
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**COMPARAÇÃO BIOLÓGICA, MORFOLÓGICA E
MOLECULAR ENTRE CARRAPATOS DO
COMPLEXO *Rhipicephalus sanguineus*
(ACARI: IXODIDAE).**

GUSTAVO SERON SANCHES

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro - SP.
Setembro – 2013.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**COMPARAÇÃO BIOLÓGICA, MORFOLÓGICA E
MOLECULAR ENTRE CARRAPATOS DO
COMPLEXO *Rhipicephalus sanguineus*
(ACARI: IXODIDAE).**

GUSTAVO SERON SANCHES

Orientadora: Profa. Dra. MARIA IZABEL CAMARGO MATHIAS

Co-Orientador: Prof. Dr. GERVÁSIO HENRIQUE BECHARA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro - SP.
Setembro – 2013.

595.42 Sanches, Gustavo Seron
S211c Comparação biológica, morfológica e molecular entre
carrapatos do complexo *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:
Ixodidae). / Gustavo Seron Sanches. - Rio Claro, 2013
120 f. : il., figs., tabs., quadros

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Izabel Camargo Mathias
Coorientador: Gervásio Henrique Bechara

1. Ácaro. 2. Turanicus. 3. Morfologia. 4. Biologia. 5.
Análise molecular. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO: Comparação biológica, morfológica e molecular entre diferentes populações geográficas de *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) e *Rhipicephalus turanicus* POMERANTSEV, 1936 (ACARI: IXODIDAE) DA ESPANHA


AUTOR: GUSTAVO SERON SANCHES


ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO


CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. GERVASIO HENRIQUE BECHARA


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO
Departamento de Biologia / Instituto de Biotecnologia de Rio Claro


Prof. Dr. MARCELO BAHIA LABRUNA
Departamento de Medicina Veterinária preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo


Profa. Dra. DARCI MORAES BARROS-BATTESTI
Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo


Prof. Dr. FILIPE DANTAS TORRES
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Depto de Imunologia, Fiocruz, Recife/PE


Prof. Dr. MARÇOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 12 de setembro de 2013.

*Dedico este trabalho a todos os **animais**
de laboratório que involuntariamente doam suas
vidas para o avanço da ciência.*

Agradecimentos

Aos meus pais, que me ensinaram a valorizar a educação como meio de alcançar um futuro digno e próspero.

*À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Isabel Camargo-Mathias**, pela confiança em mim depositada e por seu exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa.*

*Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara**, pela atenção e gentileza com as quais sempre me atendeu em seu laboratório; pelas idéias, ensinamentos e correções e por me acompanhar em mais esta etapa.*

*Aos **companheiros de pesquisa do Departamento de Biologia**, pela amizade e pela ajuda em todos os momentos.*

*A todos os **funcionários do Departamento de Biologia**, em especial ao Gerson, Mônica, Antônio e Pablo, que participaram diretamente deste trabalho.*

*Aos funcionários do **Departamento de Patologia Veterinária da UNESP de Jaboticabal** e à Claudinha do **Departamento de Microscopia Eletrônica** pela ajuda e disposição.*

*À **FAPESP**, pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desta tese e também pela oportunidade de realização de estágio de pesquisa no exterior, contribuindo tanto no crescimento profissional como pessoal.*

*A todos os **funcionários do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária – INTA (Rafaela- Argentina)**, por terem me recebido da melhor maneira possível.*

Ao Dr. Atílio José Mangold, INTA, Argentina, por ter aceitado me orientar durante o estágio de pesquisa no exterior, pelos ensinamentos sobre biologia molecular e pelo companheirismo.

Ao Dr. Santiago Nava, INTA, Argentina, pelas discussões científicas, ensinamentos e pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa.

Ao Dr. Alberto Guglielmone, INTA, Argentina, pelos ensinamentos e pelos momentos de conversa proporcionados durante os horários de almoço.

Aos Membros da Banca Examinadora, pela disponibilidade para analisar este trabalho, enriquecendo-o com suas críticas e sugestões.

A todos que em algum momento estiveram presentes em minha vida e que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

“O que antes parecia impossível torna-se possível quando alguém se sente apto a transpor todos os obstáculos, conhecendo a sua verdadeira grandeza interior.” (Nuno Cobra)

RESUMO

O presente estudo apresenta a comparação biológica, morfológica e molecular do estágio adulto de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* de diferentes regiões geográficas: Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e também do *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza). Além disso, para o *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foram realizadas comparações biológicas dos estágios imaturos, assim como o cruzamento entre estas espécies. O estágio larval de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) apresentou menor peso após o ingurgitamento em coelhos, quando comparado com o estágio larval de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal). Entretanto, *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) apresentou ninfas e adultos maiores devido a uma maior taxa de crescimento, facilitada pela maior ingestão de sangue destes estágios em relação ao *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal). Os cruzamentos entre *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) não foram bem sucedidos, uma vez que as fêmeas cruzadas transpecificamente produziram uma pequena quantidade de ovos, que eram inférteis, indicando uma separação entre estas duas espécies. A comparação dos parâmetros biológicos para os estágios adultos das diferentes populações mostraram diferenças, principalmente no peso da fêmea ingurgitada e no período de ingurgitamento, refletindo também nos parâmetros morfométricos destas espécies. A análise morfométrica sugere maior semelhança entre *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) com o *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), mostrando também variações de tamanho em relação às populações de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal) e Tailândia (Bangkok). Morfológicamente, algumas diferenças são observadas, principalmente em relação ao formato do idiossoma, formato da base do capítulo e ângulos póstero-laterais, abertura genital das fêmeas e placas espiraculares dos machos, sugerindo a ocorrência de polimorfismos para diferentes populações de *R. sanguineus*. Finalmente, a comparação molecular realizada utilizando-se o rDNA mitocondrial 12S e 16S mostrou dois grupos bastante sólidos, um formado por *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), Cuba (Havana), Tailândia (Bangkok), Colômbia (Villavicêncio e Libertad), regiões tropicais da Argentina, Peru, Paraguai, México, Guatemala, ilha de Saint Kitts, Taiwan, China, África do Sul e

Moçambique, e o outro, formado por *R. sanguineus* da Europa, regiões temperadas da Argentina, Uruguai, Israel e algumas regiões dos Estados Unidos, incluindo também neste grupo a espécie identificada como *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza). Estes resultados demonstram que as diferenças observadas entre as diversas populações de *R. sanguineus* e *R. turanicus* são maiores que previamente reportadas e que a situação biossistemática do *R. sanguineus* de regiões tropicais e temperadas deveria ser reavaliada. Tais variações podem contribuir para as diferenças relatadas quanto à biologia e competência vetorial destas espécies para patógenos de importância médica e veterinária.

ABSTRACT

The present study compares biological, morphological and molecular aspects of the adult stage of *Rhipicephalus sanguineus* ticks from different geographical regions of the world, such as Cuba (Havana), Brazil (Jaboticabal), Thailand (Bangkok), Argentina (Rafaela), and *R. turanicus* from Spain (Zaragoza). Furthermore, for *R. sanguineus* from Brazil (Jaboticabal) and *R. turanicus* from Spain (Zaragoza) the biological comparison were made for the immature stages, as well as the crossbreeding between these tick species. The larval stage of *R. turanicus* from Spain (Zaragoza) showed lower weight after feeding on rabbits when compared with *R. sanguineus* from Brazil (Jaboticabal). However, *R. turanicus* from Spain (Zaragoza) showed larger nymphs and adults due to a higher rate of growth, facilitated by greater intake of blood of these stages in relation to the *R. sanguineus* from Brazil (Jaboticabal). The crossbreeding between *R. sanguineus* from Brazil (Jaboticabal) and *R. turanicus* from Spain (Zaragoza) was not successful since the females crossed transpecifically produced a small amount of infertile eggs, indicating a separation between these two species. The comparison of biological parameters for the adult stage of the different populations showed differences, mainly in the weight of engorged females and in the engorgement period, also reflecting on the morphometric parameters of these species. The morphometric analysis suggests major similarity between *R. sanguineus* from Argentina (Rafaela) with *R. turanicus* from Spain (Zaragoza), also showing variations of size relative to populations of *R. sanguineus* from Cuba (Havana), Brazil (Jaboticabal) and Thailand (Bangkok). Morphologically, some differences were observed, especially in relation to the idiosoma shape, basis capituli shape and posterolateral angles, females' genital aperture and males' spiracular plates, suggesting the occurrence of polymorphisms in different populations of *R. sanguineus*. The molecular comparisons performed using the mitochondrial 12S and 16S rDNA showed two very strong groups, one formed by *R. sanguineus* from Brazil (Jaboticabal), Cuba (Havana), Colombia (Villavicencio and Libertad), Thailand (Bangkok), tropical regions of Argentina, Peru, Paraguay, Mexico, Guatemala, Saint Kitts island, Taiwan, China, South Africa and Mozambique, and the other formed by *R. sanguineus* from Europe, temperate regions of Argentina, Uruguay, Israel and some United States regions, also including in this group the species identified as *R. turanicus* from Spain (Zaragoza). Results

showed that differences between these strains are greater than previously assumed and that the biosystematics status of *R. sanguineus* ticks from world tropical and temperate regions should be re-evaluated. Wide variations such as these might account for the reported worldwide differences in biology and vector competence of these species for pathogens of medical and veterinary importance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1. Distribuição geográfica de <i>R. sanguineus</i>	19
Figura 2. Distribuição geográfica de <i>R. turanicus</i>	23
Figura 3. Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de larvas de <i>R. sanguineus</i> do Brasil (Jaboticabal) e de <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	50
Figura 4. Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de ninfas de <i>R. sanguineus</i> do Brasil (Jaboticabal) e de <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	51
Figura 5. Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> do Brasil (Jaboticabal) e de <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	52
Figura 6. Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> do Brasil (Jaboticabal) alimentadas em coelhos e em cães domésticos	55
Figura 7. Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de fêmeas de <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza) alimentadas em coelhos e em cães domésticos	58
Figura 8. Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> do Brasil (Jaboticabal), Cuba (Havana), Argentina (Rafaela), Tailândia (Bangkok) e <i>R. turanicus</i> da Espanha alimentadas em coelhos	66
Figura 9a. Comparação morfométrica de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	72
Figura 9b. Comparação morfométrica de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	73

Figura 10a.	Comparação morfométrica de machos de <i>R. sanguineus</i> de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	79
Figura 10b.	Comparação morfométrica de machos de <i>R. sanguineus</i> de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	80
Figura 11.	Gnatossoma dorsal de fêmeas e machos de <i>R. sanguineus</i> de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	83
Figura 12.	Gnatossoma ventral de fêmeas e machos de <i>R. sanguineus</i> de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	84
Figura 13.	Idiossoma dorsal de fêmeas e machos de <i>R. sanguineus</i> de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	85
Figura 14.	Idiossoma ventral de fêmeas e machos de <i>R. sanguineus</i> de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	86
Figura 15.	Placas adanais de machos, placas espiraculares de machos, placas espiraculares de fêmeas e abertura genital de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	87
Figura 16.	Análise das sequências de fragmentos do gene 16S rDNA de <i>R. sanguineus</i> das Américas	90
Figura 17.	Árvore filogenética baseada em um fragmento de 460 pares de bases do gene 16S rDNA de <i>R. sanguineus</i> e <i>R. turanicus</i> obtida com o método de Agrupamento de Vizinhos	91
Figura 18.	Árvore filogenética baseada em um fragmento de 460 pares de bases do gene 16S rDNA de <i>R. sanguineus</i> e <i>R. turanicus</i> obtida com o método de Máxima Verossimilhança	92

Figura 19.	Árvore filogenética baseada em um fragmento de 460 pares de bases do gene 16S rDNA de <i>R. sanguineus</i> e <i>R. turanicus</i> obtida com o método de Máxima Parcimônia	93
Figura 20.	Análise das sequências de fragmentos do gene 12S rDNA de <i>R. sanguineus</i> das Américas	96
Figura 21.	Árvore filogenética baseada em um fragmento de 460 pares de bases do gene 12S rDNA de <i>R. sanguineus</i> e <i>R. turanicus</i> obtida com o método de Agrupamento de Vizinhos	97
Figura 22.	Árvore filogenética baseada em um fragmento de 460 pares de bases do gene 12S rDNA de <i>R. sanguineus</i> e <i>R. turanicus</i> obtida com o método de Máxima Verossimilhança	98
Figura 23.	Árvore filogenética baseada em um fragmento de 460 pares de bases do gene 12S rDNA de <i>R. sanguineus</i> e <i>R. turanicus</i> obtida com o método de Máxima Parcimônia	99

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1. Reagentes, concentrações e volumes utilizados para a realização das reações de polimerização em cadeia	42

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Parâmetros biológicos de larvas de <i>R. sanguineus</i> do Brasil (Jaboticabal) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	47
Tabela 2. Parâmetros biológicos de ninfas de <i>R. sanguineus</i> do Brasil (Jaboticabal) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	48
Tabela 3. Parâmetros biológicos de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> do Brasil (Jaboticabal) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	49
Tabela 4. Parâmetros biológicos de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> do Brasil (Jaboticabal) alimentadas em coelhos e cães domésticos	54
Tabela 5. Parâmetros biológicos de fêmeas de <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza) alimentadas em coelhos e cães domésticos	57
Tabela 6. Parâmetros biológicos de fêmeas virgens de <i>R. sanguineus</i> do Brasil (Jaboticabal) e de fêmeas cruzadas conspecificamente e transpecificamente, alimentadas em coelhos	60
Tabela 7. Parâmetros biológicos de fêmeas virgens de <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza) e de fêmeas cruzadas conspecificamente e transpecificamente, alimentadas em coelhos	62
Tabela 8. Parâmetros biológicos de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	65
Tabela 9. Comparação morfométrica entre fêmeas de <i>R. sanguineus</i> de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	71
Tabela 10. Comparação morfométrica entre machos de <i>R. sanguineus</i> de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	78
Tabela 11. Espécies e isolados geográficos utilizados nas análises filogenéticas baseadas em fragmentos do gene 16S rDNA, localidade e código de acesso no Genbank	88
Tabela 12. Espécies e isolados geográficos utilizados nas análises filogenéticas baseadas em fragmentos do gene 12S rDNA, localidade e código de acesso no Genbank	94

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1 O grupo complexo <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	18
1.1.1 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	19
1.1.2 <i>Rhipicephalus turanicus</i>	22
1.2 Identificação morfológica de <i>R. sanguineus</i> e <i>R. turanicus</i>	24
1.2.1 Características morfológicas de <i>R. sanguineus</i>	25
1.2.2 Características morfológicas de <i>R. turanicus</i>	26
1.3 Importância econômica e sanitária	27
1.3.1 Agentes transmitidos por <i>R. sanguineus</i> e <i>R. turanicus</i>	27
1.3.2 Métodos de controle de carrapatos	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Carrapatos	33
3.2 Hospedeiros	34
3.3 Parâmetros biológicos dos carrapatos em condições laboratoriais	35
3.4 Cruzamentos de <i>R. sanguineus</i> do Brasil (Jaboticabal) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	36
3.5 Comparações morfométricas	38
3.6 Análise estatística	39
3.7 Ultramorfologia externa	39
3.8 Comparação de fragmentos do rDNA mitocondrial	40
3.8.1 Extração do DNA	40
3.8.2 Reações de amplificação	42
3.8.3 Visualização do DNA amplificado	43
3.8.4 Purificação do DNA amplificado	44
3.8.5 Sequenciamento	44
3.8.6 Forma de análise dos resultados	45
4 RESULTADOS	46
4.1 Comparações de parâmetros biológicos	46

4.1.1	Comparação dos parâmetros biológicos de <i>R. sanguineus</i> do Brasil (Jaboticabal) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza) em coelhos	46
4.1.2	Comparação da performance alimentar e reprodutiva de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> do Brasil (Jaboticabal) em coelhos e em cães domésticos	53
4.1.3	Comparação da performance alimentar e reprodutiva de fêmeas de <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza) em coelhos e em cães domésticos	56
4.1.4	Cruzamento entre <i>R. sanguineus</i> do Brasil (Jaboticabal) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza)	59
4.1.5	Comparação dos parâmetros biológicos de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza) alimentadas em coelhos	63
4.2	Comparações morfométricas	67
4.2.1	Comparações morfométricas entre fêmeas de <i>R. sanguineus</i> de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza) Comparações morfométricas entre fêmeas de <i>R. sanguineus</i> do Brasil, Argentina, Cuba e Tailândia e <i>R. turanicus</i> da Espanha	67
4.2.2	Comparações morfométricas entre machos de <i>R. sanguineus</i> de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e <i>R. turanicus</i> da Espanha (Zaragoza) Comparações morfométricas entre fêmeas de <i>R. sanguineus</i> do Brasil, Argentina, Cuba e Tailândia e <i>R. turanicus</i> da Espanha	74
4.3	Comparações morfológicas	81
4.4	Comparações moleculares	88
4.4.1	Análise das sequências de fragmentos do gene 16S rDNA	88
4.4.2	Análise das sequências de fragmentos do gene 12S rDNA	94
5	DISCUSSÃO GERAL	100
6	CONCLUSÕES	109
7	REFERÊNCIAS	111

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O grupo complexo *Rhipicephalus sanguineus*

Carrapatos são ectoparasitos hematófagos obrigatórios pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acari e ordem Ixodida, esta última compreendendo três famílias: Argasidae, Nuttalliellidae e Ixodidae (KRANTZ e WALTER, 2009).

Pertencente à família Ixodidae, o gênero *Rhipicephalus* Koch, 1844, compreende 84 espécies reconhecidas mundialmente, incluindo as cinco espécies previamente incluídas no subgênero *Boophilus* (APANASLEVICH et al., 2013; GUGLIELMONE et al., 2010; HORAK et al., 2013) .

Dentro do gênero *Rhipicephalus* encontra-se o grupo complexo *Rhipicephalus sanguineus*, constituído de 17 espécies que se apresentam morfológicamente semelhantes e cuja posição taxonômica para algumas é ainda incerta, a saber: *R. sanguineus* sensu lato; *R. turanicus* Pomerantsev, 1936; *R. rossicus* Yakimov and Kol-Yakimova, 1911; *R. pumilio* Schulze, 1935; *R. leporis* Pomerantsev, 1946; *R. schulzei* Olenov, 1929; *R. pusillus* Gil Collado, 1936; *R. sulcatus* Neumann, 1908; *R. guilhoni* Morel e Vassiliades,

1936; *R. moucheti* Morel, 1965; *R. bergeoni* Morel e Balis, 1976; *R. camicasi*, *R. ramachandrai* Dhanda, 1966; *R. tetracornus* Kitaoka and Suzuki, 1983; *R. ziemanni* Neumann, 1904; *R. aurantiacus* Neumann, 1907 e *R. boueti* Morel, 1957 (CAMICAS et al. 1998).

