Jonas Moraes-Filho

**Análise filogenética de diferentes populações do
carrapato *Rhipicephalus sanguineus* provenientes de
diferentes regiões do Brasil, da América Latina,
Espanha, Itália e África do Sul**

São Paulo

2010

Jonas Moraes-Filho

Análise filogenética de diferentes populações do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* provenientes de diferentes regiões do Brasil, da América Latina, Espanha, Itália e África do Sul

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo

2010

17

Nº CLASSIFICAÇÃO
T. 2245
FMVZ
Nº TOMBO
029439

SAB 2073
Syono

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
28/11/0

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2245
FMVZ

Moraes-Filho, Jonas

Análise filogenética de diferentes populações do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* provenientes de diferentes regiões do Brasil, da América Latina, Espanha, Itália e África do Sul / Jonas Moraes-Filho. -- 2010.
40 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. *Rhipicephalus sanguineus*. 2. Carrapatos. 3. Análise filogenética. 4. Brasil.
5. América Latina. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise filogenética de diferentes populações do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* provenientes de diferentes regiões do Brasil e da América do Sul", protocolado sob o nº 1535/2008, não utilizando animais, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 29 de outubro de 2008.

We certify that the Research "Genetic analysis of different populations of *Rhipicephalus sanguineus* from Brazil and South America", protocol number 1535/2008, will not be used animals, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/29/08.

São Paulo, 30 de outubro de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MORAES-FILHO, Jonas.

Título: Análise filogenética de diferentes populações do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* provenientes de diferentes regiões do Brasil, da América Latina, Espanha, Itália e África do Sul.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: 26/10/10

Banca Examinadora

Prof. Dr.	<u>MARCELO BAHIA LABRUNA</u>	Instituição:	<u>APROVADO</u>
Assinatura:	<u> </u>	Julgamento:	<u>FMVZ/USP</u>
Prof. Dr.	<u>Rodrigo Martins Soares</u>	Instituição:	<u>Aprovado</u>
Assinatura:	<u> </u>	Julgamento:	<u>FMVZ/USP</u>
Prof. Dr.	<u>Arlei Marchi</u>	Instituição:	<u>APROVADO</u>
Assinatura:	<u> </u>	Julgamento:	<u>ICB/USP</u>

Dedicatória

Dedico ao meu avô Sebastião Moraes (*in memoriam*).

A minha esposa Andressa, por ser paciente, dedicada e amorosa.

Aos meus pais.

A minha irmã Keisa e cunhado Ewerton.

A minha irmã Keila, cunhado Marcos, sobrinhas: Stella e Natália, por terem dado moradia e carinho nesses últimos anos.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus.

Ao meu orientador e “chefe” Marcelo Bahia Labruna, por ter acreditado em mim e no meu potencial.

A minha esposa Andressa.

Aos meus pais, irmãs e cunhados.

Ao meu Vô Chico e, Vó Dila e Vó Cida.

Aos meus tios, tias e primos

Ao meu sogro Mauricio e sogra Cleide.

As minhas sobrinhas Stella e Natália pela paciência e companhia todos esses anos.

Ao meu grande amigo e professor Luciano Barros, por ser o responsável pelo início da minha vida científica.

A Dra. Hilda Pena por ter sido a minha primeira orientadora desta faculdade.

Aos meus professores e amigos Paulo, Rodrigo e Fernando.

Aos meus amigos veterinários Ryan Piera, Mario Prado, Carmem Zuna, Denis Prata, Bruno, Jonathan Ferreira, Carlão, Mauricio Ator e Patricia Friggi que de alguma forma contribuíram para ter concluído esse objetivo.

Ao meu grande amigo Willian Cambotta.

As amigas Sibebe e Anaiá.

Aos amigos do laboratório carrapatos: Thiaguinho, João Gaúcho, Aline, Iara, Guilherme, Hebert Mossoró, Bruno Mineiro, Maria Polonesa e Mariana.

Ao casal Arlei e Fernanda, pelo auxílio para a finalização desse trabalho.

Aos técnicos do laboratório Renatinho e Pedrinho, pela boa convivência e amizade.

Aos amigos Danival, Alexandre Fininho, Bispo, Sandrinha e Carol.

Aos padrinhos Richard Pacheco (Tiozão) e Adriano Pinter, sendo mais do que simples amigos.

Ao amigo Mauricio Horta, por ter me suportado durante o período de bolsista de TT3.

A secretária da pós-graduação do departamento Tânia, por ter tido paciência com minhas loucuras e sustos.

A mestrande Scheila por ter seqüenciado as amostras desse projeto.

Agradeço ao grande CORINTHIANS, por grandes momentos de felicidade e únicos.

A FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

MORAES-FILHO, J. **Análise filogenética de diferentes populações do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* provenientes de diferentes regiões do Brasil, da América Latina, Espanha, Itália e África do Sul.** [Genetic analysis of different populations of *Rhipicephalus sanguineus* from Brazil, Latin América, Spain, Italy and South Africa]. 2010. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Dentro do gênero *Rhipicephalus*, há o chamado complexo *sanguineus* formado por várias espécies presentes apenas no Velho Mundo, das quais apenas a espécie *Rhipicephalus sanguineus* é considerada de ocorrência no Novo Mundo. Como as espécies deste complexo apresentam grande similaridade morfológica, é possível que mais de uma espécie do complexo *sanguineus* esteja ocorrendo nas Américas. Um trabalho recente relatou parâmetros biológicos e genéticos significativamente diferentes entre uma população de *R. sanguineus* do Brasil e outra da Argentina, sugerindo que o status biosistemático de *R. sanguineus* na América do Sul deva ser revisto. Diante disto, e da inquestionável importância médico-veterinária de *R. sanguineus* na América do Sul, este projeto objetivou realizar uma análise genética de 32 populações de *R. sanguineus*, sendo 17 do Brasil (englobando 13 estados), 3 do Chile, 2 da Venezuela, 2 da Colômbia e 1 de cada um dos seguintes países: Argentina, Uruguai, Itália, Espanha, África do Sul, Costa Rica, Panamá, México. Uma amostra de *Rhipicephalus turanicus* da Espanha e uma da África do sul também foram analisadas. Para tal, carrapatos oriundos das diferentes populações foram analisados geneticamente através de seqüências dos genes mitocondriais 16S rDNA. O resultado deste trabalho permitiu inferir sobre a possibilidade da existência no mínimo de dois grupos distintos de carrapatos sob o táxon *R. sanguineus* na América Latina, um se aproximando dos carrapatos de origem africana e com distribuição na América tropical e subtropical e outro se aproximando das amostras européias e com distribuição temperada do sul da América do Sul.

