

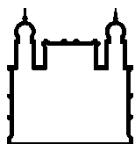
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biodiversidade e Saúde

DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE
***Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) EM DIFERENTES**
REGIÕES DO BRASIL

REBECCA LEAL CAETANO

Rio de Janeiro
setembro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

REBECCA LEAL CAETANO

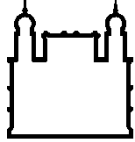
DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências (Biodiversidade e Saúde).

Orientador: Dr. Gilberto Salles Gazêta (LIRN / IOC / Fiocruz)

Co-orientadora: Dr^a Carolina Moreira Voloch (Dep. Genética / UFRJ)

Rio de Janeiro
setembro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

REBECCA LEAL CAETANO

DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Voloch

Aprovada em: 30/09/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Marinete Amorim – IOC (Presidente)

Prof. Dr. Michel Paiva Valim - MZUSP (Membro)

Prof. Dr. Marcus Vinicius Xavier Senra - UFJF (Membro)

Rio de Janeiro, 30 de setembro de 2016.

*Dedico este trabalho a todos os seres
vivos que involuntariamente doam
suas vidas para o avanço da ciência.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por tornar isso possível.

Agradeço aos coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde – Cléber Galvão e Cláudia Portes – por tornarem essa defesa possível.

Agradeço imensamente ao Dr. Gilberto Salles Gazeta e à Dra. Carolina Voloch por aceitarem a minha orientação, pela confiança, incentivo, compreensão, cuidado e apoio desde o início da jornada.

Ao Prof Dr. Nicolau Maués Serra-Freire pelos poucos momentos de aprendizado compartilhado.

Agradeço a Dra. Marinete pelo atenção, carinho, amizade, conselhos e cuidado com minha formação profissional.

Agradeço à Karlinha pela dedicação e paciência em me apresentar o mundo da biologia molecular e da genética de populações.

Agradeço ao Vini pela paciência, explicações na madrugada e por todas as palavras de incentivo.

Agradeço à Arannadia, Karen, Liege e Paulinha por todo o apoio.

Enfim, agradeço à família do LIRN por ter me recebido de braços abertos e de forma tão acolhedora.

Aos meus queridos amigos Zeneida (que iluminou minha caminhada para que eu chegasse até aqui), César e Tayra que acreditaram em mim até nos momentos em que eu mesma duvidei.

Agradeço ao querido amigo Leandro por tudo.

Sou imensamente agradecida à Lilian, Mário e Luciana.

Sou eternamente grata aos meus pais pelo apoio incondicional e pela compreensão durante os períodos ausentes; à minha irmã, ao Chuck e minhas queridas Hanna (*in memoriam*), Dora e Fiona pelos momentos de descontração, tão importantes para que eu seguisse em frente e à Julinha por todo amor e carinho.

Agradeço ao meu namorado Márcio por toda a compreensão e carinho.

Agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

E, finalmente, à Fundação Oswaldo Cruz pelo apoio financeiro e estrutural que permitiu a realização desse trabalho, juntamente com os órgãos de fomento CNPq e CAPES.

C128 Caetano, Rebecca Leal

Diversidade morfológica e genética de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em diferentes regiões no Brasil / Rebecca Leal Caetano.
– Rio de Janeiro, 2016.
xix, 106 f. : il. ; 30 cm.

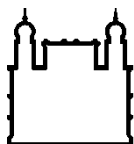
Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2016.
Bibliografia: f. 73-84

1. Ixodidae. 2. Carrapato. 3. Patógeno. 4. Morfologia. 5. Filogenia. I. Título.

CDD 595.429

**“Esquecer é uma necessidade!
A vida é uma lousa, em que o destino,
para escrever um novo caso,
precisa apagar o caso escrito”**

(Autor desconhecido)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

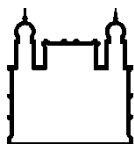
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Rebecca Leal Caetano

Dentro do gênero *Rhipicephalus* há o chamado complexo *sanguineus* formado por várias espécies presentes apenas no Velho Mundo, das quais apenas *Rhipicephalus sanguineus* é considerada de ocorrência no Novo Mundo. Como as espécies desse complexo apresentam grande similaridade morfológica é possível que mais de uma espécie desse complexo esteja ocorrendo nas Américas. *Rhipicephalus sanguineus* é um parasito natural de cães que eventualmente pode parasitar outros hospedeiros, entre eles o homem, atuando como vetor potencial do bioagente causador da Febre Maculosa Brasileira, doença humana transmitida por carrapatos mais importante no Brasil. A maioria dos casos de Febre Maculosa Brasileira ocorre nas regiões Sul e Sudeste do país, com os óbitos concentrando-se na região Sudeste. A variabilidade genética nos ixodídeos pode influenciar sua habilidade em transmitir diferentes espécies ou linhagens de patógenos. Dessa forma, populações geneticamente distintas podem ter capacidades vetoriais diferentes. O objetivo desse trabalho é analisar a diversidade morfológica e genética de *Rhipicephalus sanguineus* em diferentes regiões do Brasil.

Palavras-chave: Ixodidae, carrapato, patógeno, morfologia, filogenia



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MORPHOLOGICAL AND GENETICS DIVERSITY OF *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE 1806) IN DIFFERENT REGIONS OF BRAZIL

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Rebecca Leal Caetano

Within the genus *Rhipicephalus* there is the so called sanguineus complex formed by several species presented only in the Old World, of which only *Rhipicephalus sanguineus* is considered to occur in the New World. As the species of this complex have great morphological similarity is possible that more than one species of this complex is occurring in the Americas. *Rhipicephalus sanguineus* is a natural parasite of dogs that may eventually parasitize other hosts, including humans, acting as a potencial vector of bioagent that causes Brazilian Spotted Fever, the most important human tick-borne disease in Brazil. Most cases of Brazilian Spotted Fever occurs in the South and Southeast of the country, with deaths concentrated in the Southeast region. Genetic variability in ticks can influence their ability to transmit different species or strains of pathogens. Thus, genetically distinct populations may have different vector capabilities. The objective of this project is to analyze the morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* in different regions of Brazil.

Keywords: Ixodidae, tick, pathogen, morphology, phylogeny.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806)	3
2.2 Classificação	3
2.3 Distribuição geográfica	4
2.4 Ciclo biológico	4
2.5 Características morfológicas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806)	5
2.6 Agentes transmitidos por <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806)	6
2.7 Complexo <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806)	7
2.8 Marcadores moleculares	8
3 OBJETIVOS	10
3.1 Objetivo geral	10
3.2 Objetivos específicos	10
4 MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Carrapatos	11
4.2 Microscopia eletrônica de varredura de machos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806)	11
4.3 Análises moleculares de machos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806)	11
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 Microscopia eletrônica de varredura de machos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806)	19
5.2 Análises moleculares de machos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806)	62
6 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** – Visão dorsal de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1906) (Acari: Ixodidae) – (A) Macho e (B) Fêmea **3**
- Figura 2-** Ciclo biológico de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1906) (Acari: Ixodidae) (<http://www.familiabuscapet.com.br/#!/carrapatos/cpah>) **5**
- Figura 3** - Características morfológicas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari; Ixodidae) – Visão ventral de (A) Macho e (B) Fêmea. (<http://bristoltickid.blogs.ilrt.org/keytogenera/rhipicephalus/rhipicephalus-sanguineus/>) **6**
- Figura 4** - Micrografia eletrônica de varredura de machos adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Rondônia. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. **20**
- Figura 5** - Micrografia eletrônica de varredura de machos adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Roraima. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. **21**
- Figura 6** - Micrografia eletrônica de varredura de machos adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Pernambuco. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. **22**
- Figura 7** - Micrografia eletrônica de varredura de machos adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Pernambuco. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. **23**
- Figura 8** - Micrografia eletrônica de varredura de machos adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Paraná. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. **24**
- Figura 9** - Micrografia eletrônica de varredura de machos adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Rio Grande do Sul. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. **25**

Figura 10 – Micrografia eletrônica de varredura do capitulo de machos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Rondônia. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (P) palpo, (Ch) quelícera e (hyp) hipostômio	27
Figura 11 - Micrografia eletrônica de varredura do capitulo de machos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Roraima. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (P) palpo, (Ch) quelícera e (hyp) hipostômio	28
Figura 12 - Micrografia eletrônica de varredura do capitulo de machos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Pernambuco. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (P) palpo, (Ch) quelícera e (hyp) hipostômio	29
Figura 13 - Micrografia eletrônica de varredura do capitulo de machos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Rio Grande do Norte. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (P) palpo, (Ch) quelícera e (hyp) hipostômio	30
Figura 14 - Micrografia eletrônica de varredura do capitulo de machos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Paraná. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime.	31
Figura 15 - Micrografia eletrônica de varredura do capitulo de machos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Rio Grande do Sul. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (P) palpo, (Ch) quelícera e (hyp) hipostômio	32
Figura 16 – Micrografia eletrônica de varredura do órgão de Haller de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rondônia. (aP) cápsula anterior.....	34

Figura 17 - Micrografia eletrônica de varredura do órgão de Haller de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Roraima. (aP) cápsula anterior.	35
Figura 18 – Micrografia eletrônica de varredura do órgão de Haller de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Pernambuco. (aP) cápsula anterior.	36
Figura 19 - Micrografia eletrônica de varredura do órgão de Haller de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grande do Norte. (aP) cápsula anterior.	37
Figura 20 - Micrografia eletrônica de varredura do órgão de Haller de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Paraná. (aP) cápsula anterior.	38
Figura 21 – Micrografia eletrônica de varredura do órgão de Haller de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grande do Sul. (aP) cápsula anterior.	39
Figura 22 - Micrografia eletrônica de varredura do opistossoma de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rondônia. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (F) festões, (Lg) sulco lateral, (Ag) sulco anal, (v) valvas, (Ad) placas adanais, (As) placas acessórias e (Cp) processo caudal.	40
Figura 23 - Micrografia eletrônica de varredura do opistossoma de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Roraima. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (F) festões, (Lg) sulco lateral, (Mg) sulco marginal, (Pmg) sulco mediano pós-anal, (Ag) sulco anal, (v) valvas, (Ad) placas adanais, (As) placas acessórias e (Cp) processo caudal.	41

Figura 24 - Micrografia eletrônica de varredura do opistossoma de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Pernambuco. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (F) festões, (Lg) sulco lateral, (Ag) sulco anal, (v) valvas, (Ad) placas adanais e (As) placas acessórias. **42**

Figura 25 - Micrografia eletrônica de varredura do opistossoma de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grande do Norte. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (F) festões, (Lg) sulco lateral, (Ag) sulco anal, (v) valvas, (Ad) placas adanais, (As) placas acessórias e (Cp) processo caudal. **43**

Figura 26 - Micrografia eletrônica de varredura do opistossoma de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Paraná. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (F) festões, (Lg) sulco lateral, (Mg) sulco marginal, (Ag) sulco anal, (v) valvas, (Ad) placas adanais, (As) placas acessórias e (Cp) processo caudal. **44**

Figura 27 - Micrografia eletrônica de varredura do opistossoma de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grande do Sul. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (F) festões, (Lg) sulco lateral, (Pmg) sulco mediano pós-anal, (Ag) sulco anal, (v) valvas, (Ad) placas adanais, (As) placas acessórias e (Cp) processo caudal. **45**

Figura 28 - Micrografia eletrônica de varredura da placa espiracular de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rondônia. (Ol) região de mácula e (Sp) poros de superfície. **48**

Figura 29 - Micrografia eletrônica de varredura da placa espiracular de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Roraima. (Ol) região de mácula e (Sp) poros de superfície. **49**

Figura 30 - Micrografia eletrônica de varredura da placa espiracular de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Pernambuco. (Ol) região de mácula e (Sp) poros de superfície.	50
Figura 31 - Micrografia eletrônica de varredura da placa espiracular de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grande do Norte. (Ol) região de mácula e (Sp) poros de superfície.	51
Figura 32 - Micrografia eletrônica de varredura da placa espiracular de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Paraná. (Ol) região de mácula e (Sp) poros de superfície.	52
Figura 33 - Micrografia eletrônica de varredura da placa espiracular de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grande do Sul. (Ol) região de mácula e (Sp) poros de superfície.	53
Figura 34 - Micrografia eletrônica da placa genital de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rondônia. (Gp) placa genital.	54
Figura 35 - Micrografia eletrônica da placa genital de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Roraima. (Gp) placa genital.	55
Figura 36 - Micrografia eletrônica da placa genital de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Pernambuco. (Gp) placa genital.	56
Figura 37 - Micrografia eletrônica da placa genital de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grande do Norte. (Gp) placa genital.	57

Figura 38 - Micrografia eletrônica da placa genital de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Paraná. (Gp) placa genital.	58
Figura 39 - Micrografia eletrônica da placa genital de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grande do Sul. (Gp) placa genital.	59
Figura 40 - Análise filogenética dos espécimes classificados como <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) do Brasil inferida pelo método da Máxima-verossimilhança (MV) utilizando sequências concatenadas de nucleotídeos dos genes 12S rDNA (238 pb) e COX1 (472 pb). O modelo evolutivo utilizado foi o HKY85+G+I+F. A barra de escala representa a distância genética. Os números nos nós da árvore são os valores de bootstrap obtidos a partir de 1000 réplicas. Os números de acesso do GenBank estão apresentados à esquerda dos nomes e os triângulos representam sequências obtidas no presente trabalho.	62
Figura 41 - Análise filogenética dos espécimes classificados como <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) do Brasil inferida pelo método da Máxima-verossimilhança (MV) utilizando sequências de nucleotídeos do gene 12S rDNA (273 pb). O modelo evolutivo utilizado foi o TN93+G+F. A barra de escala representa a distância genética. Os números nos nós da árvore são os valores de bootstrap obtidos a partir de 1000 replicatas. Os números de acesso do GenBank estão apresentados à esquerda dos nomes e os triângulos representam sequências obtidas no presente trabalho.	64

Figura 42 - Análise filogenética dos espécimes classificados como *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) do Brasil inferida pelo método da Máxima-verossimilhança (MV) utilizando sequências de nucleotídeos do gene COX1 (453 pb). O modelo evolutivo utilizado foi o TN93+G+F. A barra de escala representa a distância genética. Os números nos nós da árvore são os valores de bootstrap obtidos a partir de 1000 replicatas. Os números de acesso do GenBank estão apresentados à esquerda dos nomes e os triângulos representam sequências obtidas no presente trabalho. **66**

Figura 43 - Análise filogenética dos espécimes classificados como *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) do Brasil inferida pelo método da Máxima-verossimilhança (MV) utilizando sequências de nucleotídeos do gene D-loop (322 pb). O modelo evolutivo foi o TN93+G+F. A barra de escala representa a distância genética. Os números nos nós da árvore são os valores de bootstrap obtidos a partir de 1000 replicatas. Os números de acesso do GenBank estão apresentados à esquerda dos nomes e os triângulos representam sequências obtidas no presente trabalho. **69**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela com as informações e os números de acesso no Gen Bank das sequências de COXI .dos .espécimes .machos. de *Rhipicephalus sanguineus*. (Latreille,. 1806) .(Acari; .Ixodidae). **13**

Tabela 2- Tabela com as informações e os números de acesso no Gen Bank das sequências de 12S rDNA dos espécimes machos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1906) (Acari:Ixodidae). **14**

Tabela 3 - Tabela com as informações e os números de acesso no Gen Bank das sequências de D-loop dos espécimes machos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1906) (Acari: Ixodidae). **16**

Tabela 4 - Tabela comparativa das características morfológicas observadas em machos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em seis Estados no Brasil. RO – Rondônia, RR – Roraima, PE – Pernambuco, RN – Rio Grande do Norte, PR – Paraná, RS – Rio Grande do Sul, Lg – sulco lateral e MG – sulco marginal. **60**

Tabela 5 – Matriz de divergência nucleotídica mínima e máxima do gene COX1, entre espécies do gênero *Rhipicephalus* Koch, 1844. O número de sequências disponíveis para cada espécie é apresentado entre parênteses. **68**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIC = Akaike Information Criterion

DNA = *Deoxyribonucleic Acid* - Ácido Desoxirribonucléico

FM = Febre Maculosa

FMB = Febre Maculosa Brasileira

GFM = Grupo Febre Maculosa

GT = Grupo Tifo

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

mtDNA = mitochondrial DNA – DNA mitocondrial

NaCl = Cloreto de Sódio

pb = pares de bases

PCR= Reação em Cadeia pela Polimerase

s.s. = *sensu stricto*

1. INTRODUÇÃO

A diversidade de espécies de carrapatos no Brasil é resultante dos diferentes ecossistemas nacionais (Labruna & Pereira 2001). Os carrapatos de importância econômica e saúde-pública são artrópodes da classe Arachnida, ordem Ixodida, Família Ixodidae e Argasidae. Todas as espécies são hematófagas de hospedeiros vertebrados e possuem significativo grau de especificidade podendo utilizar hospedeiros alternativos, como o homem (Massard & Fonseca 2004).

Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806), pertence à subfamília Rhipicephalinae, é vulgarmente conhecido como carrapato vermelho do cão e também como carrapato de canis (Dantas-Torres 2008; Pegram et al., 1987a, 1987b). Essa espécie foi descrita pela primeira vez em 1806 por Latreille, na ocasião era denominado como *Ixodes sanguineus*, sendo posteriormente transferido para o gênero *Rhipicephalus* (Koch, 1844) (Guglielmone et al. 2010).

O gênero *Rhipicephalus* compreende 82 espécies reconhecidas no mundo e foi introduzido nas Américas, oriundo do continente africano, provavelmente com a colonização. Atualmente, ocorre em toda a Região Neotropical predominando nas áreas urbanas e acometendo aproximadamente 30% dos cães (Barros-Battesti, et al. 2006, Guglielmone et al. 2010).

Esse carrapato tem hábito nidícola, vivendo em ninhos, tocas ou abrigos de seus hospedeiros. Quando não estão parasitando seu hospedeiro, podem ser encontrados, preferencialmente, no chão ou em frestas e buracos das tocas (Labruna & Pereira, 2001; Labruna et al 2004). *R. sanguineus* tem como hospedeiro preferencial o cão doméstico e canídeos silvestres, possuindo ampla distribuição por todo o território brasileiro (Linardi & Nagem, 1973).

Dentro do gênero *Rhipicephalus* há o chamado complexo *R. sanguineus*, composto por 17 espécies. As espécies desse complexo apresentam grandes similaridades morfológicas e, algumas vezes ecológicas e devido a essas semelhanças, os diagnósticos às vezes são errôneos e confusos (Walker et al. 2000, Gray et al. 2013). Atualmente, uma ferramenta que tenta elucidar a problemática da identificação errônea deste complexo é a biologia molecular.

O DNA mitocondrial (mtDNA) está sendo usado amplamente em estudos de genética de populações de carrapatos (Burkman 2009, Krakowetz et al. 2011, Beati et al. 2012). Devido ao seu tamanho reduzido e abundância de mitocôndrias nas células, o mtDNA é, particularmente, adequado para esses estudos porque seus

genes evoluem, em média, mais rapidamente do que os nucleares (Shao & Barker 2007).

Vários marcadores genéticos têm sido utilizados para elucidar a filogenia e a evolução das espécies do gênero *Rhipicephalus*, como por exemplo, regiões –alvo dos genes mitocondriais ribossômicos 16S e 12S (rDNA) (Black & Piesman 1994, Burlini et al. 2010). Mais raramente, são utilizadas a subunidade I do citocromo oxidase (coxI) e o espaçador interno transcrito 2 (ITS-2) (Zahler et al. 1997). A diversidade do vetor quanto sua rápida mudança genética pode influenciar fortemente na dinâmica de interação hospedeiro- vetor- patógeno (Fussmann et al. 2007).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto (s. s.), conhecido como o carrapato vermelho do cão, tem como hospedeiro primário os cães, embora também possa parasitar outros animais domésticos (Figura 1). É um carrapato trioxeno que se alimenta principalmente em cães e acidentalmente em outros hospedeiros, incluindo os seres humanos; possui geotropismo negativo procurando lugares altos ao sair do hospedeiro (Walker et al. 2005). É um importante transmissor de agentes patogênicos, sendo considerado o principal vetor da *Ehrlichia canis* no Brasil (Benenson 1992).

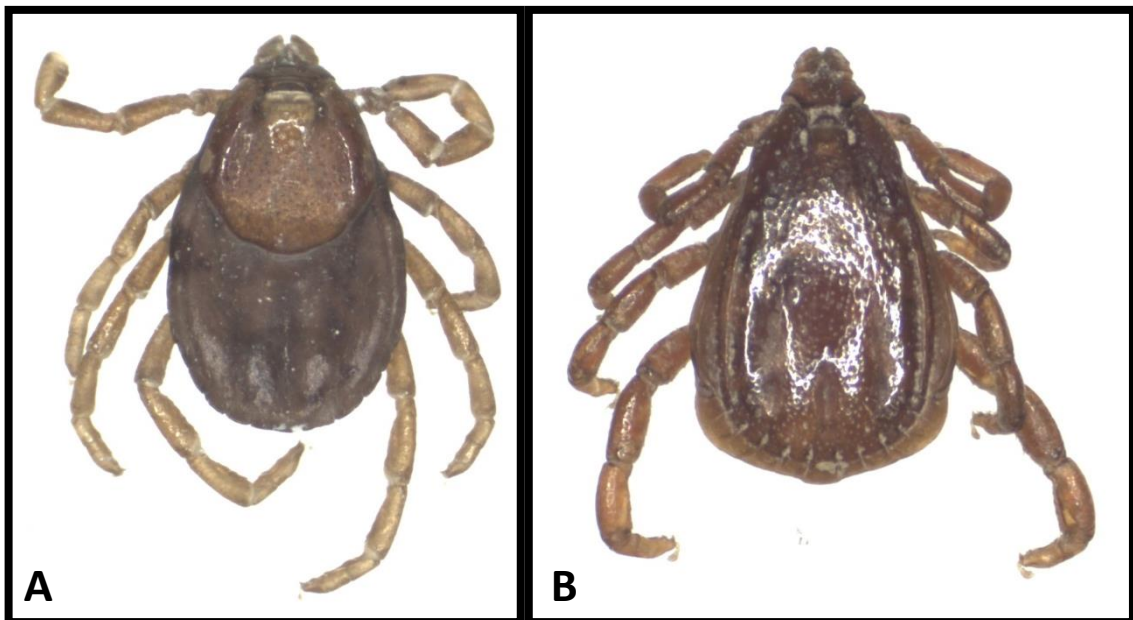


Figura 1- Visão dorsal de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1906) (Acari: Ixodidae) – (A) Macho e (B) Fêmea

2.2. Classificação

Segundo o National Center for Biotechnology Information (NCBI-ID: 34632), dos Estados Unidos da América, a classificação taxonômica do carrapato *R. sanguineus* é:

- Reino: Metazoa
- Filo: Arthropoda
- Subfilo: Chelicerata
- Classe: Arachnida
- Ordem: Acari
- Superfamília: Ixodoidea
- Família: Ixodidae
- Subfamília: Rhipicephalinae
- Gênero: *Rhipicephalus* (Koch, 1844)
- Espécie: *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)

2.3. Distribuição geográfica

É a única espécie do gênero que conseguiu se estabelecer nas Américas, é originária da região Afrotropical, onde existem aproximadamente 84 espécies do gênero *Rhipicephalus* Koch, 1844, contando cinco espécies que foram incluídas no subgênero *Boophilus* (Bowman & Nuttall 2009, Apanaslevich et al. 2013, Guglielmone et al. 2010, Horak et al. 2013). É uma espécie cosmopolita e, provavelmente, a de maior distribuição geográfica; atualmente são encontrados em todas as regiões zoogeográficas do mundo (Labruna et al 2004; Walker et al 2005).

2.4. Ciclo biológico

Possui ciclo trioxeno (Figura 2), ou seja, necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo de vida. Os únicos hospedeiros primários conhecidos para os estágios parasitários do carrapato *R. sanguineus* são os cães (Szabó et al. 1995). Há relatos de parasitismo em outras espécies de animais, incluindo alguns representantes da fauna silvestre brasileira, mas esse parasitismo acontece com pouca frequência e, quando ocorre, esse fato está estreitamente relacionado com o contato desses hospedeiros com o cão (Labruna & Pereira, 2001).



Figura 2- Ciclo biológico de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1906) (Acari: Ixodidae). (<http://www.familiabuscapet.com.br/#!carrapatos/cpah>).

2.5. Características morfológicas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1906)

Os espécimes machos e fêmeas de *R. sanguineus* possuem tamanho mediano de 3 a 5 mm, quando não estão alimentados, apresentam o idiossoma de coloração marrom escuro e o escudo sem ornamentação; em ambos os sexos os espinhos das coxas são similares, exceto o da coxa IV do macho que é maior; a base dorsal do gnatossoma é hexagonal e tanto os palpos como o hipostômio são curtos, e apresentam dentição 3/3 (Walker et al. 2000). Os carrapatos machos possuem o capítulo mais largo do que longo, com os ângulos laterais da base agudamente curvos, não sobrepondo a área escapular. Os palpos são curtos e arredondados no ápice. O escudo é ligeiramente estreitado anteriormente, com posterior ampliação para os olhos. Possui um discreto processo anterior da coxa I. A margem do aloescudo expande-se lateral/posteriormente, quando se alimentam. Olhos marginais, ligeiramente protuberantes e alinhados dorsalmente, com algumas pontuações. Possuem linhas marginais profundas e ponteadas delimitando os dois primeiros festões, estendendo-se anteriormente e terminando posterior aos olhos. Os sulcos póstero-medianos são estreitos e alongados e os sulcos póstero-lateral

são subcirculares. As pontuações variam de escassas a muitas, normalmente os espécimes maiores são mais densamente pontuados. Possuem quatro fileiras irregulares de pontuações amplamente espaçadas, com pontuações menores cobrindo o fundo do aloescudo. Ventralmente, os espiráculos são completamente alongados, com um prolongamento dorsal estreito, geralmente visível dorsalmente. As placas adanais acessórias são variáveis, mas geralmente alongadas e subtriangulares, sua parte posterior é larga, podendo ser truncada ou arredondada. Possuem placas adanais acessórias levemente distintas. Aumento das pernas em tamanho da I para a IV (Figura 3) (Walker et al. 2000).

A fêmea dessa espécie apresenta o capítulo tão largo quanto longo, com base de ângulos laterais e áreas porosas pequenas. Palpos mais longos do que os dos espécimes machos, estreitos e arredondados no ápice. Escudo mais largo do que longo, com a margem posterior ondulada. Olhos dispostos lateralmente abaulados, comumente com margens com poucas pontuações dorsalmente. Campos cervicais em forma de lâmina rodeado de estrias. As bordas cervicais externas e as áreas mediais da escápula possuem pontuações maiores. No lado ventral, a abertura genital apresenta a forma “U”(Figura 3) (Walker et al. 2000).

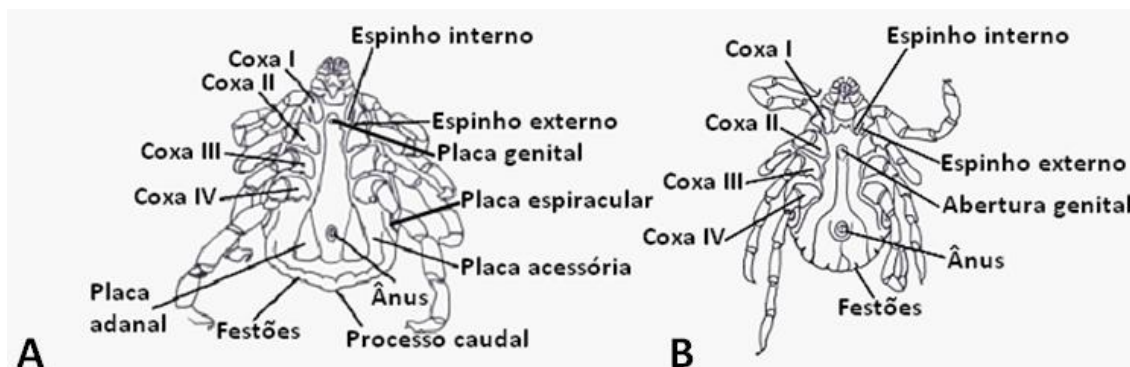


Figura 3 – Características morfológicas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari; Ixodidae) – Visão ventral de (A) Macho e (B) Fêmea. (<http://bristoltickid.blogs.ilrt.org/key-to-genera/rhipicephalus/rhipicephalus-sanguineus/>)

2.6. Agentes transmitidos por *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)

O carrapato *R.sanguineus* apresenta ampla distribuição nas Américas, Europa, África, Ásia e Austrália e provavelmente é a espécie mais prevalente entre os ixodídeos. (Bechara et al. 1995). É um parasito natural de cães que eventualmente pode parasitar outros hospedeiros, entre eles o homem (Louly et al.

2006). Nas últimas décadas, tanto a prevalência quanto a intensidade das infestações por *R. sanguineus* em cães vêm aumentando (Labruna et al. 2004).

Rhipicephalus sanguineus é considerado hospedeiro natural e vetor de alguns patógenos, como por exemplo, *Rickettsia conorii* para humanos na Europa, agente da febre botonosa e também vetor de *Rickettsia rickettsii*, agente da febre maculosa (FM) no Brasil (Louly et al., 2006). *R. sanguineus* desenvolve-se bem com altas densidades e tem alta prevalência em algumas cidades do Brasil, podendo causar aumento da incidência de outras enfermidades tais como a babesiose e a febre maculosa que são zoonoses emergentes (Fernandes, 2000).

2.7. Complexo *sanguineus* do gênero *Rhipicephalus* (Koch, 1844)

Até recentemente, acreditava-se que *R. sanguineus* s.s. fosse o único representante do gênero na América do Sul (Burlini et al. 2010) e, no Brasil a sua presença é registrada desde o início do século XX (Rohr 1909).

No entanto, espécimes de diferentes estados do Brasil apresentaram variações morfológicas (Pegram et al. 1987a, 1987b, Estrada-Pena & Sanchez 1988, Ribeiro et al. 1995, Oliveira et al. 2005, Rosa et al. 2006, 2010). O complexo *sanguineus* é composto por 17 espécies: *Rhipicephalus aurantiacus* Newmann, 1907; *Rhipicephalus bergioni* Morel & Balis, 1976; *Rhipicephalus boueti* Morel, 1957; *Rhipicephalus camicasi* Morel, Mouchet & Rodhain, 1976; *Rhipicephalus guilhoni* Morel & Vassiliades, 1963; *Rhipicephalus leporis* Pomerantzev, 1946; *Rhipicephalus moucheti* Morel, 1965; *Rhipicephalus pumilio* Schulze, 1935; *Rhipicephalus pucillus* Gil Collado, 1936; *Rhipicephalus ramachandrai* Dhanda, 1966; *Rhipicephalus rossicus* Yakimov & Kol-Yakimova, 1911; *Rhipicephalus sanguineus* s.s.; *Rhipicephalus schulzei* Olenov, 1929; *Rhipicephalus sulcatus* Newmann, 1908; *Rhipicephalus tetracornus* Kitaoka & Suzuki, 1983; *Rhipicephalus turanicus* Pomerantzev, 1940 e *Rhipicephalus ziemanni* Newmann, 1904 (Camicas et al. 1998).