1.1.1 *Rhipicephalus sanguineus*

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto (s. s.), Latreille, 1806, conhecida popularmente como “carrapato vermelho do cão” é ectoparasita habitual de cães domésticos, podendo ainda ser encontrada parasitando diversos animais silvestres e domésticos, incluindo humanos (DANTAS-TORRES et al., 2006; GUGLIELMONE et al., 2003; SZABÓ et al., 2008). Está amplamente distribuída pelo mundo, principalmente entre as latitudes 35°S e 50°N (**figura 1**), com relatos na América, Europa, África, Ásia e Austrália (PEGRAM et al., 1987; WALKER et al., 2000).

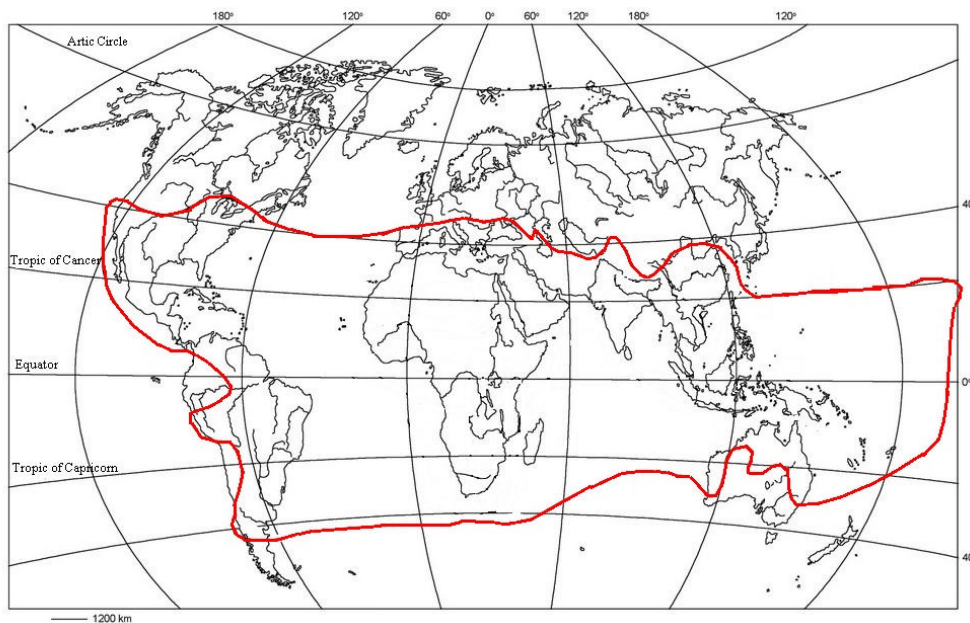


Figura 1. Distribuição geográfica de *R. sanguineus*, adaptada de Kolonin (2009).

Historicamente, a espécie *R. sanguineus* s. s., originalmente nomeada como *Ixodes sanguineus* por Latreille (1806), é uma das mais controversas, visto que o espécime tipo foi perdido. Ademais, não há uma definição de base morfológica para a espécie, e tampouco registro de hospedeiro; acredita-se ainda, que a localidade tipo seja a Gallia, atual território francês. De fato, a espécie *R. sanguineus* s. s., conforme descrição original, englobaria carrapatos vermelho-sangue, posteriormente pontuados, e possuem três linhas impressas e nenhuma região torácica distinta antero-dorsalmente (WALKER et al., 2000).

Após a descrição de Latreille várias espécies foram descritas e posteriormente a maioria delas foi considerada sinônima de *R. sanguineus* s. s. (PEGRAM et al., 1987).

A origem de *R. sanguineus* s. s. também é duvidosa. Hoogstraal (1956) considerou que é uma espécie típica da África, enquanto Feldman-Muhsam (1967), Morel e Vassiliades (1963) e Pomerantsev et al. (1940) consideraram uma espécie do Mediterrâneo.

Segundo Hoogstraal (1956), o gênero *Rhipicephalus* é um grupo bem estabelecido e que tem como centro de dispersão a África, presumindo, dessa forma, que o *R. sanguineus* também seria um carrapato africano, tendo predileção por cães domésticos e, possivelmente, por aves que facilitaram sua dispersão pelo mundo.

Pegram et al. (1987), em contrapartida, identificaram como *R. turanicus* todos os carrapatos anteriormente identificados como *R. sanguineus* coletados em aves.

Osman (1978) listou *R. sanguineus* em ovinos e caprinos, tendo sido mais tarde observado que muito desse material era na verdade compatível com *R. camicasi*.

Esses exemplos mostram a confusão taxonômica que prevalece acerca de *R. sanguineus*. Muito dessa confusão está na dificuldade de distinguir espécies como *R. camicasi*, *R. sanguineus* e *R. turanicus*, principalmente pela similaridade morfológica dos adultos e pela falta do espécime tipo de *R. sanguineus* s. s. (PEGRAM et al., 1987).

Acredita-se que o *R. sanguineus* tenha sido introduzido na América do Sul por diferentes rotas envolvidas na colonização, sendo reconhecido no Brasil no início do século XX por Rohr (1909), na Argentina em 1938 (ROVEDA, 1954) e no Chile em 1974 (TAGLE, 1976).

Até o início do século XXI apenas a espécie *R. sanguineus* s. s. era reconhecida na região Neotropical, no entanto vários estudos vêm demonstrando que o táxon inicialmente definido como *R. sanguineus* s. s. é formado por pelo menos duas linhagens diferentes nesta região biogeográfica (MORAES-FILHO et al., 2011; NAVA et al., 2012; SZABÓ et al., 2005).

Estudos comparativos sobre a biologia de populações de carrapatos *R. sanguineus* do Brasil, cepa Jaboticabal, e da Argentina, cepa Rafaela, mostraram que tais populações apresentam diferenças em seus parâmetros alimentares e reprodutivos quando alimentadas em cães domésticos. De fato, fêmeas ingurgitadas da cepa Argentina eram 50% mais pesadas que as brasileiras, apresentando períodos de ingurgitamento mais longos, e baixa taxa de conversão alimentar em massa de ovos, associada à dificuldade de se fixarem no hospedeiro. Além disso, os cruzamentos entre *R. sanguineus* da Argentina e do Brasil originaram híbridos adultos inférteis (SZABÓ et al., 2005).

A análise de DNA mitocondrial dessas mesmas populações revelou uma estreita relação filogenética do *R. sanguineus* da Argentina com o *R. sanguineus* e *R. turanicus* da França e, do *R. sanguineus* do Brasil com o *R. turanicus* da África do Sul (SZABÓ et al., 2005). Segundo os mesmos autores, diferenças na colonização do Brasil e da Argentina podem ter facilitado a introdução de populações de *R. sanguineus* de origens diversas. Alternativamente, as condições climáticas de cada país podem ter favorecido a sobrevivência de carrapatos de diferentes origens geográficas.

Simultaneamente, um estudo comparativo da morfologia destas duas populações de carrapatos mostrou diferenças no tamanho do idiossoma, formato do poro genital e morfologia das estruturas sensoriais (OLIVEIRA et al., 2005).

Burlini et al. (2009) mostraram que as divergências genéticas de *R. sanguineus* de diferentes estados do Brasil não caracterizavam espécies

diferentes, indicando apenas variações intra-específicas. Dessa forma, a população de carrapatos estudada era até então relatada como linhagem brasileira.

Posteriormente, Moraes-Filho et al. (2011), analisando sequências de 16S rDNA de *R. sanguineus* de diversas localidades, propuseram a formação de dois grupos, um formado por espécimes tropicais e subtropicais e outro por espécimes de regiões temperadas. Dessa forma, as duas linhagens são encontradas no Brasil, sendo a temperada restrita ao Sul do país.

Nava et al. (2012) analisando sequências dos genes 12S rDNA e 16S rDNA de *R. sanguineus* de diferentes regiões geográficas da Argentina e países do Cone Sul da América do Sul também observaram a existência destas mesmas duas linhagens.

Em outras áreas de distribuição mundial, a ocorrência de *R. sanguineus* é compartilhada com espécies próximas entre si, tais como *R. turanicus* e *R. camicasi* (GUGLIELMONE et al., 2006).

1.1.2 *Rhipicephalus turanicus*

O nome *R. turanicus* provavelmente faz alusão a Turan, que em persa significa Turquistão (WALKER et al., 2000). Morel e Vassiliades (1963) consideram *R. turanicus* uma espécie Paleártica distribuída principalmente no Mediterrâneo. Na África *R. turanicus* está presente desde altitudes próximas ao nível do mar até mais de 2000 m e em regiões cujas precipitações anuais variam de 100 a 1000 mm (WALKER et al., 2000). Dessa forma, a espécie é amplamente registrada em diferentes habitats ecológicos, como estepes semi-áridas, savanas tropicais e subtropicais e vegetações arbustivas. Fora da África tem sido relatada em muitos países mediterrâneos e em suas imediações, como por exemplo, Afeganistão, China, Índia, Irã, Iraque, Nepal, Paquistão, Rússia, Arábia Saudita, Sri Lanka, e Síria (WALKER et al., 2000).

Além disso, em muitas regiões pode ocorrer simpatricamente com *R. sanguineus*, como descrito no Sul da Suíça (BEATI e KEIRANS, 2001). Kolonin

(2009) em sua ilustração resume a distribuição geográfica do *R. turanicus* (figura 2).

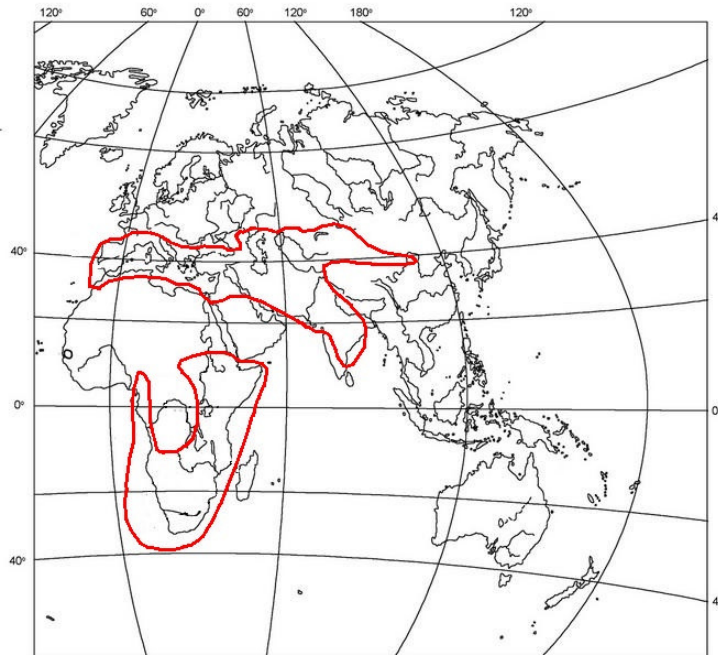


Figura 2. Distribuição geográfica de *R. turanicus*, adaptada de Kolonin (2009).

Os hospedeiros domésticos preferidos para *R. turanicus* adultos são bovinos (*Bos taurus*), ovinos (*Ovis aries*), caprinos (*Capra hircus*), cães (*Canis familiaris*) e gatos (*Felis domesticus*), enquanto que os hospedeiros silvestres registrados são ouriços (*Erinaceus europaeus*), chacal dourado (*Canis aureus*), raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) e lebres (*Sylvilagus brasiliensis*) (WALKER et al., 2000). Destaca-se ainda a ocorrência de carrapatos adultos desta espécie parasitando humanos (EREMEEVA e STROMDAHL, 2011).

Os estágios imaturos têm sido registrados principalmente em gatos domésticos, ouriços e várias espécies de roedores (WALKER et al., 2000).

A maioria dos registros de coleta de *R. turanicus* indica que o estágio adulto é ativo principalmente no final da estação chuvosa e início da estação seca (PEGRAM et al., 1987).

Ioffe-Uspensky et al. (1997) demonstraram, ao comparar a biologia de *R. sanguineus* e de *R. turanicus* em condições de laboratório, que um conjunto de

diferenças incluindo morfologia e padrões fisiológicos e ecológicos separa as duas espécies. Resumidamente, *R. turanicus* apresenta ovos de tamanhos menores quando comparados aos de *R. sanguineus*, assim como os estágios imaturos não alimentados. Todavia, como forma de compensação, os adultos de *R. turanicus* têm maior taxa de crescimento em período de tempo mais curto, com a fêmea ingurgitada sendo quase duas vezes mais pesada que a de *R. sanguineus*. Tais autores sugeriram que a produção de ovos superior e o desenvolvimento mais rápido de *R. turanicus* poderiam estar relacionados com maior dependência de fatores ambientais do que *R. sanguineus*.

Dessa forma, estudos biológicos, morfológicos e moleculares podem promover reconstruções taxonômicas mais consistentes como no grupo complexo *Rhipicephalus sanguineus*, conforme foi enfatizado por Walker et al. (2000).

1.2 Identificação morfológica de *R. sanguineus* e *R. turanicus*

Devido às semelhanças morfológicas entre *R. sanguineus* e *R. turanicus*, a identificação e separação destas duas espécies tem sido problemática. Dessa forma, alguns autores têm contribuído, por meio de estudos morfológicos e morfométricos, para um diagnóstico mais preciso (FILIPPOVA 1981; FILIPPOVA, 1997; FILIPPOVA e PANOVA, 1983; PAPADOPOULOS et al., 1992; PEGRAM et al., 1987; WALKER et al., 2000; YERUHAM et al., 1996).

Além disso, é importante ressaltar que a ocorrência de polimorfismos é bastante comum nestas duas espécies, dificultando ainda mais a separação entre elas.

Ribeiro et al. (1996) relataram variações morfológicas detectadas nas placas adanais, abertura genital, placas espiraculares, número de dentes por fileira no hipostômio e formato dos palpos em *R. sanguineus* de oito estados do Brasil.

Pegram et al. (1987) encontraram consideráveis diferenças morfológicas, particularmente nos estágios imaturos, entre as linhagens de *R. turanicus* da África e de Chipre, que se mostraram compatíveis geneticamente.

1.2.1 Características morfológicas de *R. sanguineus*

Morfológicamente, machos e fêmeas de *R. sanguineus* têm tamanho mediano (3 a 5 mm em jejum) e apresentam o idiossoma 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 idiossoma é hexagonal e tanto os palpos como o hipostômio são curtos, e apresentam dentição 3/3 (WALKER et al., 2000).

Os machos de *R. sanguineus* 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. O processo anterior da coxa I é imperceptível. Em espécimes alimentados, a parede do aloescudo expande-se lateral e posteriormente. Os olhos são marginais, ligeiramente protuberantes e alinhados dorsalmente, com algumas pontuações. As fendas cervicais são curtas e profundas e em alguns espécimes a mera indicação de fendas cervicais pode ser vista, mas esta condição é rara. Linhas marginais profundas e ponteadas delimitam 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. Caracteristicamente, quatro fileiras irregulares de pontuações amplamente espaçadas são visíveis 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 são variáveis, mas geralmente alongadas e subtriangulares. São distintamente amplas em seu aspecto posterior, mas ocasionalmente truncadas

ou arredondadas posteriormente. As placas adanais acessórias são moderadamente distintas. As pernas aumentam ligeiramente em tamanho, da I para a IV (WALKER et al., 2000).

As fêmeas de *R. sanguineus* apresentam o capítulo tão largo quanto longo, com a base apresentando ângulos laterais acentuados e áreas porosas pequenas. Os palpos são mais longos do que os dos machos, estreitamente arredondado apicalmente. O escudo é mais longo que largo, com a margem posterior sinuosa. Os olhos, dispostos nos ângulos laterais, são medianamente convexos, geralmente margeados com algumas pontuações dorsalmente. Os campos cervicais são ligeiramente deprimidos, em forma de lâmina bisturi, geralmente cercados por estrias. As margens cervicais externas são marcadas por diversas pontuações maiores, também presentes em áreas mediais da escápula. Ventralmente, a abertura genital apresenta a forma de “U” (WALKER et al, 2000).

1.2.2 Características morfológicas de *R. turanicus*

Os machos de *R. turanicus* apresentam o capítulo ligeiramente mais largo do que longo, com os ângulos laterais da base ocupando cerca do terço anterior do comprimento. Os palpos se estreitam um pouco no ápice arredondado. O processo anterior na coxa I é imperceptível. Apresentam um pequeno processo caudal arredondado quando alimentados. Nos estágios alimentados o aloescudo expande-se consideravelmente nas laterais. Os olhos são planos e as fendas cervicais têm forma de vírgula, convergente e levemente deprimida, com margem delimitada externamente por grandes pontuações. Os sulcos póstero-lateral e póstero-mediano são curtos e largos. Grandes pontuações estão presentes na escápula e em mais ou menos quatro padrões de linhas mediais distintas sobre o escudo, intercaladas por numerosas pontuações menores. Ventralmente, as placas espiraculares possuem forma variável, mas o prolongamento dorsal geralmente é amplo e suavemente curvado ou angulado (WALKER et al., 2000). As placas adanais, bastante esclerotinizadas, são estreitas e possuem formato trapezoidal,

podendo variar para mais ampla e curvada em alguns espécimes (WALKER et al., 2013).

As fêmeas de *R. turanicus* apresentam o capítulo mais largo do que longo e áreas porosas ovais. Os palpos são afilados, e bastante estreitos, para o ápice arredondado. O escudo é ligeiramente mais longo do que largo, com a margem posterior marcadamente sinuosa. Os olhos são planos e as fendas cervicais convergentes e ligeiramente deprimidas. A margem externa é bem definida, com inúmeras pontuações profundas e grandes, também presentes na escápula e na região média do escudo, intercaladas com várias pontuações menores. O padrão de pontuações é variável, mas geralmente denso e visível. Ventralmente, a abertura genital é pequena, em formato de “V” (WALKER et al., 2000).

Ioffe-Spensky et al. (1997) utilizaram as seguintes características para distinguir *R. sanguineus* de *R. turanicus*: forma da placa adanal dos machos (Pomerantsev, 1950), forma da abertura genital (Feldman-Mühsam 1952), tipo de aeróbios da placa espiracular (Filippova e Panova 1983), e tamanho relativo das placas espiraculares de machos e fêmeas (Ioffe-Uspensky et al., 1993), ressaltando que esta última característica foi importante para identificar carrapatos de vida livre.

1.3 Importância econômica e sanitária

1.3.1 Agentes transmitidos por *R. sanguineus* e *R. turanicus*

Os carrapatos *R. sanguineus* são conhecidos como vetores de patógenos como *Babesia canis vogeli* e *Ehrlichia canis*, agentes etiológicos da babesiose canina e da erliquiose monocítica, respectivamente. Suspeita-se também que o carrapato vermelho do cão esteja envolvido na transmissão de outros patógenos como *Leishmania (Leishmania) infantum*, agente da leishmaniose visceral canina (COUTINHO et al., 2005).

