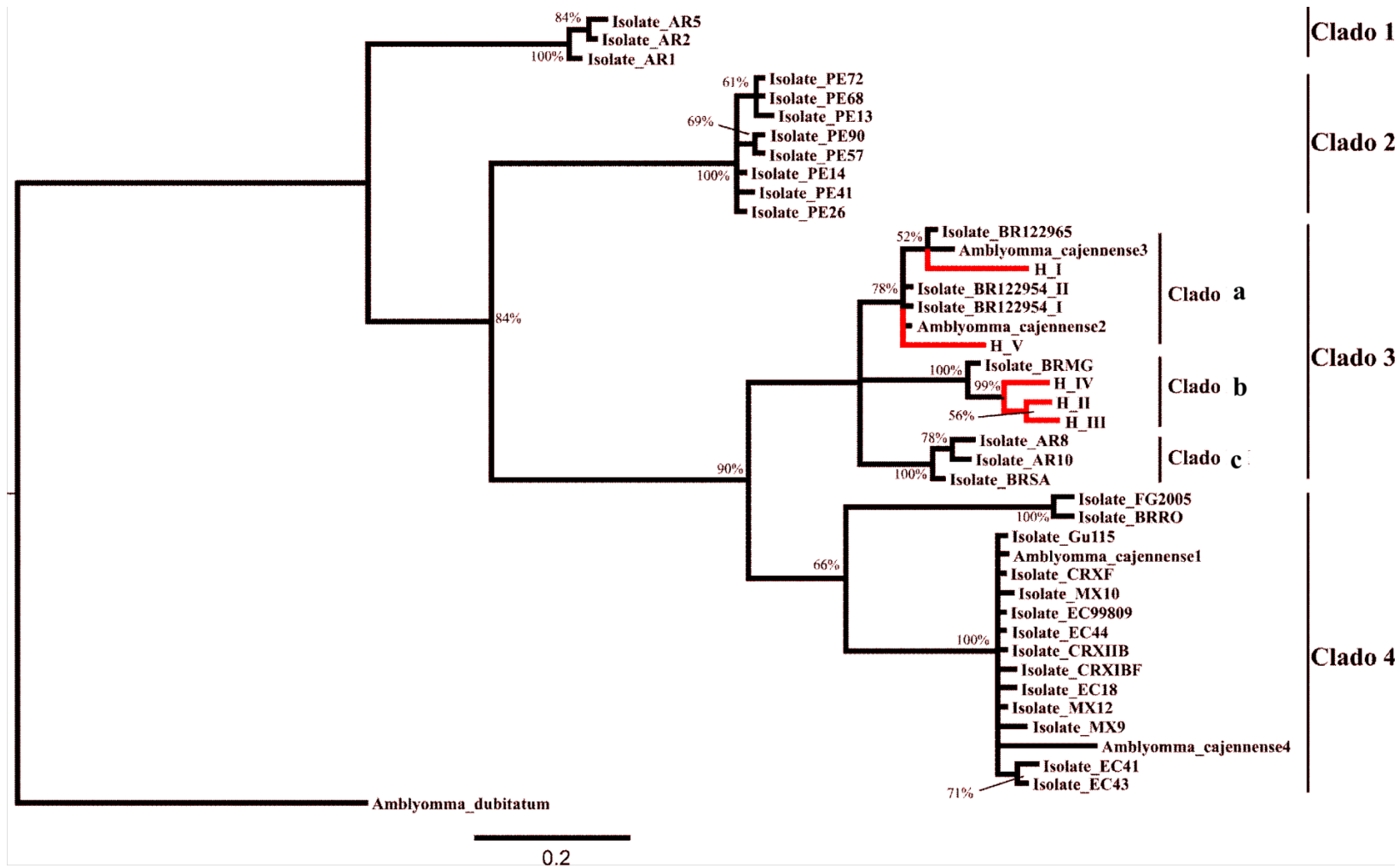
<b>Nome</b>	<b>País</b>	<b>Região</b>	<b>ID</b>
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate Gu115	Guatemala	nd	JF523333.1
<i>Amblyomma cajennense</i>	Guatemala	Moyuta	JF437644.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate BR122965	Brasil	Minas Gerais	EU791612.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate BRMG	Brasil	Minas Gerais	EU791610.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate BR122954 (I)	Brasil	Minas Gerais	EU791611.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate BR122954 (II)	Brasil	Minas Gerais	EU791613.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate BRSA	Brasil	Rio de Janeiro	EU791609.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate BRRO	Brasil	Rondônia	EU791605.1
<i>Amblyomma cajennense</i>	Brasil	nd	AY342288.1
<i>Amblyomma cajennense</i>	Brasil	nd	AY342291.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate AR8	Argentina	Yungas	EU791608.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate AR5	Argentina	Chaco Ocidental	EU791604.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate AR1	Argentina	Chaco Serrano	EU791602.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate AR10	Argentina	Yungas	EU791607.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate AR2	Argentina	Chaco Serrano	EU791603.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate FG2005	Guiana Francesa	nd	EU791606.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate PE72	Peru	Jaen	EU791600.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate PE90	Peru	Jaen	EU791598.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate PE14	Peru	Jaen	EU791596.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate PE41	Peru	Jaen	EU791594.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate PE68	Peru	Jaen	EU791601.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate PE57	Peru	Jaen	EU791599.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate PE26	Peru	Jaen	EU791597.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate PE13	Peru	Jaen	EU791595.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate CRXF	Costa Rica	Guanacaste	EU791592.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate CRXIIB	Costa Rica	Guanacaste	EU791593.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate CRXIBF	Costa Rica	Guanacaste	EU791591.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate EC41	Equador	Quito	EU791588.1

<i>Amblyomma cajennense</i> isolate EC99809	Equador	Quito	EU791586.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate EC44	Equador	Quito	EU791584.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate EC43	Equador	Quito	EU791589.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate EC18	Equador	Quito	EU791587.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate MX10	México	Veracruz	EU791590.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate MX12	México	Veracruz	EU791585.1
<i>Amblyomma cajennense</i> isolate MX9	México	Veracruz	EU791583.1
<i>Amblyomma cajennesse</i>	EUA	Oakland	U95850.1
<i>Amblyomma dubitatum</i>	Uruguai	nd	AY342256.1
<i>Amblyomma cajennense</i> haplótipo I	Brasil	Minas Gerais	nd
<i>Amblyomma cajennense</i> haplótipo II	Brasil	Minas Gerais	nd
<i>Amblyomma cajennense</i> haplótipo III	Brasil	Minas Gerais	nd
<i>Amblyomma cajennense</i> haplótipo IV	Brasil	Minas Gerais	nd
<i>Amblyomma cajennense</i> haplótipo V	Brasil	Minas Gerais	nd