A literatura relata diagnósticos errôneos e confusos em trabalhos envolvendo diferentes espécies do complexo *sanguineus* (Walker et al. 2000), não existindo um consenso entre as espécies do complexo com relação às suas similaridades morfológicas, tornando difícil sua identificação (Gray et al. 2013). Por esta razão, o uso de ferramentas de biologia molecular é bastante apropriado para estudos com diferentes espécies do complexo *sanguineus*.

Szabó et al. (2005) relataram parâmetros biológicos e genéticos significativamente diferentes entre populações de *R. sanguineus* do Brasil e da Argentina. Embora adultos da população brasileira tenham se alimentado e copulado com adultos da população Argentina (e vice-versa) os híbridos se mostraram quase que totalmente inférteis. Em adição, análises de sequencia de um fragmento do gene mitocondrial 12S rDNA mostraram que a população argentina era mais próxima de *R. sanguineus* da Europa ao passo que a população brasileira era mais próxima de uma população de *R. turanicus* na África. Baseando-se nos seus resultados Szabó et al. (2005) sugeriram que o status biosistemático de *R. sanguineus* deveria ser revisto através de novas investigações na América do Sul, onde possivelmente deva estar ocorrendo mais de uma espécie do complexo *sanguineus*.

2.8. Marcadores moleculares

No fim do século XX as técnicas moleculares geraram o potencial para investigar o DNA individual, facilitando a medição e a quantificação da variação genética intra e interespecífica. A biologia molecular tem ajudado no diagnóstico das espécies taxonomicamente complexas facilitando a identificação de estruturas de populações e esclarecendo as relações filogenéticas. Genes mitocondriais têm sido amplamente utilizados em sistemática molecular. Devido ao elevado número de cópias, torna-se mais fácil trabalhar com esses genes do que com cópias simples de genes nucleares, além de sua estrita herança materna, já mencionada, particularmente útil ao nível intraespecífico (Wilson et al. 1985).

Estudos de genética de populações de carrapatos estão usando amplamente o DNA mitocondrial (mtDNA) (Burkman 2009, Krakowetz et al. 2011, Beati et al. 2012). O mtDNA é, particularmente, adequado para esses estudos porque seus genes evoluem, em média, mais rapidamente do que os genes nucleares. E, devido ao seu tamanho reduzido e abundância de mitocôndrias nas células, é mais fácil de amplificar do que o genoma nuclear (Shao & Barker 2007).

A literatura tem demonstrado que as sequências de mtDNA são úteis para distinguir espécies de carrapatos estreitamente relacionadas e são, portanto, adequadas para identificar populações distintas dentro de uma mesma espécie (Caporale et al. 1995, Xu et al. 2003). Esse é o caso da região controle (Dloop) que evolui de forma muito rápida (Li 1997). A variabilidade do Dloop faz com que ele seja um dos genes mais utilizados em estudos populacionais (Taylor et al. 1993, Simon et al. 1994).

Os genes mitocondriais estão divididos em duas categorias principais, os genes ribossomais e os genes codificadores de proteínas. Os dois genes ribossomais são o 12S e o 16S DNAr, que não são separados por ITS. Esses genes juntamente com Dloop e citocromo oxidase II (COII) apresentam características que os tornam eficientes no estudo das relações filogenéticas e populacionais de carrapatos (Simon et al. 1994, Norris et al. 1996, Norris et al. 1999, Barker & Murrell 2004, Szabó et al. 2005, Mixson et al. 2006, Casati et al. 2008, Burkman 2009, Krakowetz et al. 2011, Beati et al. 2012, Kovalev & Mukhacheva 2012).

Segundo Norris et al. (1999), o 12S (rDNA) é uma ferramenta mais eficiente para estudos de filogenia em carrapatos que sofreram eventos de especiação recente, do que para estudos de espécies que sofreram especiação tardia. O gene 12S DNAr têm auxiliado a definir algumas relações dentro de Rhipicephalinae e dentro do gênero *Rhipicephalus* (Murrell et al. 1999). De acordo com Mangold et al. (1998), o 16S é um bom marcador para o estabelecimento de relação genética entre as espécies próximas de carrapatos. Isso se deve ao alto nível de homoplasia encontrado em genes que se desenvolvem rapidamente como os do RNA mitocondrial.

Para elucidar a filogenia e a evolução das espécies do gênero *Rhipicephalus* vários marcadores genéticos têm sido utilizados, como por exemplo, regiões-alvo dos genes mitocondriais ribossomais 16S e 12S (rDNA) (Black & Piesman 1994, Burlini et al. 2010). Mais raramente, são utilizadas a subunidade I do citocromo c oxidase (coxI) e o espaçador interno transcrito 2 (ITS-2) (Zahler et al. 1997).

Sabe-se que tanto a diversidade do vetor quanto sua rápida mudança genética podem influenciar fortemente na dinâmica de interação hospedeiro- vetor-patógeno, modificando o cenário epidemiológico (Fussmann et al. 2007). Já se tem conhecimento sobre isso na interação mosquitos-patógenos (Black & Munstermann 2005), entretanto, essa interação em carrapatos, apesar de ser uma área importante de estudo, permanece insipiente na literatura.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar a diversidade genética e morfológica de machos de *R. sanguineus* em diferentes regiões do Brasil.

3.2. Objetivos específicos

Analisar, por meio de ultraestrutura eletrônica de varredura (MEV), os machos adultos de *R. sanguineus* de diferentes regiões do Brasil, com o intuito de verificar possíveis alterações morfológicas nas seguintes estruturas: capitulum, órgão de Haller, placas adanais, abertura genital, placas espiraculares, festoes e a estrutura geral do idiossoma.

Obter sequências parciais de genes mitocondriais COX1, 12S rDNA e D-loop de rDNA, de machos adultos de *R. sanguineus* de diferentes regiões geográficas do Brasil;

Realizar análises filogenéticas de genes mitocondriais COX1, 12S rDNA e D-loop de rDNA, de machos adultos de *R. sanguineus* de diferentes regiões geográficas do Brasil, comparando com dados disponíveis na literatura. Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Carrapatos

Os espécimes machos de *Rhipicephalus sanguineus* foram coletados de cães em seis estados de três regiões do Brasil: Região Norte - Roraima (RR) e Rondônia (RO), Região Nordeste - Pernambuco (PE) e Rio Grande do Norte (RN) e Região Sul - Paraná (PR) e Rio Grande do Sul (RS). Essas coletas foram realizadas em forma de parceria entre o Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN) - IOC / FIOCRUZ e Secretarias de Saúde dos Estados Federativos do Brasil.

Os carrapatos foram identificados segundo Aragão & Fonseca (1961), Walker et al. (2005) e Guglielmone et al. (2006).

4.2. Microscopia eletrônica de varredura

Para analisar as diferenças morfológicas dos machos de *R. sanguineus* foram verificados 30 espécimes de cada estado com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Leica). Os espécimes escolhidos foram limpos com água destilada e posteriormente, desidratados em uma série alcoólica crescente (50, 60, 70, 80, 90 e 100%), permanecendo 15 minutos em cada concentração. Em seguida o material foi colocado em suportes metálicos, impregnados por partículas de ouro (20-30nm) durante dois minutos (Sputter Coater) e examinados sob o microscópio eletrônico de varredura (MEV) - JEOL 6390LV da Plataforma de Microscopia do Instituto Oswaldo Cruz (Akishima, Tóquio, Japão).

Foram analisadas as diferenças morfológicas nas seguintes estruturas: capitulum, órgão de Haller, placas adanais, abertura genital, placas espiraculares, festões e a estrutura geral do idiossoma. A terminologia utilizada neste estudo para carrapatos adultos estão de acordo com Walker et al. (2005).

4.3. Análises moleculares

Para a análise molecular, amostras de carrapatos de todos os estados analisados no estudo morfológico (exceto Pernambuco, devido ao baixo número de espécimes) foram submetidas à extração de DNA pelo método com NaCl (Aljanabi & Martinez 1997). O número final de carrapatos processados foi de: RN=11, RO=10, RR=10, PR=14 e RS=23. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi executada de acordo com a metodologia utilizada por Bitencourth et al. (2016), utilizando o Sistema de PCR GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, CA, E.U.A.).

Os iniciadores utilizados foram T1B e T2A para 12S rDNA (≈ 360 pb) (Beati & Keirans 2001) e D-loop 3-1x e D-loop 4-1x, para D-loop rDNA (≈ 440 pb) (Burkman 2009). O gene Citocromo Oxidase subunidade 1 (COX1) (≈ 820 pb) foi amplificado com os iniciadores Cox1F e Cox1R sob a temperatura / tempo de ciclo de 95°C 5'; [95°C 30", 55°C 1', 72°C 1' / Kb] 40X; 72°C 5'; 20°C ∞ (Chitimia et al. 2010). Os produtos de PCR foram submetidos à electroforese sobre um gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Os produtos de PCR com o tamanho esperado foram purificados utilizando o Kit de NucleoSpin Extract II (Macherey Nagel, KG, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante. As reacções de sequenciamento foram realizadas utilizando um kit de sequenciamento Big Dye Terminator Cycle Version 3.1 (Applied Biosystems, CA, E.U.A.), com os mesmos iniciadores de PCR e sequenciados em um sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, E.U.A.).

As sequências foram editadas no programa ChromasPro 1,5 (Technelysium Pty Ltd, Qld, Austrália) e depositadas no GenBank com os números de acesso KX383796 - KX383820 para o gene COX1, KX383865 - KX383911 para o gene 12S rDNA e KX383821 - KX383864 para o gene D-loop. Os dados totalizam 47 sequências individuais geradas para o gene 12S rRNA (RN=10, RO=7, RR=6, PR=14 e RS=10) 44 sequências individuais para o gene D-loop rDNA (RN=9, RR=7, PR=11 e RS=17) e 25 sequências individuais para o gene COI (RN=3, RO=7, RR=1, PR=3 e RS=11). Entre todos, oito espécimes têm sequências relacionadas com as três porções do mtDNA (5958B e 5958C de RN, 6084B de RR, 5584D e 6664A do PR e 5424B, 5533B e 5554A do RS) (Tabelas 1, 2 e 3).

Em um trabalho prévio realizado por nosso grupo (dados não publicados) espécimes de *R. sanguineus* foram coletados nos estados do Amazonas, Ceará, Espírito Santo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Tocantins e submetidos a extração de DNA. O material genético resultante foi utilizado em reacções de PCR para amplificar os genes COX1 e 12S rDNA. As sequências de nucleotídeos resultantes deste trabalho prévio foram somadas às produzidas pelo presente estudo e utilizadas na construção das árvores filogenéticas. Apesar de serem anteriores, as sequências foram submetidas em um momento posterior ao das produzidas pelo presente trabalho e até a finalização do mesmo ainda não apresentavam um número de acesso do GenBank.

Tabela 1 – Tabela com as informações e os números de acesso no Gen Bank das sequências de COXI dos espécimes machos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari; Ixodidae).

COXI					
Amostra	Estado	Município	Hospedeiro	Gen Bank	Haplótipo
5958B	RN	Parnamirim	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383798	h3
5958C	RN	Parnamirim	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383799	h3
5960	RN	Parnamirim	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383800	h3
5755	RO	Porto Velho	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383801	h5
5762	RO	Porto Velho	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383802	h2
5766D	RO	Porto Velho	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383815	h3
5766G	RO	Porto Velho	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383816	h2
5767C	RO	Porto Velho	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383803	h2
5767D	RO	Porto Velho	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383804	h2
6767D	RO	Porto Velho	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383820	h2
6084B	RR	Boa Vista	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383817	h7
5584D	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383814	h6
5682B	PR	Andará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383796	h2
6664A	PR	União da Vitória	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383797	h4
4727C	RS	Porto Alegre	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383805	h1
4727D	RS	Porto Alegre	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383806	h1
4736B	RS	Rio Grande	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383807	h1
4736C	RS	Rio Grande	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383808	h1
4736D	RS	Rio Grande	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383809	h1
4736F	RS	Rio Grande	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383810	h1
5424B	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383818	h1
5533B	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383811	h1
5533C	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383812	h1
5535C	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383813	h1
5554A	RS	Imbé	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383819	h1

Tabela 2 – Tabela com as informações e os números de acesso no Gen Bank das sequências de 12S rDNA dos espécimes machos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari; Ixodidae).

12S rDNA					
Amostra	Estado	Município	Hospedeiro	Gen Bank	Haplótipo
5958A	RN	Parnamirim	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383865	hB
5958B	RN	Parnamirim	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383866	hB
5958C	RN	Parnamirim	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383867	hB
5959A	RN	Parnamirim	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383868	hB
5960	RN	Parnamirim	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383869	hB
5961B	RN	Parnamirim	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383870	hD
5961C	RN	Parnamirim	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383871	hD
6062D	RN	Santa Cruz	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383872	hB
6062E	RN	Santa Cruz	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383873	hB
6062F	RN	Santa Cruz	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383874	hB
5766D	RO	Porto Velho	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383875	hB
5766E	RO	Porto Velho	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383876	hA
5766F	RO	Porto Velho	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383877	hA
5766G	RO	Porto Velho	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383878	hA
5766H	RO	Porto Velho	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383879	hA
5767C	RO	Porto Velho	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383880	hA
5767D	RO	Porto Velho	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383881	hA
6081D	RR	Boa Vista	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383882	hA
6084B	RR	Boa Vista	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383883	hA
6084D	RR	Boa Vista	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383884	hA
6085B	RR	Cantá	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383885	hA
6092B	RR	Boa Vista	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383886	hA
6096B	RR	Boa Vista	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383887	hA
5584C	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383888	hA
5584D	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383889	hB
5585A	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383890	hA
5587B	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383891	hA
5588B	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383892	hA
5682B	PR	Andira	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383893	hA
5698A	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383894	hA
5704B	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383895	hA
5704C	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383896	hA
5977	PR	Santa Cruz	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383897	hA
5994A	PR	Santa Isabel do Ivaí	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383898	hB
6664A	PR	União da Vitória	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383899	hA
6664B	PR	União da Vitória	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383900	hA
5310A	PR	União da Vitória	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383909	hB
5525C	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383901	hC
5525D	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383902	hC
5533B	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383903	hC

5553C	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383904	hC
5553F	RS	Imbé	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383905	hC
5554A	RS	Imbé	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383906	hC
5554B	RS	Imbé	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383907	hC
5554C	RS	Imbé	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383908	hC
5424A	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383910	hC
5424B	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383911	hC

Tabela 3 – Tabela com as informações e os números de acesso no Gen Bank das sequências de D-loop dos espécimes machos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari; Ixodidae).

D-loop					
Amostra	Estado	Município	Hospedeiro	Gen Bank	Haplótipo
5977	RN	Santa Cruz	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383832	hVII
5958A	RN	Parnamirim	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383833	hII
5958B	RN	Parnamirim	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383834	hII
5958C	RN	Parnamirim	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383835	hII
5959A	RN	Parnamirim	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383836	hII
5961C	RN	Parnamirim	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383837	hII
6062D	RN	Santa Cruz	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383838	hII
6062E	RN	Santa Cruz	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383839	hII
6062F	RN	Santa Cruz	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383840	hII
6082B	RR	Boa Vista	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383841	hVII
6084B	RR	Boa Vista	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383846	hIII
6084D	RR	Boa Vista	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383842	hIII
6088A	RR	Boa Vista	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383847	hIII
6092A	RR	Boa Vista	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383843	hIII
6096B	RR	Boa Vista	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383844	hIII
6107	RR	Boa Vista	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383845	hIII
5584C	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383821	hIV
5584D	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383822	hII
5585A	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383823	hIX
5586A	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383824	hII
5587B	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383825	hV
5588B	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383826	hIV
5698A	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383827	hIV
5704C	PR	Cambará	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383828	hIV
5994A	PR	Santa Isabel do Ivaí	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383829	hII
6664A	PR	União da Vitória	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383830	hV
6664B	PR	União da Vitória	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383831	hV
4726	RS	Pelotas	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383848	hI
4727C	RS	Porto Alegre	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383849	hI
4727D	RS	Porto Alegre	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383850	hI
4736C	RS	Rio Grande	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383851	hI
4736D	RS	Rio Grande	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383852	hI
4736F	RS	Rio Grande	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383853	hI
5424B	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383864	hI
5525C	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383854	hI

5525C	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383854	hl
5525D	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383855	hl
5533B	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383856	hl
5534B	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383857	hl
5535C	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383858	hl
5535D	RS	Osório	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383859	hl
5538C	RS	Arroio do Sal	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383860	hl
5553D	RS	Imbé	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383861	hl
5553E	RS	Imbé	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383862	hl
5554A	RS	Imbé	<i>Canis lupus familiaris</i>	KX383863	hl

As sequências foram alinhadas usando o servidor on-line MAFFT (Kuraku et al. 2013). Uma vez alinhadas, o programa online PhyML com Smart Model Selection (Guindon et al. 2010) foi utilizado para identificar o modelo evolutivo otimizado que melhor descreve o conjunto de dados das sequências e para a construção de árvores filogenéticas de máxima verossimilhança. O Akaike Information Criterion (AIC) indicou os modelos que melhor se adaptam e os resultados foram HKY85+G+I+F para o conjunto de dados concatenados (238 pb do 12S rDNA + 472 pb do COX1) e TN93+G+F para 12S rDNA (273 pb), gene COX1 (453 pb) e D-loop rDNA (322 pb). Como uma medida da solidez de cada nó o método de bootstrap foi aplicado com 1000 réplicas. A análise par a par das sequências do gene COX1 foi conduzida utilizando o método Kimura-2 parâmetro (K2P) (Kimura, 1980) no programa MEGA 5,2 (Tamura et al. 2011). A análise foi realizada usando a sequência KC243890, com 472 pb, como comprimento de limite.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Microscopia eletrônica de varredura de machos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)

A distribuição de cerdas dorsais no idiossoma variou entre os espécimes de cada região (Figuras 4A, 5A, 6A, 7A, 8A e 9A). Essa variação também foi observada por Barnes & Ruppert (1996), que afirmaram que o número, forma e localização das cerdas variam de um estágio para outro e também entre diferentes espécies.

Estas variações mostram que a taxonomia de *R. sanguineus* é confusa. Grande parte dessa confusão é devido à dificuldade de distinguir as espécies por semelhança morfológica dos adultos e ausência de espécime-tipo de *R. sanguineus* s.s. (Pegram et al. 1987a, b).

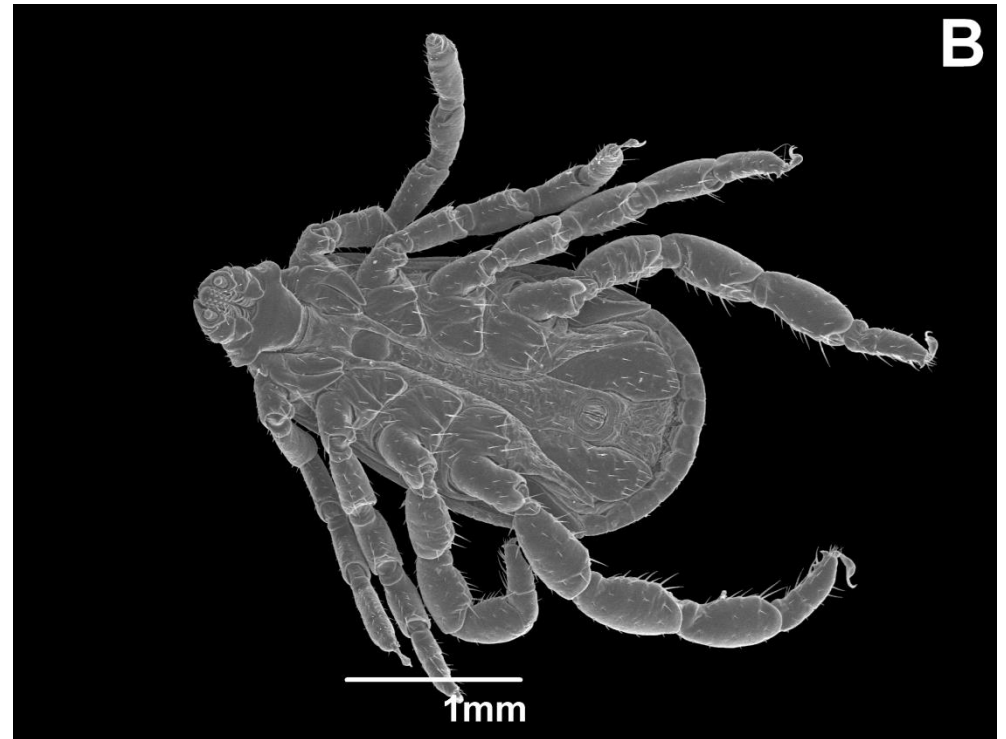
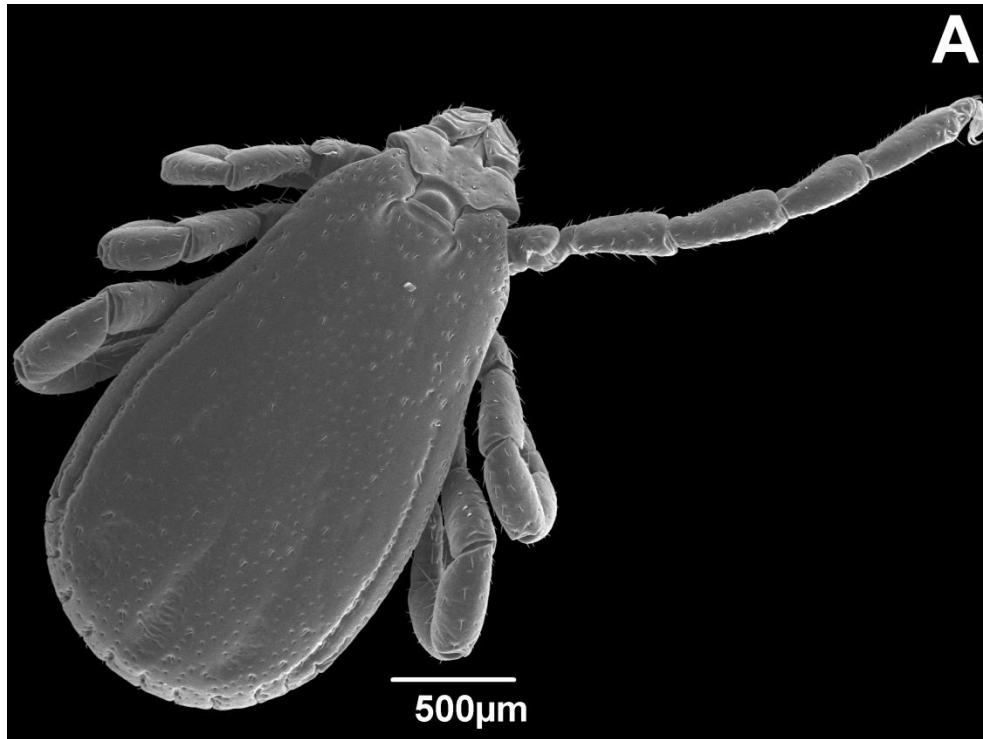


Figura 4 - Micrografia eletrônica de varredura de machos adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Rondônia. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime.

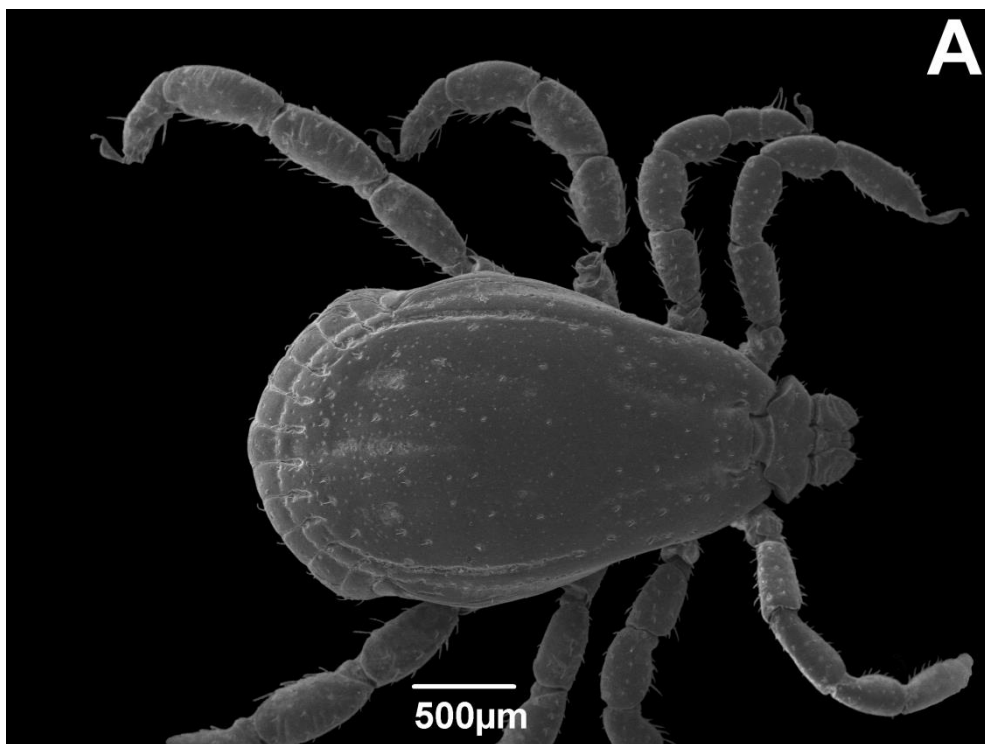


Figura 5 - Micrografia eletrônica de varredura de machos adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Roraima. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime.

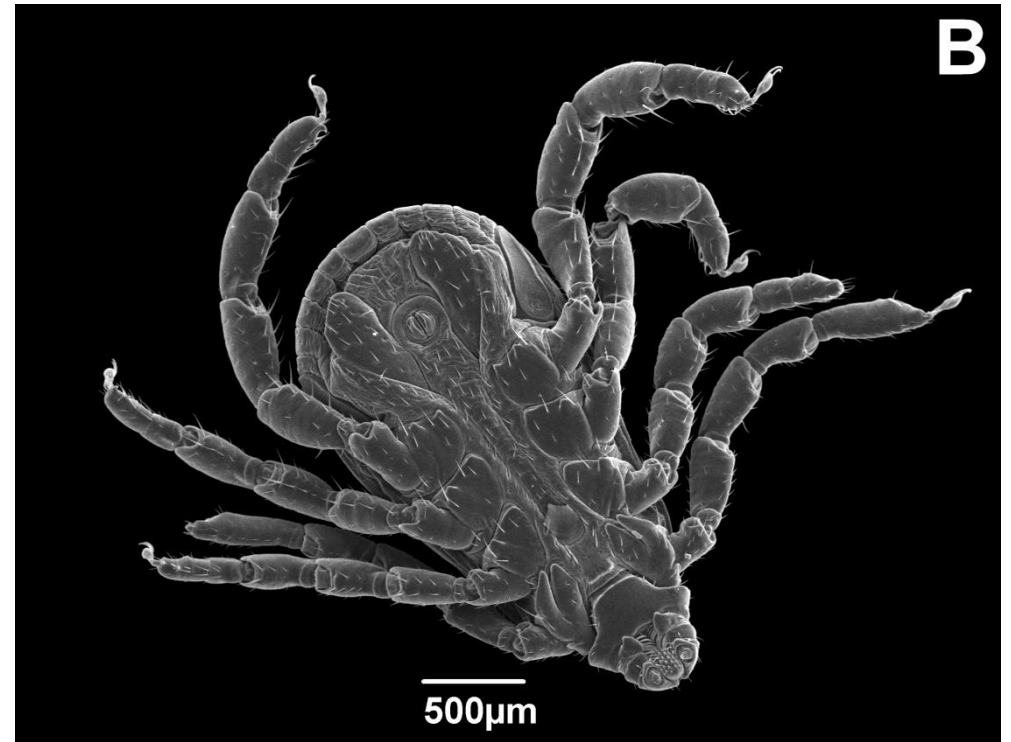
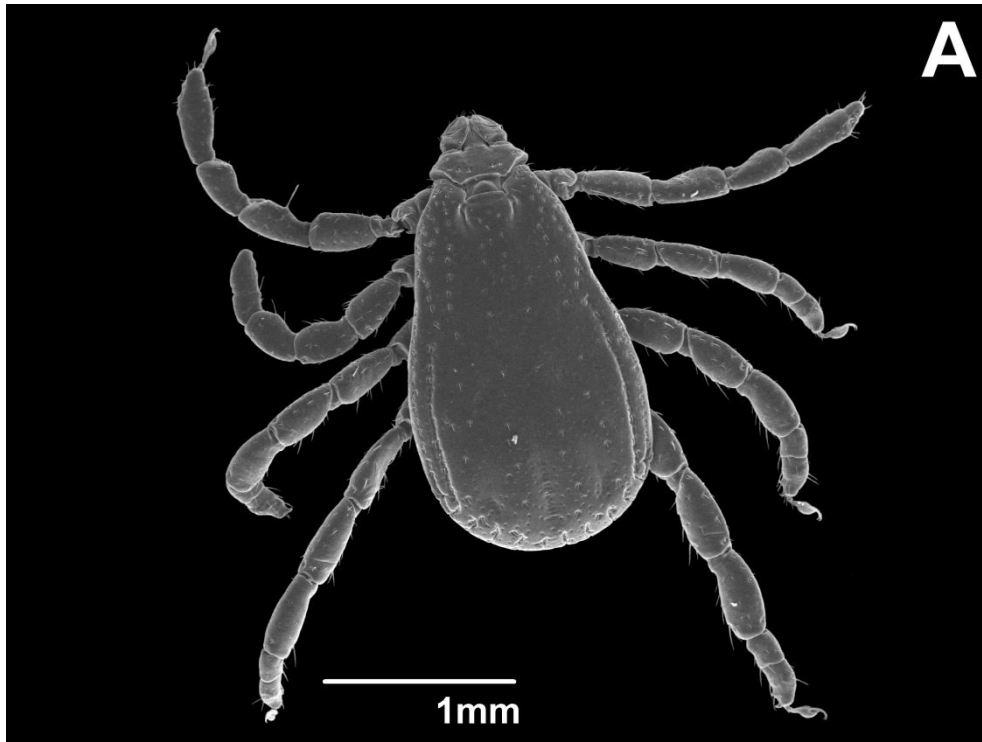


Figura 6 - Micrografia eletrônica de varredura de machos adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Pernambuco. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime.