O *R. sanguineus* também é responsável pela transmissão de *Hepatozoon canis* e *Mycoplasma haemocanis*, cuja importância ainda não está bem determinada no Brasil (GUGLIELMONE et al., 2006).

A transmissão de patógenos por *R. sanguineus* para humanos também é bem documentada. De fato, carrapatos *R. sanguineus* são vetores de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa das Montanhas Rochosas no México (BUSTAMENTE E VARELA, 1947; MARIOTTE et al., 1944) e no leste do Arizona (DEMMA et al., 2005). Na região Mediterrânea, *R. sanguineus* além de vetores são reservatórios de *Rickettsia conorii*, agente etiológico da febre exantemática do Mediterrâneo (MATSUMOTO et al., 2005a).

Há vários registros de humanos picados por *R. sanguineus* em países Neotropicais, principalmente Argentina, Brasil, Chile, Sul do México, Panamá, Peru, Porto Rico, Venezuela e Uruguai (GUGLIELMONE et al., 2003). *Ehrlichia canis* ou espécies relativamente próximas foram isoladas de humanos na Venezuela (PEREZ et al., 1996) e as evidências sugeriram que *R. sanguineus* seria o vetor (UNVER et al., 2001). Nos Estados Unidos, casos de humanos picados por carrapatos variam de acordo com a região estudada (ESTRADA-PEÑA E JONGEJAN, 1999). Na África, *R. sanguineus* é predominantemente parasita do cão doméstico, mas também infesta humanos (WALKER et al., 2000).

Estudos recentes, visando avaliar a competência vetorial de diferentes linhagens neotropicais de *R. sanguineus* para *E. canis*, mostraram que carrapatos pertencentes à linhagem tropical foram vetores competentes, diferentemente do observado para os carrapatos de linhagem temperada (MORAES-FILHO et al, 2012).

Matsumoto et al. (2005) também chamaram atenção para o fato de membros do grupo complexo *R. sanguineus* apresentarem diferentes graus de suscetibilidade para a infecção por certos patógenos como *R. conorii*.

O carrapato *R. turanicus* também tem sido apontado como possível vetor de muitos patógenos humanos e de outros animais, incluindo *Babesia*, *Theileria*, *Anaplasma phagocytophilum*, e *R. massiliae*. *Rickettsia massiliae*

exibe eficiente transmissão transestadial e transovariana em *R. turanicus* (MATSUMOTO et al., 2005b; MURA et al., 2008; VITALE et al., 2006).

Recentemente, uma nova espécie de *Rickettsia* do novo grupo da febre maculosa foi identificada em um macho de *R. turanicus* retirado de uma criança de aproximadamente dois anos de idade na Sicília (Itália) e denominada até o momento de “*Candidatus Rickettsia barbariae*” (EREMEEVA e STROMDAHL, 2011).

1.3.2 Métodos de controle de carrapatos

Os carrapatos possuem diversos inimigos naturais como bactérias, fungos e nematóides, sendo possível seu controle biológico como método alternativo (SAMISH et al., 2004). Fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* podem ter potencial para controlar populações de certas espécies de carrapatos, incluindo *R. sanguineus* (KIRKLAND ET AL., 2004; SAMISH et al., 2004).

Até o momento não há vacina comercial anti-carrapato disponível para uso em cães. Todavia, recentemente Perez-Perez et al. (2010) ao investigarem a eficácia do antígeno Bm86 sobre o potencial biótico de *R. sanguineus* em infestação desafio pós-vacinal em cães, observaram redução de 38%, 29% e 31% nas taxas de recuperação de larvas, ninfas e fêmeas adultas, respectivamente, em comparação com controles não vacinados.

Por outro lado, com os avanços nas técnicas de biologia molecular, química protéica e biologia computacional, novas moléculas têm surgido como candidatas a antígenos vacinais. Recentemente, Rodríguez-Mallon et al. (2012), em experimentos com coelhos imunizados com peptídeo imunogênico P0 obtido de *R. (Boophilus) microplus* e *R. sanguineus*, observaram uma eficácia de 90% na redução da taxa de sobrevivência de *R. sanguineus* nestes hospedeiros.

É importante ressaltar que o status biossistemático real do *R. sanguineus* em diferentes populações geográficas pode estar associado a diferenças no comportamento, biologia e capacidade vetorial. Sendo assim, o

conhecimento destas diferenças faz-se necessário para o controle destes carrapatos e de doenças por eles transmitidas em diferentes regiões (BEATI e KEIRANS, 2001; SZABÓ et al., 2005).

O controle de carrapatos *R. sanguineus* em certas áreas tem sido feito baseado no uso de acaricidas químicos nos cães e algumas vezes no ambiente, visto que 95% dos carrapatos encontram-se fora do hospedeiro (DANTAS-TORRES e FIGUEIREDO, 2006). O uso indiscriminado de acaricidas ao longo dos anos tem contribuído para a seleção de carrapatos resistentes, e o desenvolvimento de resistência aos acaricidas constitui sério problema. Miller et al. (2001) confirmaram a ocorrência de resistência na linhagem de *R. sanguineus* do Panamá a permetrina, DDT, coumafós e amitraz.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Estudar comparativamente a biologia, morfologia e genética de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), Argentina (Rafaela, Santa Fé), Cuba (Havana), Tailândia (Bangkok) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o ciclo biológico de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), comparativamente ao de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) em condições laboratoriais, utilizando-se coelhos e cães como hospedeiros;
- Realizar o cruzamento entre *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) e verificar a ocorrência e viabilidade de híbridos;

-
- Comparar os parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), Argentina (Rafaela, Santa Fé), Cuba (Havana), Tailândia (Bangkok) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) em condições laboratoriais, utilizando-se coelhos como hospedeiros;
 - Comparar morfometricamente os estágios adultos de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), Argentina (Rafaela, Santa Fé), Cuba (Havana), Tailândia (Bangkok) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza);
 - Comparar morfológicamente, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), o estágio adulto de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), Argentina (Rafaela, Santa Fé), Cuba (Havana), Tailândia (Bangkok) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza);
 - Comparar geneticamente as linhagens de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), Argentina (Rafaela, Santa Fé), Cuba (Havana), Tailândia (Bangkok) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) utilizando-se fragmentos do rDNA mitocondrial 12S e 16S;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Carrapatos

Foram utilizados nos experimentos carrapatos *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), Argentina (Rafaela, Santa Fé), Cuba (Havana), Tailândia (Bangkok) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza). Tais exemplares foram obtidos das colônias mantidas no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal, SP, Brasil.

A colônia de *R. sanguineus* do Brasil foi iniciada a partir de fêmeas ingurgitadas coletadas pelo Dr. Gervásio Henrique Bechara em cães na cidade de Jaboticabal, SP, Brasil, e existe há aproximadamente 10 anos, sendo renovada constantemente com a inclusão de exemplares locais.

A colônia de *R. sanguineus* da Argentina foi estabelecida no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal, SP, Brasil em 2005, especificamente para estudos comparativos envolvendo a biologia, morfologia e genética desta

população de carrapatos com a população de *R. sanguineus* de Jaboticabal, SP, Brasil (Szabó et al., 2005). A colônia foi iniciada a partir de fêmeas ingurgitadas coletadas em cães na cidade de Rafaela, Santa Fé, Argentina, e identificadas pelo Dr. Santiago Nava, do Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária - INTA, Rafaela, Santa Fé, Argentina. Recentemente a colônia foi renovada com exemplares coletados em 2012, em cães, na mesma localidade.

As colônias de *R. sanguineus* da Tailândia (Bangkok) e de Cuba (Havana) foram iniciadas há aproximadamente dois anos a partir de exemplares fornecidos de colônias previamente existentes nos dois países de origem. Os exemplares da Tailândia foram gentilmente cedidos pelo Dr. Sattaporn Jittapalpong, da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Kasetsart, Bangkok e os exemplares de Cuba foram gentilmente cedidos pela Dra. Alina Rodríguez-Mallon, do Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia, Havana.

A colônia de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foi iniciada há aproximadamente cinco anos, a partir de carrapatos adultos coletados na vegetação em região periurbana de Cartuja, província de Zaragoza, pelo Dr. Gervásio H. Bechara e identificados pelo Dr. Agustín Estrada-Peña, da Universidade de Zaragoza, valendo-se das chaves taxonômicas de Walker et al. (2000) e dos trabalhos de Pegram et al. (1987).

É importante destacar que, no caso das colônias estabelecidas a partir de exemplares fornecidos por outros pesquisadores, respeitou-se a identificação taxonômica previamente realizada pelos mesmos.

3.2 Hospedeiros

Para a manutenção das colônias de carrapatos foram utilizados coelhos brancos da raça Nova Zelândia sem contato prévio com carrapatos, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP, campus de Botucatu, SP.

Para o estudo de biologia comparada entre *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), Argentina (Rafaela), Cuba (Havana), Tailândia (Bangkok) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foram utilizados coelhos. Para o estágio

adulto de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foram também utilizados seis cães domésticos (*Canis familiaris*) sem raça definida (SRD), de aproximadamente seis meses de idade, sem contato prévio com carrapatos, obtidos de criadores particulares.

Durante os experimentos, os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais, no Biotério Experimental do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal, SP, Brasil. Os cães, devidamente imunizados com vacinas V-10 (Vanguard[®]) e antirrábica (Defensor[®]) e vermifugados (Drontal Plus[®]), foram mantidos no Canil Experimental do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal, SP, Brasil. Os animais foram alimentados com ração comercial apropriada e água *ad libitum*.

Para o processo de alimentação, os carrapatos ficaram restritos por câmaras de plástico transparente fixadas com cola Brascoplast[®] ao dorso depilado dos hospedeiros, de acordo com técnica descrita por Bechara et al. (1995). Para metamorfose dos instares ingurgitados, bem como para sua simples manutenção, os ácaros foram mantidos em estufa para B.O.D. (modelo 202/4G, ELETROLAB) à temperatura de 27 °C, umidade de 80% e fotoperíodo de 12 horas.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), conforme parecer n° 02.287/10.

3.3 Parâmetros biológicos dos carrapatos em condições laboratoriais

Para o estudo comparativo do ciclo biológico de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), exemplares dos três estágios de cada espécie foram alimentados de acordo com técnica proposta por Bechara et al. (1995) e descrita no item colônia de carrapatos, em 10 coelhos (cinco para cada espécie) sem contato prévio com carrapatos foram utilizados a fim de estabelecer os parâmetros biológicos parasitários e não parasitários em condições laboratoriais. Além disso, para a alimentação do

estágio adulto, além dos coelhos foram também utilizados seis cães sem raça definida (três para cada espécie de carrapatos sob estudo).

Para cada infestação realizada em coelhos foram utilizados grupos de 100 larvas, 30 ninfas e cinco casais de carrapatos adultos de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), assim como de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza). Os cães, previamente divididos em dois grupos foram infestados com 10 casais de carrapatos adultos, sendo que um dos grupos foi infestado com *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e o outro com *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

Para o estudo comparativo dos parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), Argentina (Rafaela, Santa Fé), Cuba (Havana), Tailândia (Bangkok) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), infestaram-se 10 coelhos, cada um com 10 casais de carrapatos adultos de cada população.

Os seguintes parâmetros biológicos foram avaliados durante e após as infestações: peso da fêmea ingurgitada (PFI); peso das larvas ingurgitadas (PLI); peso das ninfas ingurgitadas (PNI); peso da massa de ovos (PMO); período de fixação e ingurgitamento (Ping) e período de pré-postura (PPP) e de eclosão (PEclo); período de ecdise (PEcd) e taxa de ecdise das formas imaturas (%Ecd); índice de eficiência de conversão da reserva alimentar de fêmeas ingurgitadas em ovos (%IECO); taxa de eclosão das larvas (%ECLO) e porcentagem de recuperação (%Rec) de carrapatos ingurgitados, onde:

Ping = número de dias decorridos desde a liberação dos carrapatos sobre o hospedeiro até o seu ingurgitamento e desprendimento;

PEcd = número de dias decorridos desde o desprendimento dos carrapatos do hospedeiro até o início da ecdise;

PPP = número de dias decorridos desde o desprendimento da fêmea até o início da ovipostura;

PECLO = número de dias decorridos do início da ovipostura até a eclosão das larvas;

$$\text{IECO (\%)} = \frac{\text{PMO}}{\text{PFI}} \times 100;$$

%ECLO = obtida pela média da avaliação visual, por três pessoas, da massa de larvas que eclodiram, segundo Szabó et al. (1995);

$$\text{\%Rec} = \frac{\text{número de fêmeas, larvas ou ninfas ingurgitadas}}{\text{número de fêmeas, larvas ou ninfas liberadas}} \times 100;$$

Na comparação da performance reprodutiva e alimentar de fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) em coelhos e cães domésticos foi avaliada também a taxa de sobrevivência das fêmeas ingurgitadas em porcentagem. Dessa forma, a taxa de sobrevivência é dada por:

$$\text{\% Sobr.} = \frac{\text{número de fêmeas que concluíram a ovipostura}}{\text{número total de fêmeas liberadas}} \times 100.$$

3.4 Cruzamentos de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza)

Cinco coelhos que não tiveram contato prévio com carrapatos, cada um com seis câmaras de alimentação foram utilizados para o cruzamento entre *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza). Dez fêmeas adultas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) foram cruzadas com 10 machos adultos de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) na primeira câmara. Na segunda foram cruzadas 10 fêmeas adultas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) com 10 machos adultos de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal). Na terceira, como controle, foram cruzados 10 machos e 10 fêmeas de *R.*

sanguineus do Brasil (Jaboticabal) e na quarta 10 machos e 10 fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza). Além disso, na quinta câmara foram liberadas 10 fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e, na sexta câmara, 10 fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), para avaliar a possível ocorrência de partenogênese.

3.5 Comparações morfométricas

Foram utilizados 15 machos e 15 fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), Cuba (Havana), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela, Santa Fé) e também de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), selecionados de diferentes lotes da colônia, para serem mensurados.

Para tal, os carrapatos adultos com aproximadamente 30 dias foram fixados em álcool 70% e montados em lâminas de vidro com bálsamo do Canadá, de acordo com técnica proposta por Famadas et al. (1996). O período de 30 dias foi respeitado para que a reserva alimentar depositada fosse consumida e o exoesqueleto polimerizado.

As estruturas mensuradas foram: comprimento do gnatossoma, comprimento e largura da base do capítulo, comprimento do hipostômio (do ápice até as cerdas pós-hipostomais), largura do hipostômio, comprimento do palpo (do ápice do segmento tibiotarsal até a margem posterior do trocânter), comprimento do idiossoma (do ápice da escápula até a margem posterior do idiossoma), largura máxima do idiossoma, comprimento do escudo (na linha média), largura máxima do escudo, comprimento e largura do tarso I, comprimento das placas espiraculares, largura do prolongamento dorsal das placas espiraculares, e comprimento e largura da base das placas adanais dos machos. As medidas, apresentadas em milímetros, foram obtidas utilizando-se microscópio de luz (modelo MC80DX) com câmera de captura acoplada e com o auxílio do software Motic Image Plus 2.0 ML. Além das medidas, algumas estruturas como as placas espiraculares de machos e fêmeas, placas adanais de machos e abertura genital das fêmeas também foram fotografadas.

3.6 Análise estatística

Dados do estudo comparativo dos parâmetros biológicos dos carrapatos *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) em coelhos (item 4.1.1) e em cães (itens 4.1.2 e 4.1.3) foram comparados pelo teste t não pareado utilizando $p < 0,05$, com o auxílio do software estatístico GraphPad Prism 5.01.

Os dados obtidos dos cruzamentos entre *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) (item 4.1.4), dos parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas das diversas populações geográficas de *R. sanguineus*, comparativamente ao *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) (item 4.1.5), assim como as medidas obtidas para os carrapatos destas espécies (item 4.2) foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, utilizando-se $p < 0,05$.

3.7 Ultramorfologia externa

Dez machos e 10 fêmeas de cada espécie foram fixados por 24 horas em solução fixadora de Karnovsky e então tratados em banhos de 30 minutos cada, em série crescente de álcool 70%, 80%, 90% e 100%, repetindo-se três vezes a passagem na última concentração. Em seguida, o material foi levado ao ponto crítico de secagem para completar o processo de desidratação e fixado em suporte de metal com fita adesiva dupla face para bombardeamento com ouro e carbono.

O material preparado foi então analisado e fotografado em microscópio eletrônico de varredura (modelo PHILIPS 505) no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia no Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro, SP, e também no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP, utilizando microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM 5410. A partir das micrografias obtidas foram realizadas as comparações morfológicas.

3.8 Comparação de fragmentos do rDNA mitocondrial

A comparação de fragmentos do rDNA mitocondrial das diferentes populações de *R. sanguineus* e do *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foram realizadas no Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária – INTA, Rafaela, Santa Fé, Argentina, durante estágio de pesquisa no exterior financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, durante os meses de agosto a outubro de 2012, sob a supervisão do Dr. Atílio José Mangold. As metodologias de extração e purificação do DNA, amplificação, purificação do DNA amplificado, sequenciamento e análise das sequências são descritas abaixo.

3.8.1 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se machos e/ou fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), Argentina (Rafaela), Cuba (Havana), Tailândia (Bangkok) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) obtidos diretamente das colônias mantidas no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal, SP, Brasil. Além destes, foram incluídos também exemplares de *R. sanguineus* da Colômbia (Villavicêncio e Libertad), gentilmente cedidos e identificados pelo Dr. Efraim Benavides, da Universidade de La Salle, Bogotá, Colômbia.

Os exemplares foram conservados em álcool 70% e mantidos a -20°C. Para cada linhagem de carrapato foram processadas duas amostras contendo um indivíduo por amostra. Cada exemplar de carrapato foi retirado do frasco com etanol, lavado duas vezes em solução fisiológica tamponada com fosfato-PBS (NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 2,72 g/L) e colocado para secar à temperatura ambiente no interior de placa de Petri esterilizada.

Os procedimentos de extração e purificação foram realizados de acordo com técnicas propostas por Sambrook et al. (1989). Resumidamente, foi feita uma incisão no idiossoma de cada carrapato utilizando-se tesoura

entomológica esterilizada. Cada carrapato foi colocado em um microtubo de 1,5 mL contendo 400 μ L de solução proteolítica formada por 340 μ L de solução contendo TRIS 10 mM a pH 8,0, EDTA 100 mM e NaCl 100 mM, 40 μ L de SDS (sódio-dodecil fosfato) a 10% e 20 μ L de proteinase K a 500 μ g/mL (Boehringer Mannheim). Os tubos foram incubados em banho maria a 55°C por duas horas, agitando-se suavemente a cada 15 minutos.

A purificação do DNA foi realizada em três etapas, utilizando-se fenol e clorofórmio-álcool isoamílico para desnaturar e precipitar as proteínas.