Palavras-chave: *Rhipicephalus sanguineus*. Carrapatos. Análise filogenética. Brasil. América Latina.

ABSTRACT

MORAES-FILHO, J. **Genetic Analysis of different populations of *Rhipicephalus sanguineus* from Brazil, Latin America, Spain, Italy and South Africa.** [Análise filogenética de diferentes populações do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* provenientes de diferentes regiões do Brasil, América Latina, Espanha, Itália e África do Sul]. 2010. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Among the genus *Rhipicephalus*, there is the *sanguineus* complex composed by many species of distribution restricted to the Old World. It has been considered that *Rhipicephalus sanguineus* is the only species from this complex to be present in the New World. Due to the high similarity between the *sanguineus* complex species, it is possible that more than one species is present in the Americas, as suggested by recent papers. The present study performed a genetic evaluation based on 16S rDNA mitochondrial gene sequences of ticks representative 26 *R. sanguineus* populations from South America, one from: Italy, Spain, South Africa, Costa Rica, Panama, Mexico. Additionally, *Rhipicephalus turanicus* ticks from South Africa and Spain were also used. The results confirm the existence of genetically distinct populations of the “*sanguineus*” complex in the Americas.

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus*. Ticks. Genetic analysis. Brazil. Latin América.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Espécimes de carrapatos adultos identificados morfologicamente como *Rhipicephalus sanguineus*, coletados em diferentes localidades da América Latina e utilizados no presente estudo 23

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Matriz de divergência bruta (%) entre sequências de DNA de um fragmento do gene 16S rRNA de carrapatos morfologicamente identificados como *Rhipicephalus sanguineus* da América Latina (sequências de A a F; vide Tabela 1), *R. sanguineus* da África do Sul (R.s AF), *R. sanguineus* da Itália (R.s IT), *R. sanguineus* da Espanha (R.s ES), *Rhipicephalus turanicus* da África do Sul (R.t AF) e *Rhipicephalus turanicus* da Espanha (R.t ES)..... 29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Árvore filogenética construída por Máxima Verossimilhança, baseada em seqüências de 16S rDNA mitocondrial (359 caracteres) de carrapatos de 29 localidades discriminados na Tabela 1 (vide última coluna da Tabela 1). Seqüência de *R. appendiculatus* obtida no GenBanK foi utilizada como grupo externo. As letras de A a F representam os diferentes haplótipos. Os números correspondem aos valores de suporte de “bootstrap” em 100 replicatas, suporte de 500 replicatas do programa RAxML e probabilidade a posteriori obtida pelo MrBayes, respectivamente 30

Figura 2 – Localidades onde amostras de carrapatos identificados morfologicamente como *Rhipicephalus sanguineus* foram coletados no continente americano para o presente estudo. Os números correspondem às localidades descritas a partir da primeira coluna na Tabela 1. As letras coloridas representam as seqüências de DNA na Figura 1 (vide última coluna da Tabela 1) 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Amapá
B	Análise bayeseana
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CE	Ceará
CNC	Coleção Nacional de Carrapatos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ES	Espírito Santo
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
MG	Minas Gerais
MP	Máxima parcimônia
MT	Mato Grosso
MV	Máxima verossimilhança
PB	Paraíba
PCR	Reação em cadeia polimerase
PE	Pernambuco
PI	Piauí
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
RJ	Rio de Janeiro
RO	Rondônia
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
SP	São Paulo
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

=	Igual
°	Graus
%	Por cento
>	Maior
<	Menor
'	Minutos
''	Segundos
S	Sul
N	Norte
O	Oeste
W	Oeste
Km	Quilômetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 OBTENÇÃO DE EXEMPLARES DE <i>R. SANGUINEUS</i>	21
3.2 PROCESSAMENTOS DOS CARRAPATOS	24
3.3 PCR PARA UM FRAGMENTO DO GENE MITOCONDRIAL RIBOSSÔMICO RDNA 16S	24
3.4 ELETROFORESE EM GEL AGAROSE	24
3.5 SEQUENCIAMENTO DE DNA	25
3.6 ANÁLISES FILOGENÉTICAS DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS	25
3.6.1 Alinhamento de sequências de nucleotídeos	25
3.6.2 Análises filogenéticas	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5 CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

A fauna de carrapatos do Brasil está constituída por 61 espécies, divididas em duas famílias: Ixodidae (44 espécies) e Argasidae (17 espécies). A família Ixodidae é constituída por cinco gêneros, conforme descrito a seguir: *Amblyomma* (30 espécies), *Ixodes* (8 espécies), *Haemaphysalis* (3 espécies), *Dermacentor* (1 espécie) e *Rhipicephalus* (2 espécies). Todos esses carrapatos são nativos da América Latina, exceto as espécies *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, ambos importados com animais domésticos (bovinos e cães, respectivamente) do Velho Mundo (GUIMARÃES et al., 2001; LABRUNA et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2009).