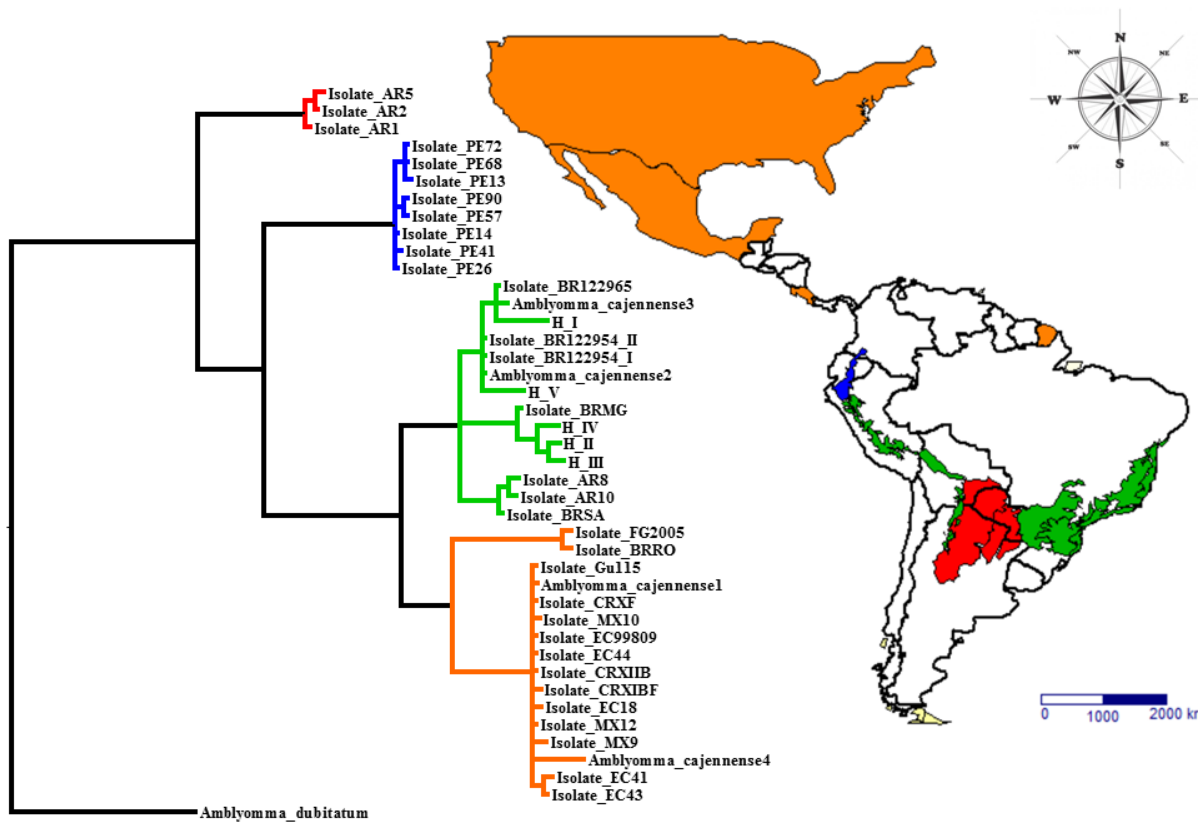
---

Nota: nd – não disponível

No Clado 3 observam-se três subdivisões: Clado I em que os háplótipos I e V estão agrupados com *A. cajennense* de Corumbá, MS (Isolate\_BR122954\_I, Isolate\_BR122954\_II e Isolate\_BR122965); Clado II que envolve os háplótipos II, III, IV com o isolado BRMG; e por último o Clado III contendo um isolado do Rio de Janeiro e dois háplótipos da região de Yungas na Argentina. A árvore gerada pela MV (Anexo I) demonstrou topologia semelhante a IB.



**Figura 5.** Árvore filogenética construída pela análise de Inferência Bayesiana baseada no gene mitocondrial 12S após 3.000.000 de gerações. Os números nos ramos demonstram a probabilidade posterior. Os ramos em vermelho representam os haplótipos encontrados no presente estudo.



**Figura 6.** Mapa contendo América do Sul, América Central, México e EUA indicando a localização dos clados resultantes da árvore filogenética pela análise de Inferência Bayesiana. Códigos: Vermelho: Clado 1 na região do chaco argentino; Azul: Clado 2 com florestas montanhosas reais da Cordilheira dos Andes; Verde: Clado 3 nas regiões do Yungas argentino e Mata Atlântica brasileira; Laranja: Clado 4 com florestas úmidas da Costa Rica, Guatemala, Equador, Guiana Francesa, México e florestas temperadas dos Estados Unidos da América.