Na primeira etapa, adicionaram-se 400 μ L de fenol, agitando-se suavemente e centrifugando-se durante cinco minutos a 12.000 g em microcentrífuga. A fase superior (aquosa) contendo o DNA foi cuidadosamente recuperada com uma pipeta automática e colocada em outro microtubo.

Na etapa seguinte, adicionaram-se 200 μ L de fenol e 200 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), misturando-se e centrifugando-se como na fase anterior e recuperando-se novamente a fase aquosa.

Na terceira etapa foram utilizados 400 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), misturando-se e recuperando-se o sobrenadante cuidadosamente.

A precipitação do DNA que se encontrava na fase aquosa foi realizada adicionando-se 0,1 mL de acetato de potássio 5M, seguida de homogeneização da amostra. Na sequência, adicionaram-se 2,5 mL de etanol absoluto mantendo-se a mistura a -20°C por pelo menos duas horas. Transcorrido este tempo, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 12.000g, a uma temperatura de 0 a 4°C para precipitar o DNA no fundo do microtubo. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 400 μ L de etanol 70%, mantendo-se a 20°C, a fim de remover o excesso de sal. Foi realizada mais uma centrifugação durante cinco minutos, descartando-se cuidadosamente o sobrenadante, deixando-se secar o pellet sedimentado à temperatura ambiente. Finalmente, uma vez seco, dissolveu-se o DNA em 30 μ L de solução TE (10mM Tris a pH 7,6, 0,1mM EDTA), misturando-se bem, identificando os tubos e armazenando-os a -20°C para posterior realização das reações de polimerização em cadeia. As amostras de DNA foram quantificadas em

aparelho espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) e apresentaram concentrações que variaram de 30 a 90 ng/μL.

3.8.2 Reações de Amplificação

Para as reações de polimerização em cadeia (PCR) foram utilizadas diluições 1:10 das amostras de DNAs extraídos, em água Milli-Q. Preparou-se uma mistura dos reativos utilizados, de acordo com o **Quadro 1**.

Em seguida, foram distribuídos 4 μL de cada amostra de DNA em tubos MicroAmp™ (Perkin Elmer) de 0,2 mL de capacidade e em seguida adicionaram-se 96 μL da mistura de reagentes em cada tubo, perfazendo um volume total de 100 μL por amostra.

Quadro 1. Reagentes, concentrações e volumes utilizados para a realização das reações de polimerização em cadeia.

Reagentes	Concentração		Volume μL
	Inicial	Final	
Água bidestilada			57
Solução buffer	10x	1x	10
MgCl ₂	25mM	2mM	4
dNTPs	1mM	0,2mM	20
Oligonucleotídeos iniciadores “Forward”	10μM	0,2 μM	2
Oligonucleotídeos iniciadores “Reverse”	10μM	0,2 μM	2
Taq polimerase	5u/μL	0,05 U/μL	1
DNA			4

As ampliações por reações de polimerização em cadeia foram realizadas em termociclador GeneAmp™ e os protocolos utilizados para cada gene ou fragmento estão detalhados a seguir.

As condições da PCR utilizadas para o rDNA 12S foram as mesmas utilizadas por Szabó et al. (2005), que estabeleceu uma desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos seguida de 35 ciclos por 45 segundos a 94 °C, 45 segundos para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores a 55 °C e 45 segundos para a extensão destes mesmos oligonucleotídeos a 72 °C. O passo final da extensão ocorreu por 7 minutos a 72 °C. Os oligonucleotídeos iniciadores usados para a amplificação e sequenciamento do fragmento de 400 pares de bases foram: “forward”, 5’– AAA CTA GCA TTA GAT ACC CTA TTA TTT TAG – 3’ e “reverse”, 5’– CTA TGT AAC GCA TTA TCT TAA TAA AGA GTG – 3’.

As condições da PCR para o rDNA 16S foram as mesmas utilizadas por Black e Piesman (1994) que incluiu uma desnaturação inicial a 95 °C por cinco minutos seguida de 10 ciclos de 1 minuto a 92 °C, 1 minuto a 48 °C e 1,5 minutos a 72 °C, seguidos por 32 ciclos de 1 minuto a 92 °C, 35 segundos a 54 °C e 1,5 minutos a 72 °C. O passo final de extensão do oligonucleotídeos iniciadores ocorreu por 7 minutos a 72 °C. Os oligonucleotídeos iniciadores usados para a amplificação e sequenciamento do fragmento de 460 pares de bases foram: “forward”, 5’– CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T – 3’ e “reverse”, 5’– CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC TGT GG – 3’.

3.8.3 Visualização do DNA amplificado

Os produtos de amplificação das PCR foram visualizados pela separação em gel de agarose corados com brometo de etídio, indicados para a separação de fragmentos que vão desde 70 bp (gel a 3%) a 80.000 pb (gel a 0,1%). Neste estudo, foram utilizados géis na concentração de 1% em solução TAE 1x (Tris-acetato 0,04M, EDTA 1mM), no qual se processava uma alíquota de 7µL de volume da PCR. Foram utilizados por amostra, 3µL de solução buffer de carga (“gel-loading buffer”) composta de glicerol a 30% em água com

0,25% de azul de bromofenol com a finalidade de aumentar a densidade, evitando sua difusão ao exterior dos poços do gel. Simultaneamente às corridas eletroforéticas, foi utilizado um marcador de peso molecular PCR Marker (50-2000 pb). As eletroforeses foram realizadas em géis de 30 mL em equipamento de eletroforese horizontal Min Sub-cell Submarine (Bio-Rad) e as corridas duraram aproximadamente 60 minutos a uma voltagem constante de 65 V.

3.8.4 Purificação do DNA amplificado

As amostras positivas foram purificadas diretamente da PCR com a finalidade de se eliminar os componentes da reação de PCR que poderiam interferir durante a reação de sequenciamento. As purificações foram realizadas com a utilização do kit Wizard™ PCR Preps DNA Purification System (Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante e obtendo-se um volume final de 30 µL.

3.8.5 Sequenciamento

Para o sequenciamento dos produtos diretos da PCR foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados em cada reação de PCR. O sequenciamento foi realizado na Unidade Genômica do Instituto de Biotecnologia – INTA, Buenos Aires, Argentina, empregando-se, com algumas modificações, o protocolo descrito pelo fabricante do Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

Utilizaram-se 3,5 µL do Tampão 2,5x (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl₂); 0,5 µL de Big Dye e 5 pmoles de cada oligonucleotídeo, 2,5 µL de água ultra-pura e 1,5 µL de DNA (sendo este ajustado de acordo com sua concentração, mensurada em aparelho espectrofotômetro Nanodrop, ThermoScientific). As amplificações foram realizadas inicialmente em termociclador (MJ Research-Inc).

O processo de lavagem das amostras foi realizado adicionando-se 80 µL de isopropanol 75% em cada amostra. A placa foi selada com alumínio e, após incubação por 15 minutos em local escuro à temperatura ambiente, foi centrifugada a 4.000 g por 30 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi descartado e 200 µL de etanol 70% foram adicionados e a placa novamente centrifugada, agora por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e a mesma quantidade de etanol 70% foi acrescida, repetindo-se o passo anterior. A placa foi centrifugada invertida (aceleração e desaceleração) e em seguida colocada na bomba de vácuo por 5 minutos para completa secagem das amostras. O sequenciamento foi conduzido no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

3.8.6 Forma de análise dos resultados

As sequências de nucleotídeos obtidas foram manualmente editadas e as sequências consenso foram criadas com o auxílio do software Bioedit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Sequências similares obtidas em banco de dados internacionais (GenBank) foram adicionadas e alinhadas utilizando-se a ferramenta ClustalW (LARKIN et al., 2007). Após a realização do alinhamento foi criado um arquivo “.MEG” para a realização das análises, utilizando-se o software MEGA-5 (“Phylogenetic and molecular evolutionary analyses – MEGA version 5.0 (KUMAR et al., 2001), onde foram realizadas as análises filogenéticas destas sequências utilizando-se os métodos de Agrupamento de Vizinhos, Máxima Verossimilhança e Máxima Parcimônia com o modelo Tamura-Nei com deleção parcial e ponto de corte de 95% e distribuição Gamma 0,3 quando possível; quando não, considerou-se a distribuição como uniforme. As sequências alinhadas foram reamostradas com “bootstrap” de 1000 replicações para a obtenção das árvores filogenéticas.

4 RESULTADOS

4.1 Comparações de parâmetros biológicos

4.1.1 Comparação dos parâmetros biológicos de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) em coelhos

A **tabela 1** mostra os parâmetros biológicos de larvas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) alimentadas em coelhos.

Dos parâmetros biológicos apresentados, apenas o peso médio das larvas ingurgitadas e o período de ecdise foram significativamente diferentes entre as duas populações em estudo. As larvas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) apresentaram um peso médio de aproximadamente 0,31 mg, enquanto as de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) pesaram em média 0,22 mg. O período de ecdise foi de aproximadamente 7,7 dias para *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e de 8,7 dias para *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

Os demais parâmetros (período de ingurgitamento, taxa de ecdise e taxa de recuperação) não mostraram diferenças para $p < 0,05$.

Tabela 1. Parâmetros biológicos de larvas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

Parâmetros	Espécie	
	<i>R. sanguineus</i> Brasil (Jaboticabal)	<i>R. turanicus</i> Espanha (Zaragoza)
PLI (mg)	0,308 ± 0,012 ^a	0,223 ± 0,001 ^b
% Rec	79,33 ± 17,01 ^a	85,33 ± 5,748 ^a
Ping (dias)	3,568 ± 0,255 ^a	2,832 ± 0,099 ^a
PEcd (dias)	7,780 ± 0,186 ^a	8,797 ± 0,200 ^b
% Ecd	99,04 ± 0,478 ^a	87,26 ± 5,43 ^a

PLI = peso de larvas ingurgitadas; % Rec = taxa de recuperação; Ping = período de ingurgitamento; PEcd = período de ecdise; % Ecd = taxa de ecdise. Médias em uma linha seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$).

A **tabela 2** mostra os parâmetros biológicos de ninfas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) alimentadas em coelhos.

Apenas o peso médio das ninfas ingurgitadas mostrou-se significativamente diferente em relação às duas populações em estudo. As ninfas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) apresentaram um peso médio de aproximadamente 0,42 mg, enquanto as de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) pesaram em média 0,49 mg. Os demais parâmetros (período de ingurgitamento, período de ecdise, taxa de recuperação e taxa de ecdise) não mostraram diferenças para $p < 0,05$.

Tabela 2. Parâmetros biológicos de ninfas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

Parâmetros	Espécie	
	<i>R. sanguineus</i> Brasil (Jaboticabal)	<i>R. turanicus</i> Espanha (Zaragoza)
PNI (mg)	0,423 ± 0,010 ^a	0,488 ± 0,012 ^b
% Rec	75,20 ± 8,237 ^a	61,60 ± 8,818 ^a
Ping (dias)	4,707 ± 0,346 ^a	4,904 ± 0,146 ^a
PEcd (dias)	15,37 ± 0,682 ^a	14,64 ± 0,282 ^a
% Ecd	89,10 ± 2,116 ^a	91,93 ± 3,128 ^a

PNI = peso de ninfas ingurgitadas; **% Rec** = taxa de recuperação; **Ping** = período de ingurgitamento; **PEcd** = período de ecdise; **% Ecd** = taxa de ecdise. Médias em uma linha seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$).

A **tabela 3** mostra os parâmetros biológicos de fêmeas adultas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), também alimentadas em coelhos.

Neste estágio observaram-se diferenças significativas para $p < 0,05$ em mais parâmetros do que nos estágios imaturos. O peso médio das fêmeas ingurgitadas foi de 132,6 mg para *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e de 332,3 mg para *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), o peso da massa de ovos foi de 66,2 mg para *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e 164,6 mg para *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza). Outros parâmetros cujas diferenças também se mostraram significativas foram o período médio de ingurgitamento, que foi de 10,7 dias para *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e de 16,2 dias para *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza); o período médio de pré-postura que foi de 4,3 dias para *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e de 2,4 dias para *R.*

turanicus da Espanha (Zaragoza), e o período de eclosão de que foi de 19,4 dias para *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e de 21,9 dias para *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

Os demais parâmetros como a taxa de eclosão, taxa de recuperação e conversão da reserva alimentar das fêmeas em ovos não apresentaram diferenças para $p < 0,05$.

Tabela 3. Parâmetros biológicos de fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

Parâmetros	Espécie	
	<i>R. sanguineus</i> Brasil (Jaboticabal)	<i>R. turanicus</i> Espanha (Zaragoza)
PFI (mg)	132,6 ± 25,13 ^a	332,3 ± 123,29 ^b
Ping (dias)	10,72 ± 0,82 ^a	16,25 ± 3,57 ^b
PMO (mg)	66,21 ± 16,39 ^a	164,6 ± 65,13 ^b
PPP (dias)	4,30 ± 1,18 ^a	2,375 ± 0,51 ^b
% ECLO	91,94 ± 4,27 ^a	92,75 ± 2,96 ^a
PECLO (dias)	19,39 ± 1,7 ^a	21,88 ± 0,99 ^b
% Rec	90,00 ± 11,54 ^a	90,00 ± 14,14 ^a
% IECO	49,23 ± 8,31 ^a	49,05 ± 6,32 ^a

PFI = peso da fêmea ingurgitada; **Ping** = período de ingurgitamento; **PMO** = peso da massa de ovos; **PPP** = período de pré-postura; **% ECLO** = taxa de eclosão de larvas; **PECLO** = período de eclosão de larvas; **% Rec** = taxa de recuperação; **% IECO** = taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos. Médias em uma linha seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$).

As **figuras 3, 4 e 5** mostram os parâmetros biológicos dos diferentes instares de *R. sanguineus* (Jaboticabal) e *R. turanicus* (Zaragoza) alimentados em coelhos.

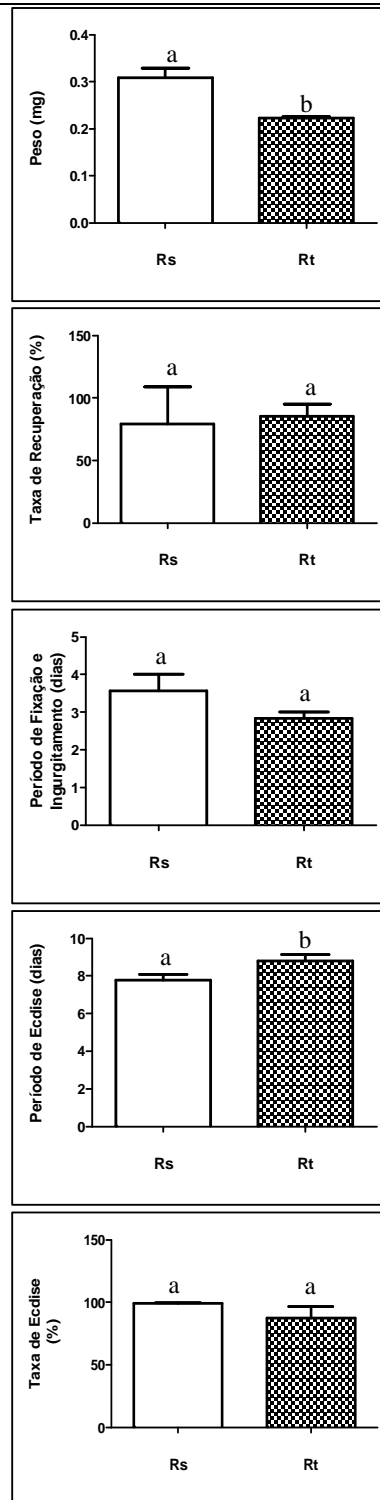


Figura 3. Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de larvas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza). Rs = *R. sanguineus*; Rt = *R. turanicus*.

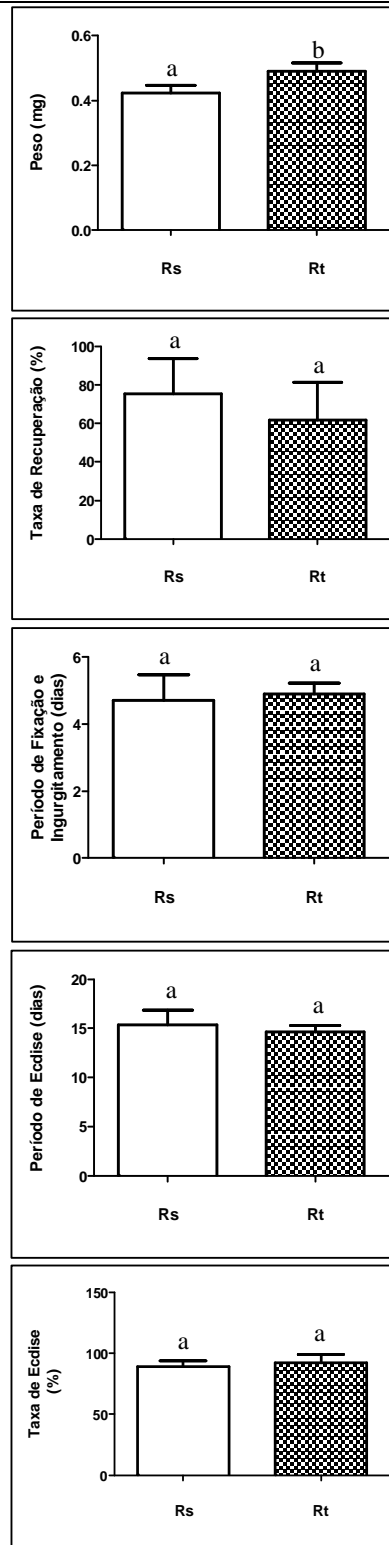


Figura 4. Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de ninfas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

Rs = *R. sanguineus*; Rt = *R. turanicus*.