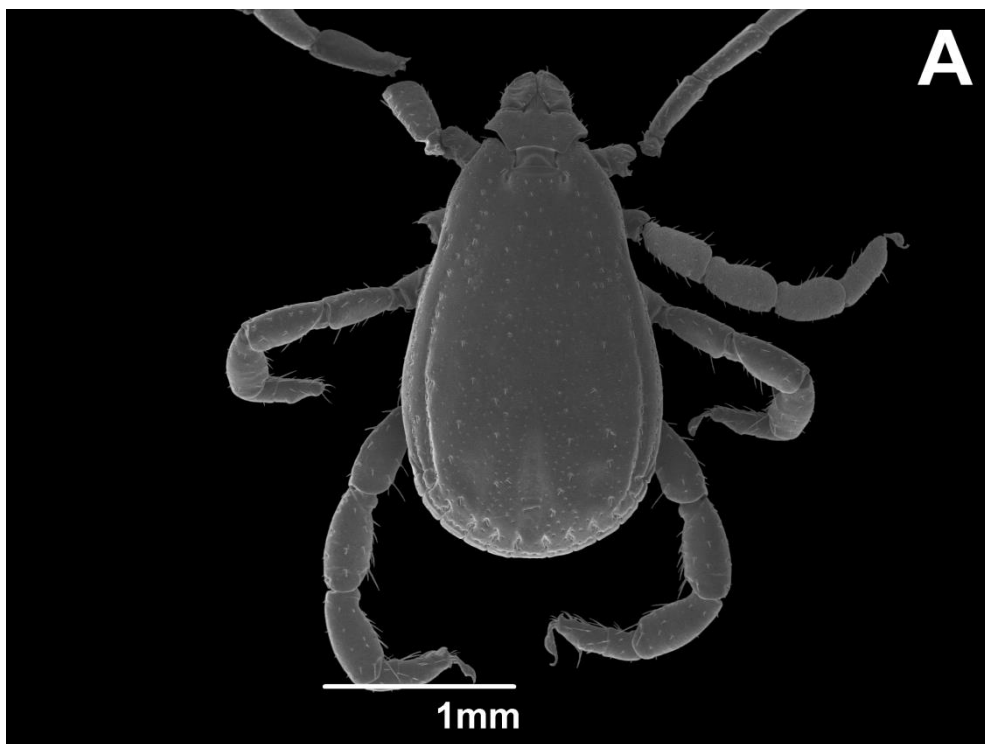


Figura 7 - Micrografia eletrônica de varredura de machos adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Pernambuco. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime.

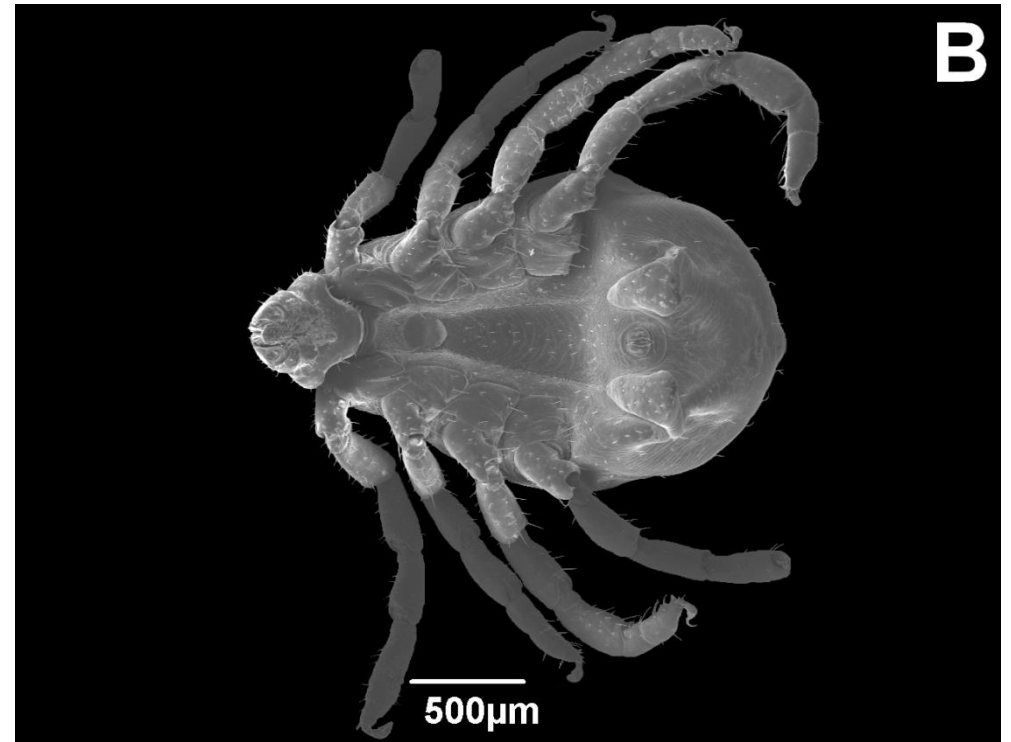
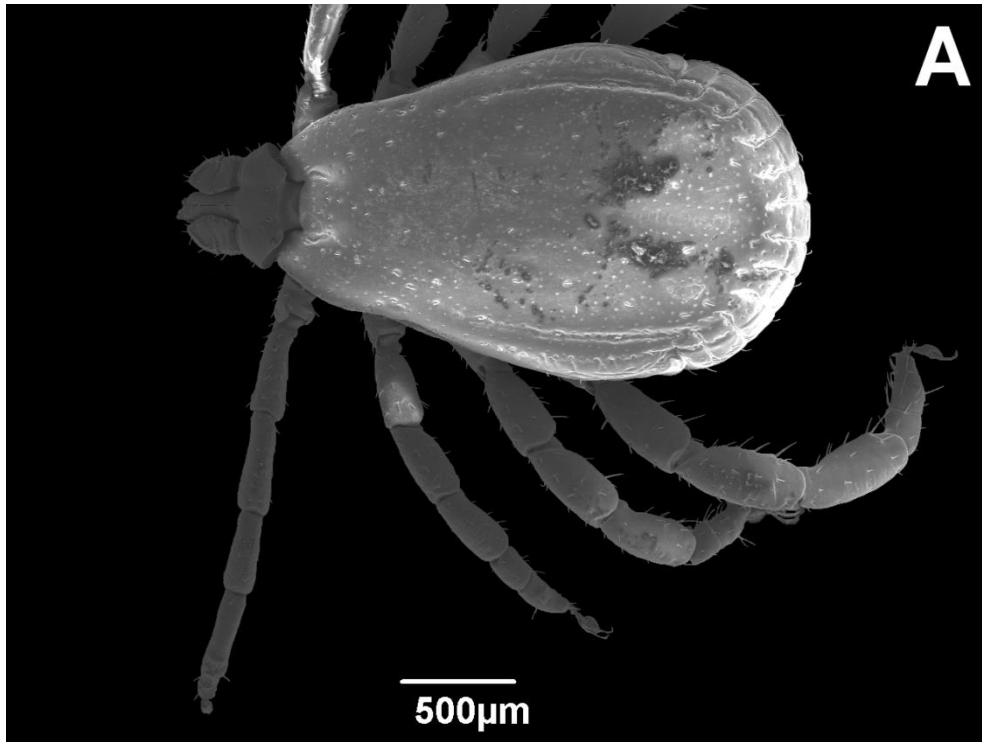


Figura 8 - Micrografia eletrônica de varredura de machos adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Paraná. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime.

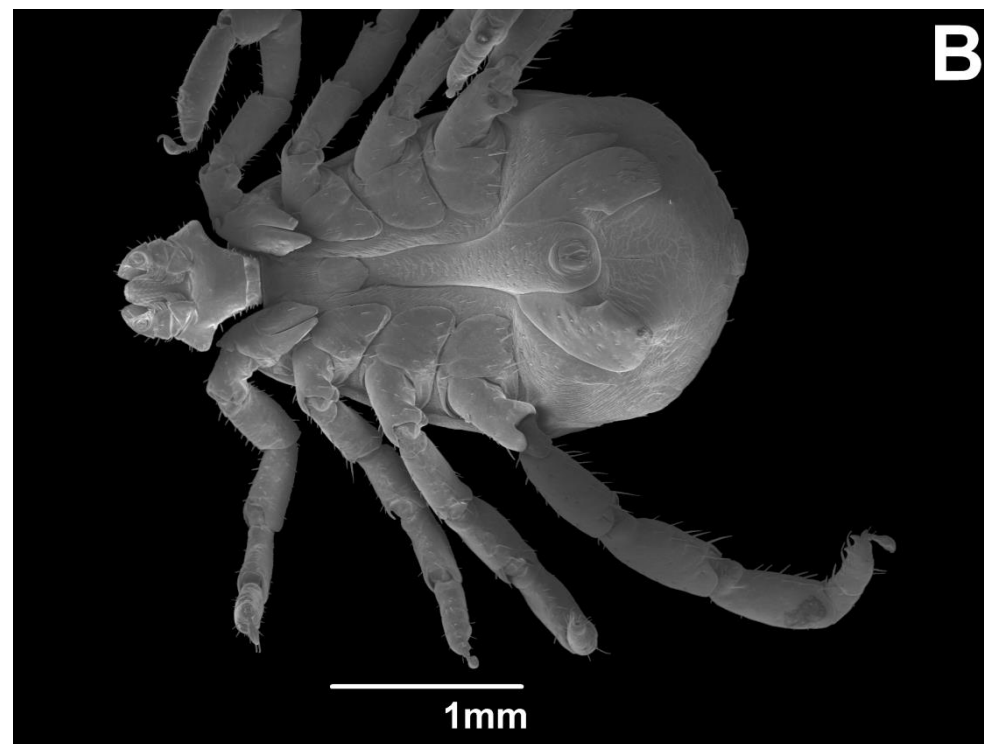
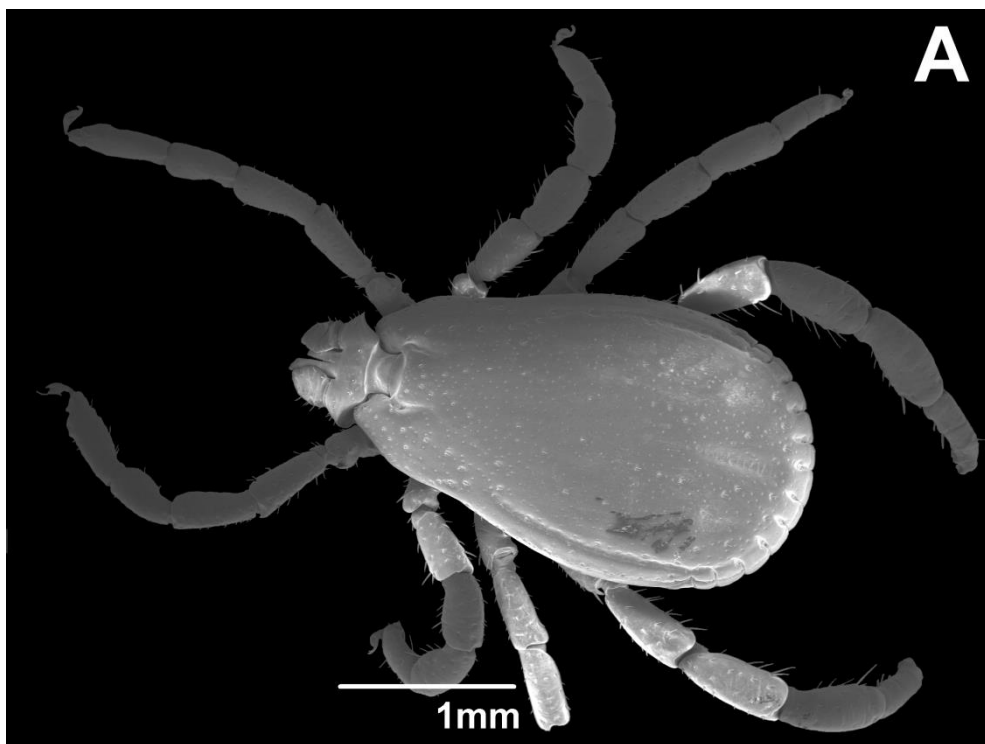


Figura 9 - Micrografia eletrônica de varredura de machos adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Rio Grande do Sul. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime.

Gnatossoma é a porção anterior móvel do corpo que inclui a base do capitulum, hipostômio (Hyp), palpos (P) e quelíceras (CH) (Walker et al., 2005) (Figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15).

Base do capitulum é a porção basal em que as peças bucais estão ligadas; no gênero *Rhipicephalus* essa base é hexagonal (Figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15). Na base do capitulum dos espécimes de todas as localidades, cerdas e sensilla foram encontradas.

De acordo com Sonenshine (1991), os receptores quimiossensoriais e mecanosensoriais que fornecem informações sobre os hospedeiros podem ser encontrados nas quelíceras (Ch). No presente estudo, assim como Oliveira et al. (2005), essas estruturas relatadas por Sonenshine (1991) não foram encontradas.

A comparação do tamanho dos palpos e das quelíceras fornece um caráter importante utilizado para a distinção entre machos e fêmeas (Walker et al. 2005) e entre fêmeas de *R. sanguineus* de diferentes países (Oliveira et al. 2005). Oliveira et al. (2005) constataram que *R. sanguineus* da Argentina apresenta palpos ligeiramente mais longo que quelíceras enquanto *R. sanguineus* do Brasil apresenta palpos muito mais longos do que quelíceras.

Todos os carrapatos do presente estudo apresentaram palpos ligeiramente mais longos do que as quelíceras, semelhantes aos carrapatos da Argentina. A razão pela qual as características dos espécimes coletados neste estudo não se assemelham com os espécimes coletados no Brasil por Oliveira et al. (2005) é devido ao fato de que a coleta desses autores foi restrita a um único local (São Paulo), no sudeste do Brasil, enquanto o presente estudo abrangeu coletas de diferentes locais em três regiões do Brasil. Estes dados podem sugerir a existência de diferenças morfológicas em diferentes populações de *R. sanguineus* no Brasil.

O órgão de Haller é a estrutura sensorial localizada na superfície dorsal do tarso subapical I (Walker et al. 2005). A arranjo deste órgão compreende uma cápsula anterior (aP) e uma cápsula posterior, com várias sensilas que

respondem a diferentes estímulos (Krantz & Walter 2009).

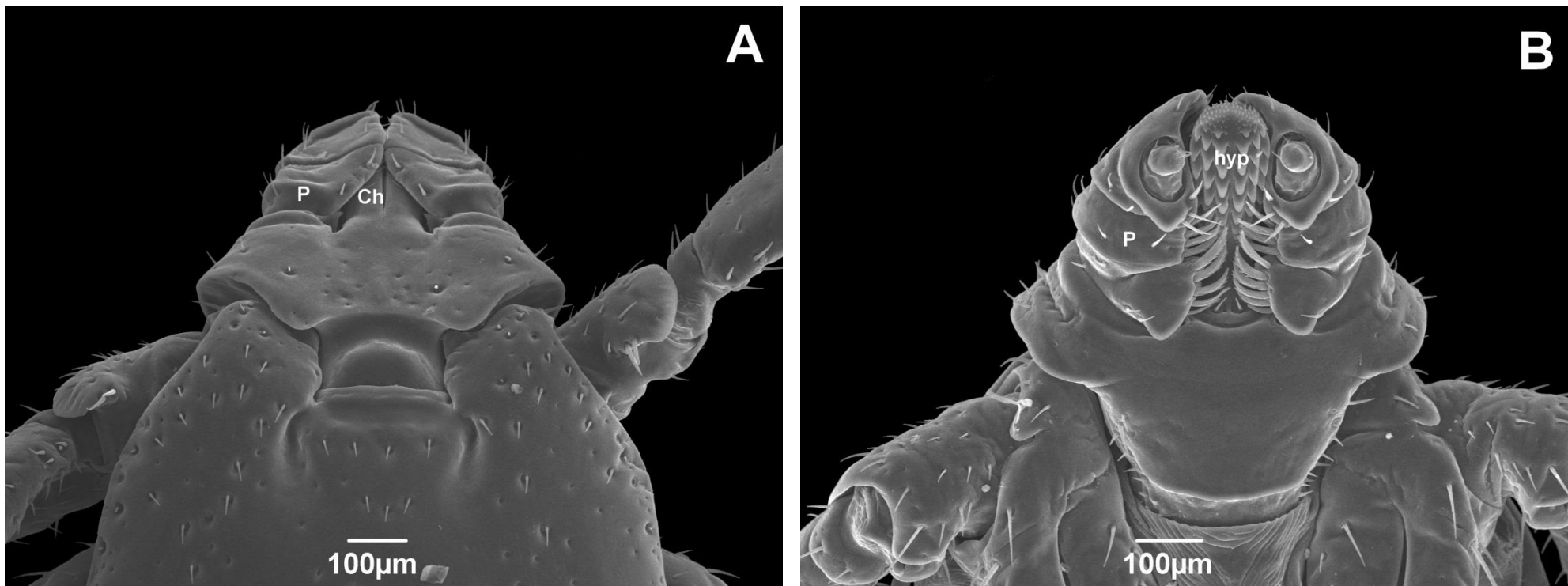


Figura 10 - Micrografia eletrônica de varredura do capitulo de machos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Rondônia. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (P) palpo, (Ch) quelícera e (hyp) hipostômio.

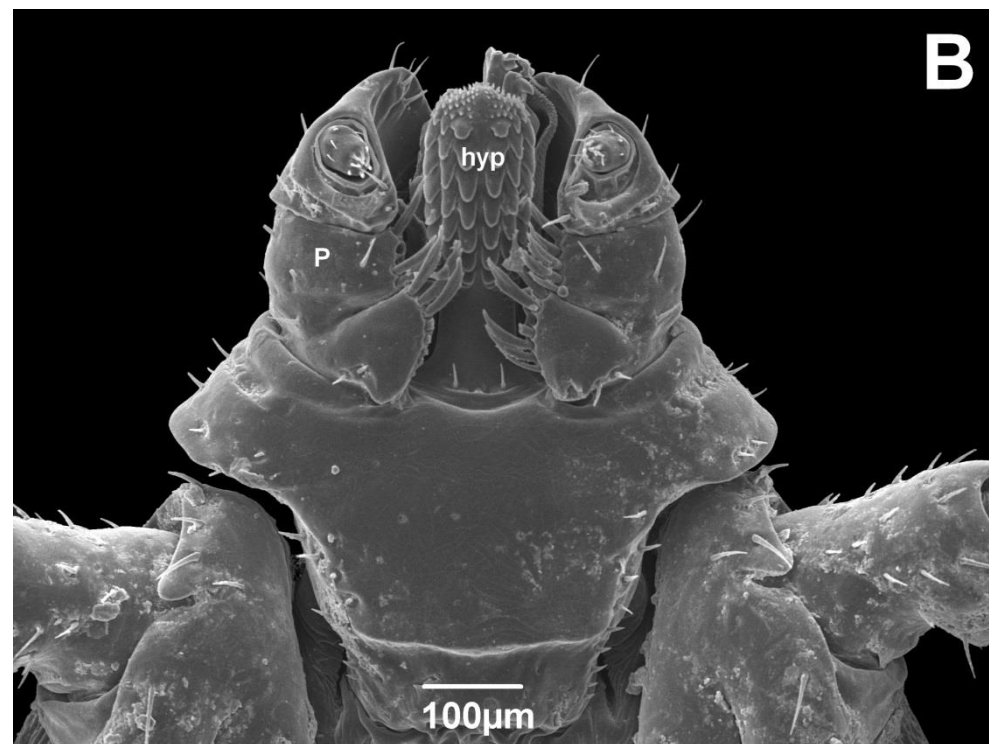
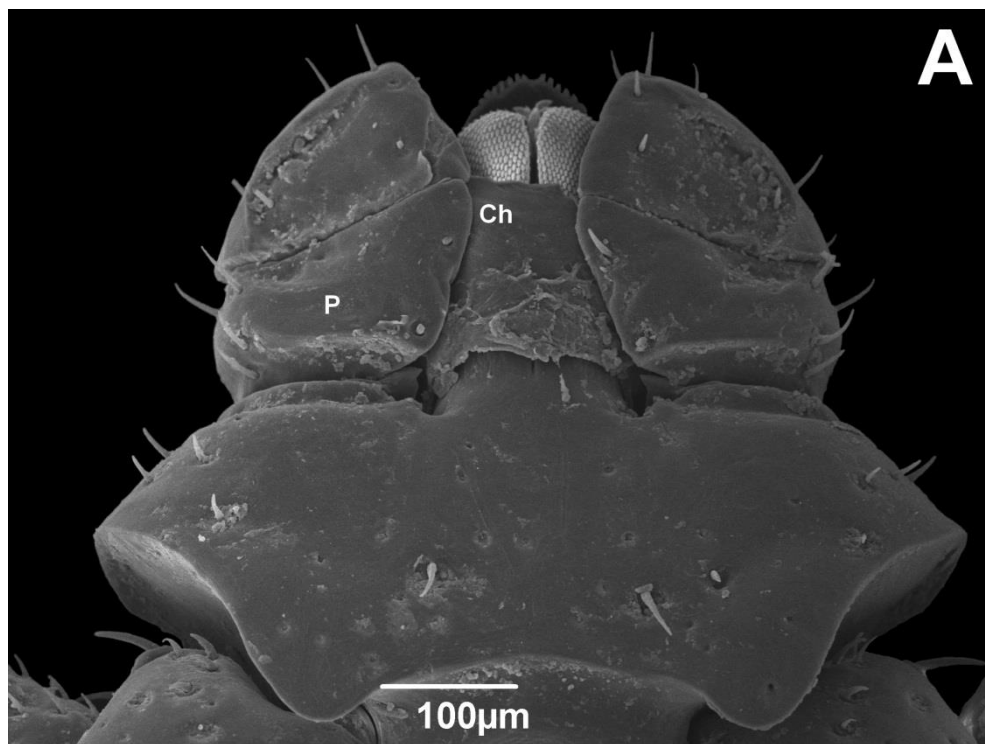


Figura 11 - Micrografia eletrônica de varredura do capitulo de machos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Roraima. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (P) palpo, (Ch) quelícera e (hyp) hipostômio.

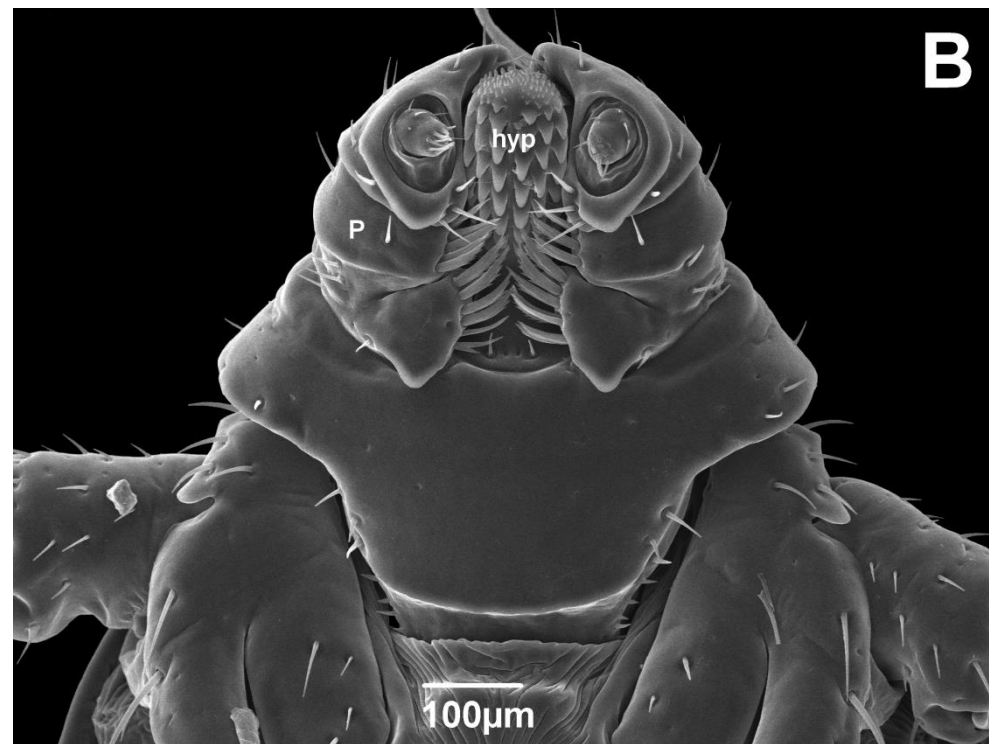
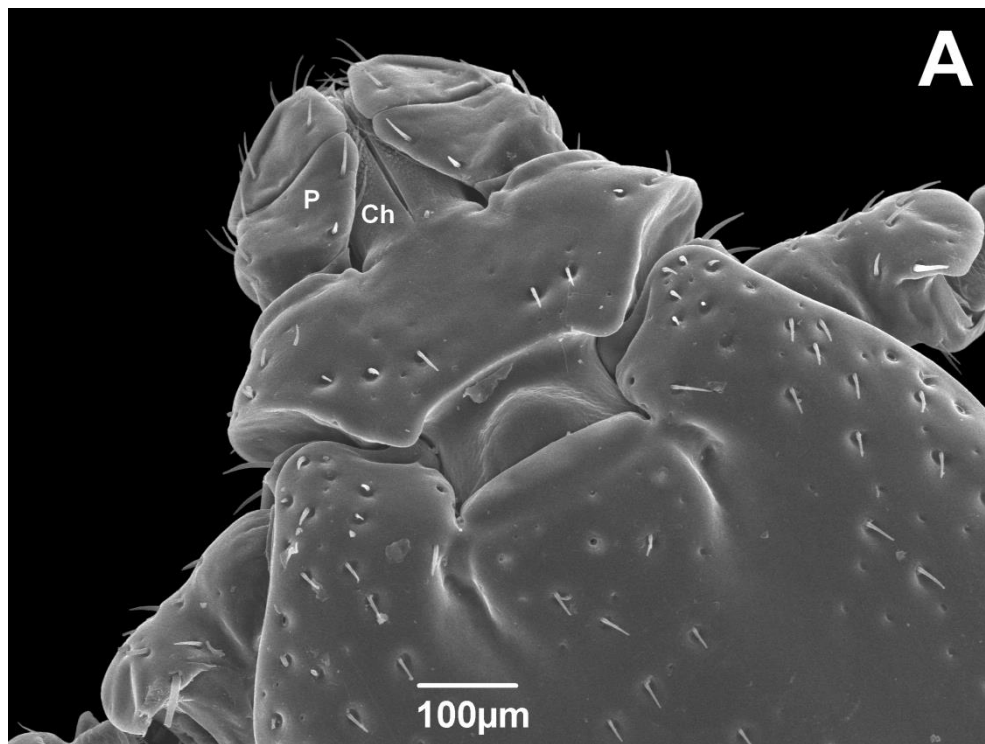


Figura 12 - Micrografia eletrônica de varredura do capitulo de machos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Pernambuco. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (P) palpo, (Ch) quelícera e (hyp) hipostômio.

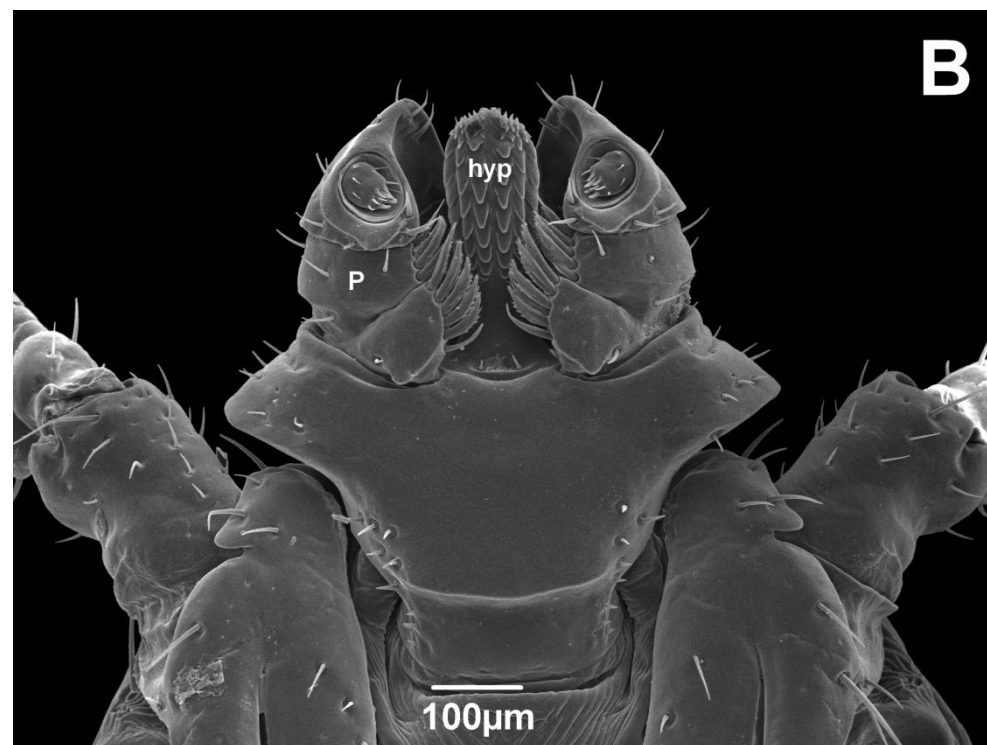
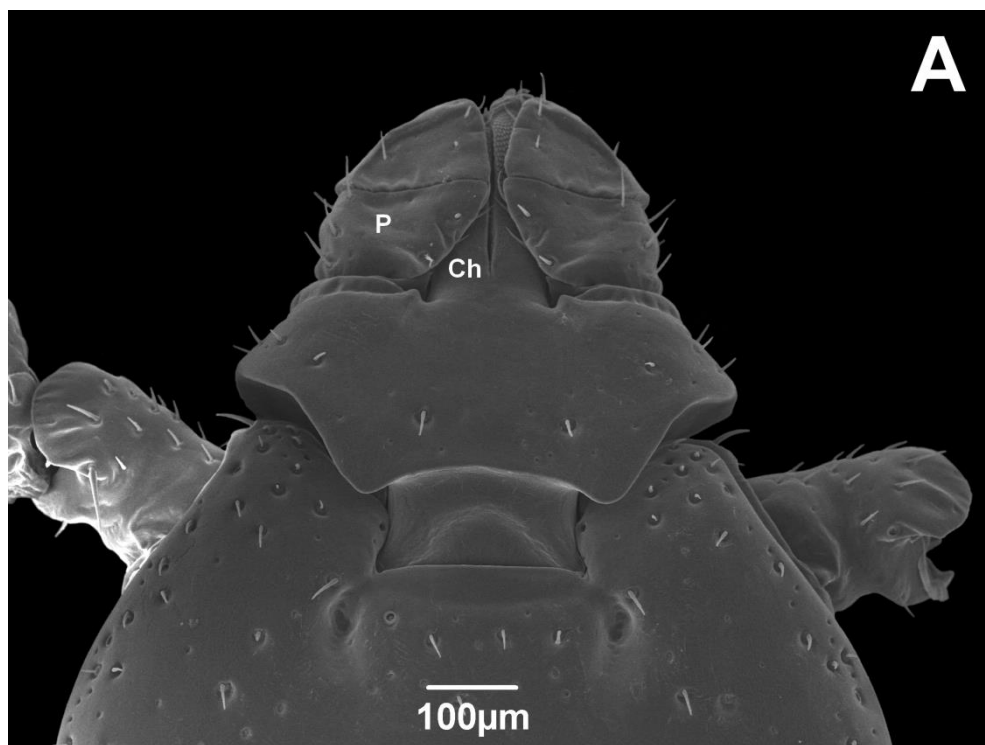


Figura 13 - Micrografia eletrônica de varredura do capitulo de machos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Rio Grande do Norte. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (P) palpo, (Ch) quelícera e (hyp) hipostômio.