O carrapato *R. sanguineus* está presente em todos os continentes do planeta e parasita primariamente o cão doméstico. Embora ele tenha se originado na região Afrotropical, sua distribuição quase cosmopolita se deve às migrações humanas pelo mundo, levando consigo o cão doméstico (WALKER et al., 2000). A introdução do *R. sanguineus* nas Américas pode ter ocorrido recentemente, durante colonização européia a partir do final do século 15, ou mesmo anteriormente, já que há relatos de fósseis de cães domésticos no Peru, Bolívia e México datados de antes do século 15 (LEONARD et al., 2002).

No Brasil, *R. sanguineus* não era encontrado nos estados de Minas Gerais, São Paulo e na região Sul até antes de 1906, quando já era abundante na Bahia, Sergipe, Maranhão, Pará, Mato Grosso e em algumas localidades da cidade do Rio de Janeiro. De 1910 em diante, esta espécie tornou-se mais abundante no Rio de Janeiro e nos demais estados das regiões Sudeste e Sul (ARAGÃO, 1911, 1936). Nas últimas décadas, tanto a prevalência quanto a intensidade das infestações por *R. sanguineus* em cães vêm aumentando. No Rio Grande do Sul, por exemplo, este carrapato foi citado de baixa ocorrência em 1947, tendo sido encontrado em apenas 1 (1,29%) de 77 cães examinados (CORRÊA, 1955). Cinco décadas mais tarde, este mesmo carrapato foi encontrado em 48,8% de 450 cães da cidade de Porto Alegre (RIBEIRO et al., 1997). Atualmente, *R. sanguineus* é considerado, juntamente com as pulgas, os principais ectoparasitas de cães em

todo o Brasil (LABRUNA, 2004). Tal fato é retratado pela grande atenção com que a indústria farmacêutica veterinária trata este carrapato; até o início da década de 1980, não existia no mercado brasileiro nenhum produto comercial carrapaticida com indicação específica para tratamento de *R. sanguineus* em cães. Atualmente, há dezenas de produtos, das mais diversas formulações e apresentações, representando uma cifra considerável no faturamento da linha veterinária das indústrias farmacêuticas do Brasil.

Além de poder causar infestações maciças nos cães, podendo inclusive atingir níveis letais, o carrapato *R. sanguineus* é o único vetor conhecido de *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* no Brasil (LABRUNA; Pereira 2001). Desta forma, *R. sanguineus* vem se tornando um dos parasitos de maior importância veterinária do Brasil.

Muito embora os cães sejam os hospedeiros primários de *R. sanguineus*, a literatura científica contém relatos esporádicos de infestação humana por esta espécie de carrapato, inclusive no Brasil (GODDARD, 1989; DANTAS-TORRES et al., 2006; LOULY et al., 2006). Além disso, diferentes trabalhos têm relatado casos humanos de febre maculosa (causada por *Rickettsia rickettsii*) transmitida por *R. sanguineus* nos Estados Unidos e México (MARIOTTE et al., 1944; BUSTAMANTE; Varela 1947; DEMMA et al., 2005). No Brasil, primeiros relatos estão sendo descritos, nos quais foi diagnosticado pela biologia molecular *R. rickettsii* parasitando *R. sanguineus* no município de Santo André na Grande São Paulo (MORAES-FILHO et al., 2009), e isolamento da bactéria em células Vero em *R. sanguineus* proveniente do município de Juiz de Fora, MG (PACHECO et al., 2009). Semelhantemente, casos de infecção humana pela riquetsia *E. canis* foram recentemente associados ao carrapato *R. sanguineus* na Venezuela (UNVER et al., 2001; PEREZ et al., 2006). Muito embora *R. sanguineus* já seja conhecido de longa data como principal vetor de febre maculosa na Europa (causada principalmente por *R. conorii*), os recentes trabalhos no continente americano sugerem que a importância médica deste carrapato deva ser bem maior do que se supunha (PAROLA et al., 2005). Finalmente, um recente trabalho experimental no Brasil sugeriu que a leishmaniose visceral canina (causada por *Leishmania chagasi*) possa ser transmitida através da ingestão de carrapatos *R. sanguineus* após se alimentarem em cães infectados (COUTINHO et al., 2005).

Dentro do gênero *Rhipicephalus*, há o chamado complexo *sanguineus*, formado por várias espécies, dentre as quais *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *R. camicasi* e *R. guilhoni* se

destacam como de maior importância veterinária na África e Europa (WALKER et al., 2000, 2003; ESTRADA-PENÑA et al., 2004). As espécies deste complexo apresentam grandes similaridades morfológicas, e algumas vezes ecológicas, distribuídas principalmente na África, região mediterrânea e Oriente Médio. O tamanho do *R. sanguineus* também diferencia em diferentes regiões, como exemplo, trabalhos mostraram que fêmeas do Brasil (SZABO et al., 2005) chegam a pesar até 50% a menos que as dos EUA (JITTAPALAPONG et al., 2000) e Japão (INOKUMA et al., 1997). Outra característica importante a relatar diz respeito à capacidade variável dos cães para desenvolver resistência ao parasitismo do *R. sanguineus* após algumas infestações. Em alguns casos, foi observado que os cães são incapazes de adquirir resistências, mesmo após várias infestações (SZABO et al., 2005), enquanto que outros autores detectaram algum grau de resistência após reinfestação (INOKUMA et al., 1997; JITTAPALAPONG et al., 2000). A literatura relata inúmeros diagnósticos errôneos e confusões ocorridas em trabalhos envolvendo diferentes espécies do complexo *sanguineus* (WALKER et al., 2000). Por esta razão, o uso de ferramentas de biologia molecular é bastante apropriado para estudos com diferentes espécies do complexo *sanguineus*.