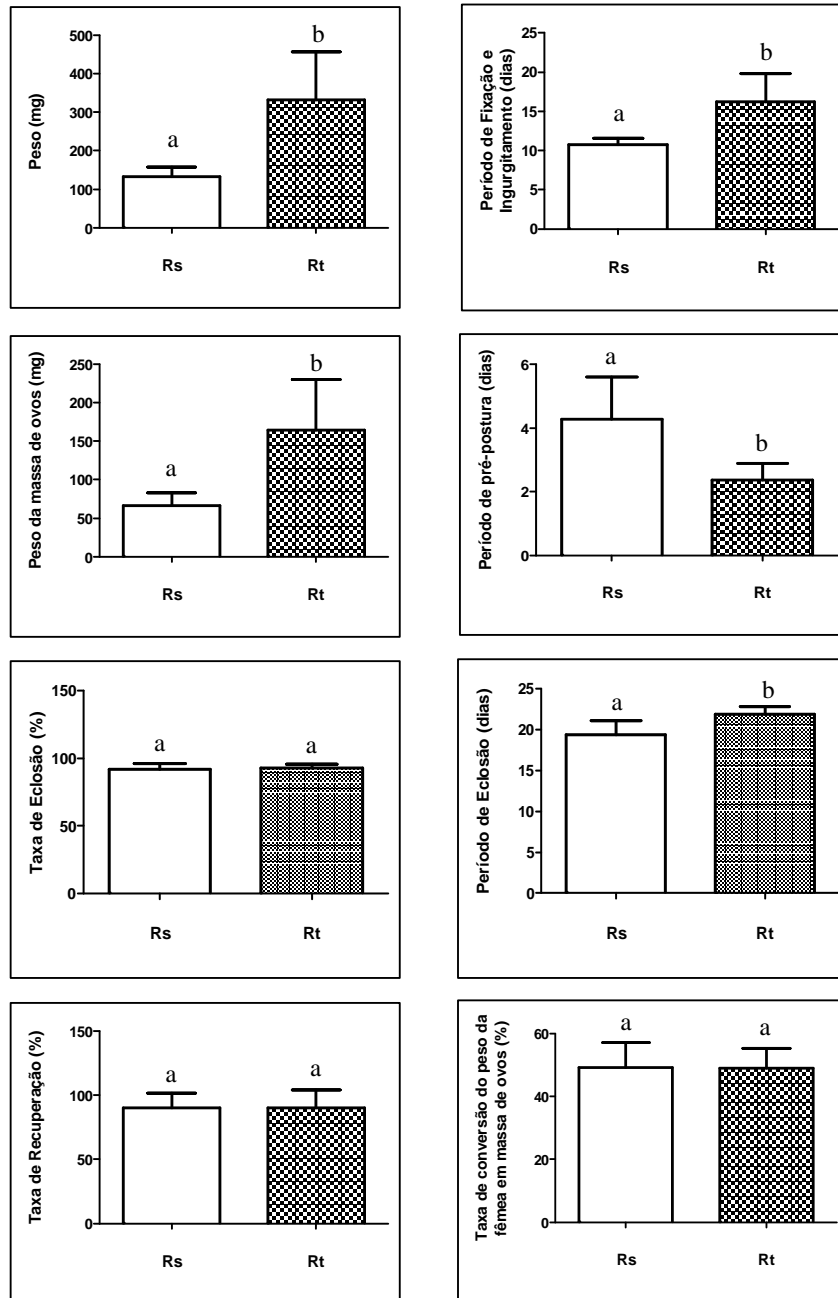


Figura 5. Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza). Rs = *R. sanguineus*; Rt = *R. turanicus*.

4.1.2 Comparação da performance alimentar e reprodutiva de fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) em coelhos e em cães domésticos

Os resultados da comparação dos parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) alimentadas em coelhos e em cães domésticos sem raça definida são apresentados na **tabela 4** e na **figura 6**.

O peso das fêmeas ingurgitadas, assim como o peso da massa de ovos das fêmeas alimentadas em cães domésticos foram ligeiramente superiores quando comparados aos mesmos parâmetros obtidos das fêmeas alimentadas em coelhos, apesar da diferença não ser significativa para $p < 0,05$.

Apenas o período médio de ingurgitamento mostrou diferença significativa, sendo de aproximadamente 8,9 dias para fêmeas alimentadas em cães domésticos e de 10,7 dias para aquelas alimentadas em coelhos.

Os demais parâmetros (período de pré-postura e de eclosão, taxas de recuperação, eclosão, sobrevivência e taxa de conversão do peso da fêmea em massa de ovos) não mostraram diferenças significativas.

Tabela 4. Parâmetros biológicos de fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) alimentadas em coelhos e cães domésticos.

Parâmetros	Espécie/Hospedeiro	
	<i>R. sanguineus</i> Brasil (Jaboticabal) Coelhos	<i>R. sanguineus</i> Brasil (Jaboticabal) Cães domésticos
PFI (mg)	132,6 ± 25,13 ^a	144,01 ± 35,38 ^a
Ping (dias)	10,72 ± 0,82 ^a	8,88 ± 1,18 ^b
PMO (mg)	66,21 ± 16,39 ^a	70,04 ± 30,92 ^a
PPP (dias)	4,30 ± 1,18 ^a	4,31 ± 1,99 ^a
% ECLO	91,94 ± 4,27 ^a	92,33 ± 8,76 ^a
PECLO (dias)	19,39 ± 1,75 ^a	20,23 ± 2,56 ^a
% Rec	90,00 ± 11,54 ^a	72,5 ± 12,58 ^a
% IECO	49,23 ± 8,31 ^a	52,48 ± 13,57 ^a
% Sobr	97,50 ± 5,00 ^a	84,93 ± 14,3 ^a

PFI = peso da fêmea ingurgitada; **Ping** = período de ingurgitamento; **PMO** = peso da massa de ovos; **PPP** = período de pré-postura; **% ECLO** = taxa de eclosão de larvas; **PECLO** = período de eclosão de larvas; **% Rec** = taxa de recuperação; **% IECO** = taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos; **% Sobr** = taxa de sobrevivência de fêmeas ingurgitadas. Médias em uma linha seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$).

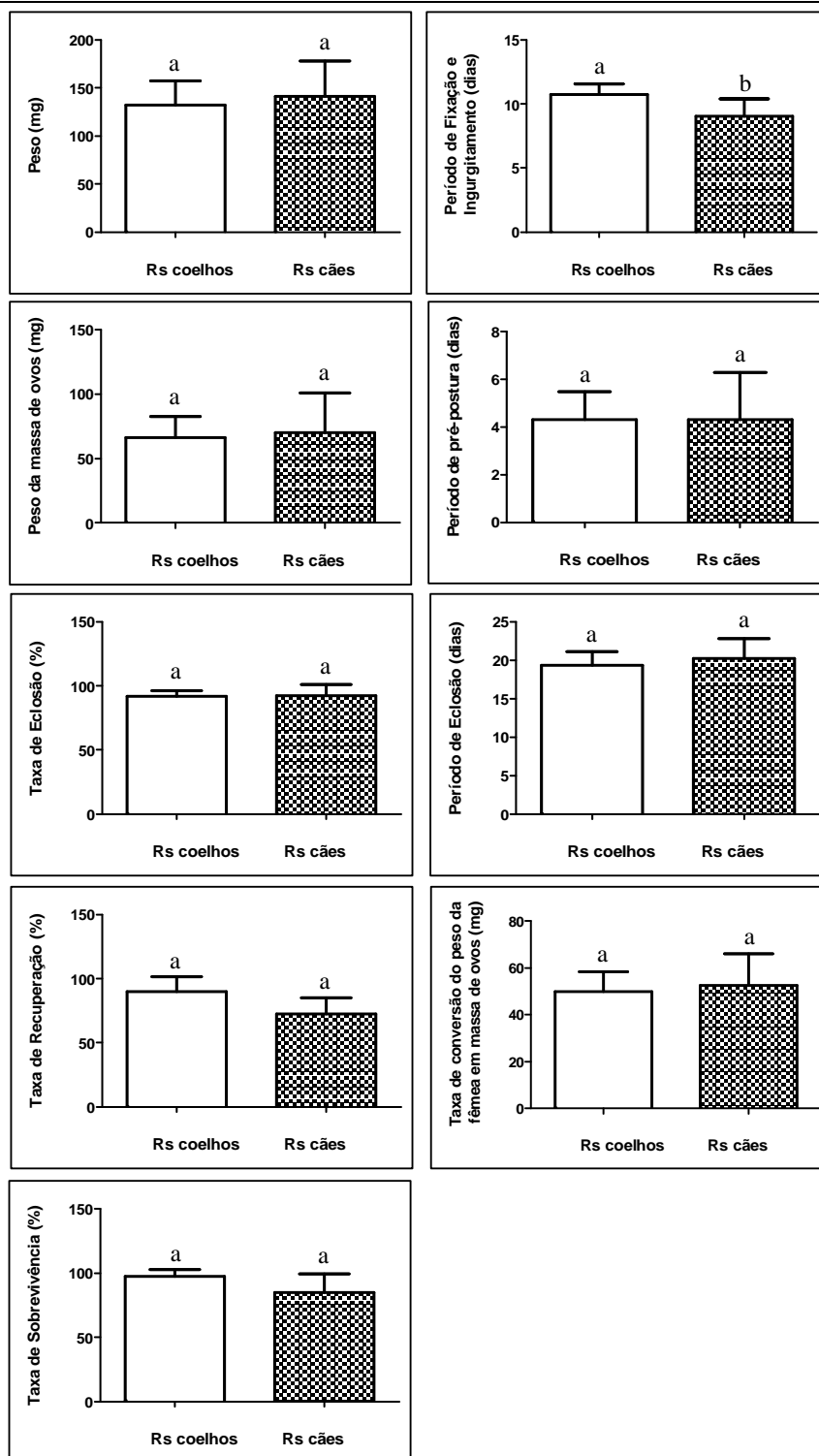


Figura 6. Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) alimentadas em coelhos e em cães domésticos. Rs = *Rhipicephalus sanguineus*.

4.1.3 Comparação da performance alimentar e reprodutiva de fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) em coelhos e em cães domésticos

Os resultados da comparação dos parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) alimentadas em coelhos e em cães domésticos são apresentados na **tabela 5** e na **figura 7**.

Dos parâmetros biológicos analisados, o período médio de ingurgitamento, período de pré-postura e a taxa de sobrevivência mostraram diferenças significativas.

O período médio de ingurgitamento foi de aproximadamente 8,7 dias para fêmeas alimentadas em cães domésticos e de 16,2 dias para aquelas alimentadas em coelhos, enquanto que o período de pré-postura foi de 4,4 dias para fêmeas alimentadas em cães domésticos e de 2,4 dias para aquelas alimentadas em coelhos.

A taxa de sobrevivência das fêmeas alimentadas em coelhos foi significativamente maior do que a das fêmeas alimentadas em cães domésticos.

Nas infestações realizadas em cães observou-se que algumas das fêmeas ingurgitadas tornavam-se escuras, morrendo antes de realizar a ovipostura. Tal fenômeno foi pouco observado nas infestações realizadas em coelhos.

Os demais parâmetros como peso médio das fêmeas ingurgitadas, período de eclosão e taxas eclosão e de conversão do peso da fêmea em massa de ovos não mostraram diferenças significativas.

Tabela 5. Parâmetros biológicos de fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) alimentadas em coelhos e cães domésticos.

Parâmetros	Espécie/Hospedeiro	
	<i>R. turanicus</i> Espanha (Zaragoza) Coelhos	<i>R. turanicus</i> Espanha (Zaragoza) Cães domésticos
PFI (mg)	332,3 ± 123,29 ^a	337,5 ± 45,21 ^a
Ping (dias)	16,25 ± 3,57 ^a	8,75 ± 1,16 ^b
PMO (mg)	164,6 ± 65,13 ^a	159,3 ± 58,00 ^a
PPP (dias)	2,37 ± 0,51 ^a	4,4 ± 2,07 ^b
% ECLO	92,75 ± 2,96 ^a	87,14 ± 8,95 ^a
PECLO (dias)	21,87 ± 0,99 ^a	22,75 ± 1,25 ^a
% Rec	90,00 ± 14,14 ^a	90,00 ± 10,00 ^a
% IECO	49,05 ± 6,32 ^a	43,63 ± 15,07 ^a
% Sobr	93,35 ± 11,54 ^a	60,67 ± 8,14 ^b

PFI = peso da fêmea ingurgitada; **Ping** = período de ingurgitamento; **PMO** = peso da massa de ovos; **PPP** = período de pré-postura; **% ECLO** = taxa de eclosão de larvas; **PECLO** = período de eclosão de larvas; **% Rec** = taxa de recuperação; **% IECO** = taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos; **% Sobr** = taxa de sobrevivência de fêmeas ingurgitadas. Médias em uma linha seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$).

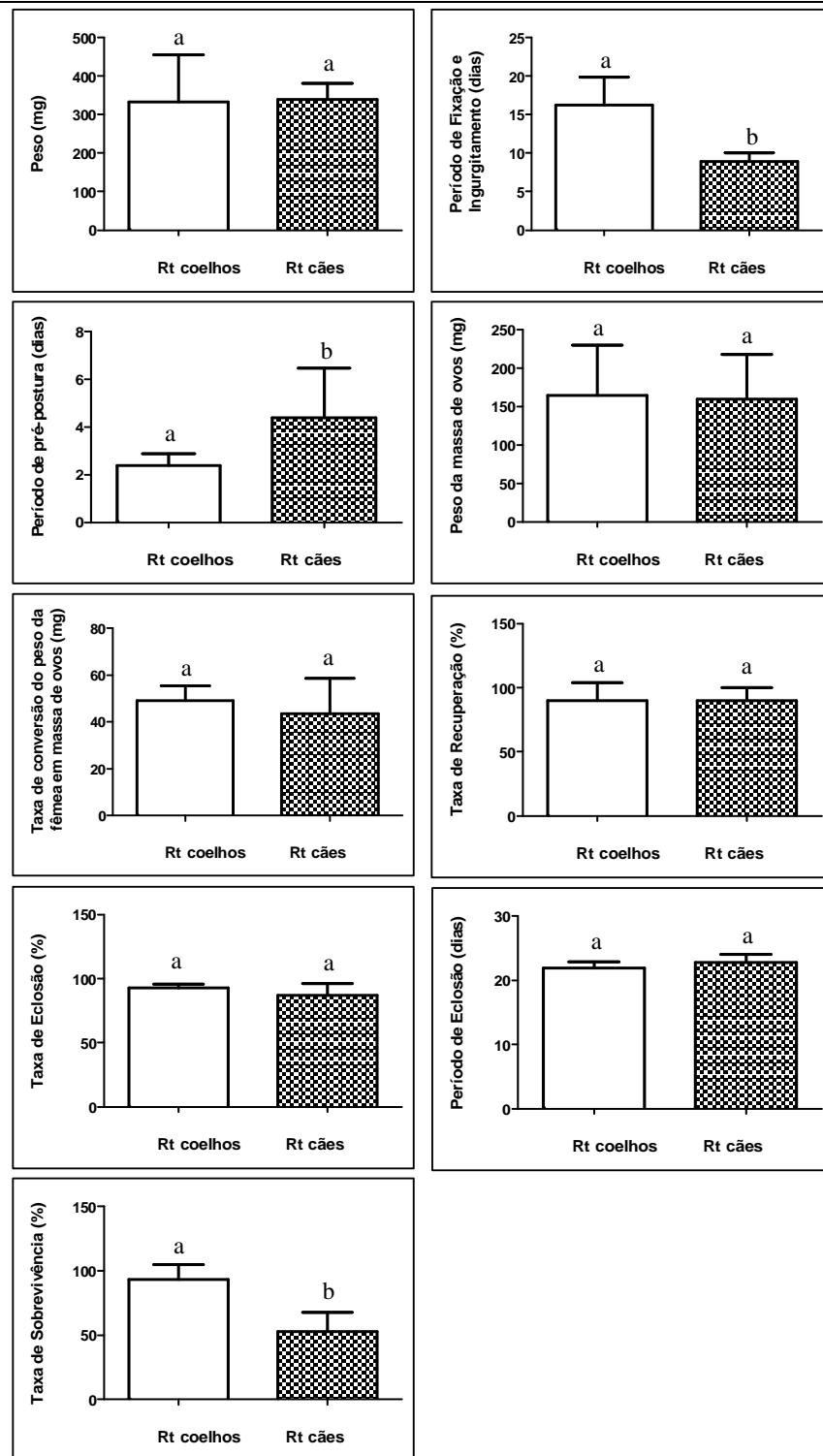


Figura 7. Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) alimentadas em coelhos e em cães domésticos. Rt = *Rhipicephalus turanicus*.

4.1.4 Cruzamento entre *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza)

Considerando-se as diferenças significativas existentes entre os parâmetros biológicos das fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) mostradas anteriormente, os resultados dos parâmetros biológicos obtidos dos cruzamentos foram apresentados separadamente em duas tabelas.

A **tabela 6** mostra os parâmetros biológicos de fêmeas virgens de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e após cruzamentos conspecíficos e transpecíficos.

O peso das fêmeas virgens de *R. sanguineus* (Jaboticabal) não apresentou diferença significativa quando comparado com as fêmeas cruzadas com machos de *R. turanicus* (Zaragoza), enquanto no cruzamento conspecífico as fêmeas mostraram-se 50% mais pesadas.

O período de ingurgitamento para as fêmeas de *R. sanguineus* (Jaboticabal) no cruzamento conspecífico foi de aproximadamente 7 dias, diferindo significativamente do período verificado para as fêmeas virgens e fêmeas cruzadas com machos de *R. turanicus* (Zaragoza), que foi em média de 22 dias.

A taxa de recuperação das fêmeas alimentadas foi de 67% para fêmeas virgens, significativamente diferente do valor obtido para fêmeas cruzadas com machos de *R. sanguineus* (Jaboticabal), que foi de 86%, e com fêmeas cruzadas com machos de *R. turanicus* (Zaragoza), que foi de 83%.

As fêmeas virgens não realizaram a ovipostura, permitindo-se descartar a ocorrência de partenogênese. Algumas fêmeas que tiveram cruzamentos transpecíficos a fizeram, porém o peso da massa de ovos foi baixo (10,7mg), assim como a taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos (19,5%).

É importante ressaltar que desses ovos não eclodiram larvas, ou seja, os ovos produzidos foram inférteis e o cruzamento não ocorreu com sucesso.

Tabela 6. Parâmetros biológicos de fêmeas virgens de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e de fêmeas cruzadas conspecificamente e transspecificamente, alimentadas em coelhos.

	Fêmeas virgens	Fêmeas Rs x Machos Rs	Fêmeas Rs x Machos Rt
PFI (mg)	53 ± 40 ^a	129 ± 30 ^b	51 ± 13 ^a
PMO (mg)	-	74 ± 20 ^a	10,7 ± 4 ^b
Ping (dias)	22,5 ± 7,06 ^a	7,58 ± 0,62 ^b	22 ± 2,56 ^a
PPP (dias)	-	5,13 ± 1,12 ^a	4 ± 2,19 ^a
PECLO (dias)	-	23,81 ± 1,22	-
% ECLO	-	92 ± 3,05	-
%IECO	-	56,68 ± 7,69 ^a	19,56 ± 0,03 ^b
% Rec	67 ± 7,07 ^a	86,6 ± 7,07 ^b	83,3 ± 7,07 ^b

PFI = peso da fêmea ingurgitada; **Ping** = período de ingurgitamento; **PMO** = peso da massa de ovos; **PPP** = período de pré-postura; **% ECLO** = taxa de eclosão de larvas; **PECLO** = período de eclosão de larvas; **% Rec** = taxa de recuperação; **% IEICO** = taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos; - = ausência de resultados; **Rs** = *Rhipicephalus sanguineus*; **Rt** = *Rhipicephalus turanicus*. Médias em uma linha seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$).