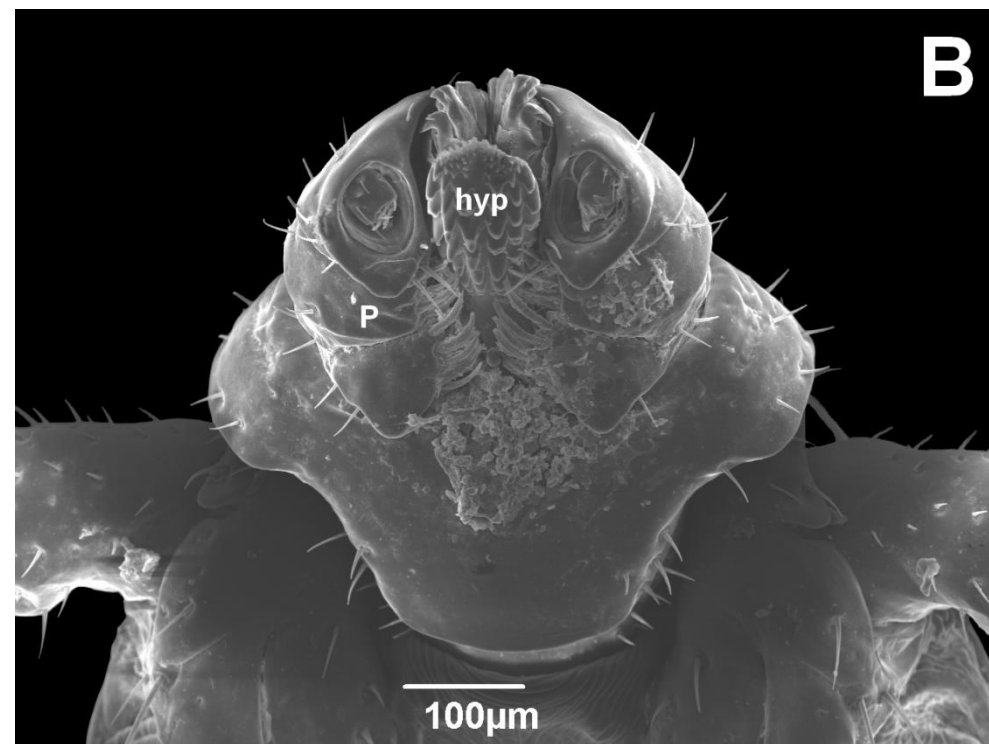
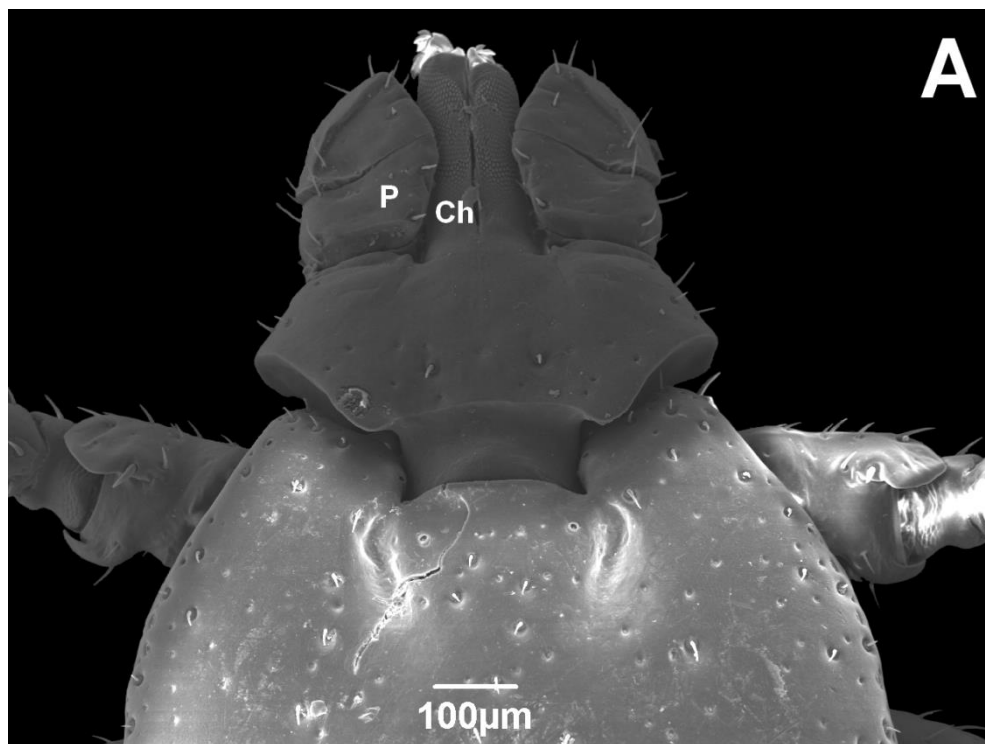


Figura 14 - Micrografia eletrônica de varredura do capitulo de machos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Paraná. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (P) palpo, (Ch) quelícera e (hyp) hipostômio.

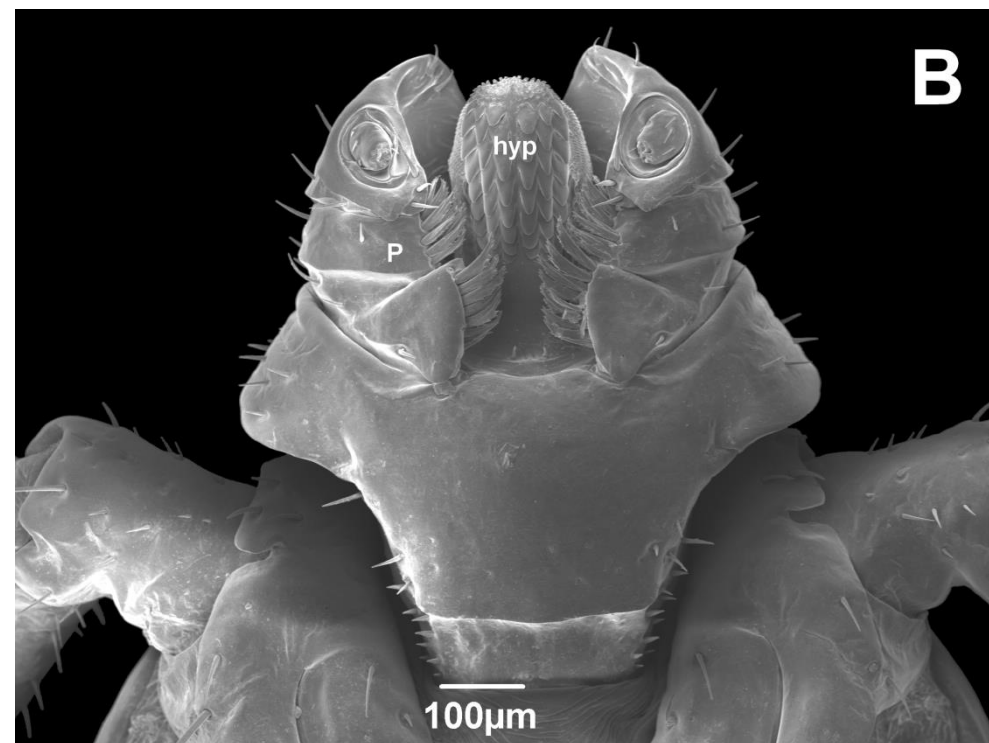
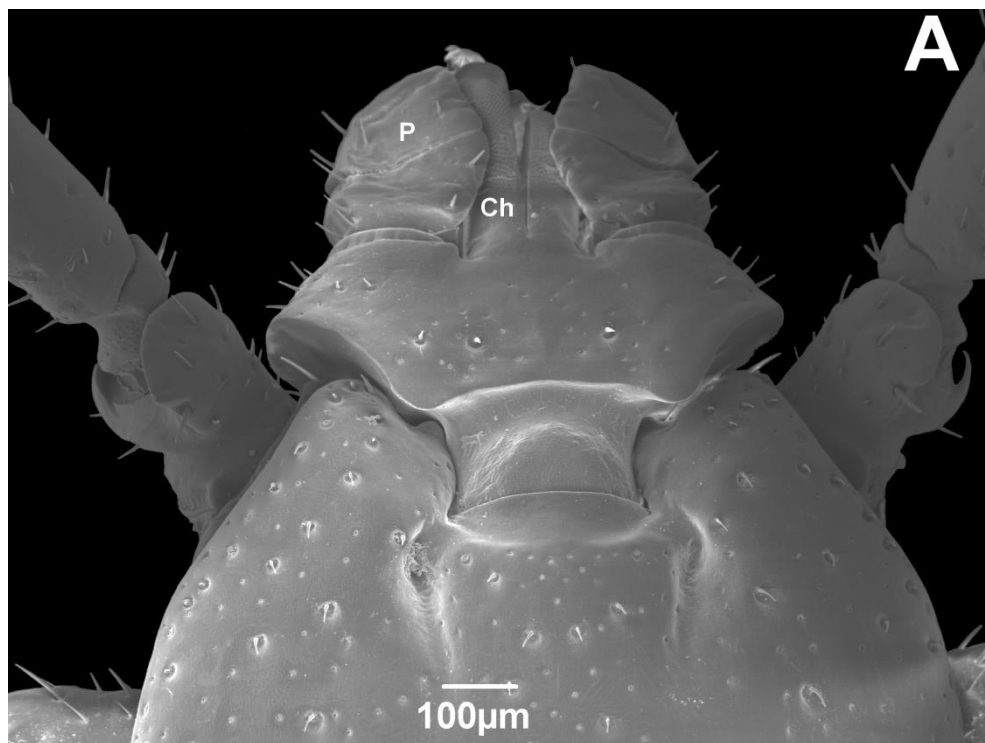


Figura 15 - Micrografia eletrônica de varredura do capitulo de machos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em Rio Grande do Sul. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (P) palpo, (Ch) quelícera e (hyp) hipostômio.

Neste estudo, a cápsula anterior do órgão de Haller apresenta sensilas que diferem em forma, e seu número é semelhante ($n = 5$) (Figuras 17, 18, 19, 20 e 21), exceto nos espécimes de RO, nos quais seis sensilas podem ser notadas (Figura 16). O arranjo da cápsula varia entre espécies coletadas nos diferentes Estados (Figura 6). De acordo Foelix & Axtell (1972) o órgão de Haller não difere entre as formas de larvas e de adultos, mas pode haver variação entre espécies e entre as espécies, como observado por Bruce (1971) e Foelix & Axtell (1972).

Os festões (F) dos machos observados no presente estudo mostrou onze porções retangulares distintas que só são delimitados por sulcos laterais profundos (Figuras 22A, 24A, 25A e 27A), exceto nas amostras de Roraima e Paraná onde os festões foram delimitadas pelos sulcos laterais (Lg) e pela sulco marginal (Mg) (Figura 23A e 26A). Esse mesmo padrão de delimitação foi observado por Oliveira et al. (2005) em fêmeas coletadas em São Paulo, Brasil.

O processo caudal (Cp) varia em tamanho (Figuras 23B, 25B, 26Be 27B), e é uma protrusão do festão central em machos alimentados. *Rhipicephalus* é o gênero mais comum em que esta característica é vista (Universidade de Bristol Tick ID).

O orifício anal é composto por duas válvulas (V) e o sulco anal (Ag) em todas as amostras coletadas. As válvulas do orifício anal são de forma articulada com quatro cerdas dispostas simetricamente em cada parte (Figuras 22B, 23B, 24B, 25B, 26B e 27B). Oliveira et al. (2005) também observaram o padrão de quatro cerdas em cada válvula para *R. sanguineus* da Argentina, mas para espécimes de São Paulo, as válvulas apresentaram três cerdas mais uma modificada. Por outro lado, o sulco mediano pós-anal (Pmg) foi apenas observado nas amostras de Roraima e Rio Grande do Sul (Figura 23B e 27B). Este sulco não só pode ser observado em *R. sanguineus* de São Paulo (Oliveira et al. 2005), mas também em outras espécies do gênero *Rhipicephalus* (Walker et al. 2005, Horak et al. 2013).

As placas adanais (ad) e as placas acessórias (as) fazem parte da região anogenital e têm a forma de um par ventral de grandes estruturas esclerotizadas localizadas lateralmente ao ânus em machos (Walker et al 2005; Krantz & Walter, 2009). As placas acessórias estão localizadas do lado de fora das placas adanais e variam na forma (Figuras 22B, 23B, 24B, 25B, 26B e 27B).

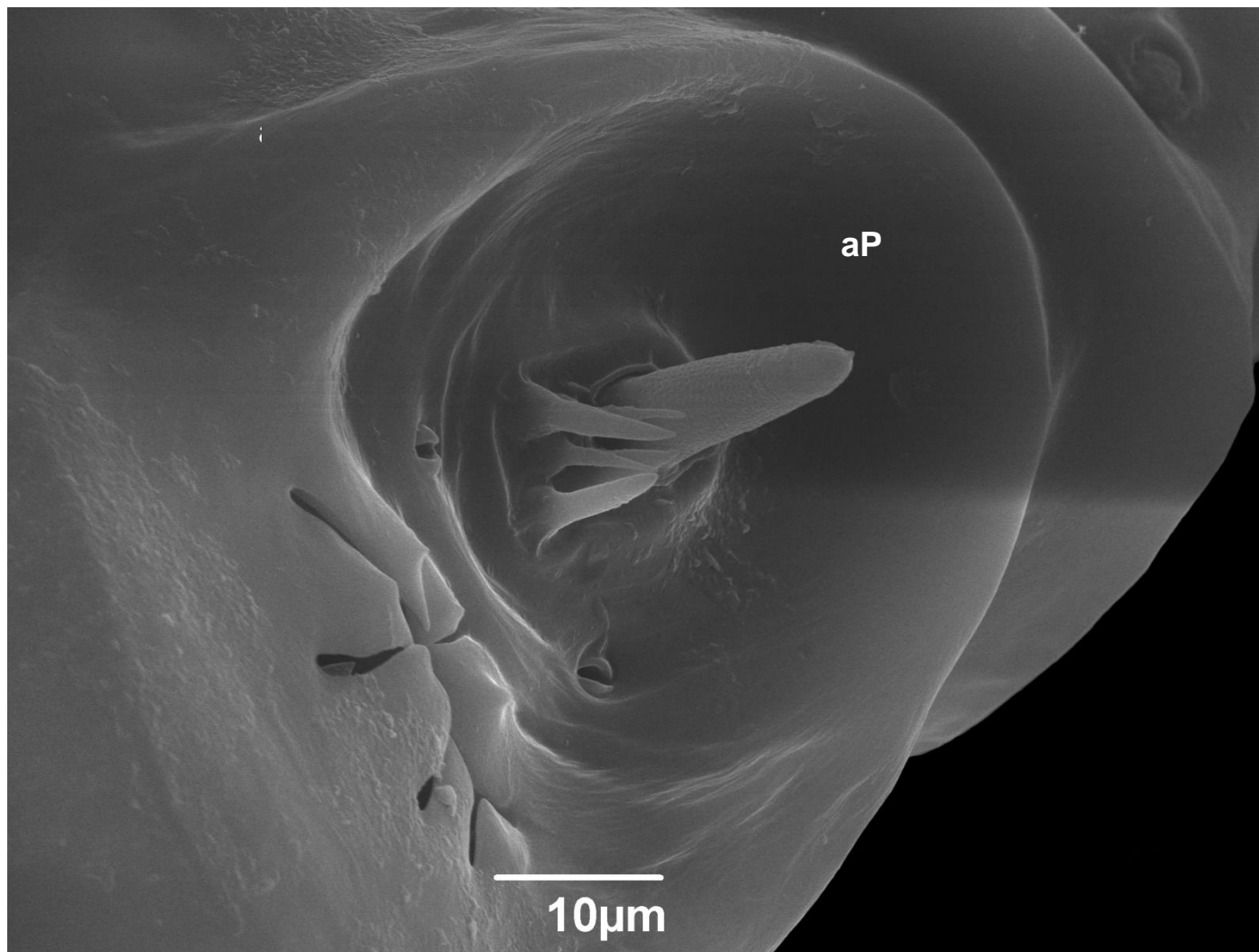


Figura 16 - Micrografia eletrônica de varredura do órgão de Haller de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rondônia. (aP) cápsula anterior.

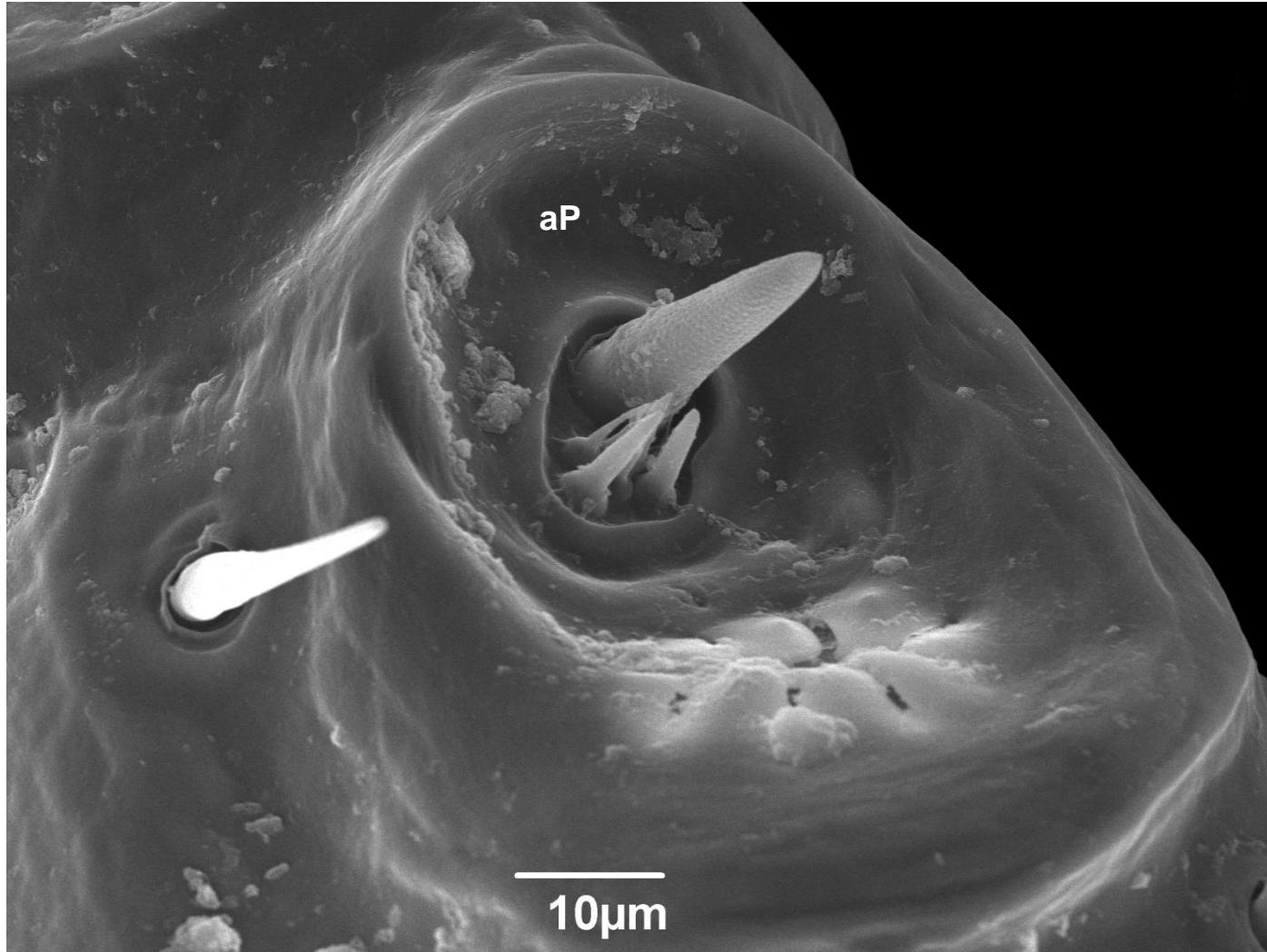


Figura 17 - Micrografia eletrônica de varredura do órgão de Haller de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Roraima. (aP) cápsula anterior.

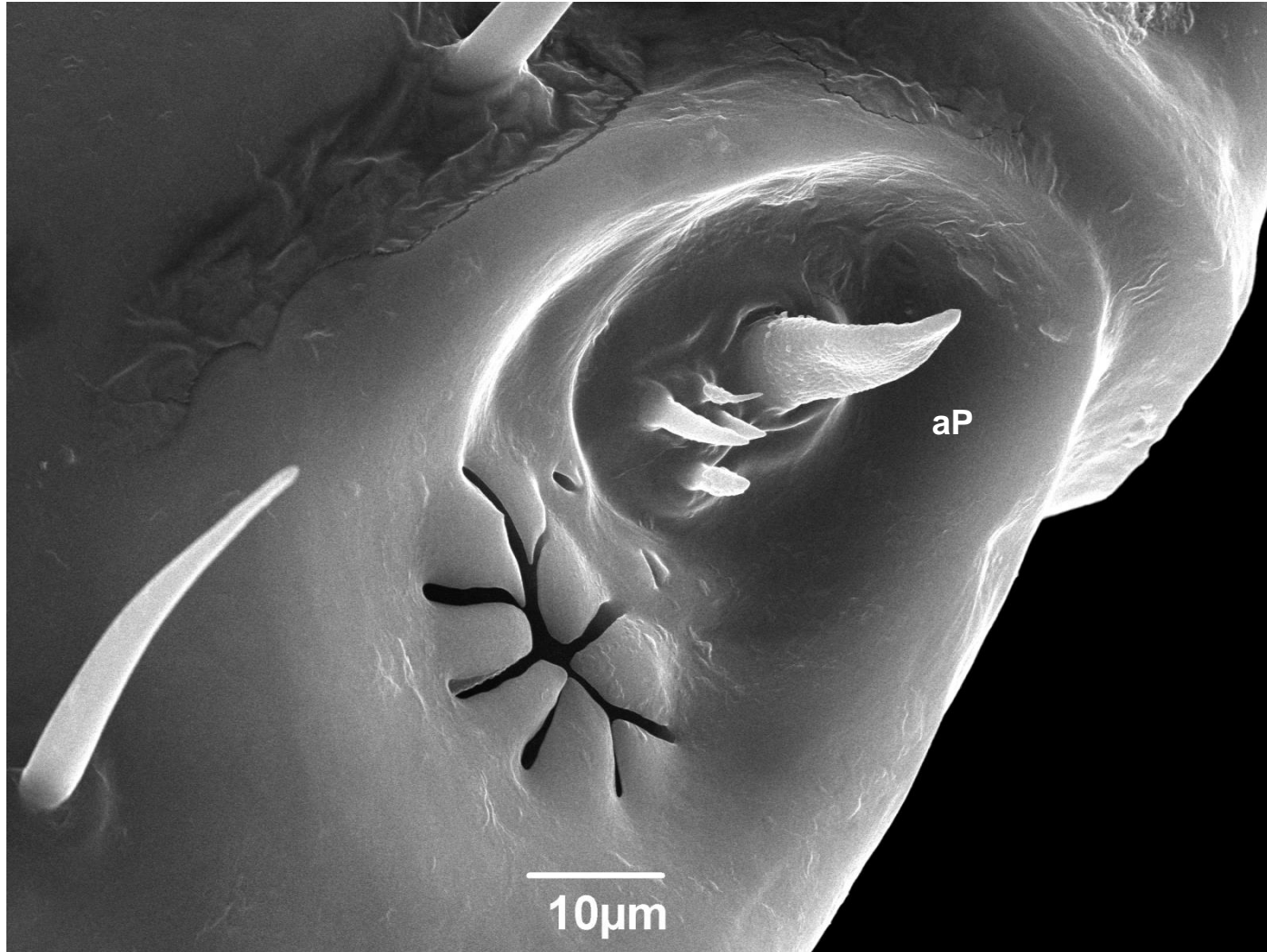


Figura 18 - Micrografia eletrônica de varredura do órgão de Haller de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Pernambuco. (aP) cápsula anterior.

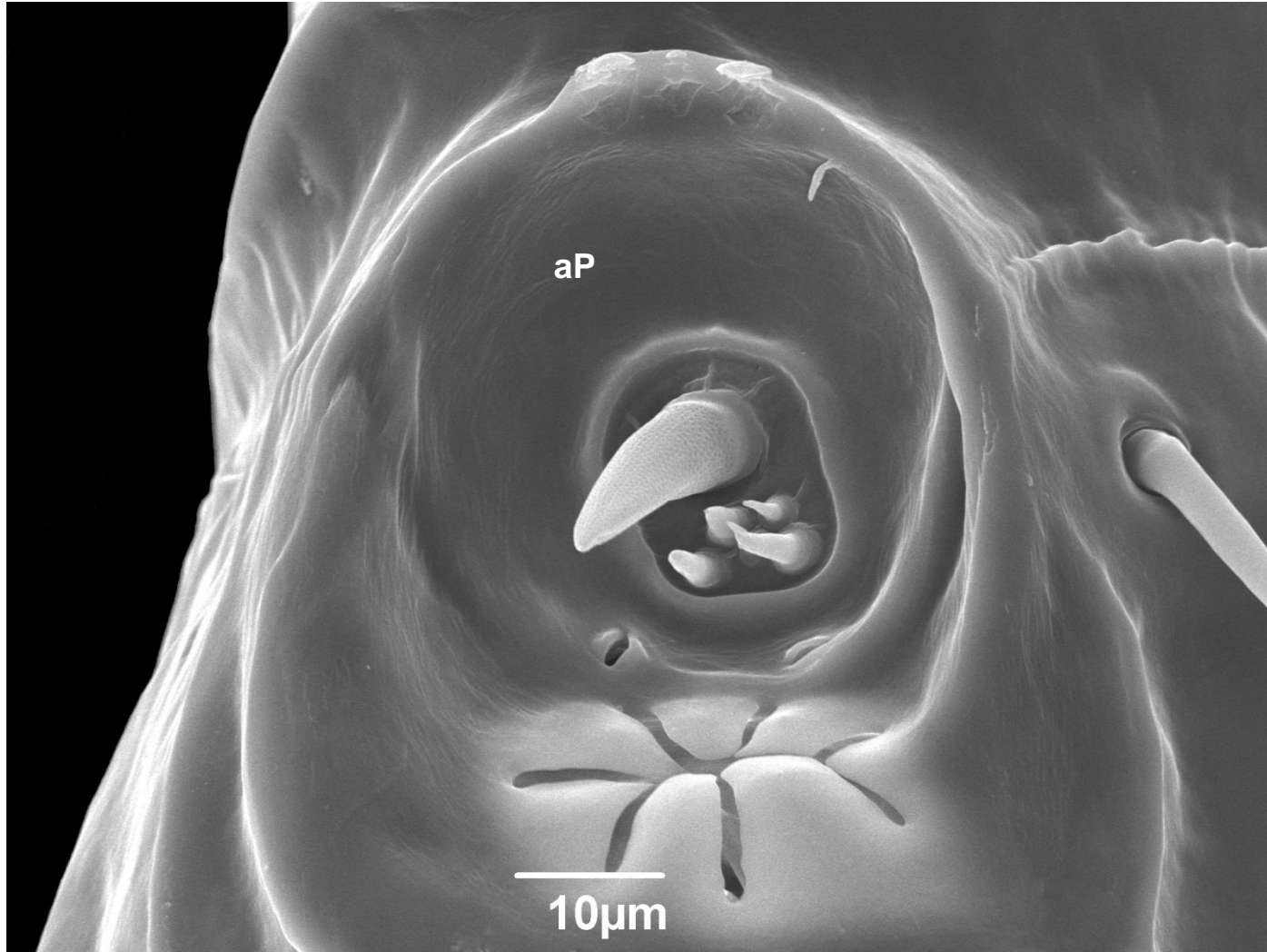


Figura 19 - Micrografia eletrônica de varredura do órgão de Haller de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grande do Norte. (aP) cápsula anterior.

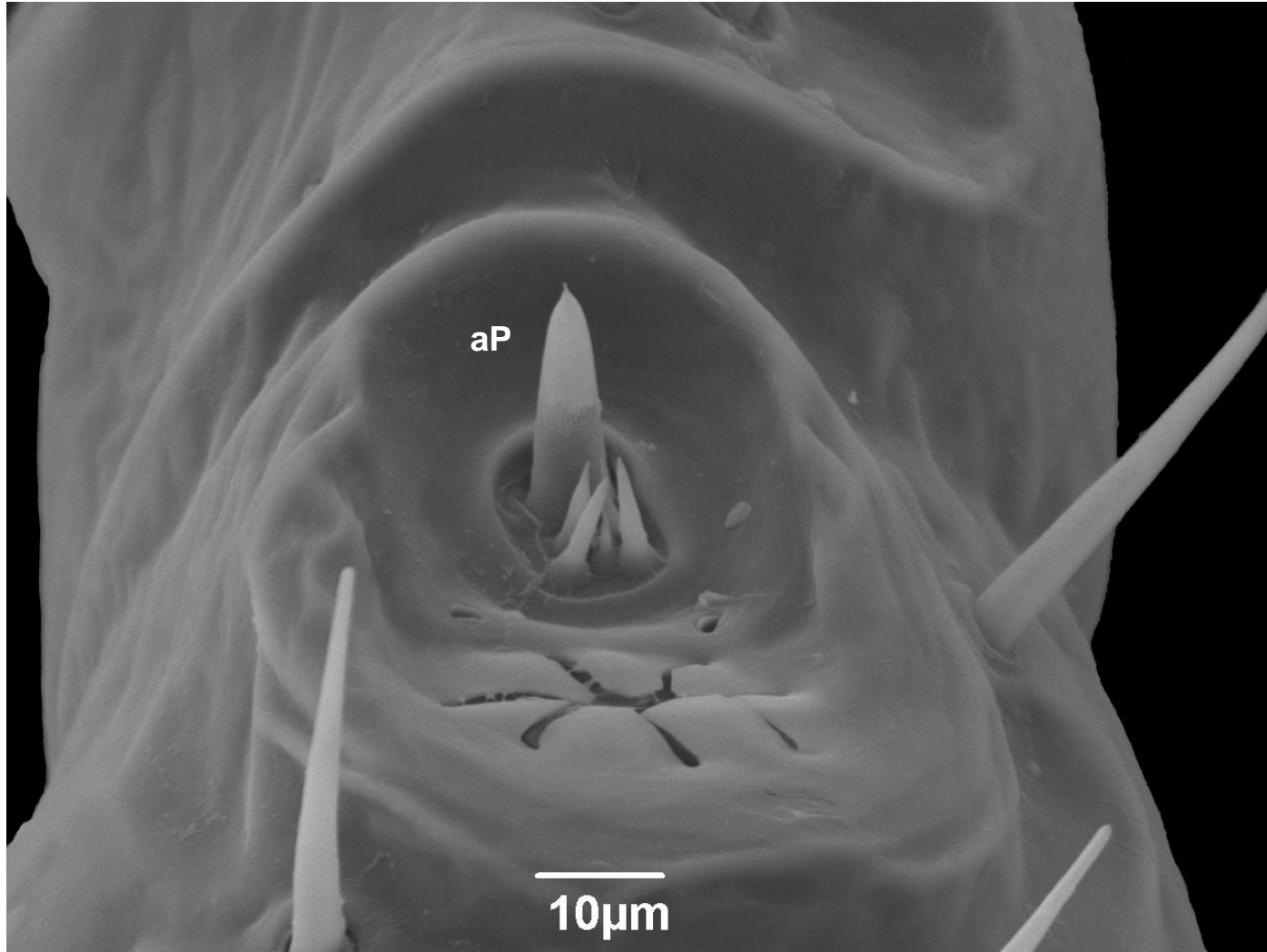


Figura 20 - Micrografia eletrônica de varredura do órgão de Haller de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Paraná. (aP) cápsula anterior.