Mesmo diante da existência deste complexo, *R. sanguineus* tem sido sempre considerada a única espécie de *Rhipicephalus* ocorrendo no Novo mundo (GUGLIELMONE et al., 2003; BARROS-BATTESTI et al., 2006). Recentemente, SZABO et al. (2005) relataram parâmetros biológicos e genéticos significativamente diferentes entre uma população de *R. sanguineus* do Brasil e uma da Argentina. Embora adultos da população brasileira tenham se alimentados e copulado com adultos da população Argentina (e vice-versa), os híbridos se mostraram quase que totalmente inférteis. Em adição, análise de seqüências de DNA de um fragmento do gene mitocondrial rRNA 12S 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* da África. Baseando-se nos seus resultados, SZABO 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 chamado complexo *sanguineus*.

Um outro estudo em laboratório comparando as espécies de *R. sanguineus* e *R. turanicus* demonstrou que são semelhantes quanto às: adaptações ao meio-ambiente, taxa de reprodução e tamanho dos ovos. Em relação às fêmeas dessas espécies, foi observado que *R. turanicus* produz uma quantidade maior de ovos e mais leves, bem como são mais pesadas após ingurgitação quando comparadas com as fêmeas de *R. sanguineus* (IOFFE-USPENSKY, 1997).

Genes mitocondriais têm sido amplamente utilizados na sistemática molecular. Desta forma, o seu número elevado de cópias torna muito mais fácil de trabalhar, com regiões altamente conservadas. Com isso podem ser usados para determinar o parentesco evolutivo de microorganismos. As seguintes duas categorias têm sido avaliadas em estudos filogenéticos: genes ribossomais e genes codificadores de proteínas. Há dois genes mitocondriais ribossomais, 12S e 16S rDNA, que não são separados por espaçadores internos transcritos. Vale salientar que esses genes têm sido considerados marcadores moleculares de excelência para problemas taxonômicos do nível intraespecífico para espécies filogeneticamente muito próximas. Um dos problemas potenciais com genes mitocondriais são os genes conhecidos como numts (cópias nucleares à partir de gene mitocondrial) ou pseudogenes mitocondriais, que podem ser amplificados e seqüenciados por engano, o que pode conduzir a filogenias erradas (CRUICKSHANK, 2002).

2 OBJETIVOS

Diante dos fatores expostos acima, especialmente no tocante à importância médico-veterinária de *R. sanguineus* no Brasil e nas Américas, e da falta de estudos sobre a biosistemática de *R. sanguineus* nas Américas (onde pode estar ocorrendo mais de uma espécie sob o mesmo nome), o presente trabalho objetivou: a) determinar seqüências de DNA referentes a um fragmento do gene mitocondrial ribossômico rDNA 16S de carrapatos morfológicamente identificados com *R. sanguineus* provenientes de regiões do Brasil, Américas do Sul, Central e Norte, Espanha, Itália e África do Sul e *R. turanicus* provenientes da Espanha e África do Sul; b) realizar uma análise filogenética das seqüências obtidas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos ocorreram das seguintes maneiras:

3.1 OBTENÇÃO DE EXEMPLARES DE CARRAPATOS

Para o presente estudo, foram utilizados espécimes de carrapatos adultos (machos e fêmeas) conservados em álcool 70 a 100%, morfologicamente compatíveis com os padrões descritos por WALKER et al. (2000) para *R. sanguineus*, coletados em diferentes países da América Latina e em diversos estados brasileiros, totalizando 29 localidades. Uma lista desses carrapatos encontra-se discriminada na tabela 1. De cada localidade, foram processados de forma individual dois espécimes adultos de carrapatos, exceto para as localidades 1, 3, 8, 9, 11, 14, 20, 22, 27 e 28, das quais apenas um espécime adulto foi processado. Parte desses carrapatos já se encontrava depositada na Coleção Nacional de Carrapatos (CNC) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Outra parte foi adquirida em coletas a campo durante o curso do presente projeto. Por fim, alguns espécimes foram cedidos e enviados por colaboradores de outros centros de pesquisa, conforme descrito a seguir. Esses exemplares enviados correspondem às seguintes localidades:

- Ilha de Páscoa, Chile: enviado pela Dra. Kátia Abarca, da Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
- Santiago, Chile: enviado pelo Dr. Javier Lopez, médico veterinário autônomo em Santiago, Chile.
- Rafaela, Santa Fé, Argentina: enviado pelo Dr. Alberto A. Guglielmone, do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA), Rafaela, Argentina.
- Santa Maria, RS, Brasil: enviado pelo Prof. Luis A. Sangioni, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.
- Garopaba, SC, Brasil: enviado pelo Prof. Matias P. J. Szabó, da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

-Recife, PE, Brasil: enviado pelo Dr. Filipe Dantas-Torres, da Fiocruz de Recife, PE.

-Linares, México: enviado pelo Dr. Adriano Pinter, da Sucen, São Paulo, SP.

Em adição, amostras de carrapatos adultos das espécies *R. sanguineus* e *R. turanicus* provenientes tanto da Espanha como da África do Sul, foram incluídos no presente estudo. Os carrapatos da Espanha foram identificados através de morfologia por J. M. Venzal (Universidad de La Republica, Uruguay) e A. Estrada-Peña (Universidad de Zaragoza, Espanha), e eram provenientes de colônias de laboratório. Os carrapatos da África do Sul foram identificados através de morfologia por Ivan Horak (Universidade de Pretória, África do Sul). Por fim, amostras de *R. sanguineus* identificados por morfologia, provenientes da Itália, foram enviadas pela Dra. Giulia Maioli (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Itália).