A **tabela 7** mostra os parâmetros biológicos para fêmeas virgens de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) e após cruzamentos conspecíficos e transpecíficos.

As fêmeas virgens de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) pesaram em média 39 mg, não apresentando diferença significativa em relação ao peso das fêmeas cruzadas com machos de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), que foi de 62 mg. Em contrapartida, o peso médio das fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) após cruzamento conspecífico foi significativamente maior (298 mg).

O período de ingurgitamento para as fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) no cruzamento conspecífico foi de aproximadamente 15 dias, diferindo significativamente do período verificado para as fêmeas virgens (27 dias) e fêmeas cruzadas com machos de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), que foi em média 26 dias.

Algumas fêmeas virgens, assim como algumas cruzadas transpecíficamente ovipositaram em média 10 mg de ovos inférteis, garantindo uma taxa de conversão de peso da fêmea em massa de ovos de em média 16%. Estes parâmetros foram significativamente diferentes quando comparados com o peso da massa de ovos das fêmeas no cruzamento conspecífico (146 mg) e com a taxa de conversão do peso da fêmea em massa de ovos (48%).

O período de pré-postura não apresentou diferença significativa para fêmeas virgens (8,4 dias) e fêmeas após o cruzamento transpecífico (9,6 dias), porém foi altamente significativo em relação ao cruzamento conspecífico, que foi de em média 2,84 dias. A taxa de recuperação de fêmeas alimentadas não mostrou diferença significativa em relação às condições analisadas.

A semelhança entre os parâmetros obtidos das fêmeas virgens de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) e daquelas alimentadas juntamente com machos de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) sugere que o cruzamento transpecífico não ocorreu com sucesso.

Tabela 7. Parâmetros biológicos de fêmeas virgens de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) e de fêmeas cruzadas conspecificamente e transpecificamente, alimentadas em coelhos.

	Fêmeas virgens	Fêmeas Rt x Machos Rt	Fêmeas Rt x Machos Rs
PFI (mg)	39 ± 22 ^a	298 ± 142 ^b	62 ± 25 ^a
PMO (mg)	10 ± 7 ^a	146 ± 72 ^b	12 ± 5 ^a
Ping (dias)	27,36 ± 7,61 ^a	15,73 ± 2,71 ^b	26,53 ± 10,19 ^a
Ppp (dias)	8,4 ± 2,60 ^a	2,84 ± 9,89 ^b	9,6 ± 6,37 ^a
Peclo (dias)	-	21,87 ± 0,99	-
Tx. Eclo (%)	-	85 ± 5	-
Tx. Conv. (%)	16,4 ± 8,8 ^a	48,55 ± 5,0 ^b	16,8 ± 6,3 ^a
Tx. Rec (%)	75 ± 7,0 ^a	86 ± 11 ^a	55 ± 21 ^a

PFI = peso da fêmea ingurgitada; **Ping** = período de ingurgitamento; **PMO** = peso da massa de ovos; **PPP** = período de pré-postura; % **ECLO** = taxa de eclosão de larvas; **PECLO** = período de eclosão de larvas; % **Rec** = taxa de recuperação; % **IECO** = taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos; - = ausência de resultados; **Rs** = *Rhipicephalus sanguineus*; **Rt** = *Rhipicephalus turanicus*. Médias em uma linha seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$).

4.1.5 Comparação dos parâmetros biológicos de fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) alimentadas em coelhos

Os resultados da comparação dos parâmetros biológicos de fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok) e Argentina (Rafaela) e também de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) alimentadas em coelhos estão apresentados na **tabela 8** e na **figura 8**.

O peso médio das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) mostrou-se significativamente menor do que o peso das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* da Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e também das fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), porém não mostrou diferença significativa em relação ao peso médio das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal).

Além disso, o peso médio das fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) também não mostrou diferença significativa quando comparado com o das fêmeas de *R. sanguineus* da Tailândia (Bangkok).

Os pesos das fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) e *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) também não mostraram diferenças significativas entre si. Por outro lado, os pesos das fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal) e Tailândia (Bangkok) foram significativamente menores do que os das fêmeas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

Quanto ao período de ingurgitamento, *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok) e Argentina (Rafaela) apresentaram um período médio de ingurgitamento de aproximadamente 10 dias, diferindo significativamente das fêmeas de *R. turanicus*, que apresentaram um período médio de ingurgitamento de aproximadamente 16 dias.

Quanto ao peso da massa de ovos, *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) Cuba (Havana) e Tailândia (Bangkok) não apresentaram

diferenças significativas, da mesma forma que *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), porém os dois grupos diferiram significativamente entre si.

Nos períodos de pré-postura e de eclosão houve diferença significativa apenas entre *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), cujos valores médios em dias foram de 4,3 e 19,3 e de 2,31 e 21,8, respectivamente.

Os demais parâmetros, como taxas de eclosão, recuperação e conversão do peso da fêmea em massa de ovos, não se mostraram significativamente diferentes.

Tabela 8. Parâmetros biológicos de fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

Parâmetros	Espécie/Localidade				
	<i>Rs Cub</i>	<i>Rs Bra</i>	<i>Rs Tai</i>	<i>Rs Arg</i>	<i>Rt Esp</i>
PFI (mg)	76,7 ± 30,23 ^a	132,3 ± 25,13 ^{a,b}	166,8 ± 29,96 ^b	285,1 ± 68,78 ^c	332,2 ± 123,29 ^c
Ping (dias)	10,5 ± 1,27 ^a	10,7 ± 0,82 ^a	9,9 ± 1,57 ^a	10,4 ± 2,59 ^a	16,2 ± 3,57 ^b
PMO (mg)	49,2 ± 8,35 ^a	66,2 ± 16,39 ^a	105,6 ± 24,65 ^a	158,1 ± 20,98 ^b	164,6 ± 65,13 ^b
PPP (dias)	3,0 ± 1,00 ^{a,b}	4,30 ± 1,18 ^a	4,0 ± 1,00 ^{a,b}	4,00 ± 0,81 ^{a,b}	2,37 ± 0,51 ^b
% ECLO	92,8 ± 2,16 ^a	91,9 ± 3,78 ^a	95,6 ± 3,78 ^a	93,4 ± 4,21 ^a	92,7 ± 2,96 ^a
PECLO (dias)	20,5 ± 1,73 ^{a,b}	19,3 ± 1,75 ^a	20,0 ± 1,41 ^{a,b}	21,4 ± 1,14 ^{a,b}	21,8 ± 0,99 ^b
% Rec	93,3 ± 11,54 ^a	90 ± 14,14 ^a	96,6 ± 5,77 ^a	76,6 ± 15,27 ^a	90 ± 10,00 ^a
%IECO	53,2 ± 3,62 ^a	50,04 ± 8,07 ^a	58,4 ± 13,30 ^a	50,4 ± 1,14 ^a	49,02 ± 6,31 ^a

PFI = peso da fêmea ingurgitada; **Ping** = período de ingurgitamento; **PMO** = peso da massa de ovos; **PPP** = período de pré-postura; **% ECLO** = taxa de eclosão de larvas; **PECLO** = período de eclosão de larvas; **% Rec** = taxa de recuperação; **% IECO** = taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos; **Rs** = *Rhipicephalus sanguineus*; **Rt** = *Rhipicephalus turanicus*; **Cub** = Cuba (Havana); **Bra** = Brasil (Jaboticabal), **Tai** = Tailândia (Bangkok); **Arg** = Argentina (Rafaela); **Esp** = Espanha (Zaragoza). Média em uma linha seguida pela mesma letra não difere significativamente ($p > 0,05$).

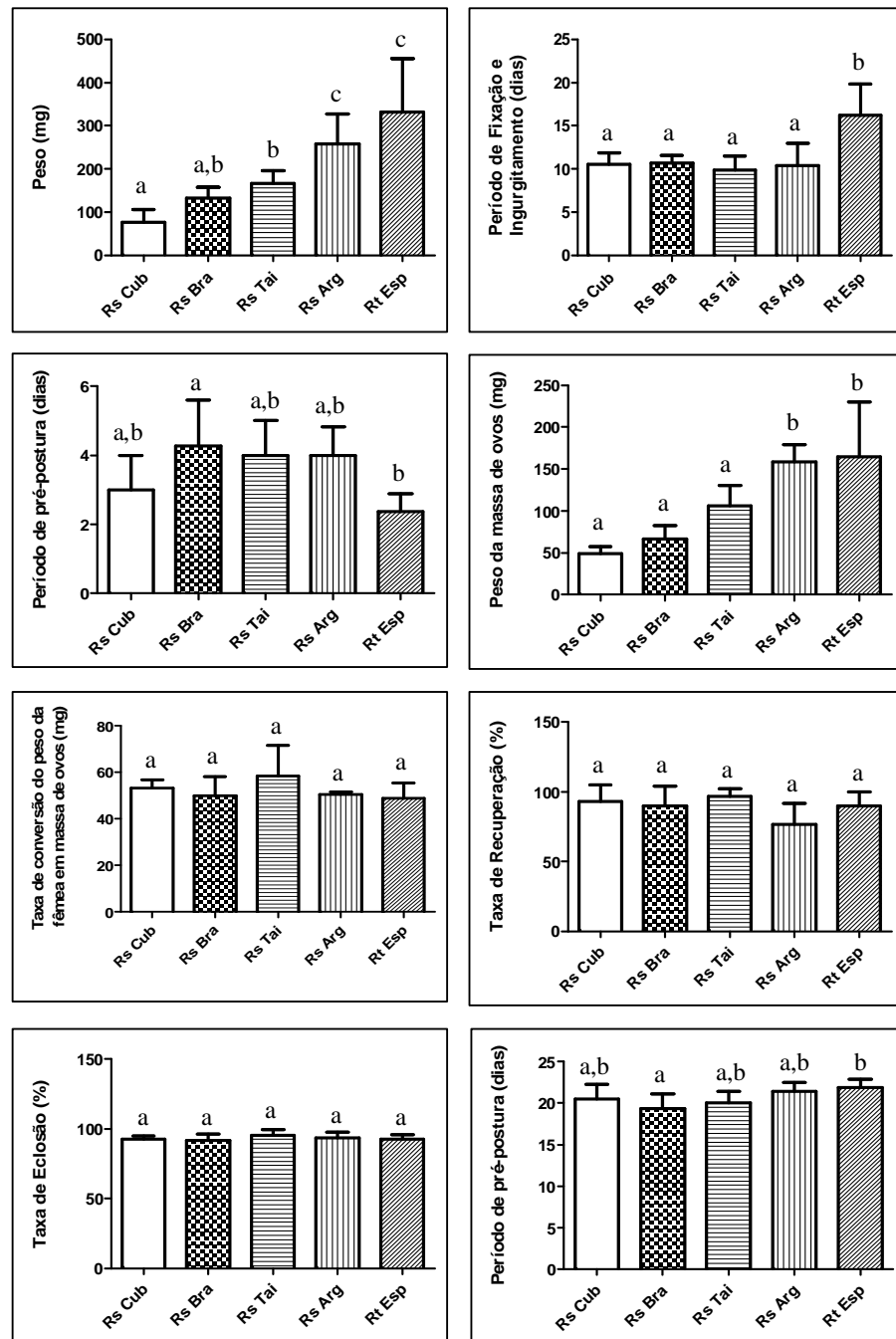


Figura 8. Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela), e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) alimentadas em coelhos.

4.2 Comparações morfométricas

4.2.1 Comparações morfométricas entre fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza)

A seguir, apresenta-se a comparação morfométrica de fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e também de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) (**tabela 9 e figuras 9a e 9b**).

As medidas do comprimento do gnátossoma de fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal) e Tailândia (Bangkok) não apresentaram diferenças significativas. A mesma medida obtida das fêmeas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) mostrou-se semelhante a das fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), porém significativamente diferente em relação às demais populações analisadas.

O comprimento da base do capítulo de fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) foi significativamente menor quando comparado com o de fêmeas das demais populações de carrapatos analisadas, cujas medidas mostraram-se semelhantes entre si.

A largura da base do capítulo de fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) mostrou-se semelhante a das fêmeas de *R. sanguineus* da Tailândia (Bangkok), porém mostraram-se significativamente diferentes em relação às demais populações de carrapatos estudadas.

Os comprimentos do palpo das fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Tailândia (Bangkok) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) não apresentaram diferenças significativas entre si. Em contrapartida, as fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) apresentaram a menor medida, enquanto as fêmeas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) apresentaram a maior medida, sendo significativamente diferentes entre si e também entre as fêmeas

de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Tailândia (Bangkok) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

Em relação à largura do palpo, as fêmeas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foram semelhantes entre si, porém mostraram diferenças significativas quando comparadas com as demais populações de carrapatos estudadas.

O comprimento médio do hipostômio não mostrou diferença significativa entre as populações de carrapatos analisadas. Já em relação à largura do hipostômio, as fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal) e Tailândia (Bangkok) mostraram-se semelhantes, assim como *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), porém os dois grupos mostraram-se significativamente diferentes entre si.

O comprimento do idiossoma das fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) foi de 2,10 mm, significativamente menor quando comparado com as outras populações. A mesma medida para fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) foi de 2,34 mm e para fêmeas de *R. sanguineus* da Tailândia (Bangkok) foi 2,41 mm, sendo semelhantes entre si. Os valores para as fêmeas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) e para *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foram, respectivamente, 3,15 mm e 3,66 mm, significativamente diferentes entre si e também entre as demais populações de carrapatos analisadas.

A largura do idiossoma das fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) foi de 1,36 mm, também significativamente menor quando comparado com as outras populações de carrapatos estudadas. A mesma medida para fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) foi de 1,64 mm e para fêmeas de *R. sanguineus* da Tailândia (Bangkok) foi 1,75 mm, sendo semelhantes entre si. Os valores para as fêmeas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) e para *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foram, respectivamente, 2,34 mm e 2,11 mm, semelhantes entre si, porém significativamente diferentes em relação às demais populações analisadas.

Os comprimentos do escudo das fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), *R. sanguineus* da Tailândia (Bangkok) e de *R. sanguineus* de

Cuba (Havana) foram semelhantes entre si. O comprimento do escudo das fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) também foi semelhante ao das fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) e Tailândia (Bangkok). O comprimento do escudo das fêmeas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) foi significativamente maior do que nas demais populações de carrapatos estudadas.

A largura do escudo das fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) foi significativamente menor que a das outras populações. A largura do escudo das fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) foi semelhante ao das fêmeas de *R. sanguineus* da Tailândia (Bangkok). Por outro lado, a largura do escudo das fêmeas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) não mostrou diferença significativa em relação às fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), porém ambas foram significativamente diferentes em relação às outras populações de carrapatos analisadas.

Os comprimentos do tarso I das fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foram semelhantes. Por outro lado, o comprimento do tarso I das fêmeas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) também foi semelhante ao das fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), porém mostrou-se significativamente diferente em relação às demais populações de carrapatos analisadas.

As larguras do tarso I das fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal) e Tailândia (Bangkok) foram semelhantes. Considerando a mesma medida, *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) também se mostraram semelhantes, porém, significativamente diferentes em relação às outras populações de carrapatos estudadas.

Os comprimentos das placas espiraculares das fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok) e Argentina (Rafaela) foram semelhantes. O comprimento da placa espiracular das fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foi semelhante ao das

fêmeas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela), porém significativamente diferente das demais populações de carrapatos analisadas.

As larguras do prolongamento dorsal das placas espiraculares das fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foram, respectivamente, de 0,11 mm; 0,11 mm; 0,12 mm; 0,13 mm e 0,13 mm, não mostrando diferenças significativas.

Tabela 9. Comparação morfométrica entre fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza). Médias em uma linha seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$).

Estrutura	<i>Rs Cub</i>		<i>Rs Bra</i>		<i>Rs Tai</i>		<i>Rs Arg</i>		<i>Rt Esp</i>	
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura
Gnatossoma	0,56 ± 0,03 ^a	-	0,59 ± 0,04 ^a	-	0,61 ± 0,03 ^a	-	0,69 ± 0,003 ^b	-	0,63 ± 0,04 ^{a,b}	-
Base do Capítulo	0,27 ± 0,02 ^a	0,69 ± 0,01 ^a	0,36 ± 0,03 ^b	0,65 ± 0,02 ^b	0,35 ± 0,03 ^b	0,70 ± 0,02 ^a	0,34 ± 0,03 ^b	0,83 ± 0,02 ^c	0,38 ± 0,06 ^b	0,77 ± 0,02 ^d
Palpo	0,32 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,005 ^{a,b}	0,28 ± 0,02 ^b	0,10 ± 0,01 ^a	0,33 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,01 ^{b,c}	0,42 ± 0,005 ^c	0,17 ± 0,01 ^c	0,35 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^c
Hipostômio	0,36 ± 0,06 ^a	0,13 ± 0,007 ^a	0,35 ± 0,05 ^a	0,12 ± 0,005 ^a	0,35 ± 0,09 ^a	0,13 ± 0,004 ^a	0,46 ± 0,02 ^a	0,17 ± 0,02 ^b	0,45 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,02 ^b
Idiossoma	2,10 ± 0,22 ^a	1,36 ± 0,08 ^a	2,34 ± 0,14 ^b	1,64 ± 0,10 ^b	2,41 ± 0,11 ^b	1,75 ± 0,13 ^b	3,15 ± 0,09 ^c	2,34 ± 0,08 ^c	2,66 ± 0,08 ^d	2,11 ± 0,08 ^c
Escudo	1,17 ± 0,01 ^{a,c}	1,21 ± 0,04 ^a	1,12 ± 0,06 ^a	1,16 ± 0,04 ^b	1,16 ± 0,08 ^{a,c}	1,20 ± 0,07 ^a	1,47 ± 0,03 ^b	1,59 ± 0,04 ^c	1,29 ± 0,01 ^c	1,52 ± 0,07 ^c
Tarso I	0,60 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,008 ^a	0,56 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,005 ^a	0,60 ± 0,02 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	0,66 ± 0,04 ^b	0,16 ± 0,01 ^b	0,61 ± 0,03 ^{a,b}	0,17 ± 0,02 ^b
Placa espiracular	0,37 ± 0,03 ^a	0,11 ± 0,01 ^a	0,37 ± 0,04 ^a	0,11 ± 0,01 ^a	0,37 ± 0,02 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	0,42 ± 0,02 ^{a,b}	0,13 ± 0,01 ^a	0,46 ± 0,02 ^b	0,13 ± 0,01 ^a

Rs Cub = *R. sanguineus* de Cuba (Havana); *Rs Bra* = *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal); *Rs Tai* = *R. sanguineus* da Tailândia (Bangkok); *Rs Arg* = *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela); *Rt Esp* = *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