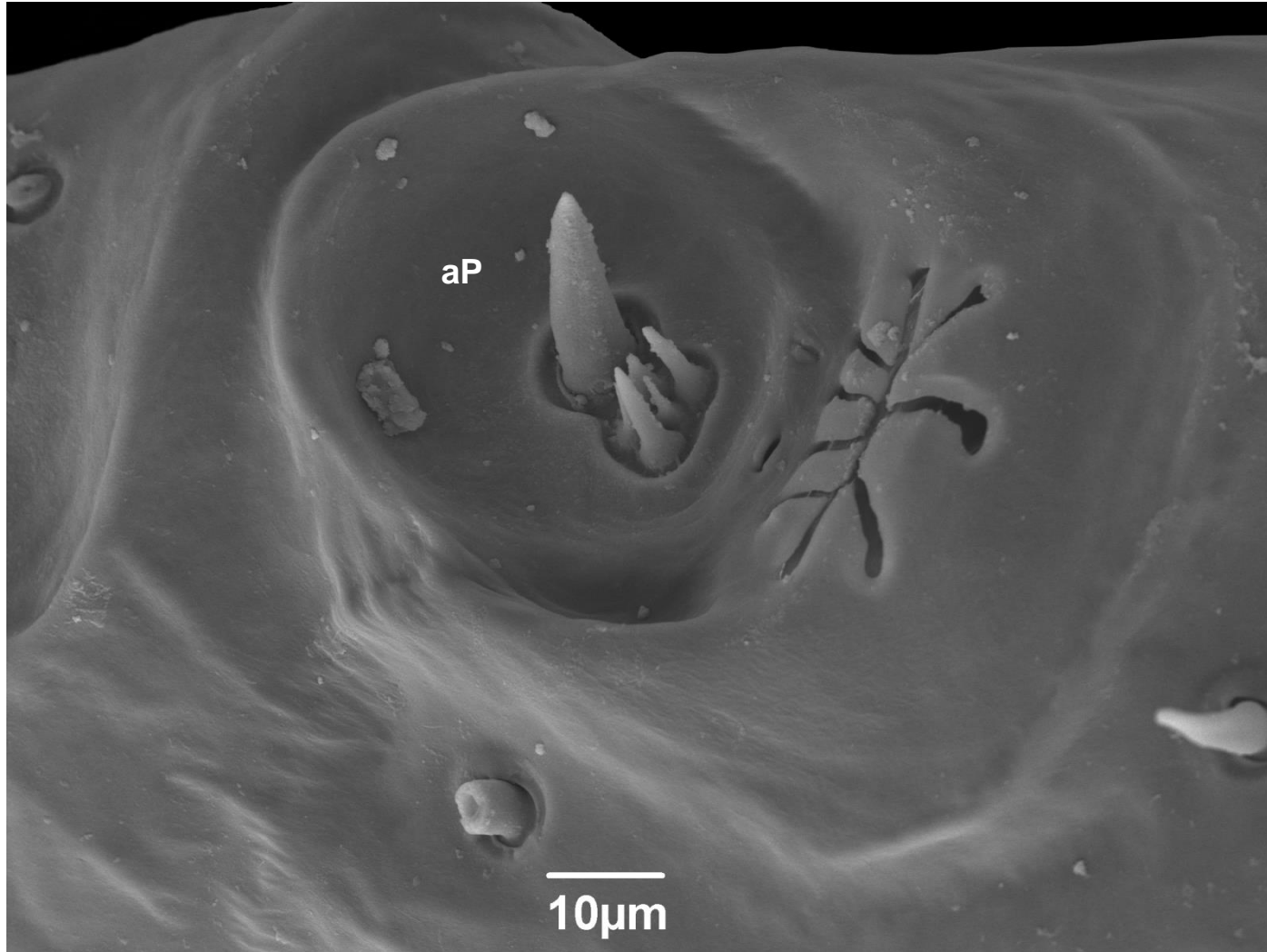


Figura 21 - Micrografia eletrônica de varredura do órgão de Haller de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grande do Sul. (aP) cápsula anterior.

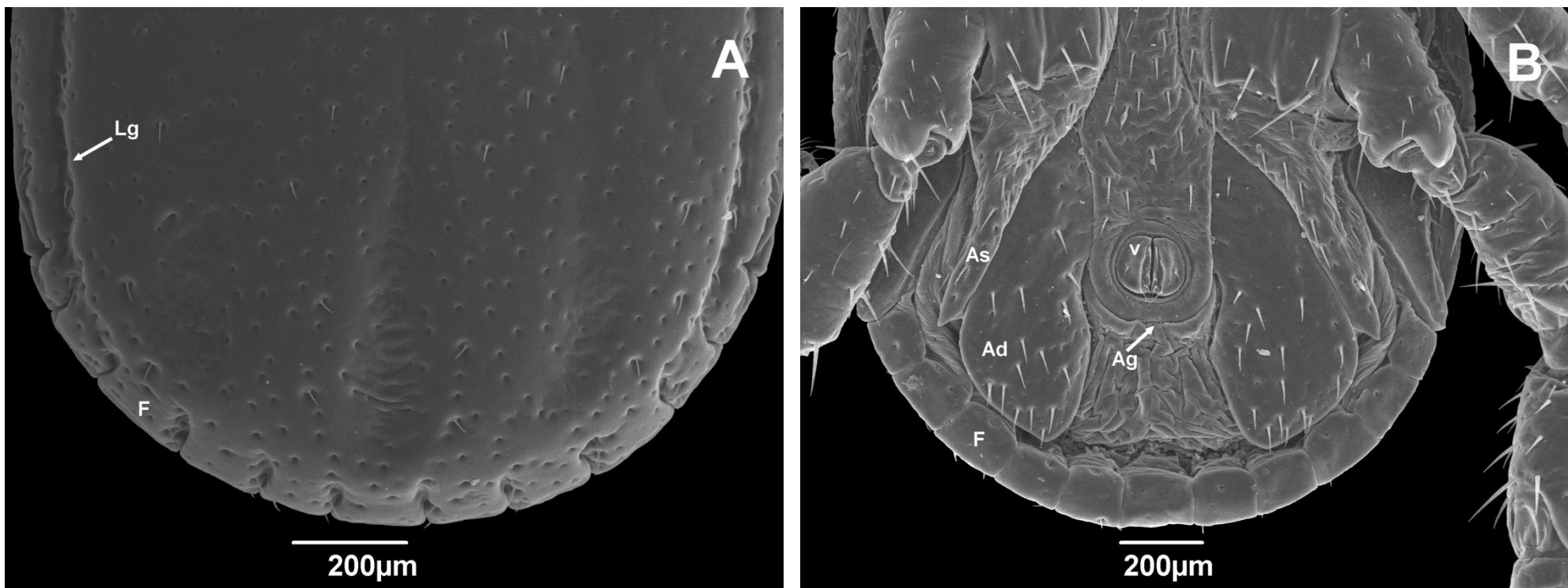


Figura 22 - Micrografia eletrônica de varredura do opistossoma de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rondônia. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (F) festões, (Lg) sulco lateral, (Ag) sulco anal, (v) valvas, (Ad) placas adanais e (As) placas acessórias.

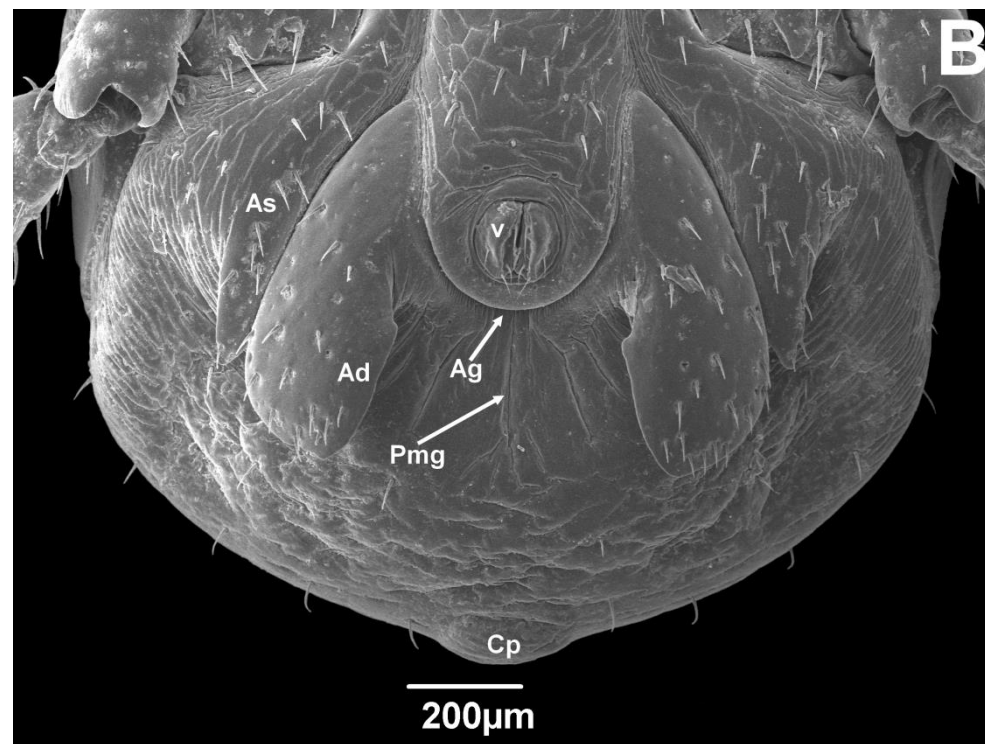
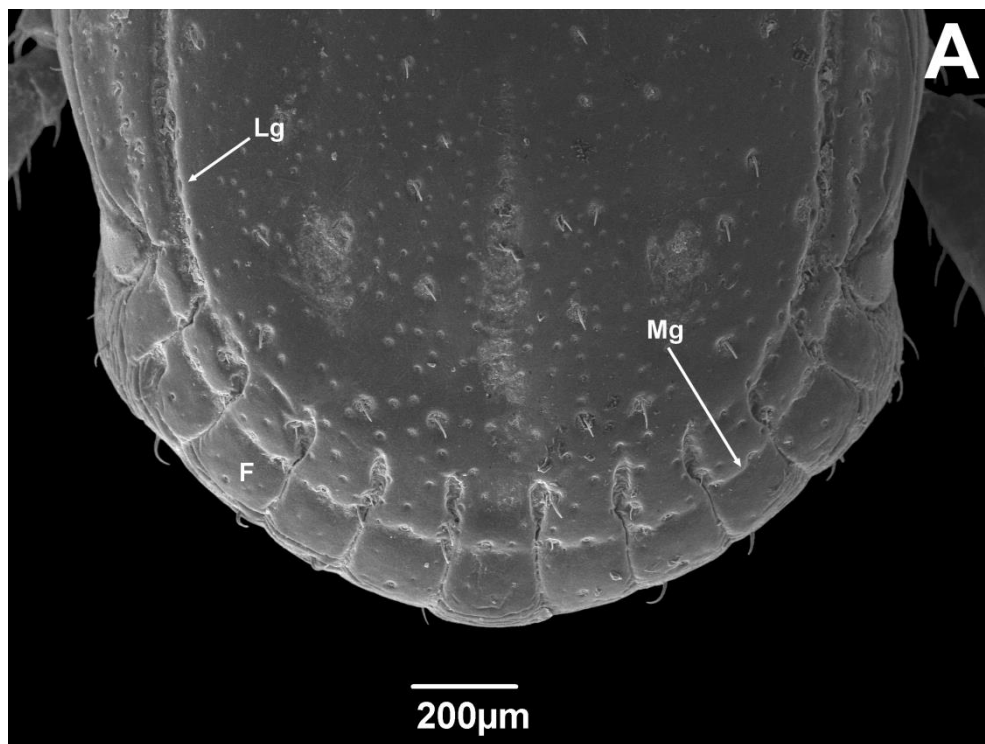


Figura 23 - Micrografia eletrônica de varredura do opistossoma de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Roraima. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (F) festões, (Lg) sulco lateral, (Mg) sulco marginal, (Pmg) sulco mediano pós-anal, (Ag) sulco anal, (v) valvas, (Ad) placas adanais, (As) placas acessórias e (Cp) processo caudal.

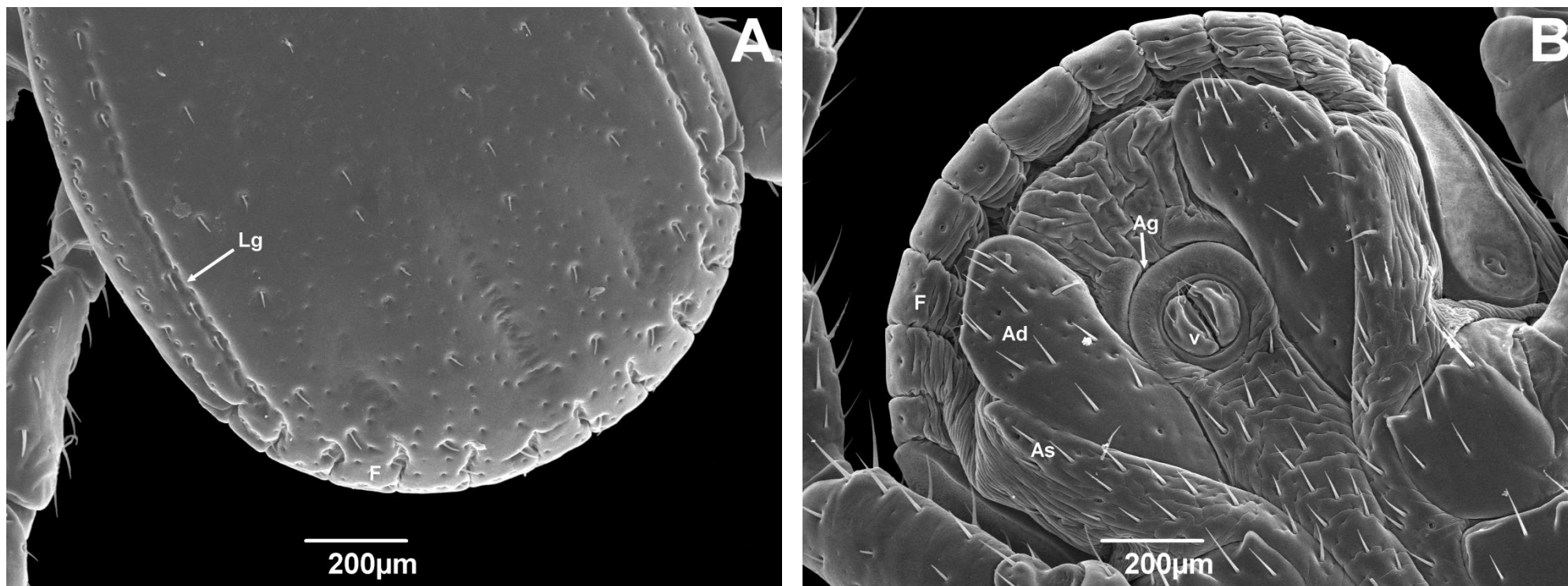


Figura 24 - Micrografia eletrônica de varredura do opistossoma de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Pernambuco. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (F) festões, (Lg) sulco lateral, (Ag) sulco anal, (v) valvas, (Ad) placas adanais e (As) placas acessórias.

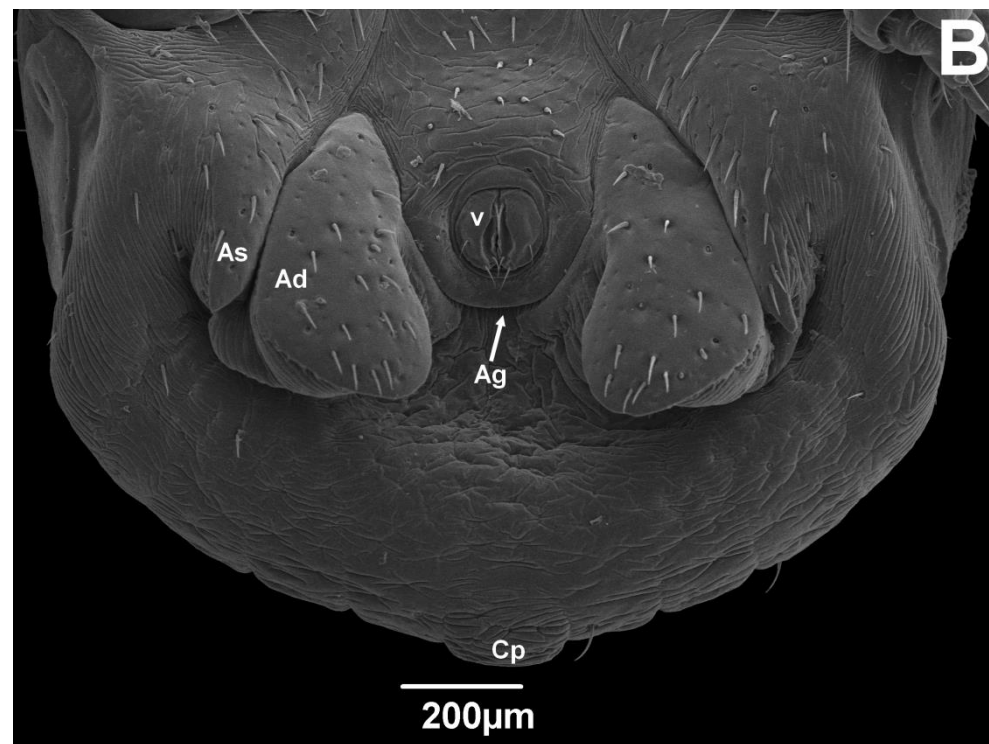
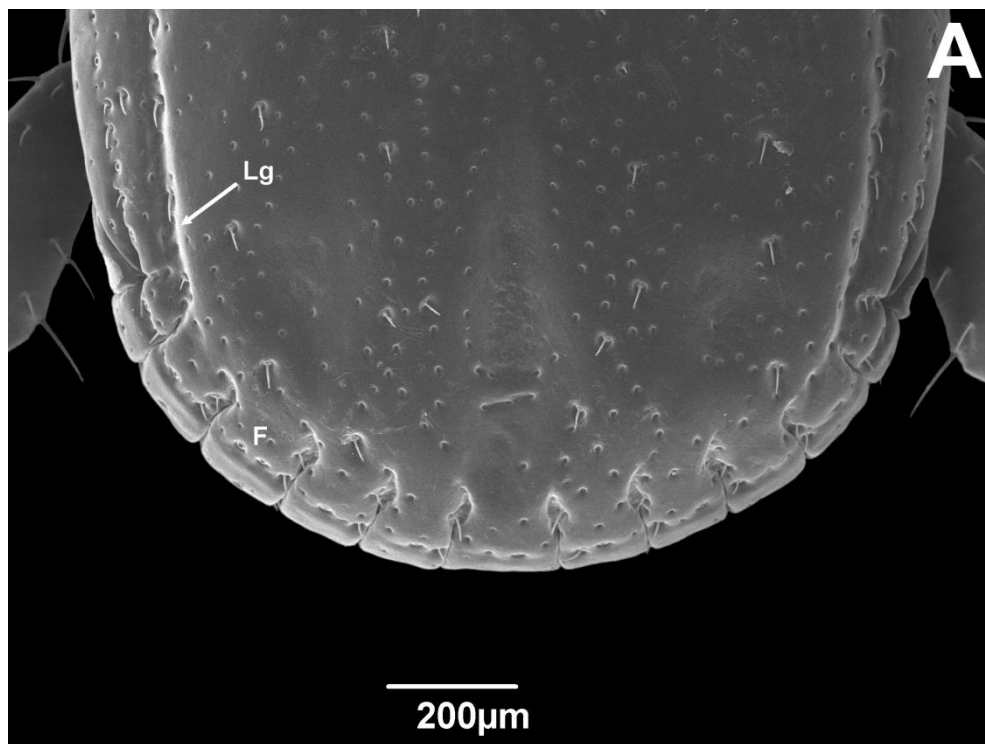


Figura 25 - Micrografia eletrônica de varredura do opistossoma de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grande do Norte. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (F) festões, (Lg) sulco lateral, (Ag) sulco anal, (v) valvas, (Ad) placas adanais, (As) placas acessórias e (Cp) processo caudal.

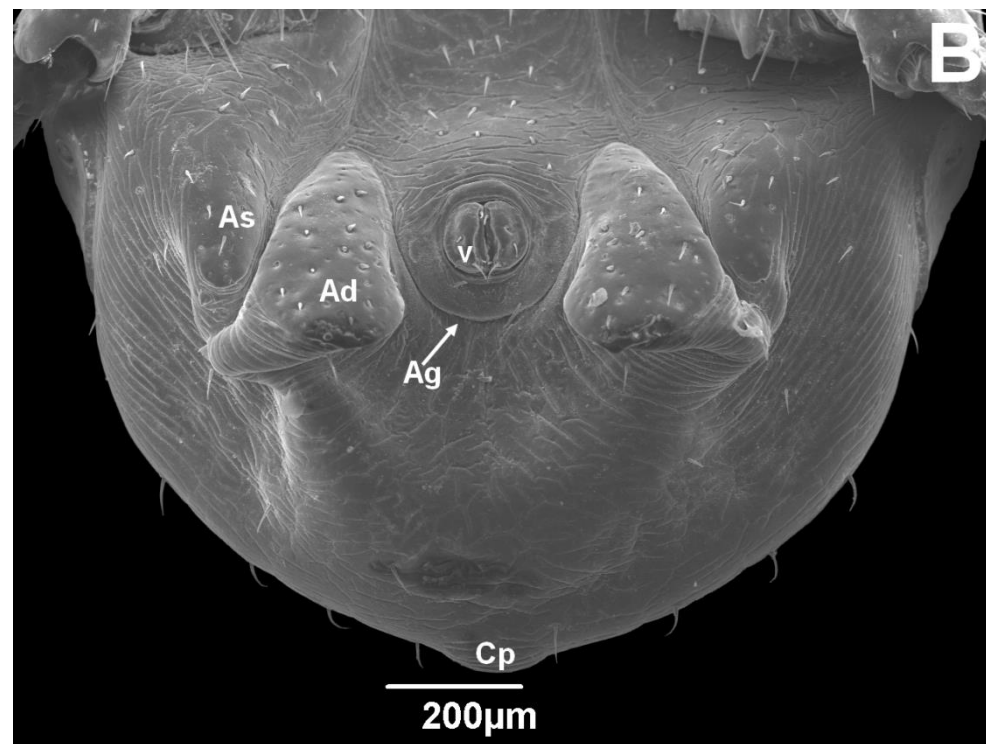
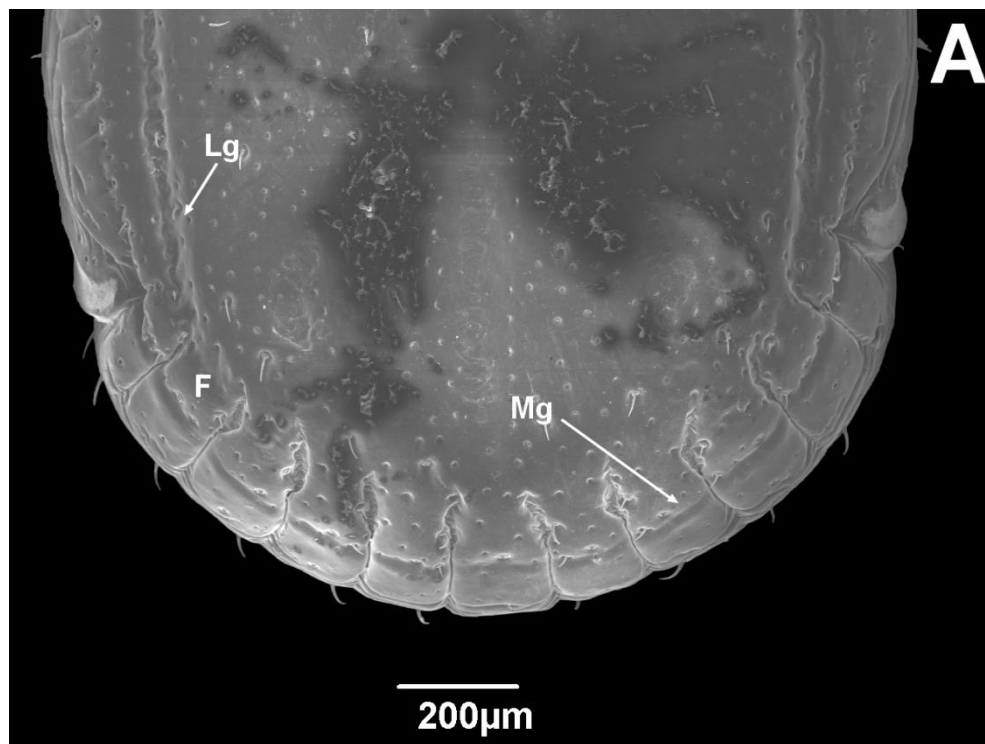


Figura 26 - Micrografia eletrônica de varredura do opistossoma de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Paraná. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (F) festões, (Lg) sulco lateral, (Mg) sulco marginal, (Ag) sulco anal, (v) valvas, (Ad) placas adanais, (As) placas acessórias e (Cp) processo caudal.

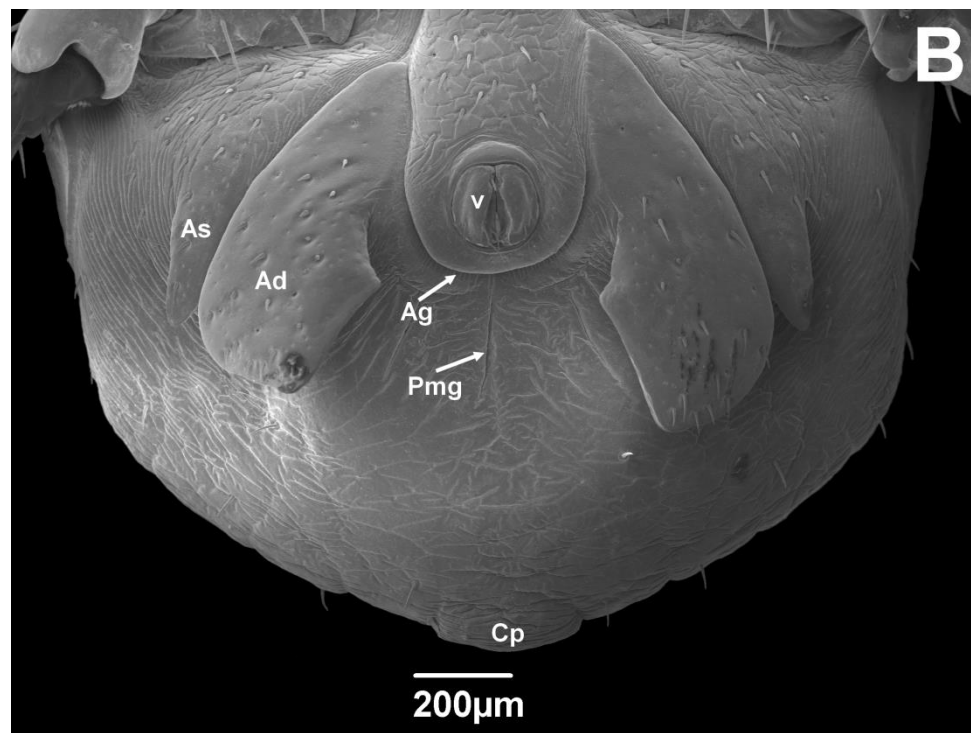
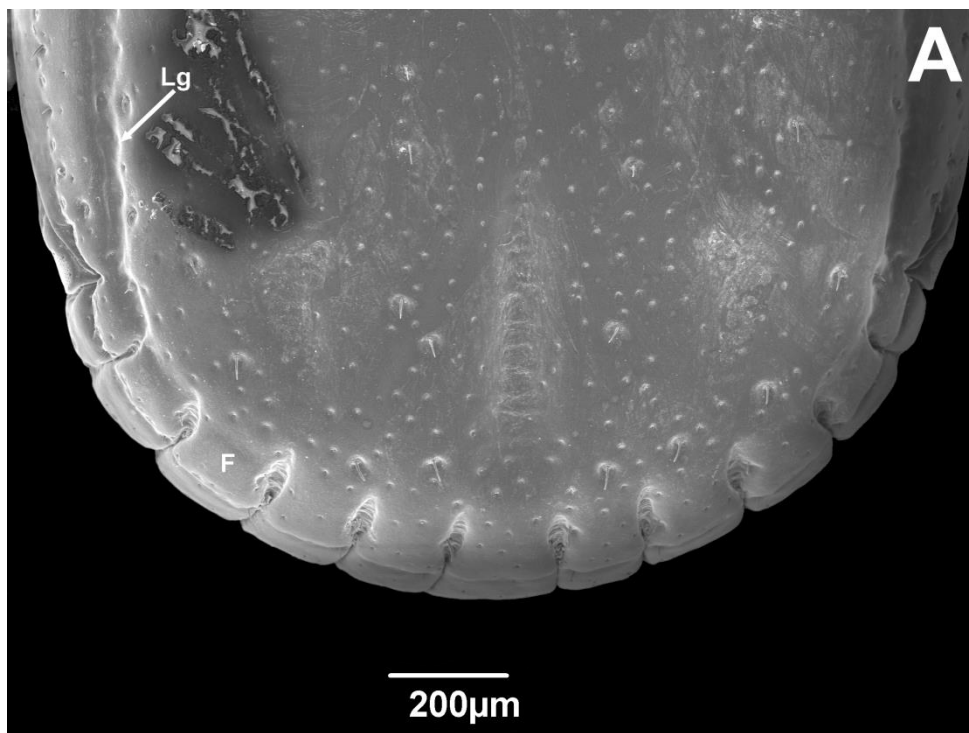


Figura 27 - Micrografia eletrônica de varredura do opistossoma de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grande do Sul. Vista dorsal (A) e ventral (B) do espécime. (F) festões, (Lg) sulco lateral, (Pmg) sulco mediano pós-anal, (Ag) sulco anal, (v) valvas, (Ad) placas adanais, (As) placas acessórias e (Cp) processo caudal.