### 5.3. Análise de haplótipos

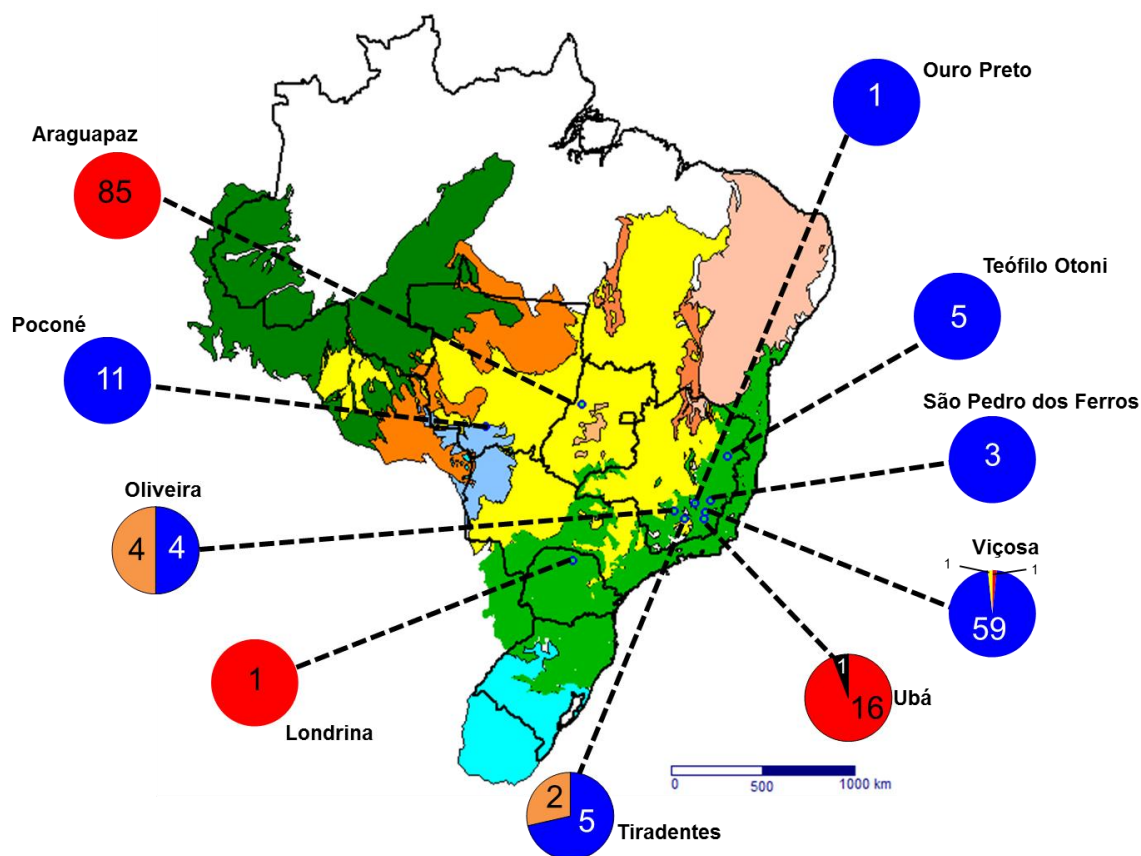
Foi alinhado um fragmento de 329bp, sendo obtidos 5 haplótipos com 287 sítios invariáveis e 28 sítios variáveis (polimórficos) das 199 sequências analisadas.

Dos cinco haplótipos identificados neste estudo, três foram encontrados em mais de um bioma (haplótipos I, II e IV) e dois (V e III) localizaram-se apenas na Mata Atlântica. A distribuição dos haplótipos nos locais de coleta encontra-se na Tabela 3.

**Tabela 3.** Distribuição dos haplótipos nos biomas e nas respectivas cidades de origem.

Bioma	Cidade	Estado	Haplótipos					TOTAL
			I	II	III	IV	V	
Mata Atlântica	Teófilo Otoni	MG		5				5
	São Pedro dos Ferros	MG		3				3
	Viçosa	MG	1	59	1			61
	Ubá	MG	16				1	17
	Oliveira	MG		4		4		8
	Ouro Preto	MG		1				1
	Londrina	PR	1					1
Cerrado	Araguapaz	GO	85					85
	Tiradentes	MG		5		2		7
Pantanal	Poconé	MT		11				11
TOTAL			103	88	1	6	1	199

A Figura 7 mostra a distribuição dos cinco haplótipos de acordo com a região e bioma de origem.



**Figura 7.** Distribuição dos cinco haplótipos encontrados no presente estudo de acordo com o bioma e cidade de origem. Os números no interior dos gráficos indicam a frequência dos haplótipos. Códigos: Azul: haplótipo II; Vermelho: haplótipo I; Amarelo: haplótipo III; Preto: haplótipo V; Laranja: haplótipo IV. Biomas: Mata Atlântica em verde claro; Cerrado em amarelo; Pantanal em azul claro.

Pela análise de AMOVA (Tabela 4) observou-se que as populações de *A. cajennense* estão estruturadas em duas grandes populações corroborando a estrutura indicada na Figura 5. O maior valor de variação foi entre as populações (Clado 1 e Clado 2) com 97,33% de variância e uma pequena porcentagem, 2,67%, de variância dentro das populações. O alto valor de  $F_{ST}$  também sugere a estruturação genética observada pela análise de AMOVA.

**Tabela 4.** Análise de variância molecular (AMOVA) para os grupos e populações de haplótipos de *A. cajennense* nos biomas de Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal no Brasil. AMOVA realizada com 1.000 permutações.

Origem de variação	Valor de $p \pm SD$	Valor de FST	Porcentagem de variância
Entre populações	0,00000 $\pm$ 0.00000	0,97332	97,33
Dentro das populações	nd	nd	2,67

Duas populações: Clado 1 formado pelas amostras de Araguapaz, Viçosa, Ubá e Londrina e; Clado 2 composto por amostras de Viçosa, Teófilo Otoni, Ouro Preto, São Pedro dos Ferros, Tiradentes e Poconé. nd – Não determinado.

A AMOVA resultante da estruturação populacional de *A. cajennense* nas Américas (Tabela 5) também se mostrou significativa para formação de diferentes populações de *A. cajennense* observados na Figura 6 onde a maior variação foi entre os grupos (47,95%), seguido de 46,04% de variação das populações dentro dos grupos. A menor porcentagem (6%) foi dentro das populações. Os grupos foram organizados da seguinte forma: Grupo 1 contendo populações (haplótipos) referentes ao Clado **a**, Clado **b**, Clado **c** e haplótipos da região de Yungas na Argentina (Isolate AR8 e Isolate AR10); Grupo 2 contendo populações do Clado 2 e Clado 3 e; Grupo 3 contendo populações do Clado 4 e haplótipos da região amazônica (Isolate BRRO e Isolate FG2005).

**Tabela 5.** Análise de variância molecular (AMOVA) para os grupos e populações de haplótipos de *A. cajennense* das Américas realizado com 1.000 permutações.

Origem de variação	Valor de $p \pm SD$	Valor de FST	Porcentagem de variância
Entre grupos	0 $\pm$ 0	0,48	47,95%
Entre populações dentro dos grupos	0 $\pm$ 0	0,88	46,04%
Dentro das populações	0,006 $\pm$ 0,002	0,94	6%

Grupos definidos como: Grupo 1 (4 populações: Clado I, Clado II, Clado III e Yungas na Argentina; Grupo 2 (2 populações: Clado 2 e Clado 3 e; Grupo 3 (2 populações: Clado 4 e região Amazônica.