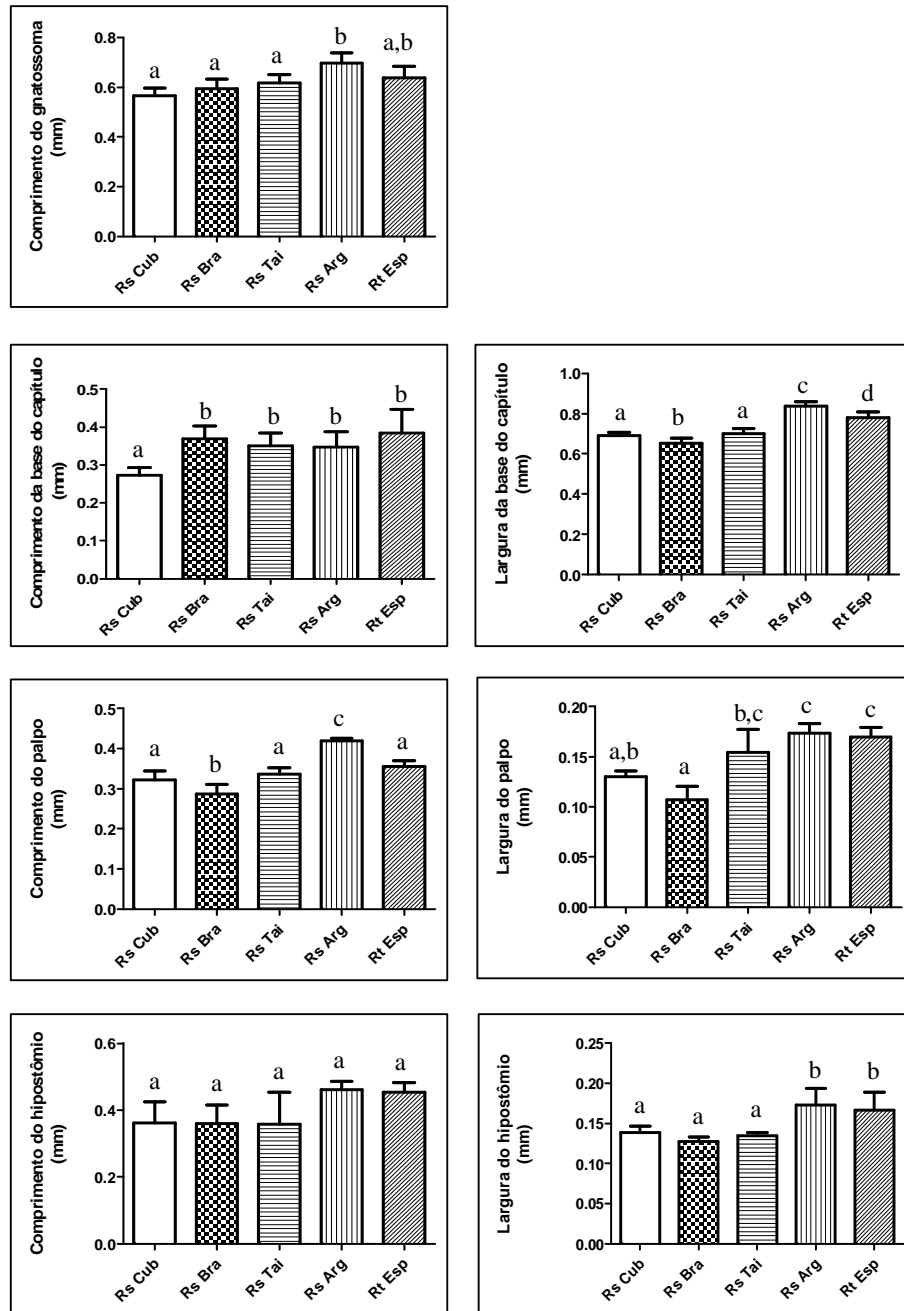


Figura 9a. Comparação morfométrica de fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

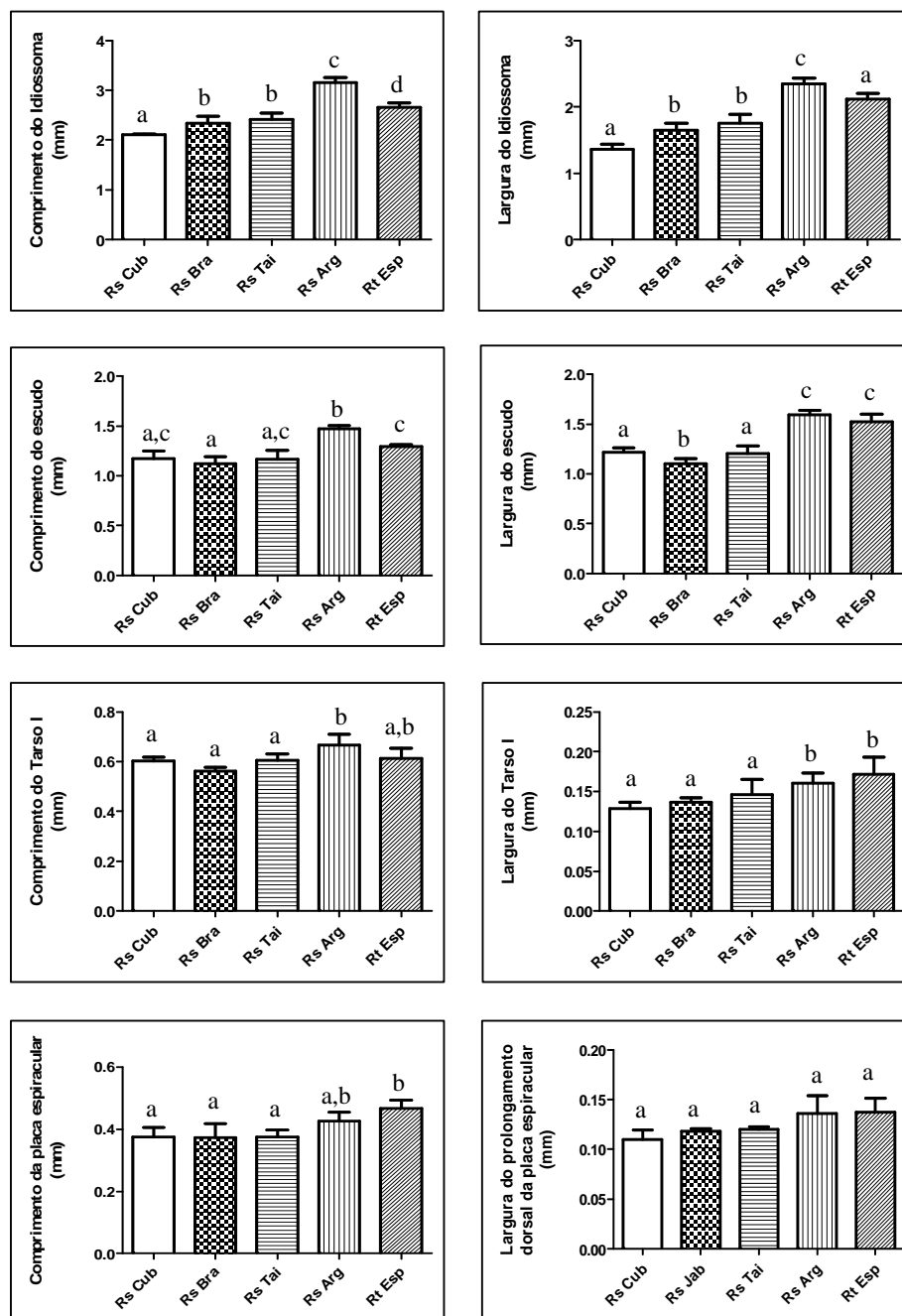


Figura 9b. Comparação morfométrica de fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

4.2.2 Comparações morfométricas entre machos de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), Cuba (Havana), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza)

A seguir apresenta-se a comparação morfométrica de machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Havana), Argentina (Rafaela) e também de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) (**tabela 10 e figuras 10a e 10b**).

O comprimento do gnatossoma de machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) foi significativamente menor do que das outras populações analisadas. Por outro lado, o comprimento do gnatossoma dos machos de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) não mostrou diferença significativa quando comparado com *R. sanguineus* da Tailândia (Bangkok) e também com *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela). Já os machos de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) mostraram-se semelhantes aos de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) em relação ao comprimento do gnatossoma, porém significativamente diferentes das demais populações de carrapatos estudadas.

O comprimento da base do capítulo dos machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) foi significativamente menor quando comparado com machos das outras populações. A mesma medida mostrou-se semelhante para machos de *R. sanguineus* de Jaboticabal (Brasil), Tailândia (Bangkok) e Argentina (Rafaela). Já o comprimento da base do capítulo dos machos de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foi maior e significativamente diferente em relação às demais populações de carrapatos analisadas.

As larguras da base do capítulo dos machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal) e Tailândia (Bangkok) não mostraram diferenças significativas. Esta medida para os machos de *R. sanguineus* da Tailândia (Bangkok) também não apresentou diferença significativa em relação aos machos de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza). Os machos de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) apresentaram a base do capítulo mais larga e

significativamente diferente em relação às demais populações de carrapatos estudadas.

Os comprimentos médios do palpo dos machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) e Brasil (Jaboticabal) mostraram-se semelhantes entre si, enquanto que os o comprimento médio do palpo dos machos de *R. sanguineus* da Tailândia (Bangkok) foram semelhantes aos de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela). Já o comprimento do palpo dos machos de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foi significativamente diferente em relação a estas populações de carrapatos analisadas.

As larguras médias dos palpos dos machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal) e Tailândia (Bangkok) não mostraram diferenças significativas entre si. Tal medida obtida para os machos de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) foi semelhante à de machos de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e da Tailândia (Bangkok).

Os comprimentos do hipostômio dos machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal) e Tailândia (Bangkok) não mostraram diferenças significativas entre si. Já a mesma medida para os machos de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) também foram semelhantes entre si, porém significativamente diferentes em relação às outras populações de carrapatos estudadas.

Quanto a largura do hipostômio, não houve diferença significativa entre as populações de carrapatos estudadas.

Os comprimentos do idiossoma dos machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal) e Tailândia (Bangkok) foram, respectivamente, de 2,24 mm, 2,34 mm e 2,35 mm, não mostrando diferenças significativas. A mesma medida para os machos de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) foi de 2,88 mm e para o *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foi de 2,63 mm, significativamente diferentes entre si e também entre as demais populações de carrapatos estudadas.

Quanto à largura do idiossoma, os machos de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) apresentaram a menor medida, sendo 1,32mm, porém não mostraram diferenças significativas em relação aos machos de *R. sanguineus*

de Cuba (Havana), que mediram 1,48mm. Em contrapartida, a largura do idiossoma dos machos de *R. sanguineus* da Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foram, respectivamente, de 1,50 mm, 1,86 mm e 1,69 mm, significativamente diferentes entre si e entre as demais populações de carrapatos estudadas.

Os comprimentos do tarso I dos machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) não mostraram diferenças significativas entre si. Já o comprimento do tarso I dos machos de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) foram significativamente diferentes destas populações de carrapatos analisadas.

As larguras do tarso I dos machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal) e Tailândia (Bangkok) não mostraram diferenças significativas. A mesma medida para os machos de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) também não mostraram diferenças significativas entre si e também quando comparados com os machos do Brasil (Jaboticabal) e da Tailândia (Bangkok).

Os comprimentos das placas espiraculares dos machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) não mostraram diferenças significativas. A mesma medida para machos de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) mostrou diferença significativa em relação aos machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), porém foram semelhantes as demais populações de carrapatos estudadas.

As larguras do prolongamento dorsal das placas espiraculares dos machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foram, respectivamente, de 0,10 mm; 0,10 mm; 0,10 mm; 0,12 mm e 0,12 mm, não mostraram diferenças significativas.

Os comprimentos das placas adanais dos machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal) e Tailândia (Bangkok) foram, respectivamente, de 0,55 mm, 0,62 mm e 0,62 mm, não mostrando diferenças significativas. A mesma medida para os machos de *R. turanicus* da Espanha

(Zaragoza) foi de 0,69 mm, também não mostrando diferenças significativas em relação aos machos de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e Tailândia (Bangkok). Os machos de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) apresentaram a maior medida, 0,80 mm, sendo semelhantes apenas em relação aos machos de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

As larguras das placas adanais dos machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) não mostraram diferenças significativas, enquanto que apenas os machos de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) mostraram diferenças significativas em relação a estas populações de carrapatos.

Tabela 10. Comparação morfométrica entre machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza). Média em uma linha seguida pela mesma letra não difere significativamente ($p > 0,05$).

Estrutura	<i>Rs Cub</i>		<i>Rs Bra</i>		<i>Rs Tai</i>		<i>Rs Arg</i>		<i>Rt Esp</i>	
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura
Gnatossoma	0,45 ± 0,03 ^a	-	0,55 ± 0,04 ^{b,c}	-	0,54 ± 0,03 ^b	-	0,60 ± 0,002 ^{c,d}	-	0,62 ± 0,04 ^d	-
Base do Capítulo	0,22 ± 0,01 ^a	0,56 ± 0,03 ^a	0,35 ± 0,02 ^b	0,58 ± 0,04 ^{a,c}	0,35 ± 0,02 ^b	0,57 ± 0,03 ^a	0,32 ± 0,01 ^b	0,7 ± 0,02 ^b	0,4 ± 0,03 ^c	0,65 ± 0,06 ^{b,c}
Palpo	0,25 ± 0,009 ^a	0,11 ± 0,004 ^a	0,23 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,01 ^{a,b,c}	0,30 ± 0,01 ^b	0,13 ± 0,01 ^{a,b}	0,31 ± 0,02 ^b	0,15 ± 0,01 ^{b,c}	0,26 ± 0,01 ^c	0,15 ± 0,01 ^c
Hipostômio	0,33 ± 0,001 ^a	0,11 ± 0,007 ^a	0,32 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,007 ^a	0,32 ± 0,03 ^a	0,11 ± 0,005 ^a	0,42 ± 0,02 ^b	0,12 ± 0,009 ^a	0,42 ± 0,006 ^b	0,12 ± 0,009 ^a
Idiossoma	2,24 ± 0,05 ^a	1,48 ± 0,08 ^{a,b}	2,34 ± 0,15 ^a	1,32 ± 0,13 ^a	2,35 ± 0,10 ^a	1,50 ± 0,10 ^b	2,88 ± 0,05 ^b	1,86 ± 0,07 ^c	2,63 ± 0,20 ^c	1,69 ± 0,06 ^d
Tarso I	0,52 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	0,50 ± 0,03 ^a	0,14 ± 0,01 ^{a,b}	0,53 ± 0,03 ^a	0,15 ± 0,01 ^{a,b}	0,60 ± 0,02 ^b	0,16 ± 0,03 ^b	0,55 ± 0,04 ^a	0,17 ± 0,01 ^b
Placa espiracular	0,42 ± 0,05 ^a	0,10 ± 0,01 ^a	0,45 ± 0,06 ^{a,b}	0,10 ± 0,01 ^a	0,47 ± 0,02 ^{a,b}	0,10 ± 0,01 ^a	0,55 ± 0,03 ^b	0,12 ± 0,01 ^a	0,49 ± 0,08 ^{a,b}	0,12 ± 0,01 ^a
Placa adanal	0,55 ± 0,06 ^a	0,25 ± 0,03 ^a	0,62 ± 0,08 ^{a,c}	0,24 ± 0,01 ^a	0,62 ± 0,05 ^{a,c}	0,29 ± 0,01 ^a	0,80 ± 0,05 ^{b,c}	0,37 ± 0,04 ^b	0,69 ± 0,09 ^c	0,28 ± 0,03 ^a

Rs Cub = *R. sanguineus* de Cuba (Havana); *Rs Bra* = *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal); *Rs Tai* = *R. sanguineus* da Tailândia (Bangkok); *Rs Arg* = *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela); *Rt Esp* = *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

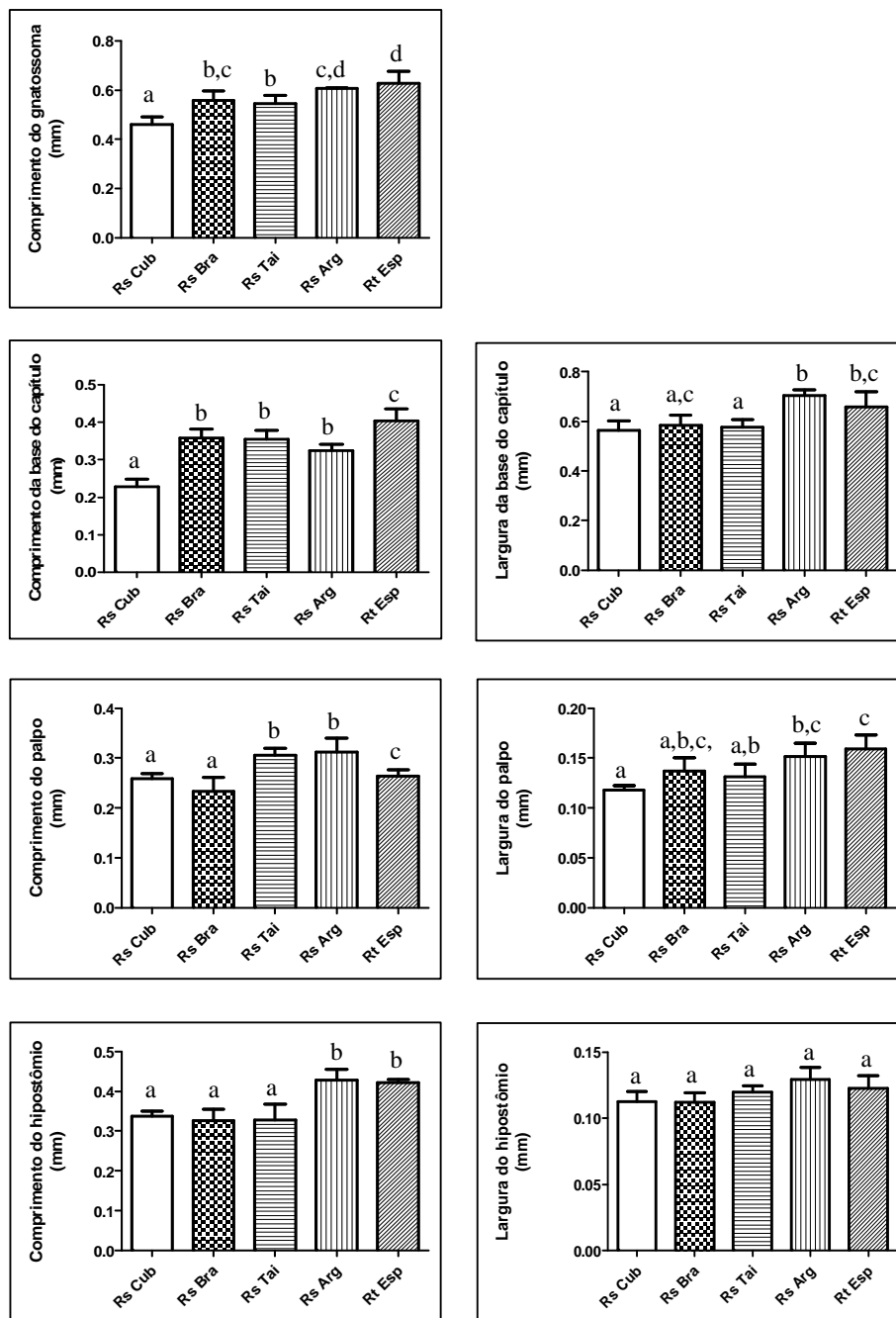


Figura 10a. Comparação morfométrica de machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