Tabela 1 - Espécimes de carrapatos adultos identificados morfologicamente como *Rhipicephalus sanguineus*, coletados em diferentes localidades da América Latina e utilizados no presente estudo

Número do carrapato *	Localidade	País	Coordenadas geográficas		Hospedeiro	Letra da sequência 16S rDNA na Figura 2
			Latitude	Longitude		
1	Ilha de Pascoa	Chile	27°09'S	109°27'O	Cão	D
2	Santiago	Chile	33°24'S	70°40'O	Cão	D
3	Vinã del Mar	Chile	33°00'S	71°30'O	Cão	D
4	Rafaela, Santa Fé	Argentina	31°15'S	61°29'O	Cão	F
5	Montevideo	Uruguai	14°51'S	56°10'O	Cão	E
6	Santa Maria, RS	Brasil	29°40'S	53°48'O	Cão	E
7	Garopaba, SC	Brasil	28°01'S	48°36'O	Cão	B
8	Jaboticabal, SP	Brasil	21°15'S	48°17'O	Vida livre	B
9	Seropédica, RJ	Brasil	22°44'S	43°42'O	Cão	B
10	Uberlândia, MG	Brasil	19°00'S	48°20'O	Vida livre	A
11	Itabira, MG	Brasil	19°37'S	43°13'O	Cão	B
12	Nova Venécia, ES	Brasil	18°45'S	40°24'O	Cão	B
13	Cuiabá, MT	Brasil	15°35'S	56°05'O	Cão	A
14	Sinop, MT	Brasil	11°51'S	55°30'O	Cão	A
15	Guarantã do Norte, MT	Brasil	09°47'S	54°54'O	Cão	A
16	Recife, PE	Brasil	08°00'S	35°00'O	Cão	A
17	João Pessoa, PB	Brasil	07°10'S	34°52'O	Cão	B
18	Fortaleza, CE	Brasil	03°45'S	38°35'O	Cão	A
19	Cumbuco, CE	Brasil	03°35'S	38°45'O	Cão	A
20	Teresina, PI	Brasil	05°05'S	42°48'O	Raposa	B
21	Macapá, AP	Brasil	00°05'N	51°04'O	Cão	B
22	Porto Velho, RO	Brasil	08°46'S	63°54'O	Cão	B
23	El Vigia, Mérida	Venezuela		71°39'O	Cão	B
24	Arquipélago Los Roques	Venezuela	11°50'N	66°45'O	Cão	B
25	Los Córdoba, Córdoba	Colômbia	08°54'N	76°21'O	Cão	C
26	Cerete, Cordoba	Colômbia	08°49'N	75°46'O	Cão	C
27	Cidade do Panamá	Panamá	08°59'N	79°31'O	Cão	B
28	San José	Costa Rica	09°55'N	84°02'O	Cão	B
29	Linares, Novo Leon	México	24°51'N	99°33'O	Cão	B

*Este número representa a localidade de coleta do carrapato no mapa da figura 1.

3.2 PROCESSAMENTOS DOS CARRAPATOS

De cada localidade, pelo menos um exemplar adulto foi processado individualmente. Cada carrapato foi submetido à extração de DNA pelo método de isotiocianato de guanidina, conforme previamente descrito e realizado em nosso laboratório (SANGIONI et al., 2005). Uma vez extraído o DNA, cada carrapato foi submetido a um protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme descrito a seguir.

3.3 PCR PARA UM FRAGMENTO DO GENE MITOCONDRIAL RIBOSSÔMICO rDNA 16S

Para este PCR, foram utilizados os primers 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT-3' e 5'-GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTG T-3', que amplificam um fragmento de 460 nucleotídeos do gene 16S rRNA de praticamente todas as espécies de carrapatos (MANGOLD et al., 1998). O protocolo de PCR foi o mesmo descrito por Mangold et al. (1998).

3.4 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

As preparações de DNA (DNA amplificado por PCR) foram acrescidas de tampão de amostra e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE a 50 V/100 mA. Como marcadores de tamanhos moleculares foi utilizado Ladder 100 bp ou 1 Kb (MBI Fermentas). Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e fotografados em transiluminador de luz U.V.

3.5 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Todos os produtos de PCR obtidos, correspondendo ao tamanho esperado, foram submetidos a reações de sequenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer), de acordo com especificações do fabricante, em seqüenciador automático de DNA presente em nosso departamento, sob a responsabilidade do Prof. Leonardo Richtzenhain. Os fragmentos correspondentes ao gene 16S mitocondrial foram processados por seqüenciamento direto, após prévia purificação utilizando-se ExoSap (USB, EUA), conforme instruções do fabricante.

3.6 ANÁLISES FILOGENÉTICAS DAS SEQUENCIAS OBTIDAS

As análises filogenéticas das seqüências obtidas foram trabalhadas das seguintes maneiras:

3.6.1 Alinhamento de seqüências de nucleotídeos

As seqüências obtidas foram alinhadas entre si utilizando-se o programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997) alterando os parâmetros relativos à inserção de “indels” (peso de inserção=1, extensão=1) e manualmente ajustados no programa GeneDoc v. 2.6.01 (NICHOLAS et al., 1997). Em adição, a seqüência correspondente de *Rhipicephalus appendiculatus* (L34301) foi incluída como grupo externo (*outgroup*).