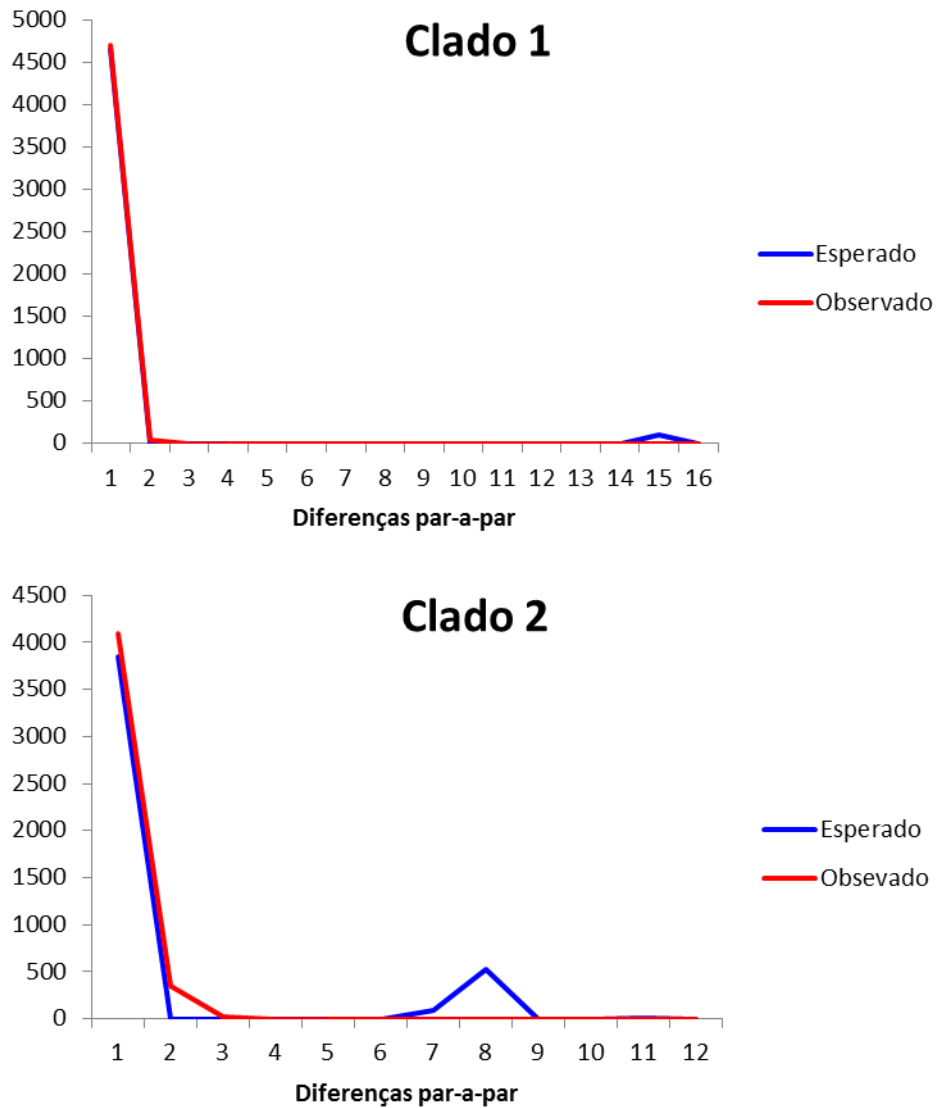
A diversidade genética (diversidade haplotípica + diversidade nucleotídica) foi baixa para os dois clados. O teste D de Tajima para ambos os clados foi negativo o que indica população em expansão e, ou, excesso de polimorfismos de baixa frequência (raros). A significância do teste D no

Clado 1 pode sugerir a presença de seleção natural ao contrário do que indicou para o Clado 2 que apresenta neutralidade. Como o teste de Fu possui um poder maior que o teste D de Tajima (FU, 1997), a sua não significância demonstra presença de evolução neutra em ambos os cladros (Tabela 6). A distribuição de *mismatch* também indicou que ambos os cladros estão em expansão o que é caracterizado por um único pico (Figura 9). Os altos valores do índice de *raggedness* apontam a presença dos picos acentuados nos gráficos de distribuição de *mismatch*.

**Tabela 6.** Estatísticas descritivas dos haplótipos de *A. cajennense* estudadas.

Grupo	Ns	S	k	H ± SD	π ± SD	Teste D Tajima	Teste Fu's	r
						D(p)	Fs (p)	
Clado 1	98	13	2	0,0204 ± 0,0199	0,0008 ± 0,0011	-2,4199 (0,00)	1,136 (0,55)	0,96
Clado 2	95	6	3	0,1393 ± 0,0467	0,0030 ± 0,0023	-0,9938 (0,18)	2,531 (0,89)	0,76

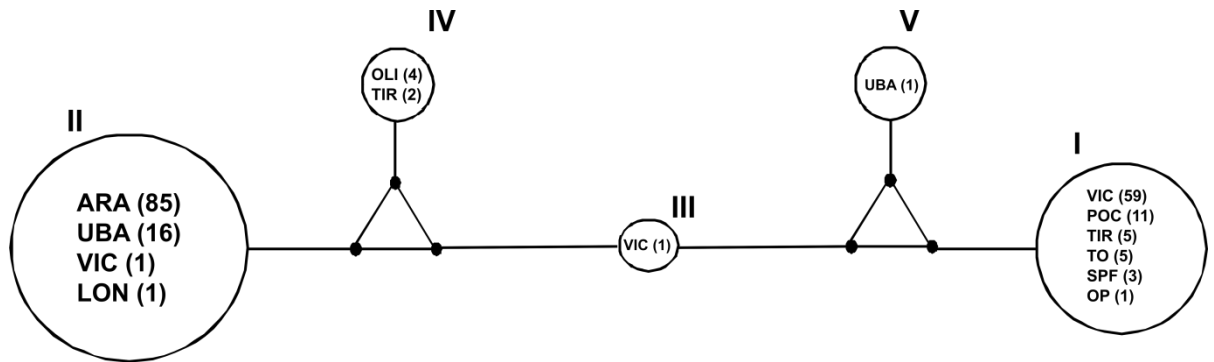
Ns, n° de sequências; S, sítios segregantes; k, n° de haplótipos; H, diversidade haplotípica ± SD; π, diversidade nucleotídica/sítio ± SD; Rg, índice de *raggedness* obtido pela análise de distribuição de *mismatch*. Os valores de *p* estão entre parênteses.