Neste estudo, os espécimes observados apresentam dois pares de placas adanais paralelas longas e variáveis em forma (margem posterior pontuda ou arredondada). A distribuição de cerdas não é padronizada (Figuras 22B, 23B, 24B, 25B, 26B e 27B).

Em espécimes de *R. sanguineus* os espiráculos são em forma de vírgula (Dantas-Torres et al., 2008) (Figuras 28, 29, 30, 31, 32 e 33).

Estudos anteriores com carrapatos tentaram elucidar a função da espiráculo (Woolley 1972; Roshdy & Hefnawy 1973; Evans 1992;. Dantas-Torres et al 2013). Hinton (1967) considerou os poros da placa espiracular em carrapatos como aberturas funcionais para a troca de gases e o óstio como uma estrutura não-funcional, oriunda de um tubo colapsado durante a ecdise de ninfa para adultos. Por outro lado, Hefnawy (1970) sugeriu que os espiráculos exerceriam um controle fisiológico sobre a perda de água.

Neste estudo, as placas espiraculares podem ser muito estreitas, em alguns espécimes (Figuras 28, 30 e 33), mas muito grande em outros (Figuras 29, 31 e 32). O padrão de distribuição dos poros superficiais (Sp) é aleatório. As regiões de mácula (Ol) variam de tamanho e forma, em todas as espécies de diferentes localidades (Figuras 28, 29, 30, 31, 32 e 33). A variação nas placas espiraculares observada neste estudo também pode ser observada em outras espécies do gênero *Rhipicephalus*; enquanto as placas espiraculares de *R. walkerae* são longas e estreitas dorsalmente (Horak et al. 2013), em *R. turanicus*, as placas são alargadas (Pegram et al. 1987a, 1987b). O presente estudo concorda com Dantas-Torres et al. (2013) que o padrão de perfuração das placas espiraculares pode variar entre populações.

De acordo com Walker et al. (2005), apenas a abertura genital feminina tem valor taxonômico para o gênero *Rhipicephalus*, mas este estudo forneceu novas informações sobre a forma de placa genital (Gp) de espécimes machos de diferentes localidades.

Os machos de RO apresentam placa genital levemente arredondada na extremidade distal (Figura 34); em PE a placa triangular é desprovida de ápice na extremidade distal (Figura 36); no RR e RN, apresentam placa fortemente triangular na extremidade distal (Figuras 35 e 37); no PR e RS as placas genitais são semelhantes, com a margem descontínua e truncada na porção distal (Figuras 38 e 39).

As características morfológicas observadas no presente trabalho foram sintetizadas em uma tabela comparativa entre os Estados (Tabela 4).

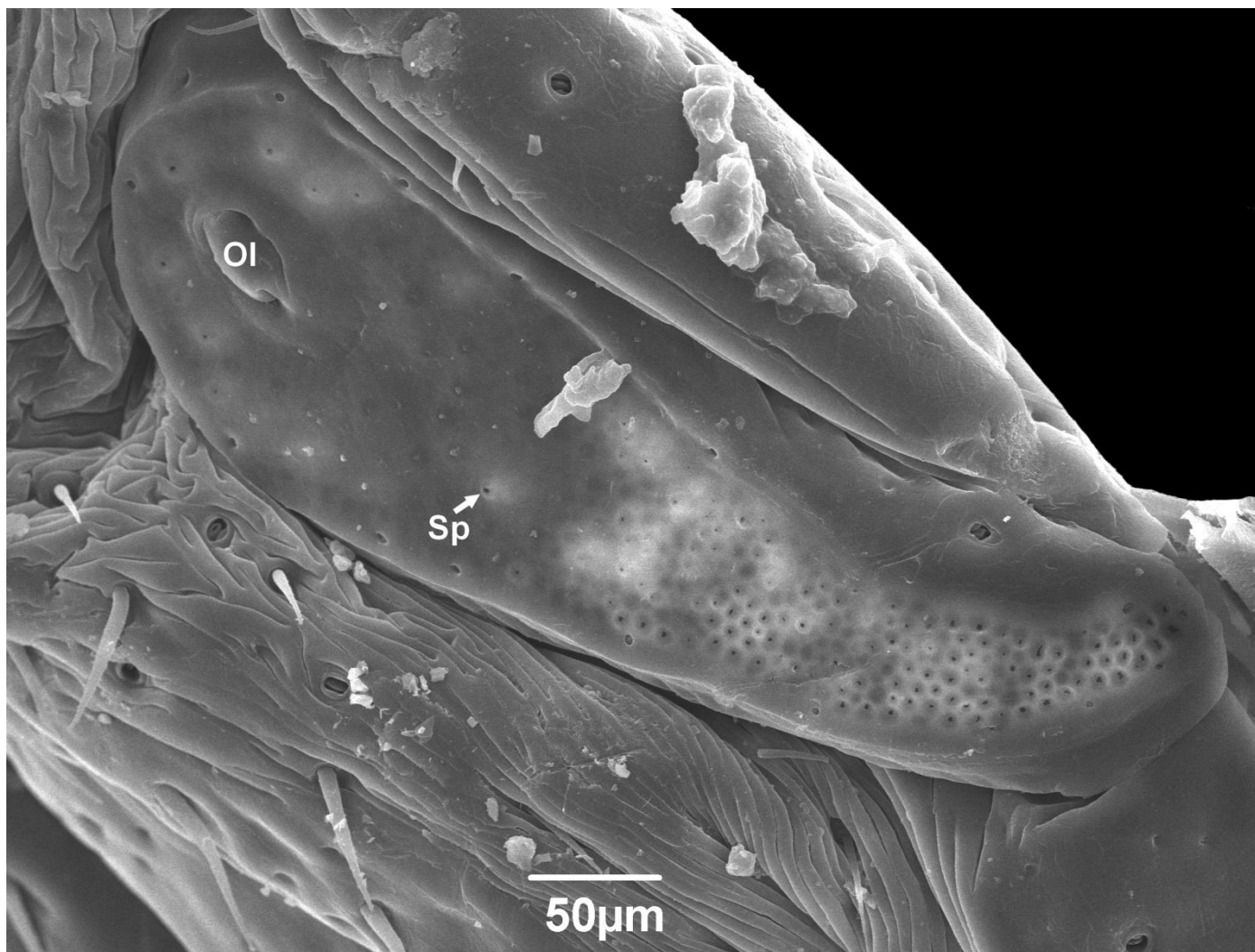


Figura 28 - Micrografia eletrônica de varredura da placa espiracular de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rondônia. (OI) região de mácula e (Sp) poros de superfície.

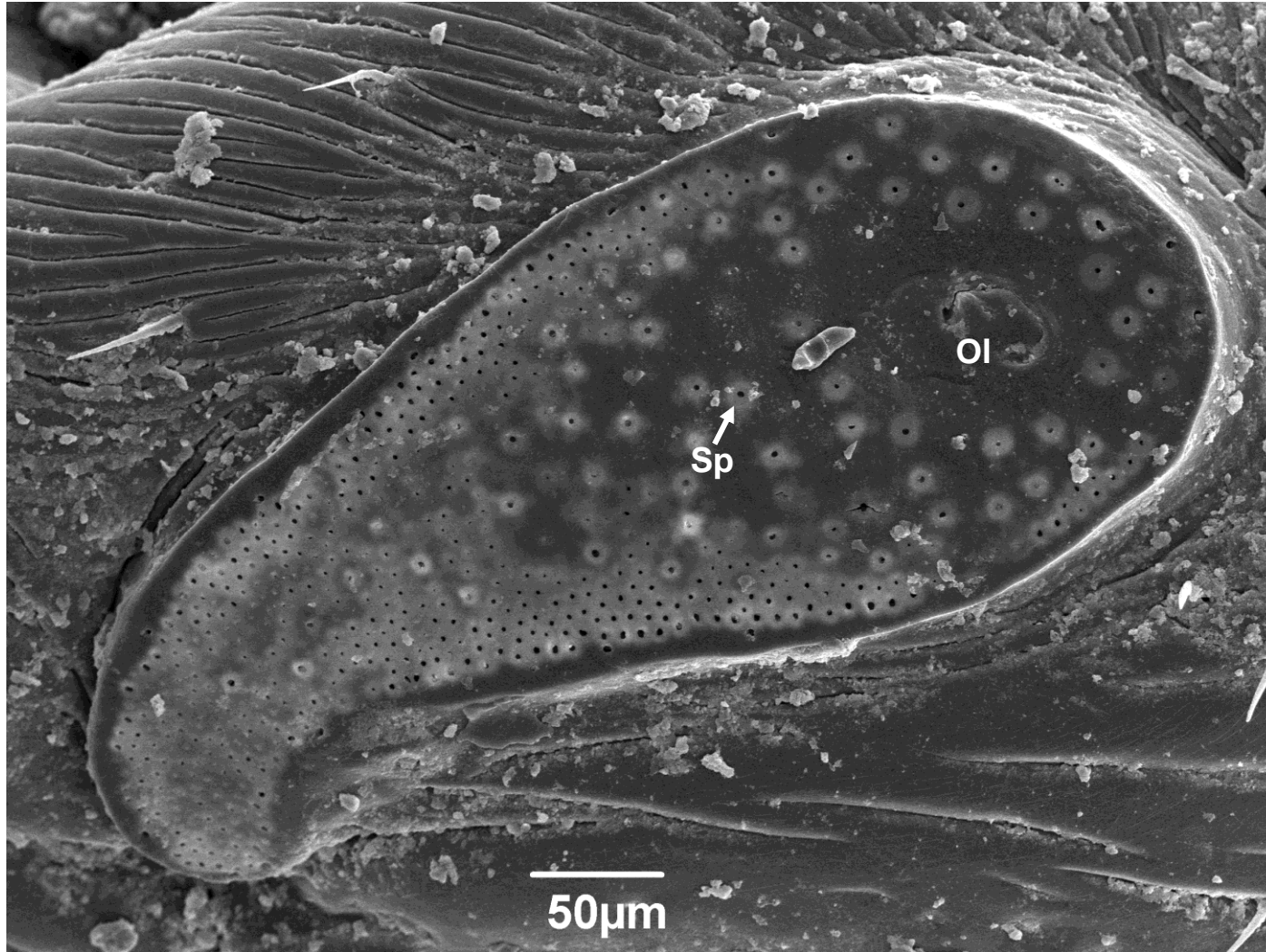


Figura 29 - Micrografia eletrônica de varredura da placa espiracular de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Roraima. (OI) região de mácula e (Sp) poros de superfície.

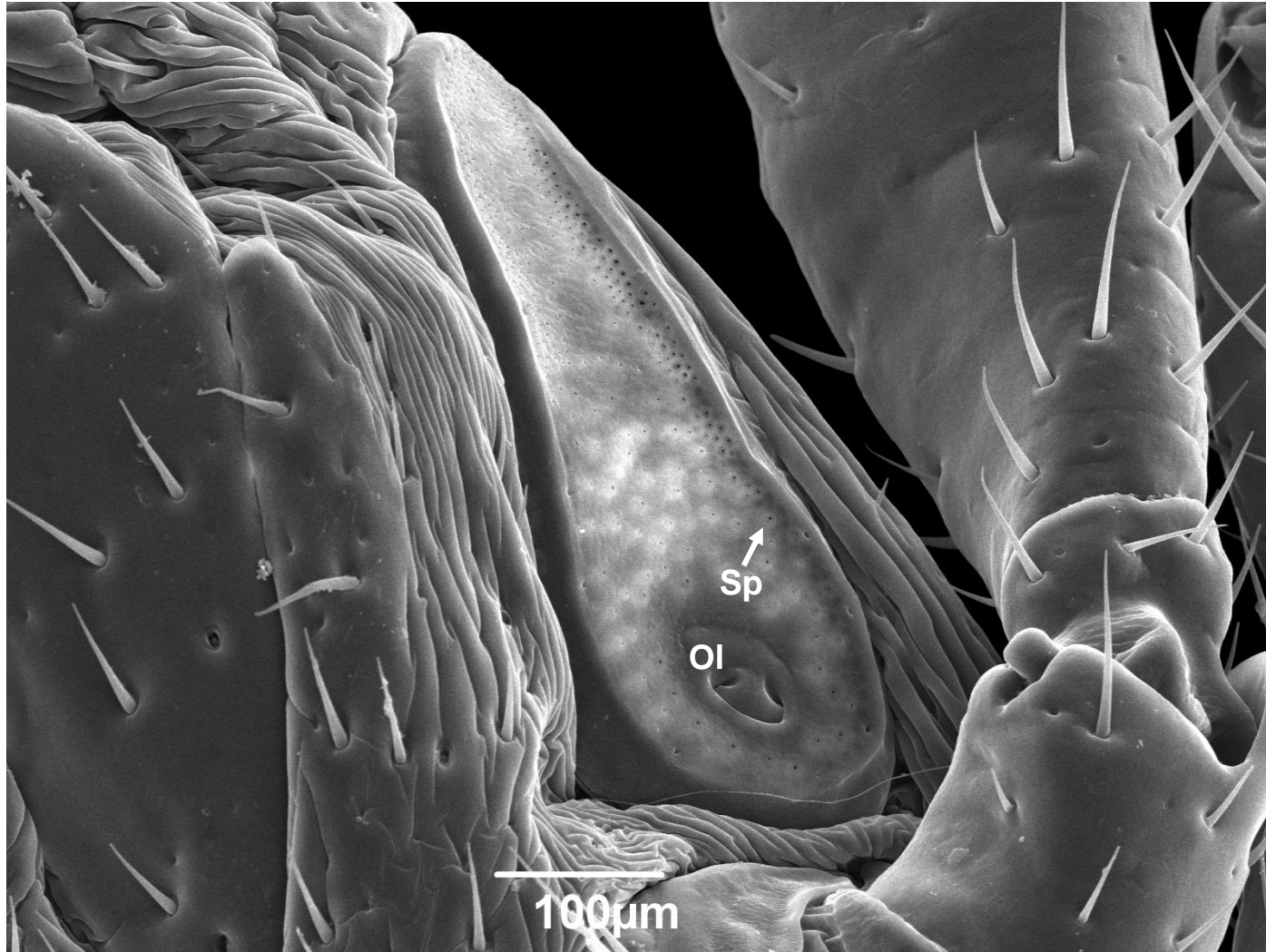


Figura 30 - Micrografia eletrônica de varredura da placa espiracular de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Pernambuco. (Ol) região de mácula e (Sp) poros de superfície.

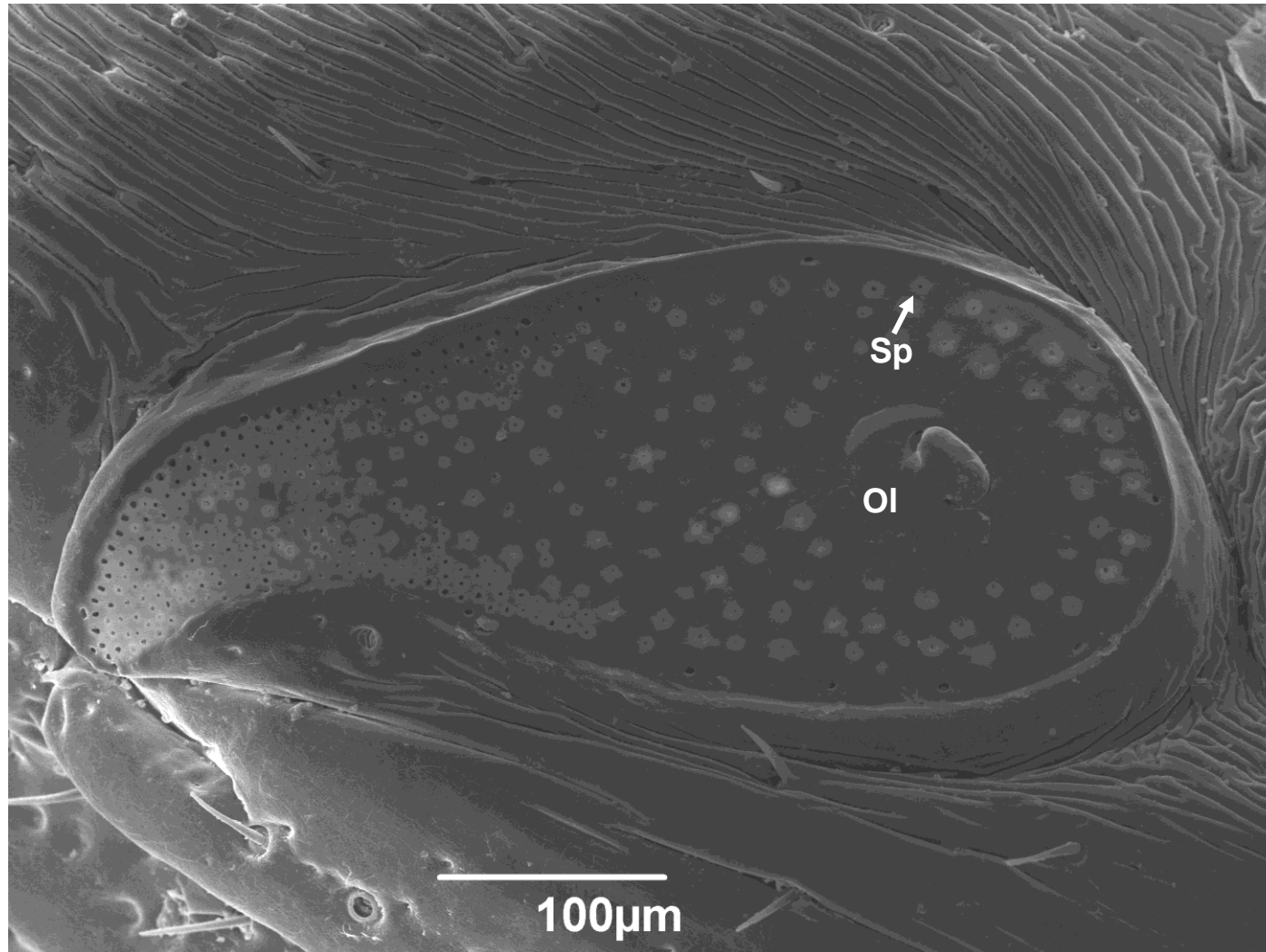


Figura 31 - Micrografia eletrônica de varredura da placa espiracular de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grande do Norte. (Ol) região de mácula e (Sp) poros de superfície.

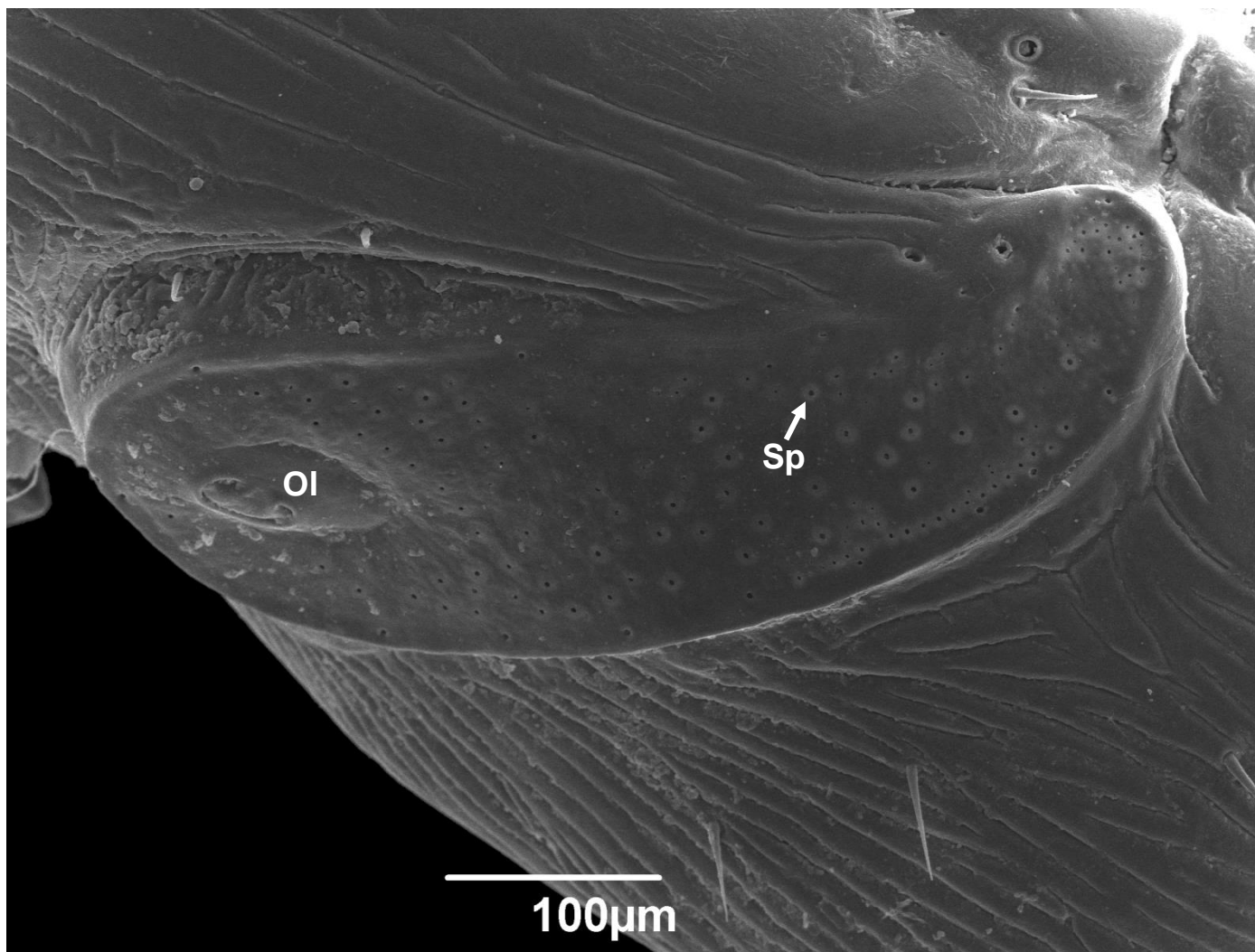


Figura 32 - Micrografia eletrônica de varredura da placa espiracular de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Paraná. (Ol) região de mácula e (Sp) poros de superfície.

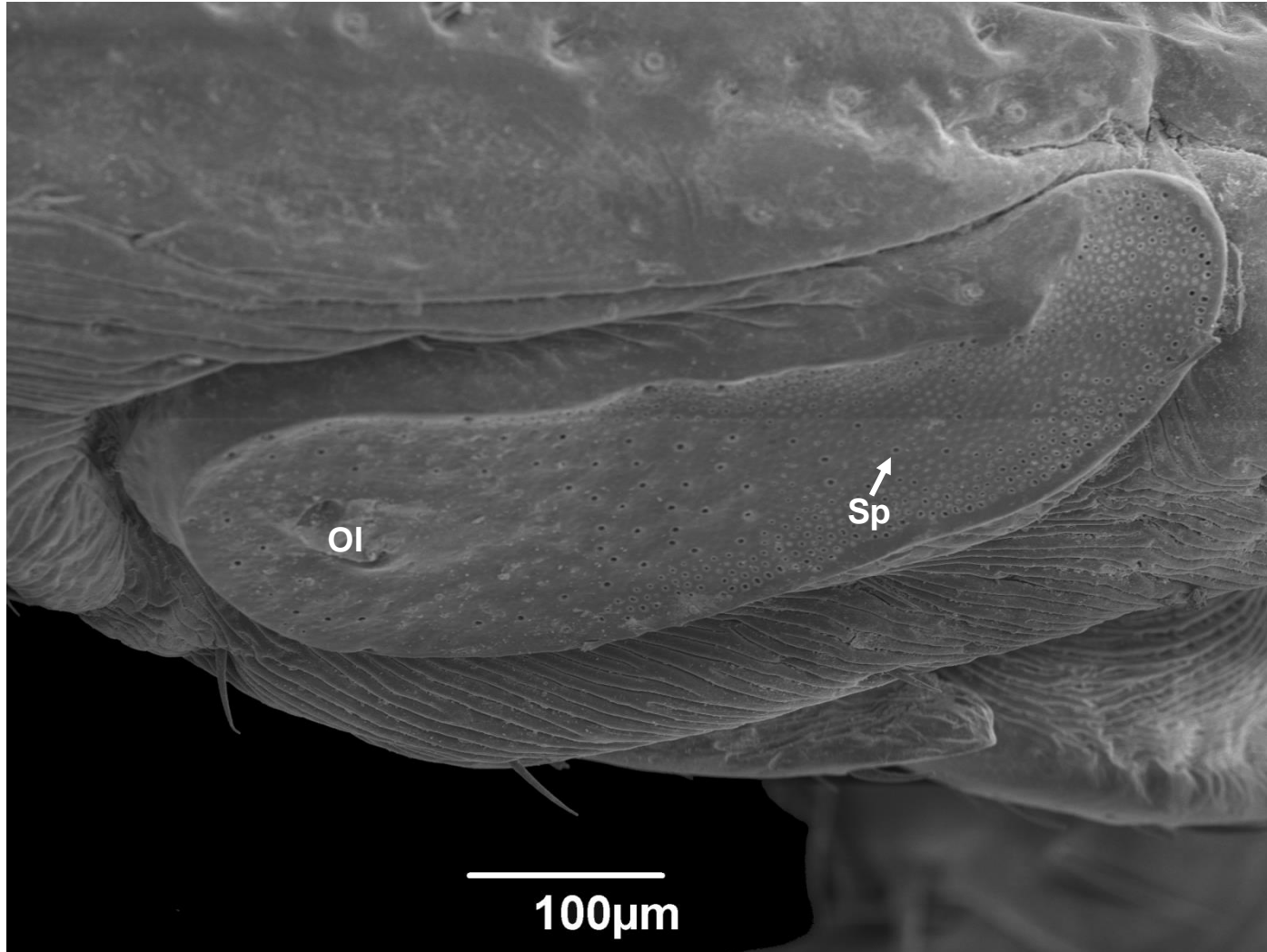


Figura 33 - Micrografia eletrônica de varredura da placa espiracular de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grande do Sul. (Ol) região de mácula e (Sp) poros de superfície.

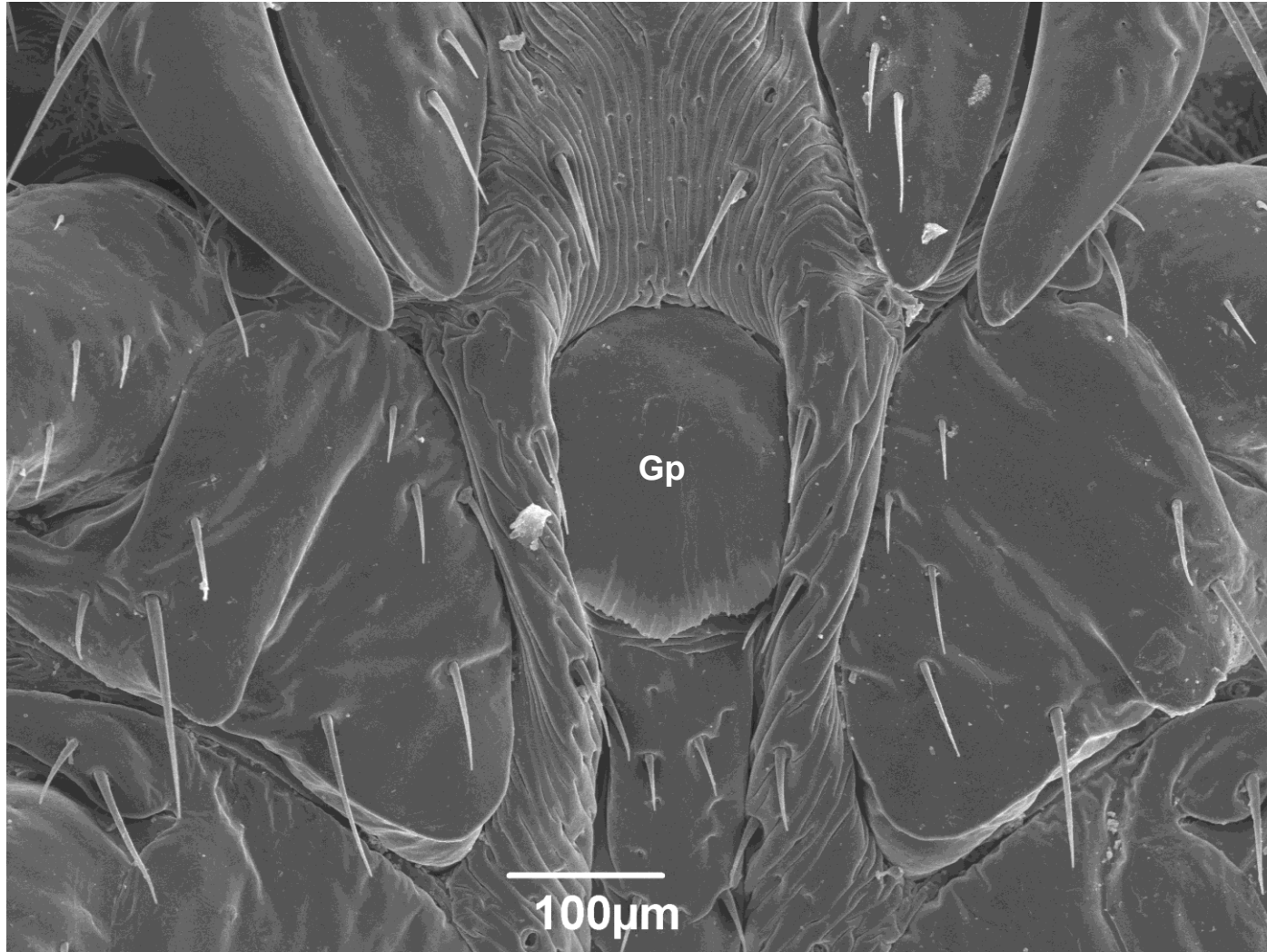


Figura 34 - Micrografia eletrônica da placa genital de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rondônia. (Gp) placa genital.