3.6.2 Análises filogenéticas

As árvores filogenéticas foram inferidas pelos métodos de máxima verosimilhança (MV), análise bayesiana (B) e máxima parcimônia (MP). As árvores de MP foram construídas utilizando o programa PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 1998) via busca heurística com 100 réplicas de adição aleatória dos terminais seguida de troca de ramos (“RAS-TBR Branch-breaking”). As análises de suporte por “bootstrap” foram feitas em 100 replicatas com os mesmos parâmetros empregados na busca.

As análises bayesianas foram executadas no programa MrBayes v.3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK 2003). Foram empregadas 500.000 gerações usando GTR como modelo de substituição e quatro categorias de gama mais proporção de sítios invariantes. Para a construção do dendrograma final foram utilizados apenas os diagramas obtidos nas últimas 75 réplicas. Para a verificação de suporte de ramos nas análises bayesianas foram utilizados os valores de probabilidade a posteriori obtidos com o programa MrBayes.

As análises de MV foram realizadas no programa RaxML v. 7.0.4 (STAMATAKIS, 2006). Foram empregadas 500 replicatas usando GTR como modelo de substituição e quatro categorias de gama e diagramas obtidos por parcimônia como árvores iniciais. Os parâmetros do modelo de substituição empregado foram estimados durante a busca. O suporte de ramos foi estimado com 500 replicatas de “bootstrap” no programa RaxML. As matrizes de similaridade (baseadas em distância p não corrigida) foram construídas utilizando o programa Point Replacer v. 2.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seqüências parciais de DNA do gene 16S rDNA foram obtidas para carrapatos das 29 localidades americanas descritas na tabela 1, além dos exemplares europeus e sul-africanos processados. As seqüências obtidas, após serem editadas, apresentaram 357 a 359 nucleotídeos. Todas as vezes que dois espécimes de carrapatos de uma mesma localidade foram processados, as seqüências obtidas foram idênticas para os dois espécimes.

Ao todo, foram obtidas cinco seqüências diferentes (haplótipos), que foram representadas pelas letras A, B, C, D, E, F (Tabela 1). O haplótipo mais freqüente foi o B, presente em 14 localidades em um total de 5 países. O menos freqüente foi o F, representado por uma única localidade na Argentina. As seqüências dos haplótipos A a F, assim como as seqüências de *R. sanguineus* e *R. turanicus* da Europa e África do Sul, foram depositadas no GenBank sob os números de acesso GU553074-GU553085.

O quadro 1 apresenta as diferenças brutas entre as seqüências de nucleotídeos obtidas no presente trabalho. As diferenças entre os haplótipos A a F variaram de 0,28 a 7,21%, sendo as diferenças entre A, B, e C de 0,33 a 0,75%, e entre D, E e F de 0,28 a 0,67%; por outro lado, as diferenças entre A-B-C e D-E foram de 5,90 a 7,28%. A seqüência de *R. sanguineus* da África do Sul foi apenas 0,0 a 0,42% diferente dos haplótipos A, B e C, e ao mesmo tempo, 6,13 a 6,80% diferente dos haplótipos D, E e F. Semelhantemente, a seqüência de *R. turanicus* da África do Sul foi apenas 1,16 a 1,81% diferente dos haplótipos A, B e C, e ao mesmo tempo, 5,01 a 6,13% diferente dos haplótipos D, E e F. Por outro lado, a seqüência de *R. sanguineus* da Espanha foi apenas 0,0 a 0,39% diferente dos haplótipos D, E e F, e ao mesmo tempo, 6,18 a 6,82% diferente dos haplótipos A, B e C. Já a seqüência de *R. sanguineus* da Itália foi 4,18 a 6,80% diferente dos haplótipos D, E e F, e ao mesmo tempo, 5,34 a 5,99% diferente dos haplótipos A, B e C. A seqüência de *R. turanicus* da Espanha foi 6,13 a 6,80% diferente dos haplótipos D, E e F, e ao mesmo tempo, 5,62 a 6,27% diferente dos haplótipos A, B e C. A diferença entre *R. turanicus* sul-africano do *R. sanguineus* sul-africano (5,57%) foi semelhante às diferenças do primeiro com *R. turanicus* espanhol (4,46%) e do segundo com as amostras de *R. sanguineus* européias (5,77-6,41%).

As análises filogenéticas baseadas no gene 16S rDNA mitocondrial realizadas por parcimônia, máxima verossimilhança e bayeseana geraram topologias congruentes e com altos valores de suporte de ramos. Tais topologias segregam as seqüências de carrapatos em dois distintos clados (figura 1). Um clado está composto por carrapatos sul-africanos (tanto *R. sanguineus* como *R. turanicus*), por amostras de *R. sanguineus* do México, Costa Rica, Panamá, Colômbia e Venezuela e por todas as amostras de *R. sanguineus* do Brasil (exceto a do estado do Rio Grande do Sul). O segundo clado está composto por carrapatos europeus (tanto *R. sanguineus* como *R. turanicus*), por amostras de *R. sanguineus* do Chile, Argentina, Uruguai e do estado do Rio Grande do Sul no Brasil (figura 2).