**Figura 8.** Análise de distribuição de *mismatch* das variações haplotípicas das diferentes populações de *A. cajennense* demonstrando a presença de um único pico nos 2 clados.

#### 5.4. Análise filogeográfica

A rede indica o fluxo gênico por apresentar os haplótipos I e IV tanto no Cerrado quanto na Mata Atlântica e o haplótipo II no Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. O haplótipo III parece ser um intermediário entre os haplótipos I, II, IV e V.



**Figura 9.** Rede de haplótipos gerada pelo aplicativo *Network* por meio do algoritmo *Median Joining*. Os pontos pretos significam informações faltantes ou amostragem não realizada. Códigos: ARA: Araguapaz; UBA: Ubá; VIC: Viçosa; LON: Londrina; OLI: Oliveira; TIR: Tiradentes; POC: Poconé; TO: Teófilo Otoni; SPF: São Pedro dos Ferros; OP: Ouro Preto.

## 6. DISCUSSÃO

Apesar da grande importância médica-veterinária da espécie *A. cajennense*, ainda não se encontra na literatura estudos sobre evolução e estruturação genética desta espécie. Este conhecimento é valioso uma vez que este carrapato é vetor de vários micro-organismos patogênicos. Neste contexto a presença de diferentes haplótipos num único táxon pode sugerir a presença de diferentes espécies ou o surgimento de novas mutações devido a diversos fatores, como por exemplo, o isolamento geográfico.

A filogeografia é mais bem entendida sob a perspectiva de mutações neutras de acordo com o modelo de Wright-Fisher. Essa visão facilita a interpretação da evolução das sequências de DNA bem como a dos organismos. O teste de Fu mostrou que os dois clados formados estão de acordo com a teoria neutra.

Esperava-se que as populações de diferentes biomas fossem diferentes genética e geograficamente ao apresentar diferentes haplótipos e isolados entre eles. Contudo, constatou-se que as populações estão em simpatria e expansão demográfica. A diversidade genética corrobora estes fatos ao apresentar baixos valores de diversidade haplotípica (0,0204 e 0,1393 para o Clado 1 e Clado 2, respectivamente) e diversidade nucleotídica (0,0008 e 0,0030 para o Clado 1 e Clado 2, respectivamente). Embora estudos com outros carrapatos demonstrem maiores valores de diversidade de haplótipos para o gene 16S (MIXSON et al., 2006; TROUT et al., 2010) a baixa diversidade genética pode ser explicada também pela amostragem tendenciosa de *A. cajennense* no presente estudo já que a maioria dos carrapatos foram coletados de cavalos (MCCOY et al., 2005; de MEEÛS et al., 2010).

Apesar da amostragem tendenciosa, a baixa diversidade genética é também embasada pela rede de haplótipos onde se percebe a prevalência dos haplótipos I, II e IV em mais de um bioma. Entretanto, a presença de *singletons* (haplótipos únicos) pode indicar o surgimento de novas populações. A rede sugere que as populações estão em simpatria, embora a alopatria possa estar se iniciando já que *singletons* são observados. A

possibilidade de expansão de novos haplótipos demonstra que o aumento da amostragem poderá identificar novas populações ou aumentar a diversidade genética. Por outro lado, a ocorrência desses novos haplótipos entre os diferentes biomas pode ser reflexo da migração de hospedeiros acarretado pelo homem. Viçosa, um dos locais de coleta de carrapatos, foi alvo de importação de cavalos provenientes de São Paulo e das regiões Sul do estado e Leste de Minas Gerais na década de 80. Coincidentemente, este foi o local que apresentou maior número de haplótipos. Como os carrapatos dependem dos hospedeiros para completarem seus ciclos, a migração de animais também refletirá na migração de ectoparasitos.

A hipótese de que o táxon *A. cajennense* seja um complexo de espécies ainda é persistente uma vez que existem diferentes haplótipos em populações geograficamente distintas. Outros trabalhos fortalecem esta hipótese. Estudos reprodutivos tem demonstrado que populações diferentes de *A. cajennense* apresentam graus variáveis de isolamento reprodutivo. Labruna e cols. (2011) e Mastropaolo e cols. (2011) mostraram que a taxa de fertilidade é próxima de zero quando cruzamentos entre *A. cajennense* situados no Brasil, Argentina, Colômbia e entre populações de diferentes regiões na Argentina, respectivamente. Este fato é característico de isolamentos pós zigóticos (barreira de isolamento reprodutivo onde os zigotos híbridos tem sua viabilidade reduzida ou nula) e a ocorrência de espécies crípticas (espécies morfológicamente iguais ou semelhantes, porém sem inter-reprodução) podem estar ocorrendo dentro deste táxon.

A nível continental observou-se nitidamente a segregação de diferentes populações de *A. cajennense* de acordo com distintas vegetações presentes nas Américas. O resultado da AMOVA na Tabela 4 e a Figura 7 demonstram como as populações estão altamente estruturadas. A suspeita da ocorrência de um complexo aumenta quando estudos filogenéticos usando marcadores distintos, tais como o ITS2 do rDNA (MARRELI et al., 2007) e genomas mitocondriais completos (BURGER et al., 2012) indicam que o gênero *Amblyomma* ainda não está bem definido filogeneticamente. O uso de mais marcadores moleculares, tais como região controle, citocromo c oxidase e

18S deverão auxiliar no melhor entendimento da história evolutiva bem como a estruturação genética desta espécie.

O melhor conhecimento da situação taxonômica do *A. cajennense* refletir-se-á também em um melhor entendimento da prevalência de patógenos transmitidos por este carrapato. Se um complexo existe, este provavelmente poderá explicar o comportamento de certas bactérias que até hoje não são bem entendidos como, por exemplo, a *R. rickettsii* agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira. Alguns haplótipos podem ser mais suscetíveis à infecção por *R. rickettsii* do que outros. Por exemplo, nos EUA, existem duas grandes linhagens de *Ixodes scapularis*, o principal vetor da bactéria *Borrelia burgdorferi*. Qiu & cols., (2002) observaram que as linhagens situadas no norte são mais suscetíveis em transmitir a borreliose do que as linhagens do sul.