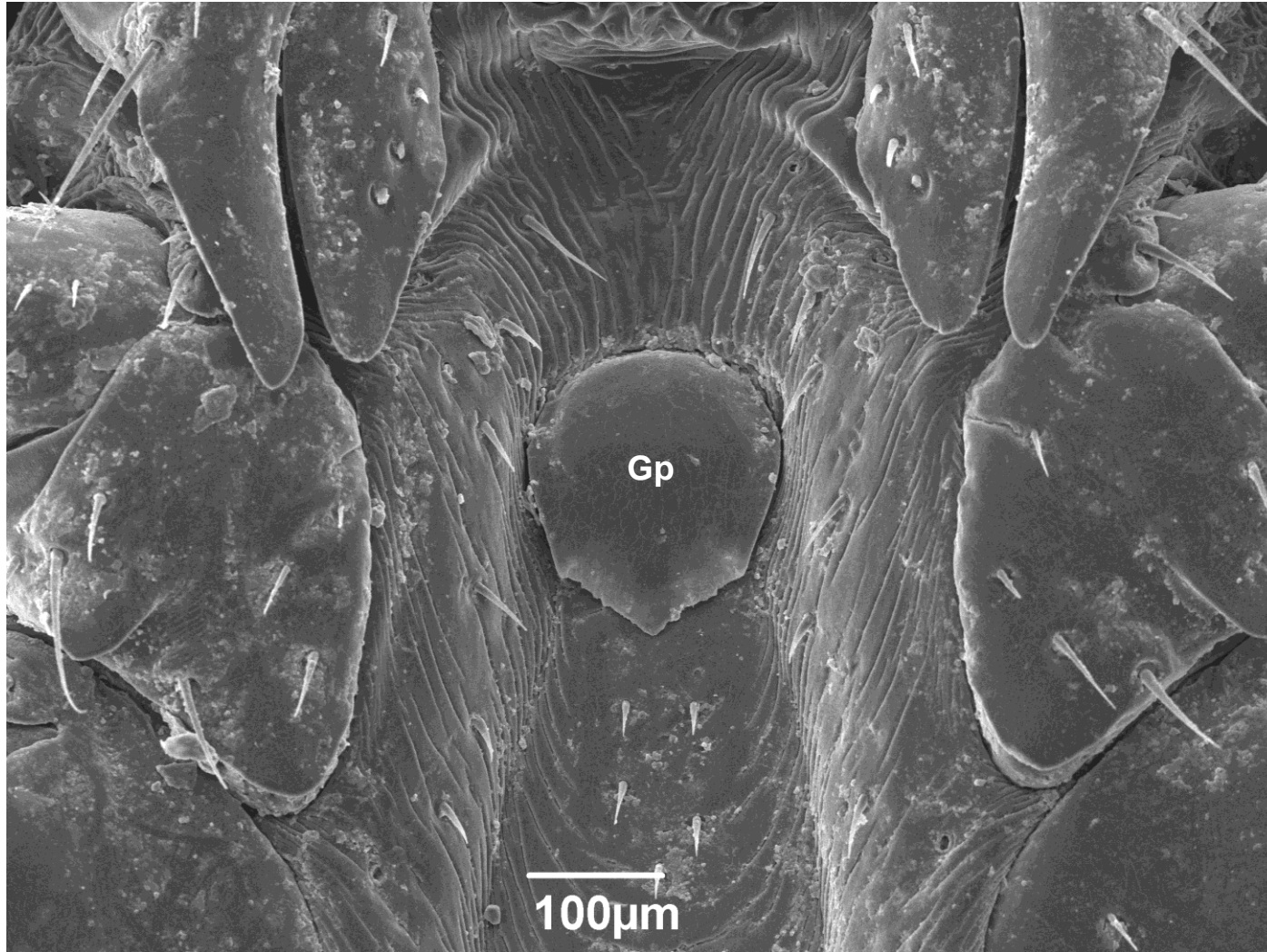


Figura 35 - Micrografia eletrônica da placa genital de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Roraima. (Gp) placa genital.

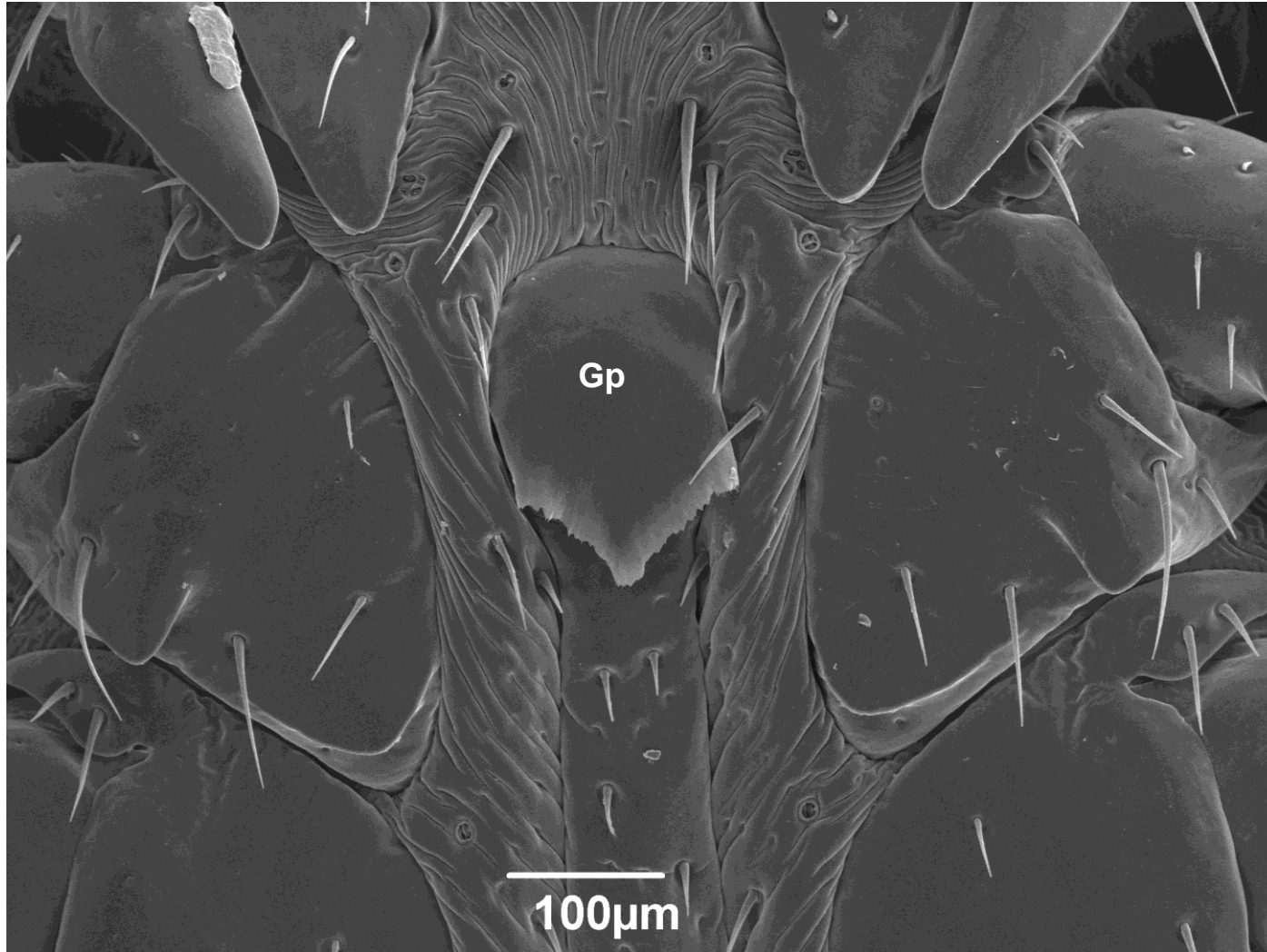


Figura 36 - Micrografia eletrônica da placa genital de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Pernambuco. (Gp) placa genital.

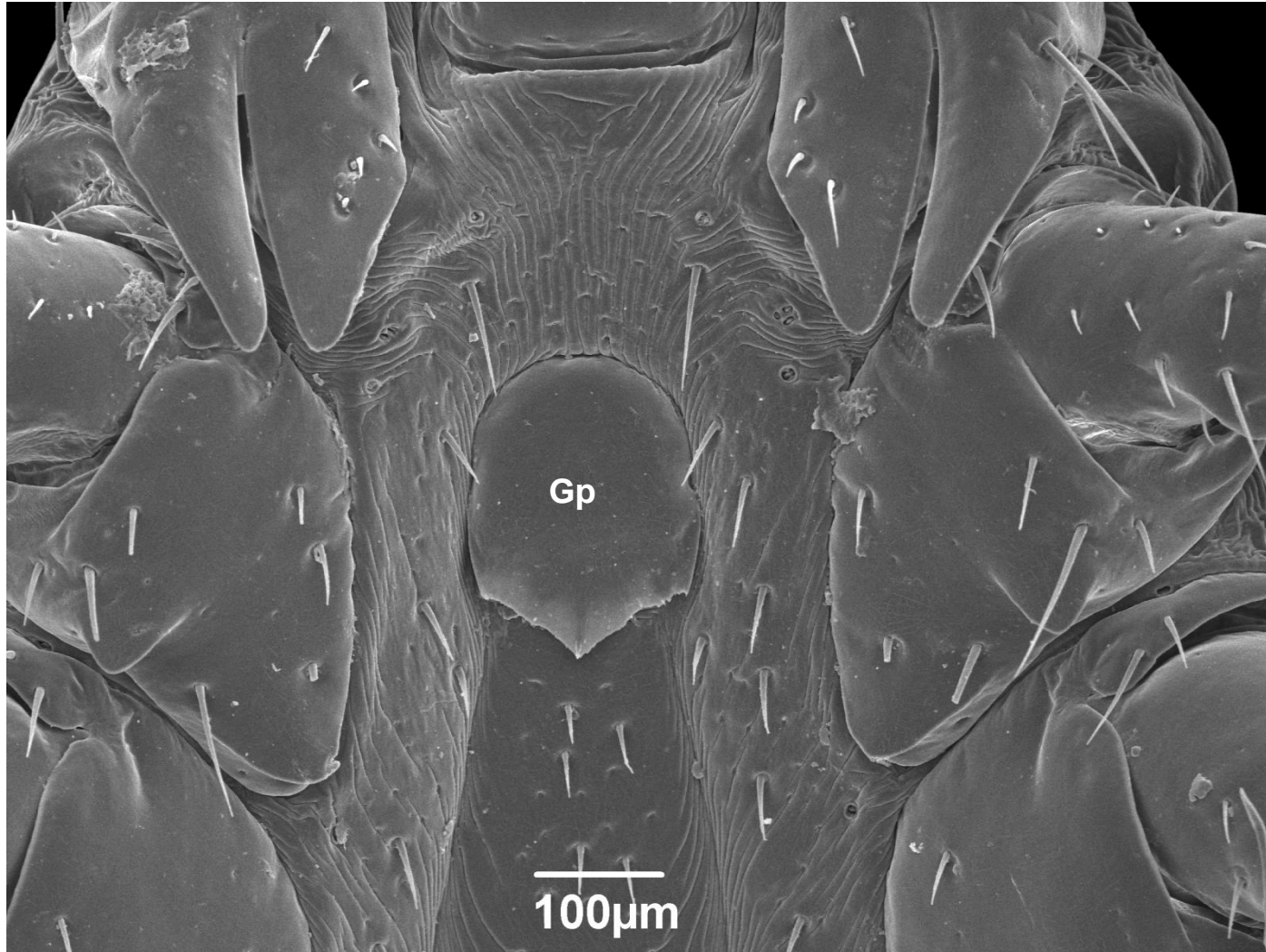


Figura 37 - Micrografia eletrônica da placa genital de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grande do Norte. (Gp) placa genital.

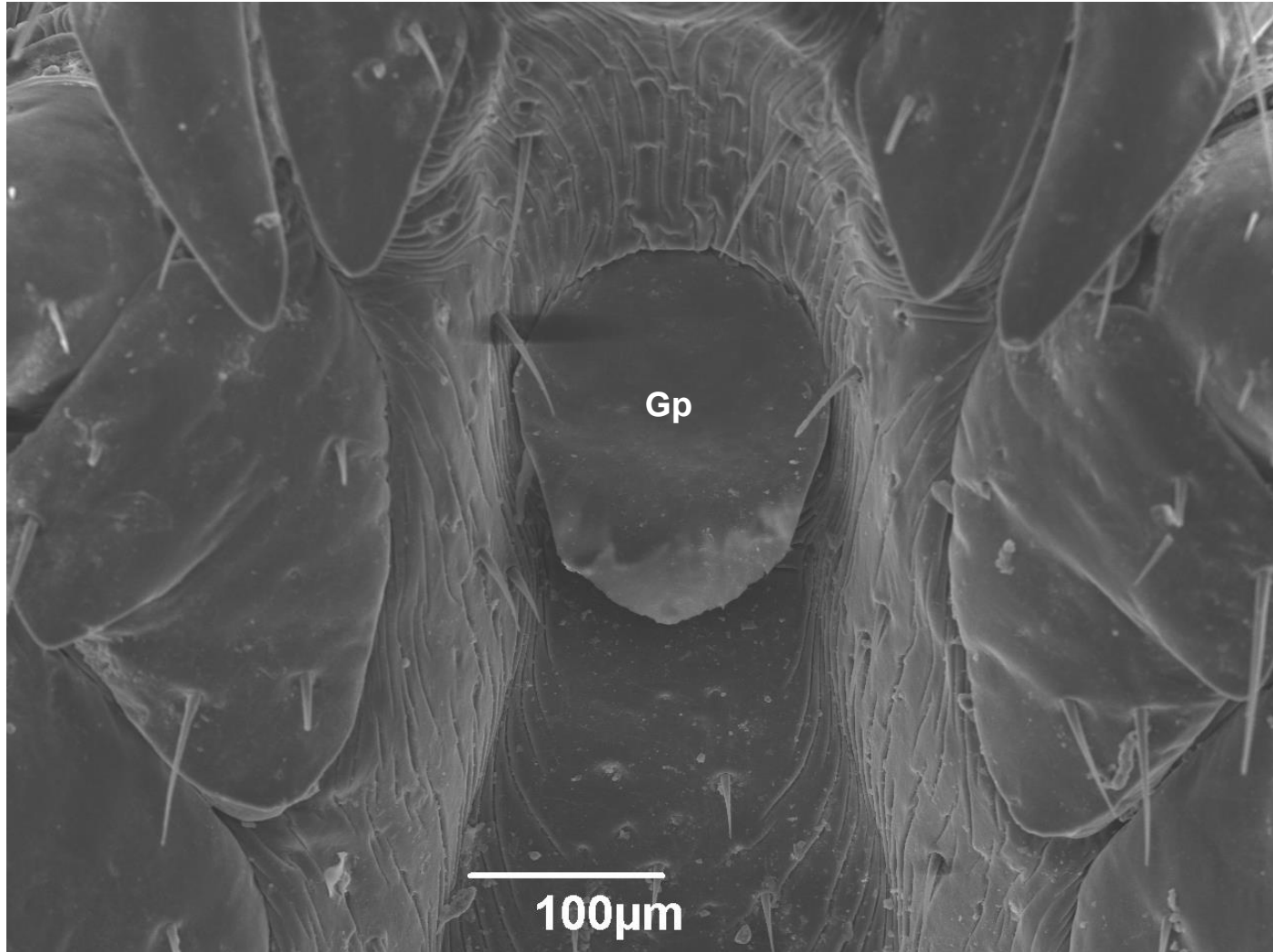


Figura 38 - Micrografia eletrônica da placa genital de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Paraná. (Gp) placa genital.

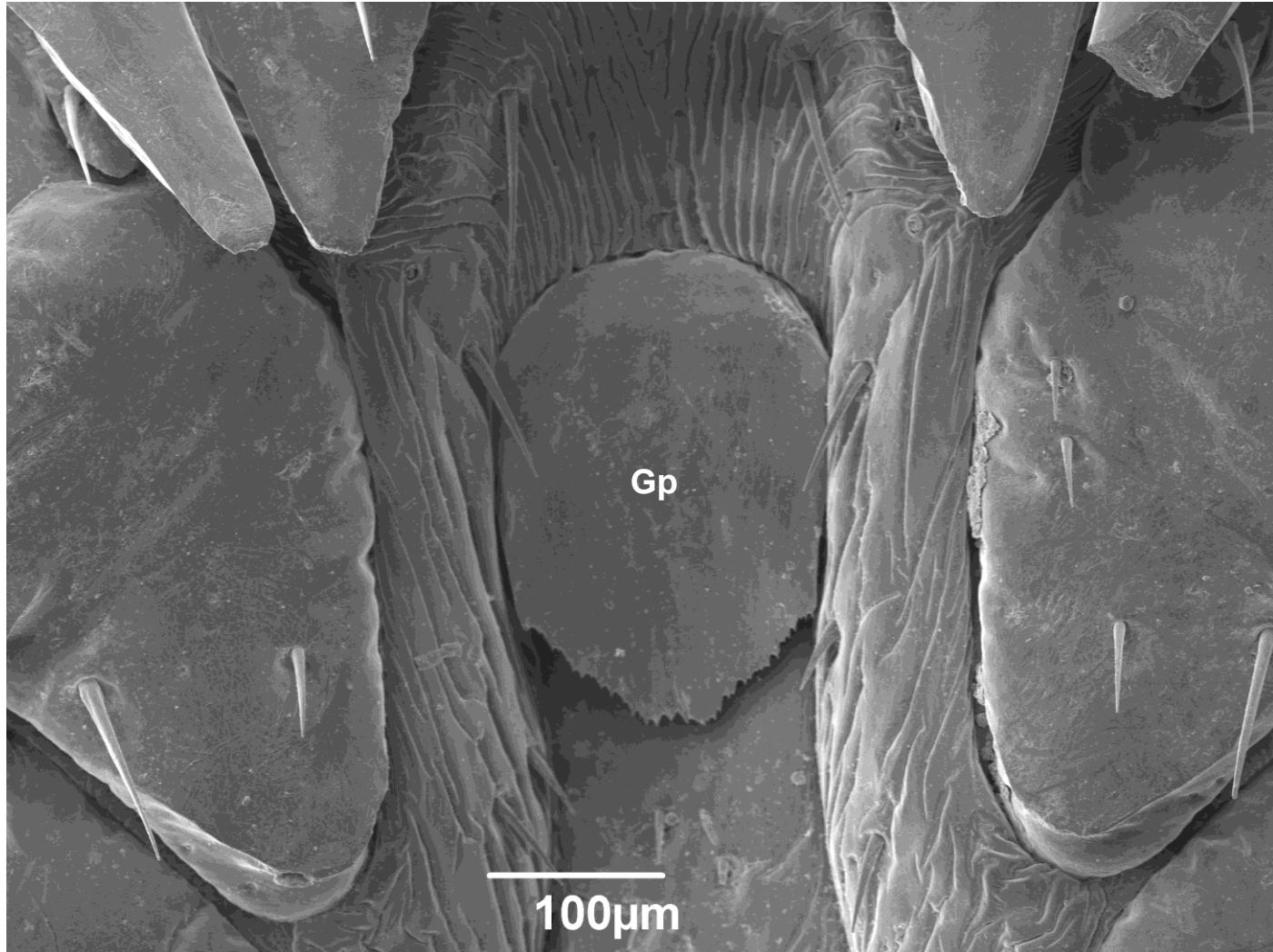


Figura 39 - Micrografia eletrônica da placa genital de macho de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletado em Rio Grnade do Sul. (Gp) placa genital.

Tabela 4: Tabela comparativa das características morfológicas observadas em machos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados em seis Estados no Brasil. RO – Rondônia, RR – Roraima, PE – Pernambuco, RN – Rio Grande do Norte, PR – Paraná, RS – Rio Grande do Sul, Lg – sulco lateral e MG – sulco marginal.

	RO	RR	PE	RN	PR	RS
Distribuição de cerdas dorsais variável	X	X	X	X	X	X
Base do <i>capitulum</i> com cerdas	X	X	X	X	X	X
Quelíceras sem quimio e mecanorreceptores	X	X	X	X	X	X
Palpos ligeiramente maiores do que as quelíceras	X	X	X	X	X	X
Nº de cerdas do Órgão de Haller	5	5	4	4	5	5
Nº de Festões	11	11	11	11	11	11
Delimitação dos festões	Lg	Lg+Mg	Lg	Lg	Lg	Lg
Orifício anal com 4 cerdas simétricas	X	X	X	X	X	X
Sulco mediano pós-anal		X				X
Placas espiraculares	estreitas	largas	estreitas	largas	largas	estreitas
Placa genital	sem ápice distal	com ápice distal	com ápice distal	com ápice distal	sem ápice distal	Truncada no ápice distal

5.2. Análises moleculares de machos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)

A análise molecular, bem como a análise morfológica, demonstra que existem diferenças significativas entre os carrapatos morfológicamente identificados como *R. sanguineus* no Brasil.

Em relação às diferenças observadas entre as sequências, quatro haplótipos foram encontrados para 12S rDNA (hA-hD), sete para COX1 (h1-h7) e dez para D-loop rDNA (hI-hX). A classificação dos haplótipos encontrados aqui faz referência apenas às sequências produzidas neste estudo, sem nenhuma relação com classificações utilizadas em outros estudos. Os haplótipos h1 de COX1, hC de 12S rDNA e hI de D-loop foram encontrados exclusivamente no estado do Rio Grande do Sul. Outros haplótipos foram encontrados em mais de um estado, como h2 (RO e PA) e h3 (RN e RO) de COX1 e hB (RN, PA, RO) de 12s rDNA. D-loop foi a região com o maior número de variações entre as seqüências, totalizando 10 haplótipos. Todos os Estados, exceto Rio Grande do Sul, têm mais de um haplótipo e o Estado do Paraná foi o que apresentou o maior número, com quatro variantes.

Sequências dos genes 12S rDNA e COX1 de pelo menos uma amostra de cada estado foram concatenadas e utilizadas para análise filogenética (Figura 40). A árvore resultante mostra uma separação entre amostras do Rio Grande do Sul em relação a outros espécimes dos estados das regiões Norte e Nordeste e até mesmo amostras de outro Estado da região sul do país, o estado do Paraná.

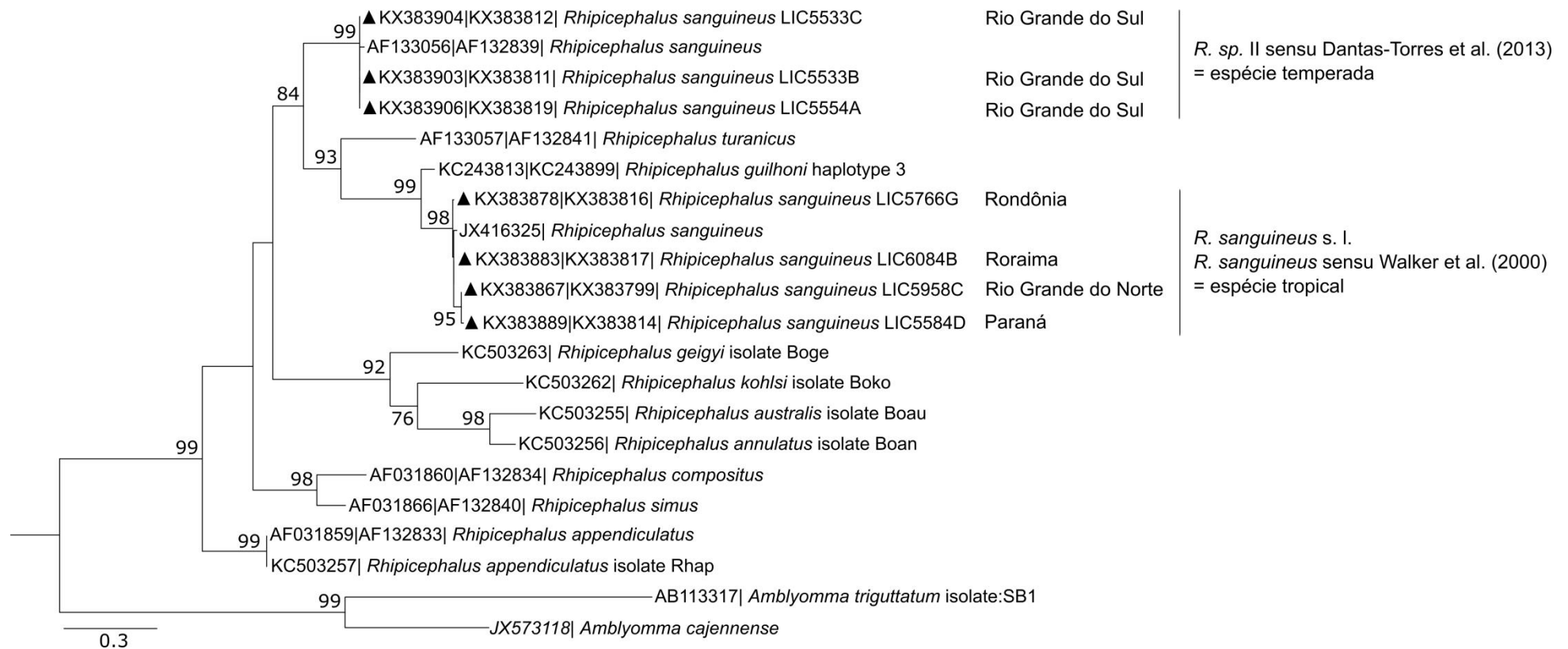


Figura 40 - Análise filogenética dos espécimes classificados como *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) do Brasil inferida pelo método da Máxima-verossimilhança (MV) utilizando sequências concatenadas de nucleotídeos dos genes 12S rDNA (238 pb) e COX1 (472 pb). O modelo evolutivo utilizado foi o HKY85+G+I+F. A barra de escala representa a distância genética. Os números nos nós da árvore são os valores de bootstrap obtidos a partir de 1000 réplicas. Os números de acesso do GenBank estão apresentados à esquerda dos nomes e os triângulos representam sequências obtidas no presente trabalho.

A análise filogenética realizada apenas com as sequências de 12S rDNA corroboram os resultados observados com as sequências concatenadas e, além disso, mostra que a espécie encontrada nos estados de Roraima, Rondônia, Rio Grande do Norte e Paraná é também encontrada no estado do Amazonas, Pará, Tocantins e São Paulo (Figura 41). As sequências dos carrapatos coletados nestes estados agrupam com as sequências de espécimes classificados como *R. sanguineus* s. l., espécie tropical, enquanto as sequências do Rio Grande do Sul agrupam com sequências de espécimes classificados como *R. sp. II* ou espécie temperada (Dantas-Torres et al. 2013). Na construção da árvore filogenética para o gene 12SrDNA foram utilizadas sequências de espécimes provenientes de colônias que foram utilizadas em dois estudos prévios e que apontaram uma incompatibilidade reprodutiva entre a espécie encontrada no estado do Rio Grande do Sul, *R. sp. II* (espécie temperada), e a espécie encontrada nos outros estados brasileiros, *R. sanguineus* s. l. (espécie tropical) (Szabó et al. 2005; Levin et al. 2012) (Figura 41). A incompatibilidade reprodutiva é uma característica biológica utilizada como definidora de espécies distintas e corrobora os dados moleculares observados.

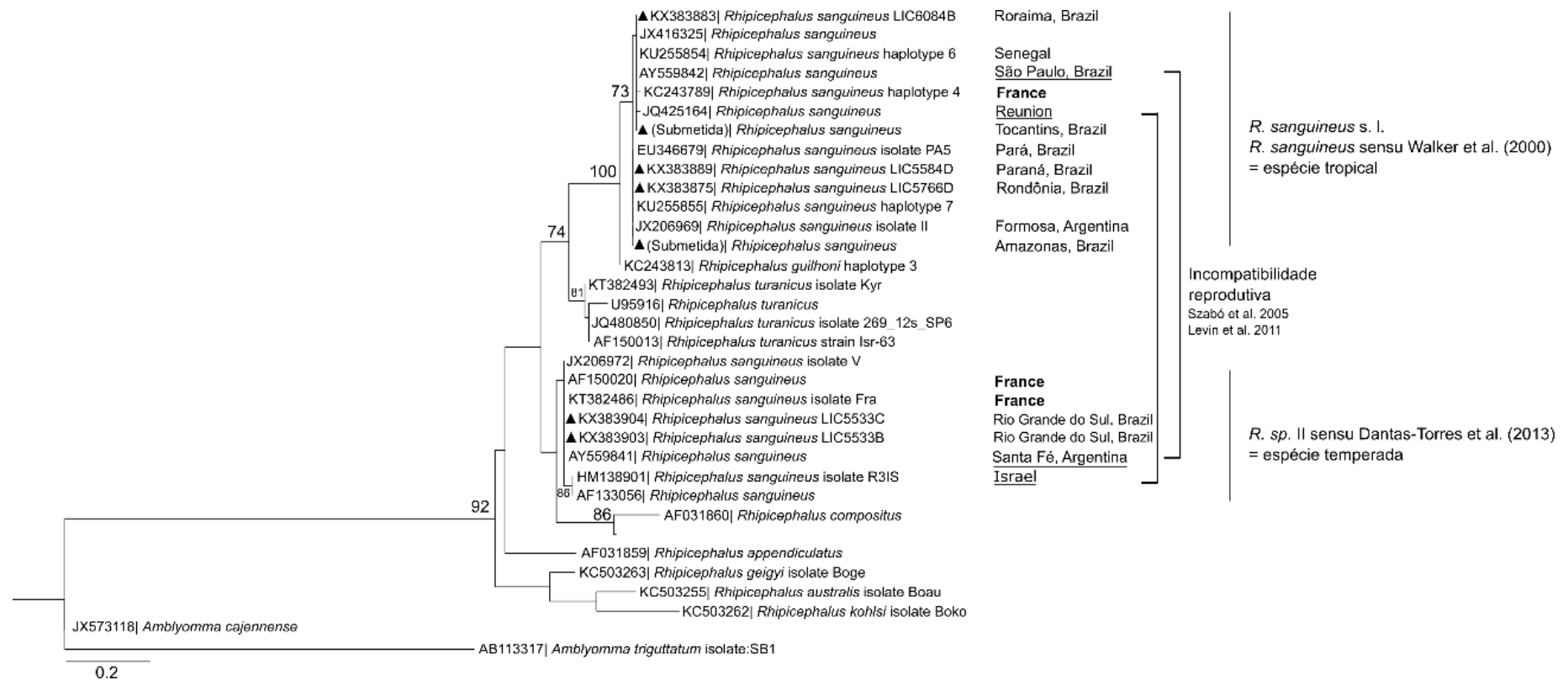


Figura 41 - Análise filogenética dos espécimes classificados como *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) do Brasil inferida pelo método da Máxima-verossimilhança (MV) utilizando sequências de nucleotídeos do gene 12S rDNA (273 pb). O modelo evolutivo utilizado foi o TN93+G+F. A barra de escala representa a distância genética. Os números nos nós da árvore são os valores de bootstrap obtidos a partir de 1000 replicatas. Os números de acesso do GenBank estão apresentados à esquerda dos nomes e os triângulos representam sequências obtidas no presente trabalho.

A mesma análise (Figura 41) mostra que a espécie *R. sp. II* também é encontrada na Argentina (KT382508) e França (KT382486). Por outro lado, é possível notar que a espécie tropical, encontrada nos outros estados brasileiros, apresenta sequências que agrupam com uma sequência de um espécime africano (KU255854).

A análise do gene COX1 também mostra uma separação entre os carrapatos do Rio Grande do Sul e os carrapatos dos outros estados e evidencia que a espécie *R. sp. II*, também pode ser encontrada no estado de Santa Catarina. Tal como observado para o gene 12S rRNA, as sequências de COX1 do Rio Grande do Sul e Santa Catarina agrupam com sequências de países europeus, como Portugal (KC243890), Itália (KC243886) e Espanha (KC243891) (Figura 42).