Sequências	A	B	C	D	E	F	R.s AF	R.s IT	R.s ES	R.t AF	R.t ES
A	-										
B	0.75	-									
C	0.33	0.42	-								
D	5.90	6.55	6.13	-							
E	6.50	7.21	6.80	0.67	-						
F	6.18	6.82	6.41	0.28	0.39	-					
R.s AF	0.33	0.42	0.00	6.13	6.80	6.41	-				
R.s IT	5.34	5.99	5.57	4.68	6.80	6.41	5.77	-			
R.s ES	6.18	6.82	6.41	0.28	0.39	0.00	6.41	5.01	-		
R.t AF	1.16	1.81	1.39	6.13	5.40	5.01	5.57	4.18	6.41	-	
R.t ES	5.62	6.27	5.85	6.13	6.80	6.41	4.46	0.84	0.56	4.46	-

Quadro 1 - Matriz de divergência bruta (%) entre sequências de DNA de um fragmento do gene 16S rRNA de carrapatos morfológicamente identificados como *Rhipicephalus sanguineus* da América Latina (sequências de A a F; vide Tabela 1), *R. sanguineus* da África do Sul (R.s AF), *R. sanguineus* da Itália (R.s IT), *R. sanguineus* da Espanha (R.s ES), *Rhipicephalus turanicus* da África do Sul (R.t AF) e *Rhipicephalus turanicus* da Espanha (R.t ES)

Figura 1 – Árvore filogenética construída por Máxima Verossimilhança, baseada em seqüências de 16S rDNA mitocondrial (359 caracteres) de carrapatos de 29 localidades discriminados na Tabela 1 (vide última coluna da Tabela 1). Seqüência de *R. appendiculatus* obtida no GenBanK foi utilizada como grupo externo. As letras de A a F representam os diferentes haplótipos. Os números correspondem aos valores de suporte de “bootstrap” em 100 replicatas, suporte de 500 replicatas do programa RAxML e probabilidade a posteriori obtida pelo MrBayes, respectivamente

Figura 2 - Localidades onde amostras de carrapatos identificados morfologicamente como *Rhipicephalus sanguineus* foram coletados no continente americano para o presente estudo. Os números correspondem às localidades descritas a partir da primeira coluna na tabela 1. As letras coloridas (A – F) representam as sequências de DNA na figura 1 (vide ultima coluna da tabela 1)

As grandes diferenças genéticas (>5% diferença bruta para o gene 16S rRNA) encontradas no presente trabalho, assim como o padrão encontrado pelas análises filogenéticas, indicam que pelo menos duas espécies de carrapatos estão sendo representadas pelo táxon *R. sanguineus* no continente americano.

Uma espécie de carrapato está distribuída em regiões mais quentes, englobando o México, América central e grande parte da América do Sul, exceto as regiões mais ao sul. Para efeito de discussão, designamos esta espécie como “espécie tropical”.

A segunda espécie de carrapato está distribuída em regiões mais temperadas, englobando o Chile, Argentina, Uruguai e o Estado do Rio Grande do Sul no Brasil. Para efeito de discussão, designamos esta espécie como “espécie temperada”.

As análises filogenéticas indicam que a “espécie tropical” pertence à mesma espécie de *R. sanguineus* sul-africano e que a “espécie temperada” pertence à mesma espécie de *R. sanguineus* espanhol.

Esses resultados são corroborados por estudos prévios com os genes mitocondriais 12S e 16S rDNA, que indicaram que os carrapatos *R. sanguineus* da Argentina foram geneticamente mais próximos de *R. sanguineus* europeu, ao passo que os carrapatos *R. sanguineus* de diferentes regiões do Brasil (não analisou amostras do Rio Grande do Sul) foram mais próximas de *R. sanguineus* e *R. turanicus* africanos (SZABO et al., 2005; BURLINI et al., 2009).

Nossos resultados também levantam a possibilidade de que o carrapato *R. turanicus* sul-africano seja da mesma espécie do carrapato *R. sanguineus* sul-africano, e que o *R. turanicus* europeu seja da mesma espécie do *R. sanguineus* europeu, embora tal afirmação precise ser confirmada em futuros estudos morfológicos, moleculares e biológicos.

Os resultados indicam que o ambiente influenciou na adaptação dos carrapatos chamados de *R. sanguineus* das Américas, já que um clado de sequências foi composto por amostras de países considerados de temperaturas altas (espécie tropical), ao passo que um outro clado foi composto por amostras de países que apresentam temperaturas mais baixas (espécie temperada).

O gênero *Rhipicephalus* é originário do Velho Mundo, sem nenhum representante nativo das Américas (NAVA et al., 2009).

Desta forma, as espécies tropicais e temperadas foram introduzidas no Novo Mundo pelo homem, possivelmente durante a colonização européia.

Os resultados obtidos até o presente permitem inferir que a espécie tropical é proveniente da África sub-Saara, ao passo que a espécie temperada é proveniente da Europa ou região mediterrânea.

Por outro lado, é bem provável que tenha havido várias introduções sem sucesso da espécie tropical nas zonas mais frias da América do Sul (Chile, Argentina, Uruguai), assim como introduções sem sucesso da espécie temperada nas zonas mais quentes da América Latina.

Tal insucesso foi possivelmente resultante da incapacidade desses carrapatos de colonizarem tais zonas com características climáticas distintas, que vem ao longo das décadas, limitando a espécie temperada para o sul da América do Sul e a espécie tropical para o resto da América Latina.

De qualquer forma, novos estudos englobando amostras de uma maior variedade de localidades latino-americanas, incluindo altitudes variadas, devem ser realizados para um melhor entendimento da distribuição do táxon *R. sanguineus* no Novo Mundo.

Embora nossos resultados demonstrem a existência de duas espécies de carrapatos sob o taxon *R. sanguineus* nas Américas, não é possível neste momento definir a espécie que esses taxa representam, uma vez que nem mesmo no Velho Mundo os status taxonômicos de *R. sanguineus* e *R. turanicus* estão definidos (NAVA et al., 2009).

Por exemplo, nossos resultados indicam que o que se chama de *R. sanguineus* e *R. turanicus* na África do Sul é geneticamente distinto do que se chama de *R. sanguineus* e *R. turanicus*, respectivamente, na Europa.

Assim, somente estudos futuros com espécies tipos e/ou com novas amostras coletadas em localidades tipos poderão definir o que realmente representa o táxon *R. sanguineus* e espécies afins, dentro do complexo *sanguineus*.