Por fim, apesar da baixa diversidade genética, o presente estudo sugere que o táxon *A. cajennense* seja um complexo, visto os problemas filogenéticos ainda persistentes, bem como possíveis isolamentos reprodutivos e a presença de haplogrupos bem definidos. Uma amostragem mais vasta dentre os biomas do Brasil deverá ser realizada para corroborar esta hipótese, juntamente com estudos reprodutivos de carrapatos de outras regiões e ensaios citogenéticos (estudo do cariótipo) deste carrapato.

## 7. CONCLUSÕES

Considerando os espécimes de carrapatos *A. cajennense* utilizados, bem como os marcadores genéticos avaliados, pode-se concluir que:

- O presente estudo demonstrou que os biomas Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal apresentam populações de *A. cajennense* em simpatria;
- Observaram-se populações filogeneticamente próximas associadas a diferentes perfis vegetativos: Yungas argentino e a Mata Atlântica brasileira; Chaco Serrano e Chaco Ocidental; Florestas montanhosas reais da Cordilheira dos Andes, florestas úmidas da Costa Rica, Guatemala, Equador, Guiana Francesa, México e florestas temperadas dos Estados Unidos da América;
- Apesar da baixa diversidade genética, o presente estudo sugere que o táxon *Amblyomma cajennense* é um complexo, uma vez que existem populações geneticamente diferentes e bem estruturadas relacionadas com tipos vegetativos ao longo do continente americano. O uso de mais marcadores moleculares, a citogenética e a reprodução entre diferentes populações de *A. cajennense* deverão aumentar a compreensão da história evolutiva do *A. cajennense*;
- A prevalência de algumas doenças, como por exemplo a FMB, pode estar associada com haplótipos específicos, o que poderia explicar as diferentes taxas de infectividade ao longo do Brasil;
- Mais coletas devem ser realizadas especialmente nos biomas ausentes no trabalho (Floresta Amazônica, Caatinga e Pampas Gaúchos) para um melhor entendimento do perfil filogeográfico deste carrapato;

## 8. REFERÊNCIAS

- ARAGÃO HB, FONSECA F. Notas de ixodologia V. A propósito de validade de algumas espécies do gênero *Amblyomma* do continente Americano (Acari: Ixodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.51: p.485-492, 1953.
- AVISE JC. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. **Molecular Ecology**, v.7: p.371-379, 1998.
- AVISE JC, ARNOLD J, BALL RM, BERMINGHAM E, LAMB T, NEIGEL JE, REEB CA, SAUNDERS NC. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.18: p.489-522, 1987.
- BANDELT H-J, FORSTER P, RÖHL A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, n.1: p.37-48, 1999.
- BARRÉ N, UILEMBERG G, MOREL PC, CAMUS E. Danger of introducing heartwater onto the American mainland: Potential role of indigenous and exotic *Amblyomma* ticks. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.54: p.405-417, 1987.
- BARROS-BATTESTI DM, ARZUA M, BECHARA GH. *Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies*. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan; 2006.
- BEATI L, BARROS-BATTESTI DM, LABRUNA MB, GUGLIELMONE AA, CORNEJO CG, CACERES A, FACCINI JLH, LEON R, BLACKFORD EJ. Phylogeography of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), a widespread American tick species, based on the analysis of mitochondrial gene sequences. In: Entomological Society of America Annual Meeting, 2007,
- BEATI L, KEIRANS JE. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological

characters. **Journal of Parasitology**, v.87: p.32-48, 2001.

BEATI L,PATEL J,LUCAS-WILLIAMS H,ADAKAL H,KANDUMA EG,TEMBO-MWASE E,KRECEK R,MERTINS JW,ALFRED JT,KELLY S,KELLY P.

Phylogeography and demographic history of *Amblyomma variegatum*, the Tropical Bont tick. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.12, n.6: p.514-524, 2012.

BERMINGHAM E,MORITZ C. Comparative phylogeography: concepts and applications. **Molecular Ecology**, v.7: p.367-369, 1998.

BILLINGS AN,YU X,WALKER DH,TEEL PD. Detection of a spotted fever group Rickettsia in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. **Journal of Medical Entomology**, v.35: p.474-478, 1998.

BURGER TD,SHAO R,BEATI L,MILLER H,BARKER SC. Phylogenetic analysis of ticks (Acari: Ixodida) using mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes indicates that the genus *Amblyomma* is polyphyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.64: p.45-55, 2012.

BURKMAN EJ. **Genetic structure of *Amblyomma cajennense* (acari: ixodidae) populations based on mitochondrial gene sequences.**

Statesboro, Florida International University, 2009. p.57, Thesis.

CHATEIGNER-BOUTIN A,SMALL I. A rapid high-throughput method for the detection and quantification of RNA editing based on high-resolution melting of amplicons. **Nucleic Acids Research**, v.35: p.e114, 2007.

DANTAS-TORRES F,CASTILHO VO,BARROS-BATTESTTI DM. The Ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic & Applied Acarology**, v.14: p.30-46, 2009.

DANTAS-TORRES F,VENZAL JM,BERNARDI LFO,FERREIRA RL,ONOFRIO VC,MARCILI A,BERMÚDEZ SE,RIBEIRO AF,BARROS-BATTESTTI DM,LABRUNA MB. Description of a New Species of Bat-Associated Argasid Tick (Acari: Argasidae) from Brazil. **The Journal of Parasitology**, v.98: p.36-45, 2012.

DE MEEÛS T,KOFFI BB,BARRÉ N,DE GARINE-WICHATITSKY M,CHEVILLON C. Swift sympatric adaptation of a species of cattle tick to a

new deer host in New Caledonia. **Infection, Genetics and Evolution**, v.10: p.976-983, 2010.

DIAS E, MARTINS AV. Spotted fever in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine**, v.19: p.103-108, 1939.

ESTRADA-PEÑA A, GUGLIELMONE AA, MANGOLD AJ. The distribution and ecological "preferences" of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.98: p.283-292, 2004.

EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. **Arlequin ver 3.0: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis**. 2005. 47-50,

FOULDS LR, HENDY MD, PENNY D. A graph theoretic approach to the development of minimal phylogenetic trees. **Journal of molecular Evolution**, v.13, n.2: p.127-149, 1979.