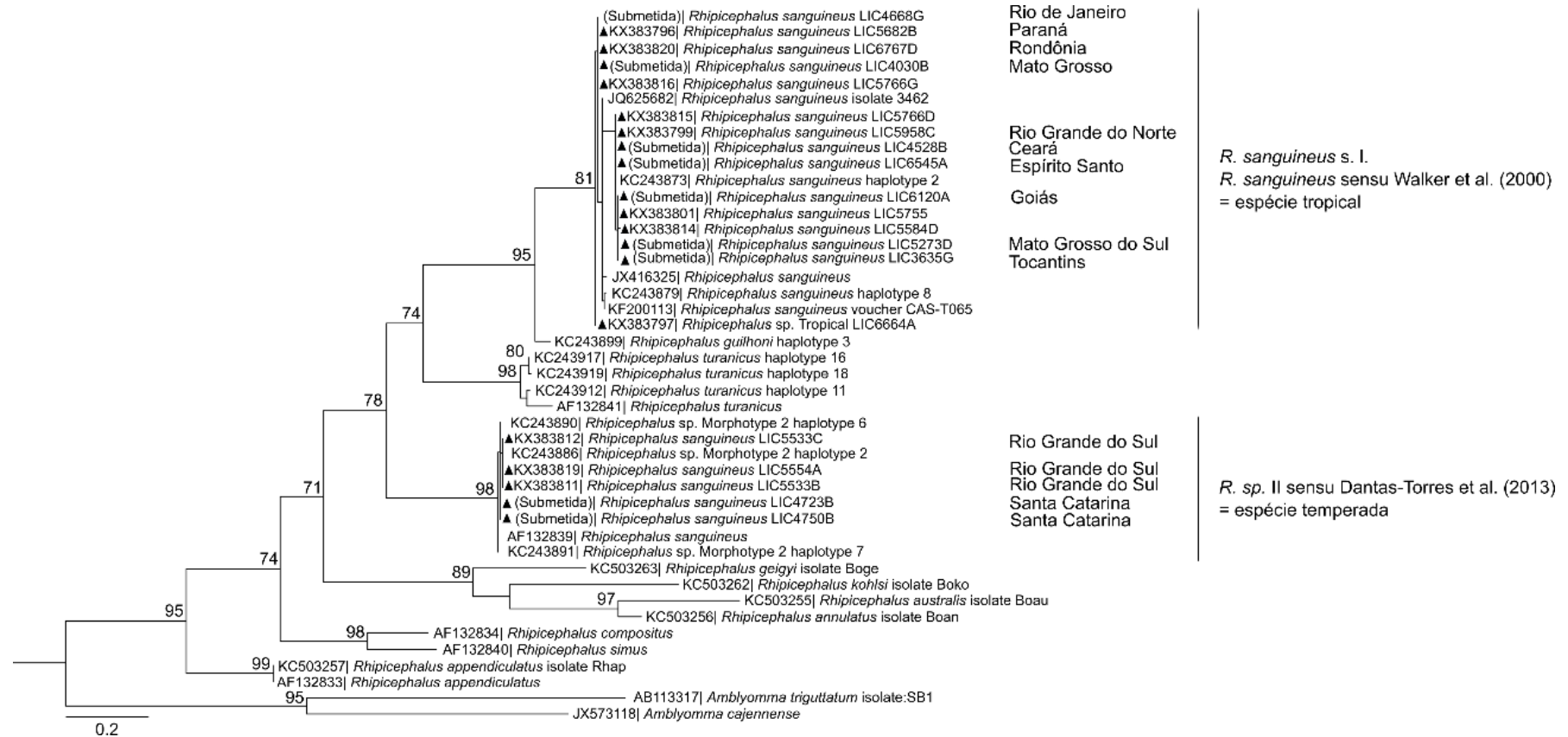


Figura 42 - Análise filogenética dos espécimes classificados como *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) do Brasil inferida pelo método da Máxima-verossimilhança (MV) utilizando sequências de nucleotídeos do gene COX1 (453 pb). O modelo evolutivo utilizado foi o TN93+G+F. A barra de escala representa a distância genética. Os números nos nós da árvore são os valores de bootstrap obtidos a partir de 1000 replicatas. Os números de acesso do GenBank estão apresentados à esquerda dos nomes e os triângulos representam sequências obtidas no presente trabalho.

A análise desse gene mostra que a espécie *R. sanguineus* s. l. é encontrada ainda nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo, Ceará e Rio de Janeiro, o que em acréscimo com a informação apresentada pela análise com o gene 12S rDNA mostra que esta espécie é encontrada em todas as regiões do país.

Hebert et al (2003) desenvolveram um sistema de identificação baseada no cálculo da divergência nucleotídica de 617 pb do gene COX1, utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parametros. Quando aplicado para o estudo de lepidópteros eles observaram que os valores de divergência entre organismos de uma mesma espécie eram menores do que 3%. Se o mesmo valor fosse aplicado como limite para a identificação de espécies de carrapatos do gênero *Rhipicephalus*, observaríamos que uma sequência de um espécime classificado como *R. turanicus*, coletado na Turquia (AF132841) (Murrell et al. 2000), apresenta um valor superior a esse limite quando comparada com outras três sequências de espécimes também classificados como *R. turanicus*, coletados na Itália (KC243917 e KC243919) e Grécia (KC243912). Estas três sequências apresentam um valor de divergência menor que 3% quando comparadas entre elas. Uma vez que este valor de divergência é apresentado por sequências de espécimes classificados como *R. turanicus* e coletados em regiões próximas, nós utilizamos o valor de 4% como o limite para a classificação de espécies. Como resultado observou-se que todas as outras comparações entre organismos de diferentes espécies ultrapassam esse valor e a tabela 5 apresenta o menor e o maior valor de divergência apresentado pela comparação quando há mais de uma sequência de uma espécie. A comparação da espécie tropical e a espécie *R. guilhoni* apresenta os valores de divergência de 5.8%-7.3%. Em adição, a espécie da região tropical do Brasil, *R. sanguineus* s. l., apresenta valores mínimo e máximo de divergência de 12.3%-13.4%, quando comparada à espécie *R. sp. II*, de regiões temperadas. Este valor é maior do que o obtido nas comparações entre *R. annulatus* X *R. australis* (8.5%), *R. compositus* X *R. simus* (9.3%) e *R. sp. II* e *R. guilhoni* (Tabela 5).

Tabela 5 – Matriz de divergência nucleotídica mínima e máxima do gene COX1, entre espécies do gênero *Rhipicephalus* Koch, 1844. O número de sequências disponíveis para cada espécie é apresentado entre parênteses.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 - <i>R. sanguineus</i> Trop. (20)	0.0% - 2.5%												
2 - <i>R. guilhoni</i> (1)	5.8% - 7.3%												
3 - <i>R. turanicus</i> (4)	12.9% - 15.7%	12.1% - 14.3%	0.2% - 3.9%										
4 - <i>R. sp.</i> Il Temperada (9)	12.3% - 13.4%	11.2% - 11.7%	11.0% - 14.2%	0.0% - 0.4%									
5 - <i>R. geigy</i> (1)	15.7% - 17.1%	13.5%	17.1% - 18.8%	13.3% - 13.8%									
6 - <i>R. kohlsi</i> (1)	16.3% - 17.7%	16.5%	18.6% - 20.0%	14.6% - 14.9%	12.7%								
7 - <i>R. australis</i> (1)	18.2% - 19.9%	17.6%	19.7% - 21.7%	16.8% - 17.1%	12.7%	13.8%							
8 - <i>R. annulatus</i> (1)	18.2% - 19.6%	16.5%	17.1% - 19.7%	14.6% - 14.9%	11.7%	12.5%	8.5%						
9 - <i>R. compositus</i> (1)	15.7% - 17.4%	14.1%	14.5% - 17.5%	12.5% - 13.0%	14.8%	17.4%	17.1%	16.2%					
10 - <i>R. simus</i> (1)	17.1% - 18.2%	16.0%	15.8% - 17.7%	15.5% - 16.1%	14.8%	17.1%	17.9%	16.8%	9.3%				
11 - <i>R. appendiculatus</i> (2)	14.6% - 16.0%	13.3%	17.7% - 20.0%	14.1% - 14.3%	15.1%	17.9%	17.0%	17.3%	13.5%	14.6%	0.0%		
12 - <i>A. triguttatum</i> (1)	20.8% - 21.4%	21.4%	21.1% - 23.5%	21.6% - 21.9%	21.9%	23.4%	20.7%	22.6%	22.0%	23.5%	18.2%		
13 - <i>A. cajennense</i> (1)	23.9% - 24.9%	23.9%	23.5% - 24.4%	22.1% - 22.4%	20.5%	21.1%	22.3%	22.3%	21.4%	22.0%	20.5%	19.1%	

A análise filogenética realizada com a região de controle D-loop mostrou o mesmo resultado que foi observado com os três conjuntos de dados anteriormente analisados, separando os carrapatos do Rio Grande do Sul dos outros carrapatos encontrados no Brasil (Figura 43).

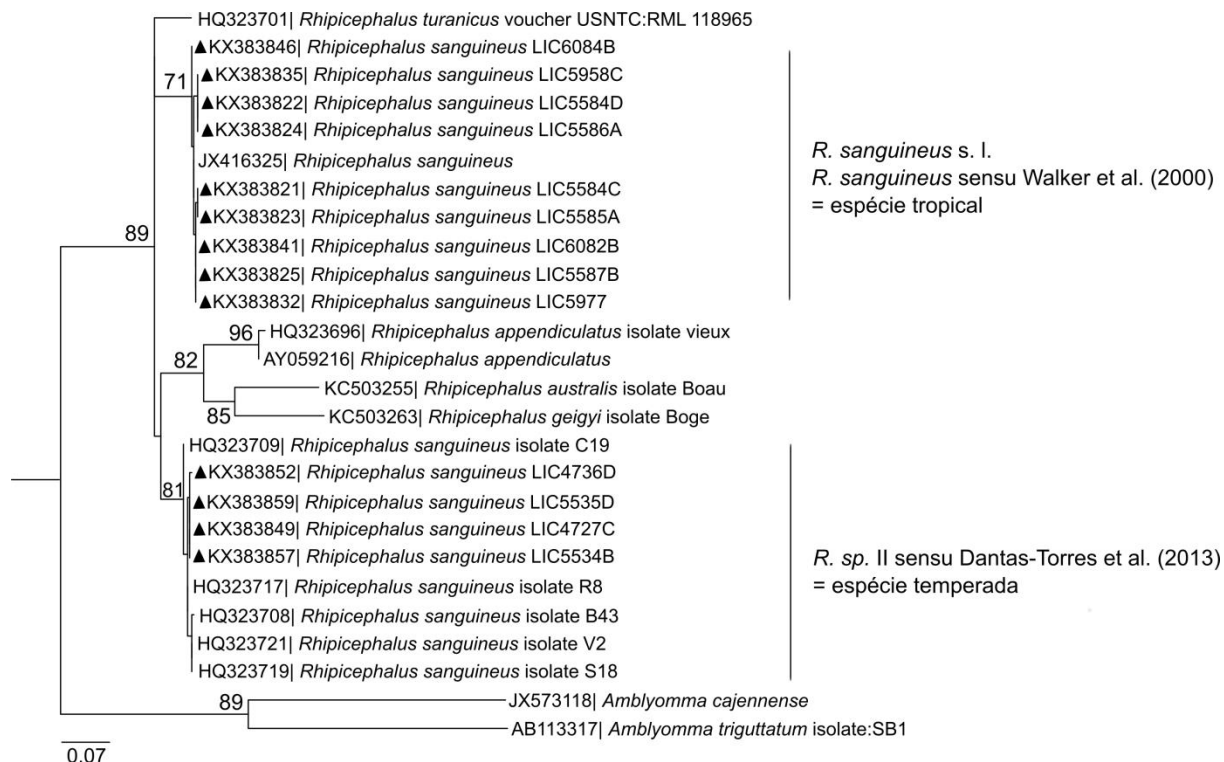


Figura 43 - Análise filogenética dos espécimes classificados como *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) do Brasil inferida pelo método da Máxima-verossimilhança (MV) utilizando sequências de nucleotídeos do gene D-loop (322 pb). O modelo evolutivo foi o TN93+G+F. A barra de escala representa a distância genética. Os números nos nós da árvore são os valores de bootstrap obtidos a partir de 1000 replicatas. Os números de acesso do GenBank estão apresentados à esquerda dos nomes e os triângulos representam sequências obtidas no presente trabalho.

De acordo com a reconstrução filogenética, os espécimes de *R. sanguineus* do Rio Grande do Sul (12S rDNA, COX1 e D-loop) e Santa Catarina (COX1) formam um clado bem delimitado e suportado, bem distinto de todos os outros espécimes analisados (Figuras 40, 41, 42 e 43).

A globalização do comércio, migração animal (Pfeffer & Dobler 2010) e migração humana, além das alterações climáticas (Estrada-Peña 2009) são alguns dos fatores que podem causar a disseminação de carrapatos e seus patógenos (Klaus et al 2016). O padrão de agrupamento da diversidade encontrada para *R. sanguineus* no Brasil pode ser compreendida se olharmos para trás na história de migração do Brasil, e, neste contexto, ao migrar o ser humano leva consigo seus

cães infestados com *R. sanguineus* para diferentes regiões do país. Este perfil de diversidade genética, associada a migrações humanas, pode ser observado em outras espécies de ixodídeos (Lampo et al., 1998, Casati et al. 2008, Bitencourth et al. 2016).

Como o resto do mundo, o Brasil teve grandes movimentos migratórios ao longo de sua história. De acordo com Adas et al. (2004) a migração brasileira é dividida em três períodos: 1080-1850, 1850-1930 e 1930 até os dias atuais. A migração interna desempenhou um papel importante, devido à mobilidade notável da população. Os ciclos econômicos brasileiros foram cruciais para estes movimentos de população, entre eles podemos citar os movimentos devido à colonização do país, estrada Trans-amazônica, mineração, ciclo da borracha, a construção de Brasília, entre outros (Martins & Vanalli, 2004).

O Tratado de Tordesilhas dividiu o território brasileiro em duas partes. Quase toda a costa leste estava sob o domínio Português, no entanto, o Estado do Rio Grande do Sul era parte da costa leste brasileira que estava sob domínio Espanhol. O fluxo intenso de navios da África para as colônias portuguesas pode explicar por que uma das espécies de *R. sanguineus* estudados aqui é encontrado em vários estados cujos territórios estavam sob o domínio Português. De fato, um dos carrapatos morfologicamente identificados como *R. sanguineus* parece ter tido sua origem na África (Otranto et al. 2014).

A dispersão pelo interior do país pode ser explicada por outros fatores, como a disseminação da cultura do café que começou no vale do rio Paraíba do Sul e teve sua idade de ouro entre 1850 e 1929, atingindo o oeste de São Paulo e, em seguida, norte de Paraná, em uma impressionante onda verde apoiada por correntes migratórias do Nordeste e de Minas Gerais. Foi o maior movimento interno da população no Brasil e foi responsável por uma profunda mudança na distribuição da população do país (Martins & Vanalli 2004).

Houve uma afluência de novos migrantes para a Amazônia, especialmente no Acre e Rondônia, no segundo ciclo da borracha (1942-1945), em uma tentativa de tentar aumentar a produção, uma vez que os seringais asiáticos estavam tomados pelos japoneses, adversários dos Aliados (URSS, Inglaterra, França e EUA) durante a guerra. (Martins & Vanalli 2004).

Também na década de 1940, o número de sulistas que começaram a habitar outras unidades da Federação tem crescido. A diáspora dos sulistas em relação a outros estados foi motivada pela falta de terra para o cultivo. Mais de cem mil

sulistas migraram para Rondônia, a maioria vivendo nos municípios de Vilhena e Ji-Paraná para plantar soja, e Porto Velho, trabalhando como profissionais e funcionários públicos. Em Roraima a concentração de migrantes vindos de Paraná também é grande por causa das grandes plantações de arroz (Martins & Vanalli 2004).

A década de 1950 foi uma época de grande fluxo migratório, rumo principalmente para a industrialização de São Paulo e Rio de Janeiro e Goiás, devido à construção da capital federal. Nessa época, destacam-se também as migrações para Rondônia com cassiterita e norte do Paraná com o café (Martins & Vanalli 2004).

Entre 1970 e 1991, as unidades da federação brasileira que receberam a maioria dos migrantes foram Rondônia e Roraima. Para Rondônia devido a projetos de colonização e de liquidação inicialmente promovidos pelo programa do governo militar chamada Polonoroeste (1970-1980) e organizados pelo Incra, e Roraima, devido à mineração de ouro e diamante a partir da década de 1970 (Martins & Vanalli 2004).

Por outro lado, a presença de um carrapato com possível origem europeia no estado do Rio Grande do Sul pode ser explicada por características que são quase exclusivas desse estado, em comparação com outros estados do país.

Rio Grande do Sul, no início do século XX, teve 12% de sua população composta de estrangeiros (alemães e italianos, principalmente), muito maior do que o índice do Brasil. Este fato é o resultado do intenso fluxo migratório para o Estado no final do século XIX. Esta tendência tem mudado ao longo do tempo (de Lourdes Jardim & Barcellos, 2012). Como Rio Grande do Sul, a Argentina tem forte tradição europeia, o que poderia explicar a presença do mesmo carrapato neste país.

Outro aspecto importante da dinâmica populacional do estado é a migração inter-regional. Cerca de 80% dos migrantes do Rio Grande do Sul tem o próprio Estado como destino. Estes movimentos seguem a dinâmica econômica e social do Estado, com os fluxos predominando nas regiões mais dinâmicas (de Lourdes Jardim & Barcellos, 2012).

A migração humana pode ter levado à propagação geográfica do hospedeiro de *R. sanguineus* – o cão doméstico. A ocorrência de carrapatos vetores nos assentamentos humanos em todo o mundo e entre os animais que são geralmente associados com a atividade humana, como gatos, cães e roedores apoiam essa teoria. O aumento das viagens pode ter desempenhado um papel importante na

disseminação de tais carrapatos associados aos cães durante a história, conforme os viajantes e seus animais domésticos se moviam entre os Estados (Soto 2009).

6. CONCLUSÃO

No que diz respeito à grande importância médica e veterinária do Complexo *R. sanguineus* em todo o mundo, este estudo fornece uma abordagem histórica dos movimentos de migração no Brasil para explicar a concentração da diversidade morfológica e molecular encontrada em *R. sanguineus* no país. Estas descobertas também suportam a hipótese de que mais de uma população de *R. sanguineus* ocorre no Brasil, e que essas populações não são delimitadas por regiões geográficas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adas M, Adas S, Adas M. 2004 Panorama geopolítico do Brasil: contradições, impasses e desafios sócios espaciais. São Paulo, Moderna, 608p.

Aljanabi SM, Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*; 15: 4692-3.

Apanaslevich DA, Horak IG, Mulumba-Mfumu LK. 2013. A new species of *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae), a parasite of red river hogs and domestic pigs in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Medical Entomology*, 50(3): 479-484.

Aragão H, Fonseca F. 1961. Notas de ixodologia: VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira: notas de ixodologia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 59 (2):115-129.

Barker SC, Murrell A. 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*, 129: S15-36.

Barnes RD, Ruppert EE. 1996. Zoologia dos Invertebrados. Ed. Roca Ltda, São Paulo. 651 pp.

Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. 2006. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, 223p.

Beati L, Keirans JE. 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.

Beati L, Patel J, Lucas-Williams H, Adakal H, Kanduma EG, Tembo-Mwase E, Krecek R, Mertins JW, Alfred JT, Kelly S, Kelly P. 2012. Phylogeography and

demographic history of *Amblyomma variegatum* (Fabricius)(Acari: Ixodidae), the tropical bont tick. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(6): 514-525.

Bechara A, Tranel D, Damasio H, Adolphs R. 1995. Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science*, 269(5227): 1115.

Benenson AS. 1992. Ehrlichiosis. In: El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. 15 ed. Washington D.C.: *Organizacion Mundial de Salud*, 115-117.

Bitencourth K, Voloch CM, Serra-Freire NM, Machado-Ferreira E, Amorim M, Gazêta GS. 2016. Analysis of *Amblyomma sculptum* haplotypes in an area endemic for Brazilian spotted fever. *Medical and Veterinary Entomology*, in press.

Black WC, Piesman J. 1994. Phylogeny of hard-and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(21): 10034-10038.

Black WC, Munstermann LE. 2005. Molecular taxonomy and systematic of arthropod vectors. In WC Marquardt, *Biology of Disease Vectors*, 505-528.

Bowman AS, Nuttall PA. 2008. Ticks: biology, disease and control. Cambridge University Press.

Bruce WA. 1971. Posterior capsule of Haller's organ in the lone star ticks *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Florida Entomologist* 54: 75-72.

Burlini L, Teixeira KR, Szabó MP, Famadas KM. 2010. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? *Experimental Applied Acarology* 50: 361-374.

Burkman EJ. 2009. Genetic structure of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) populations based on mitochondrial gene sequences. M. S. Thesis, Georgia Southern University. 57p.

Camicas JL, Hervy JP, Adam F, Morel PC. 1998. Les Tiques du Monde. Nomenclature, Stades Décrits, Hôtes, Répartition (Acarida, Ixodida). Éditions de l'Orstom, 233 pp.

Caporale DA, Rich SM, Spielman A, Telford SR, KocherTD. 1995. Discriminating between Ixodes ticks by means of mitochondrial DNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 4(4): 361-365.

Casati S, Bernasconi MV, Gern L, Piffaretti JC. 2008. Assessment of intraspecific mtDNA variability of European *Ixodes ricinus* sensu stricto (Acari: Ixodidae). *Infection Genetics and Evolution*, 8: 152-158.

Chitimia L, Lin RQ, Cosoroaba I, Wu XY, Song HQ, Yuan ZG, Zhu XQ. 2010. Genetic characterization of ticks from southwestern Romania by sequences of mitochondrial cox1 and nad5 genes. *Experimental Applied Acarology*, 52(3): 305-11.

Dantas-Torres, F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152: 173–185.

Dantas-Torres F, Oliveira-Filho EF, Soares FÂM, Souza BO, Valença RBP, Sá FB. 2008. Ticks infesting amphibians and reptiles in Pernambuco, Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(4): 218-221.

Dantas-Torres F, Latrofa MS, Annoscia G, Giannelli A, Parísi A, Otranto D. 2013. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and the Old Worlds. *Parasite and Vectors*, 6: 1-17.

de Lourdes Jardim M, Barcellos TMM. 2011. Migrações no Rio Grande do Sul. *Revista Paranaense de Desenvolvimento*, (121): 133-147.

Estrada-Peña A. 2009. Tick-borne pathogens, transmission rates and climate change. *Frontiers in Bioscience* 14:2674–2687.

Estrada-Peña A, Sanchez C. 1988. Morfología comparada de *Rhipicephalus sanguineus* y *R. turanicus* (Acarina: Ixodidae). *Revista Ibérica de Parasitología*, 48: 51-62.

Evans DE. 1992. Tick infestation of livestock and tick control methods in Brazil: a situation report. *International Journal of Tropical Insect Science*, 13(04): 629-643.

Fernandes FDF. 2000. In vitro activity of permethrin, cipermethrin and deltamethrin on larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari, Ixodidae). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 52(6): 621-626.

Foelix RF, Axtell RC. 1972. Utrastructure of Haller,s Organ in the tick *Amblyomma americanum* (L.). *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 124: 275-292.

Fussmann GF, Loreau M, Abrams PA. 2007. Eco-evolutionary dynamics of communities and ecosystems. *Functional Ecology*, 21(3): 465-477.

Gray J, Dantas-Torres F, Estrada-Peña A, Levin M. 2013. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4: 171–180.

Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, Estrada-Peña A. 2006. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Experimental Applied Acarology*, 40(2): 83-100.

Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG, Barker SC. 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*; 2528:1-28.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3): 307-21.

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B: *Biological Sciences*, 270(1512): 313-321.

Hefnawy T. 1970. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Water loss from the spiracles of *Hyalomma (H.) dromedarii* Koch (Ixodidae) and *Ornithodoros (O.) savignyi* (Audouin) (Argasidae). *Journal of Parasitology*, 362-366.

Hinton HE. 1967. The structure of the spiracles of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Australian Journal of Zoology*, 15(5): 941-945.

Horak IG, Apanaskevich DA, Kariuki EK. 2013. A new species of *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae), a parasite of giraffes in Kenya. *Journal of Medical Entomology*, 50(4): 685-690.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.

Klaus C, Gethmann J, Hoffmann B, Ziegler U, Heller M, Beer M 2016. Tick infestation in birds and prevalence of pathogens in ticks collected from different places in Germany. *Parasitology Research*. 1-12.

Kovalev SY, Mukhacheva TA. 2012. Phylogeographical structure of tick *Ixodes persulcatus*: a novel view. *Ticks and Tick Borne Diseases* 3: 212-18.

Krakowetz CN, Lindsay LR, Chilton NB. 2011. Genetic diversity in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) from six established populations in Canada. *Ticks and tick-borne diseases*, 2(3): 143-150.

Krantz GW, Walter DE. 2009. A Manual of Acarology. Texas Tech University Press, Lubbock, TX, 807 pp.

Kuraku S, Zmasek CM, Nishimura O, Katoh K. 2013. aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Research*. 41(Web Server issue):W22-8.

Labruna MB, Pereira MC. 2001. Carrapato em cães no Brasil. *Clínica Veterinária*, 30: 24-32.

Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari SM, Walker DH. 2004. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology* 42(1): 90-8.

Lampo M, Rangel Y, Mata A. 1998. Population genetic structure of a three-host tick, *Amblyomma dissimile*, in eastern Venezuela. *Journal of Parasitology*, 6: 1137-1142.

Levin ML, Studer E, Killmaster L, Zemtsova G, Mumcuoglu KY. 2012. Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and applied acarology*, 58(1): 51-68.

LI WH. 1997. Molecular evolution. Sinauer, Sunderland, Mass.

Linardi PM, Nagem RL. 1973. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. *Revista Brasileira de Biologia*, 33(4): 529-538.

Louly CCB, Fonseca IN, de Oliveira VF, Borges LMF. 2006. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de Goiânia, GO. *Ciência Animal Brasileira*, 7(1): 103-106.

Mangold AJ, Bargues MD, Mas-Coma S. 1998. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitology research*, 84(6): 478-484.

Martins D, Vanalli S. 2004. Migrantes. Sao Paulo, Contexto, 6ed,41p.

Massard CL, Fonseca AH. 2004. Carrapatos e doenças transmitidas, comuns ao homem e aos animais. *A Hora Veterinária*, 135: 15-23.

Mixson TR, Campbell SR, Gill JS, Ginsberg HS, Reichard MV, Schulze TL, Dasch GA. 2006. Prevalence of *Ehrlichia*, *Borrelia*, and *Rickettsial* agents in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) collected from nine states. *Journal of medical entomology*, 43(6): 1261-1268.

Murrell A, Campbell NJH, Barker SC. 1999. Mitochondrial 12S rDNA indicates that the Rhipicephalinae (Acari: Ixodida: Ixodidae) is paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*; 12: 83-6.

Murrell A, Campbell NJH Barker SC. 2000. Phylogenetic analyses of the rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16: 1-7.

Norris DE, Klompen JSH, Keirans JE, Black WC IV. 1996. Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes. *Journal of Medical Entomology*, 33: 78-89.

Norris DE, Klompen JSH, Black WC IV. 1999. 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*, 92: 117-29.

Oliveira PR, Bechara GH, Denardi SE, Saito KC, Nunes E, Szabó M, Mathias M. 2005. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) ticks from Brazil and Argentina. *Veterinary Parasitology*, 129: 139-147.

Otranto D, Huchet JB, Giannelli A, Callou C, Dantas-Torres F. 2014. The enigma of the dog mummy from ancient Egypt and the origin of '*Rhipicephalus sanguineus*'. *Parasites and Vectors*. 20: 7:2.

Pegram RG, Clifford CM, Walker JB, Keirans JE. 1987a. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). I. *R. sulcatus* Neumann, 1908 and *R. turanicus* Pomerantsev, 1936. *Systematic Parasitology*, 10: 3-26.

Pegram RG, Clifford CM, Walker JB, Keirans JE. 1987b. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). II. *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. *Systematic Parasitology*, 10: 27-44.

Pfeffer M, Dobler G .(2010.) Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasites and Vectors* 3:35. doi:10.1186/1756- 3305-3-35.

Ribeiro AL, Faccini JLH, Daemon E. 1995. Estudo das variações morfológicas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) no Brasil. *Revista da Universidade Rural – Série Ciências da Vida*, 18(1-2): 25-33.

Rohr CJ. 1909. Estudos sobre Ixodidas do Brasil. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz. 220 pp.

Rosa F, Crespo MV, Ferreirinha D, Morgado M, Madeira M, Santos-Silva M, Santos A, Sousa R. 2006. Ticks on dogs and its role as vectors/intermediate hosts Ribatejo and Oeste/Vale do Tejo, Portugal. In: Proceedings of International Congress of Parasitology, Glasgow, Scotland, Medimond S.r.l. 567-570.

Rosa F, Crespo MV, Almeida JP. 2010. Ixodídeos em cães do concelho de Óbidos. XIV Congresso Ibérico de Entomologia, Lugo, Espanha, 2-5 Setembro. Available from: <http://hdl.handle.net/10400.15/179>. Access in: january 20th 2016.

Roshdy MA, Hefnawy T. 1973. The functional morphology of *Haemaphysalis spiracles* (Ixodoidea: Ixodidae). *Zschr Parasitenk*, 42(1): 1-10.

Shao R, Barker SC. 2007. Mitochondrial genomes of parasitic arthropods: implications for studies of population genetics and evolution. *Parasitology*, 134(02): 153-167.

Simon CFF, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogentic 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 DE. 1991. Tick life cycles. *Biology of ticks*, 1: 51-66.

Soto SM. 2009. Human migration and infectious diseases. *Clinical Microbiology and Infection*, 15: 26–8.

Szabó MP, Mukai LS, Rosa PC, Bechara GH. 1995. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters, and guinea pigs to repeated infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 32(1): 43-50.

Szabó MPJ, Mangold AJ, João CF, Bechara GH, Guglielmone AA. 2005. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Veterinary Parasitology*, 130(1): 131-140.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.

Taylor MF, McKechnie SW, Pierce N, Kreitman M. 1993. The lepidopteran mitochondrial control region: structure and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 1259-72.

University of Bristol. Bristol University Tick ID: Online Photographic Guide to Ticks. Available from: <http://bristoltickid.blogs.ilrt.org>. Access: january 15th 2016.

Walker JB, Keirans JE, Horak IG. 2000. The Genus *Rhipicephalus* (Acari:Ixodidae): A guide to the brown ticks of the world. Cambridge University Press, Cambridge. 643p.

Walker JB, Keirans JE, Horak IG. 2005. The genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world. Cambridge University Press. 643 pp.

Wilson AC, Cann RL, Carr SM, George M, Gyllensten UB, Helm-Bychowski KM, Higuchi RG, Palumbi SR, Prager EM, Sage RD, Stoneking M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26(4): 375-400.

Woolley TA. 1972. Scanning electron microscopy of the respiratory apparatus of ticks. *Transactions of American Microscopical Society*, 91: 348-363.

Xu G, Fang QQ, Keirans JE, Durden LA. 2003. Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. *Journal of Parasitology* 89: 452-7.

Zahler M, Filippova NA, Morel PC, Gothe R, Rinder H. 1997. Relationships between species of the *Rhipicephalus sanguineus* group: a molecular approach. *The Journal of parasitology*, 302-306.