A partir daí, inferências poderão ser feitas sobre a distribuição deste complexo no resto do mundo, principalmente através de análises moleculares. Enquanto isso, tudo que pode ser definido no Novo Mundo é que existem pelos menos duas espécies do complexo *saguineus*, uma tropical e outra temperada.

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que há no mínimo dois grupos distintos de carrapatos sob o taxon *R. sanguineus* na América Latina, um se aproximando com carrapatos de origem africana e com distribuição na América tropical e subtropical, e outro se aproximando com amostras europeia com distribuição temperada ao sul da América do Sul.

REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, H. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, p. 759-843, 1936.
- ARAGÃO, H. B. Notas sobre ixódidas brasileiros. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 145-195, 1911.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. 223p.
- BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribucion de las rickettsias en Mexico. **Revista do Instituto Salud y Enfermedades Troops**, v. 8, p. 3-14, 1947.
- CORRÊA, O. Carrapatos determinados no Rio Grande do Sul. Biologia, patologia e controle. **Arquivos do Instituto Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v. 1, p. 35-50, 1955.
- COUTINHO, M. T.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149-155, 2005.
- CRUICKSHANK, R. H. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. **Systematic & Applied Acarology**, v. 7, p. 3-14, 2002.
- DANTAS-TORRES, F.; FIGUEIREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the Brown dog tick, parasitizing humans in Brazil **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.1, p. 64-67, 2006.
- DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 14, p. 30-49, 2009.

ESTRADA-PENÑA, A.; BOUATTOUT, A.; CAMICAS, J. L.; WALKER, A. R. **Ticks of domestic animals in the mediterranean region: a guide to identification of species.** London UK: Bioscience Reports, 2004. 131p.

GODDARD, J. Focus of human parasitism by the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 26, p. 628-629, 1989.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PENA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. **Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical zoogeographical region.** Houten, Holanda: ICTTD-2, 2003. 173 p.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitas de importância veterinária.** São Paulo: Editora Plêiade/FAPESP, 2001. 218 p.

INOKUMA, H.; TAMURA, K.; ONISHI, T. Dogs develop resistance to *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 68, p. 295-297, 1997.

IOFFE-USPENSKY, I.; MUMCUOGLU, K. Y.; USPENSKY, I.; GALUN, R. *Rhipicephalus sanguineus* and *R. turanicus* (Acari:Ixodidae): closely related species with different biological characteristics. **Journal of Medical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 74-81, 1997.

JITTAPALAPONG, S.; STICH, R. W.; GORDON, J. C.; WITTUM, T. E.; BARRIGA, O. O. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunization with tick salivary gland or midgut tissues. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 4, p. 601–611, 2000.

LABRUNA, M. B. Bioecologia de *Rhipicephalus sanguineus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 123-124, 2004. Supplement.

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; TERRASINI, F. A.; FERREIRA, F.; SCHUMAKER, T. T.; CAMARGO, E. P. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondonia, western Amazon, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 10, p. 17-32, 2005.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapato em cães no Brasil. **Revista Clínica Veterinária**, v. 6, p. 24-32, 2001.

LEONARD, J. A.; WAYNE, R. K.; WHEELER, J.; VALADEZ, R.; GUILLEN, S.; VILA, C. Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. **Science**, v. 298, p. 1613-1616, 2002.

LOULY, C. C. B.; FONSECA, I. N.; OLIVEIRA, V.F.; BORGES, L. M. F. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no Município de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2006.

MANGOLD A. J.; BARGUES M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 84, n. 6, p. 478-484, 1998.

MARIOTTE, C. O.; BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Hallazgo del *Rhipicephalus sanguineus* Latreille infectado naturalmente com fiebre manchada de las montañas rocosas, en Sonora (Mexico). **Revista do Instituto Salud y Enfermedades Tropicales**, v. 5, p. 297-300, 1944.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; GUTMANN, T. B.; BARBOSA, S. O.; GONZÁLES, M. A. R. M.; MURARO, M. A.; CECÍLIO, S. R. M.; LABRUNA, M. B. New Epidemiological Data on Brazilian Spotted Fever in an Endemic Area of the State of São Paulo, Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, p. 73-78, 2009.

NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. An overview of systematics and evolution of ticks. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 2857-2877, 2009

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS JR., H. B. **GeneDoc**: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Pittsburgh: Pittsburgh Supercomputing Center, 1997. 1 CD-ROM.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTTZEINHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Brazilian spotted fever: serosurvey of domestic animals, evaluation of *Rickettsia*-infected ticks, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. In: MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR RICKETTSIOLOGY, 23., 2009, Hilton Head Island. [**Proceedings...**], 2009. v. 1. p. 25-25.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 719-756, 2005.

PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; XIONG, Q.; RIKIHISA, Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **The New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 110-117, 2006.

RIBEIRO, V. L. S.; WEBER, M. A.; FETZER, L. O.; VARGAS, C. R. B. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 27, p. 285-289, 1997.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian Spotted Fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 265-270, 2005.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2688-2690, 2006.

SWOFFORD, D. L. **PAUP***: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Versão 4.0 beta. Sunderland MA: Sinauer Associates. University State Florida, 2002. 1 CD-ROM.

SZABO, M. P.; MANGOLD, A. J.; JOAO, C. F.; BECHARA, G. H.; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 131-140, 2005.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2788-2793, 2001.

WALKER, A. R.; BOUATTOR, A.; CAMICAS, J. L.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, L. G.; LAFIT, A. A.; PEGRAM, R. G.; PRESTON, P. M. **Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species**. Edinburgh: Bioscience Reports, 2003.

WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. **The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000, 643 p.