FU Y-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v.147: p.915-925, 1997.

GILLESPIE JH. Variability of evolutionary rates of DNA. **Genetics**, v.113: p.1077-1091, 1986.

GUGLIELMONE AA, BECHARA GH, SZABÓ MPJ. Ticks of importance for domestic animals in Latin America and Caribbean countries. In: International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases-2 of the European Commission INCO-DEV programme, 2004,

GUGLIELMONE AA, MANGOLD AJ, AUFRANC CR. *Haemaphysalis juxtakochi*, *Ixodes pararicinus* and *Otobius megnini* in relation to the phytogeography of Argentina. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v.67: p.91-93, 1992b.

GUGLIELMONE AA, MANGOLD AJ, OYOLA BC. Ciclo de vida del *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) en condiciones de laboratorio. **Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires)**, v.73: p.184-187, 1992a.

GUGLIELMONE AA, ROBBINS RG, APANASKEVICH DA, PETNEY TN, ESTRADA-PEÑA A, HORAK IG, SHAO R, BARKER SC. The Argasidae,

Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v.2528: p.1-28, 2010.

GUGLIELMONE AA, SZABÓ MPJ, MARTINS JR, ESTRADA-PEÑA A.

Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In. *Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies*. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan; 2006. p.115-124.

KOVALEV SY, MUKHACHEVA TA. Phylogeographical structure of the tick *Ixodes persulcatus*: A novel view. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.3, n.4: p.212-218, 2012.

KRYPUY M, NEWNHAM GM, THOMAS DM, CONRON M, DOBROVIC A. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. **BMC Cancer**, v.6: p.295, 2006.

LABRUNA MB, SOARES JF, MARTINS TF, SOARES HS, CABRERA RR.

Cross-mating experiments with geographically different populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.54: p.41-49, 2011.

LABRUNA MB, VENZAL JM. *Carios fonsecai* sp. nov. (Acari, Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. **Acta parasitologica**, v.54, n.4: p.355-363, 2009.

LI WH. A simulation study of Nei and Li's model for estimating DNA divergence from restriction enzyme maps. **Journal of Molecular Ecology**, v.17: p.251-255, 1981.

LINTHICUM KJ, LOGAN TM, BAILEY CL, GORDON SW, PETERS CJ, MONATH TP, OSORIO J, FRANCY DB, MCLEAN RG, LEDUC JW, GRAHAM RR, JAHRLING PB, MOULTON JR, DOHM DJ. Venezuelan equine encephalomyelitis virus infection and transmission by the tick *Amblyomma cajennense* (Arachnida: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.28: p.405-409, 1991.

MACKAY JF, WRIGHT CD, BONFIGLIOLI RG. A new approach to varietal

identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars. **Plant Methods**, v.4: p.8, 2008.

MAFRA CL, YOSHINARI NH, FAMADAS KM, CALIC SB, CUNHA NC, PINTER A, BARROS-BATTESTI DM. Rickettsiosis and other tick and flea-borne emerging diseases under the perspective of the Brazilian biomes. **Biomédica**, v.31, n. Suplemento No. 1: p.31-48, 2011.

MARRELI MT, SOUZA LF, MARQUES RC, LABRUNA MB, MATIOLI SR, TONON AP, RIBOLLA PEM, MARINOTTI O, SCHUMAKER TTS. 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**, v.44, n.2: p.228-228, 2007.

MASTROPAOLO M, NAVA S, GUGLIELMONE AA, MANGOLD AJ. Biological differences between two allopatric populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Argentina. **Experimental and Applied Acarology**, v.53: p.371-375, 2011.

MCCOY KD, CHAPUIS E, TIRARD C, BOULINIER T, MICHALAKIS Y, BOHEC CL, MAHO YL, GAUTHIER-CLERC M. Recurrent evolution of host-specialized races in a globally distributed parasite. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.272: p.2389-2395, 2005.

MIXSON TR, LYDY SL, DASCH GA, REAL LA. Inferring the population structure and demographic history of the tick, *Amblyomma americanum* Linnaeus. **Journal of Vector Ecology**, v.31, n.1: p.181-192, 2006.

NAVA S, VENZAL JM, TERASSINI FA, MANGOLD AJ, CAMARGO LM, LABRUNA MB. Description of a new argasid tick (Acari: Ixodida) from bat caves in Brazilian Amazon. **The Journal of Parasitology**, v.96, n.6: p.1089-1101, 2010.

NEDBAL MA, FLYNN JJ. Do the combined effects of the asymmetric process of replication and DNA damage from oxygen radicals produce a mutation-rate signature in the mitochondrial genome? **Molecular Ecology and Evolution**, v.15: p.219-223, 1998.

NORRIS, DF, KLOMPEN, JSH, BLACK WC. Comparison of the mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA genes in resolving phylogenetic relationships among hard ticks (Acari: Ixodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.92: p.117-129, 1999.

OLIVEIRA PR, BORGES LMF, LOPES CML, LEITE RC. 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**, v.92: p.295-301, 2000.

ONOFRIO VC, LABRUNA MB, PINTER A, GIACOMIN FG, BARROS-BATTESTI DM. Comentários e chaves para as espécies de *Amblyomma*. In. *Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies*: São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan; 2006. p.53-71.

PRICE EP, SMITH H, HUYGENS F, GIFFARD PM. High-resolution DNA melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73: p.3431-3436, 2007.

QIU, WG, DYKHUIZEN, DF, ACOSTA, MS, LUFT, BJ. Geographic uniformity of the lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the northeastern United States. **Genetics**, v.160: p.833-849, 2002.

REED GH, WITTEWER CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. **Clinical Chemistry**, v.50: p.1748-1754, 2004.

RIBEIRO MFB, GUIMARAES AM. *Encephalitozoon*-like Microsporidia in ticks *Amblyomma cajennense* and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.35: p.1029-1033, 1998.

RICHTER C. Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. **Mutation Research**, v.275: p.249-255, 1992.

ROGERS A. Population forecasting: Do simple models outperform complex models? **Mathematical Population Studies**, v.5: p.187-202, 1995.

RONQUIST F, TESLENKO M, VAN DER MARK P, AYRES DL, DARLING A, HÖHNA S, LARGET B, LIU L, SUCHARD MA, HUELSENBECK JP. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v.61, n.3: p.539-542, 2012.

SONG S, SHAO R, ARWELL R, BARKER S, VANKAN D. Phylogenetic and phylogeographic relationships in *Ixodes holocyclus* and *Ixodes cornuatus* (Acari: Ixodidae) inferred from COX1 and ITS2 sequences. **International Journal for Parasitology**, v.41: p.871-880, 2011.

TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v.123: p.585-595, 1989.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, n.10: p.2731-2739, 2011.

TEMPLETON AR, CRANDALL KA, SING CF. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, v.132: p.619–633, 1992.

TINDALL EA, PETERSEN DC, WOODBRIDGE P, SCHIPANY K, HAYES VM. Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments. **Human Mutation**, v.30: p.876-883, 2009.

TROUT RT, STEELMAN CD, SZALANSKI AL. Population genetics and phylogeography of *Ixodes scapularis* from canines and deer in Arkansas. **Society of Southwestern Entomologists**, v.34, n.3: p.273-287, 2009.

TROUT RT, STEELMAN CD, SZALANSKI AL. Population genetics of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) collected from Arkansas. **Journal of Medical Entomology**, v.47: p.152-161, 2010.

VOSSSEN RH, ATEN E, ROOS A, DEN DUNNEN JT. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. **Human Mutation**, v.30: p.860-866, 2009.

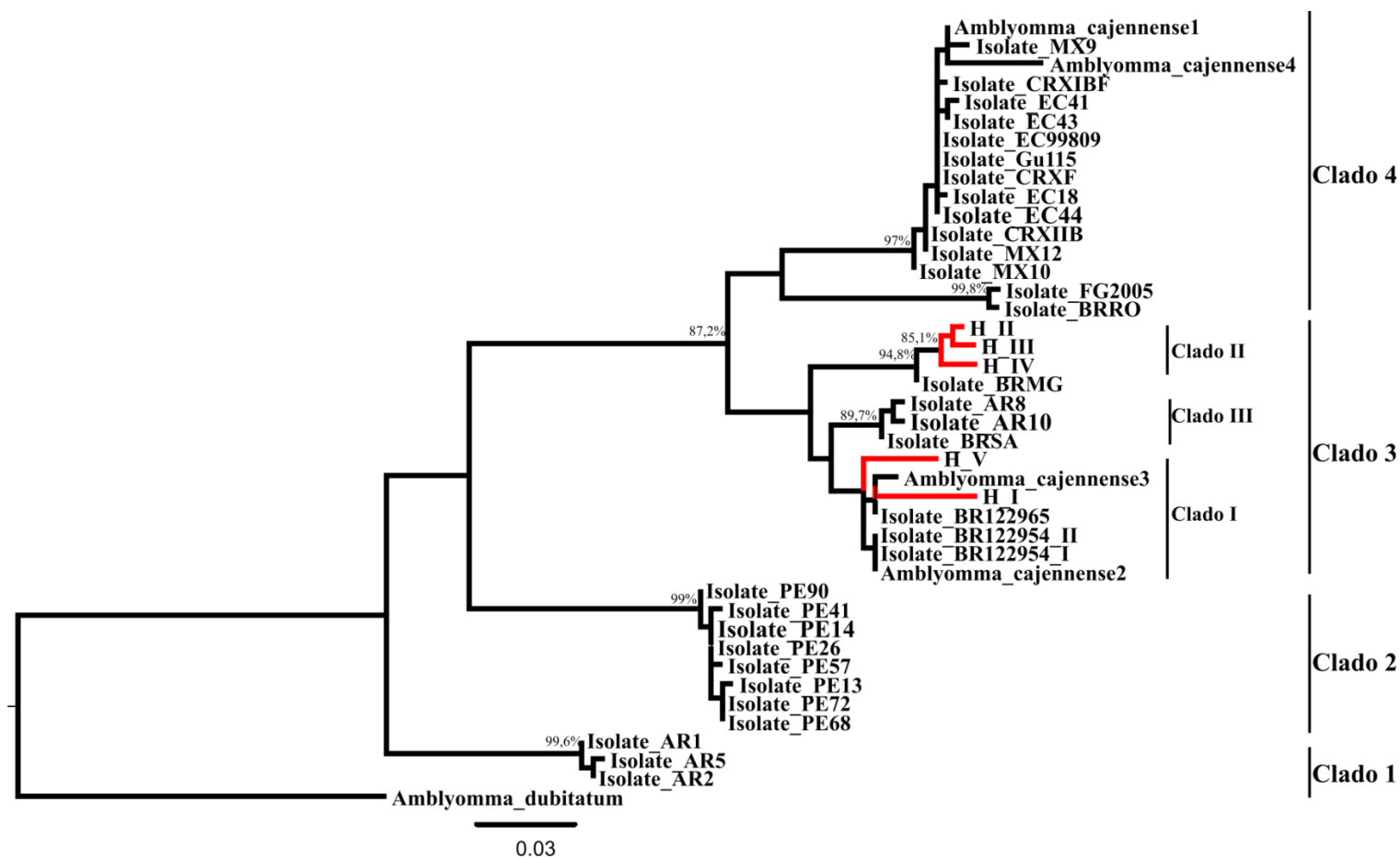
WILSON AC,CANN RL,CARR SM,GEORGE JR. M,GYLLENSTEN UB,HELM-BYCHOWSKI KM,HIGUCHI RG,PALUMBI SR,PRAGER EM,SAGE RD,STONEKING M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.26: p.375-400, 1985.

WITTEWER CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. **Human Mutation**, v.30: p.857-859, 2009.

WITTEWER CT,REED GH,GUNDRY CN,VANDERSTEEN JG,PRYOR RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. **Clinical Chemistry**, v.49: p.853-860, 2003.

WU SB,WIRTHENSOHN MG,HUNT P,GIBSON JP,SEDGLEY M. High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. **Theoretical and Applied Genetics** v.118: p.1-14, 2008.

## 9. ANEXOS



**Anexo 1.** Árvore resultante da análise de Máxima Verossimilhança pelo aplicativo MEGA 5 e de sequências de *A. cajennense* depositadas no GenBank bem como as amostras coletadas no presente estudo (ramos em vermelho). Os números nos ramos representam os valores de bootstrap.