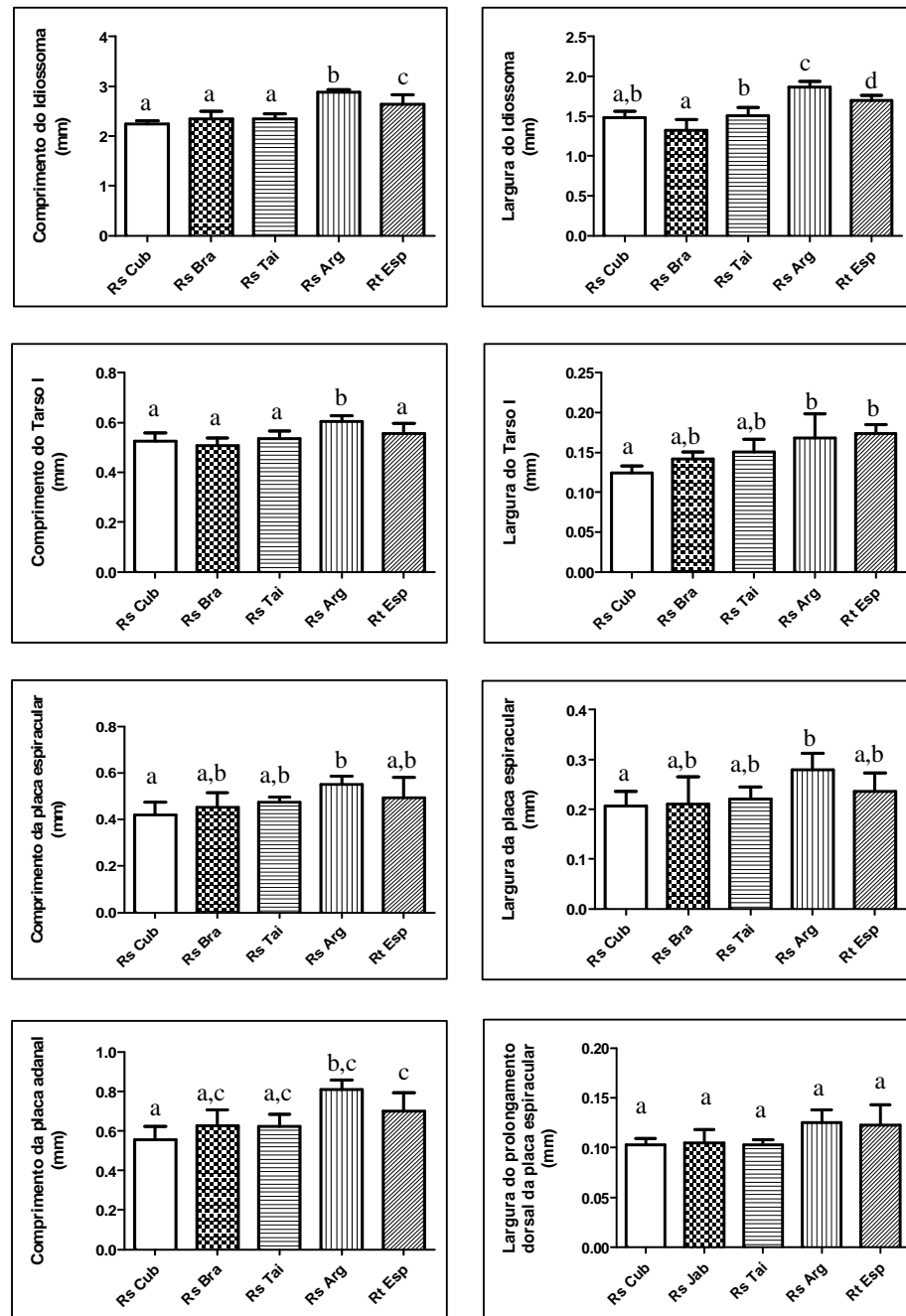


Figura 10b. Comparação morfométrica de machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza).

4.3 Comparações Morfológicas

As fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) (**Figura 11A**) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) (**Figura 11I**) apresentam áreas porosas pouco evidentes quando comparadas com *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok) e Argentina (Rafaela).

As fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) (**Figura 11I**) apresentam o escudo mais pontuado e com menos cerdas do que as demais espécies de carrapatos estudadas.

Os machos de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) (**Figura 11J**) apresentam pontuações no idiossoma e poucas cerdas, quando comparados com as demais espécies de carrapatos estudadas.

As fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) apresentam aurículas arredondadas, enquanto fêmeas e machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) (**Figura 12A, B**) e fêmeas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) (**Figura 12G**) apresentam aurículas ligeiramente retas.

Os machos de *R. sanguineus* da Argentina (**Figura 12H**) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) (**Figura 12J**) apresentam prolongamentos ventrais do artigo I do palpo em forma de espinho, diferentemente dos machos das demais espécies de carrapatos estudadas.

O idiossoma das fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) e do Brasil (Jaboticabal) apresenta-se alongado, com a extremidade hexagonal e sulcos póstero-laterais e póstero-medianos salientes (**Figura 13A, C**). Nas demais populações o idiossoma tem a extremidade arredondada ou ovalada e sulcos póstero-laterais e póstero-medianos pouco salientes.

As fêmeas de *R. sanguineus* de Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) possuem linha marginal bastante evidente (**Figura 13E, G e I**).

As placas adanais dos machos das diferentes populações de carrapatos estudadas mostram variações de forma e tamanho. Os machos de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) apresentam placas espiraculares

aparentemente menores (**Figura 14B e 15A**) do que a dos machos das demais populações de carrapatos. Os machos de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) apresentam placas espiraculares com formato mais alongado (**Figura 14D e 15B**), enquanto os machos de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) (**Figura 14H e 15 D**) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) (**Figura 14I e 15 E**) apresentam as placas espiraculares bastante semelhantes, sendo mais largas posteriormente do que as placas dos machos das outras populações de carrapatos estudadas.

As placas espiraculares dos machos (**Figura 15F-J**) e também das fêmeas (**Figura 15K-O**) de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) apresentaram prolongamentos dorsais estreitos. O prolongamento dorsal das placas espiraculares de machos e fêmeas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) mostraram-se pouco mais largo (vide comparações morfométricas) do que para as demais populações de carrapatos, porém, em média, não excederam a metade da largura do festão adjacente (dados não apresentados).

Considerando a abertura genital das fêmeas (**Figura 15P-T**), todas as populações de carrapatos analisadas apresentaram a abertura em forma de U.

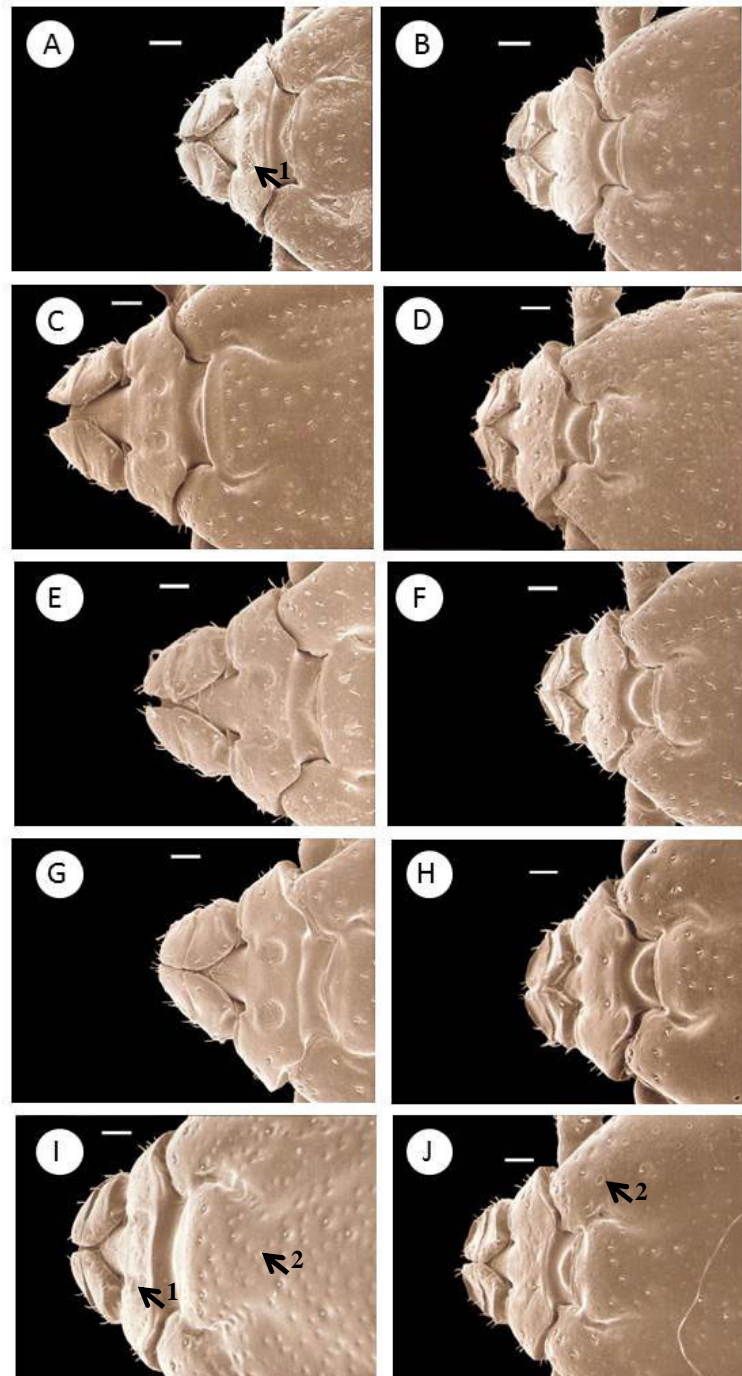


Figura 11. Gnatosoma dorsal de fêmeas (esquerda) e machos (direita) de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) (A e B), Brasil (Jaboticabal) (C e D), Tailândia (Bangkok) (E e F), Argentina (Rafaela) (G e H) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) (I e J). Barra de escala = 100μm. Setas indicando: 1 = área porosa pouco evidente; 2 = presença de pontuações).

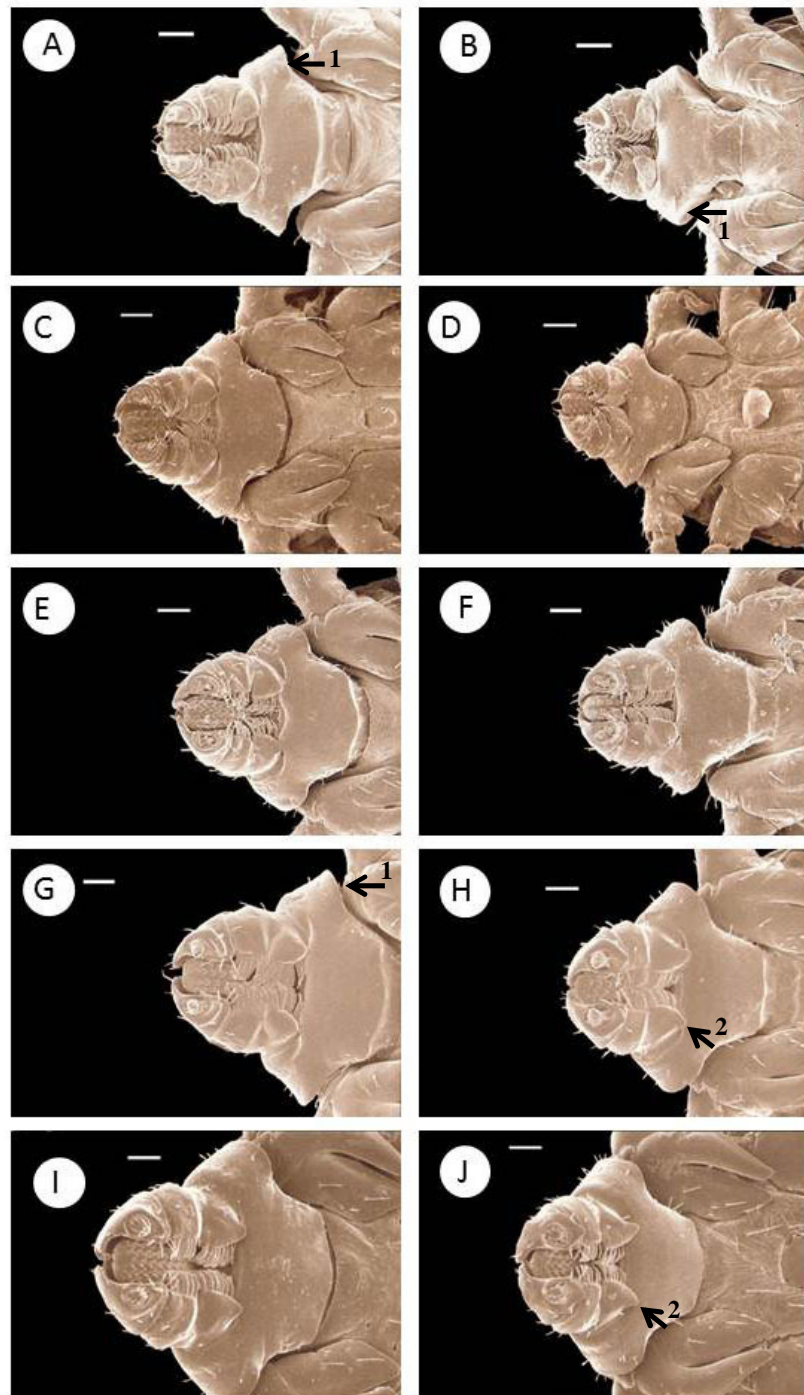


Figura 12. Gnatossoma ventral de fêmeas (esquerda) e machos (direita) de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) (A e B), Brasil (Jaboticabal) (C e D), Tailândia (Bangkok) (E e F), Argentina (Rafaela) (G e H) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) (I e J). Barra de escala = 100 μ m. Setas indicando: 1 = aurículas ligeiramente retas; 2 = prolongamento ventral do artículo I do palpo em forma de espinho.

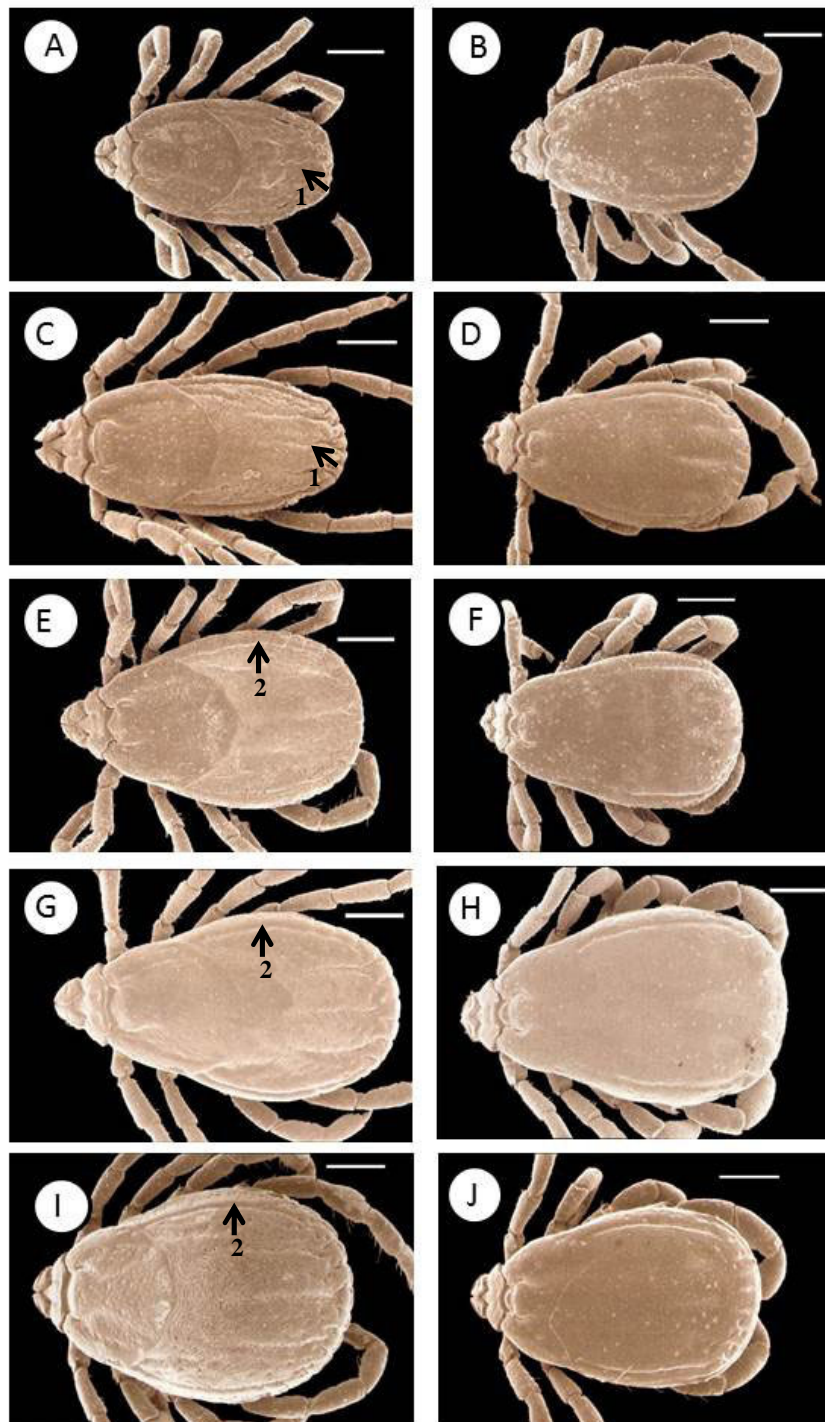


Figura 13. Idiossoma dorsal de fêmeas (esquerda) e machos (direita) de *R. sanguineus* de Cuba (A e B), Brasil (C e D), Tailândia (E e F), Argentina (G e H) e de *R. turanicus* da Espanha (I e J). Barra de escala = 500µm. Setas indicando: 1 = sulcos póstero-laterais e póstero medianos salientes; 2 = linha marginal evidente.

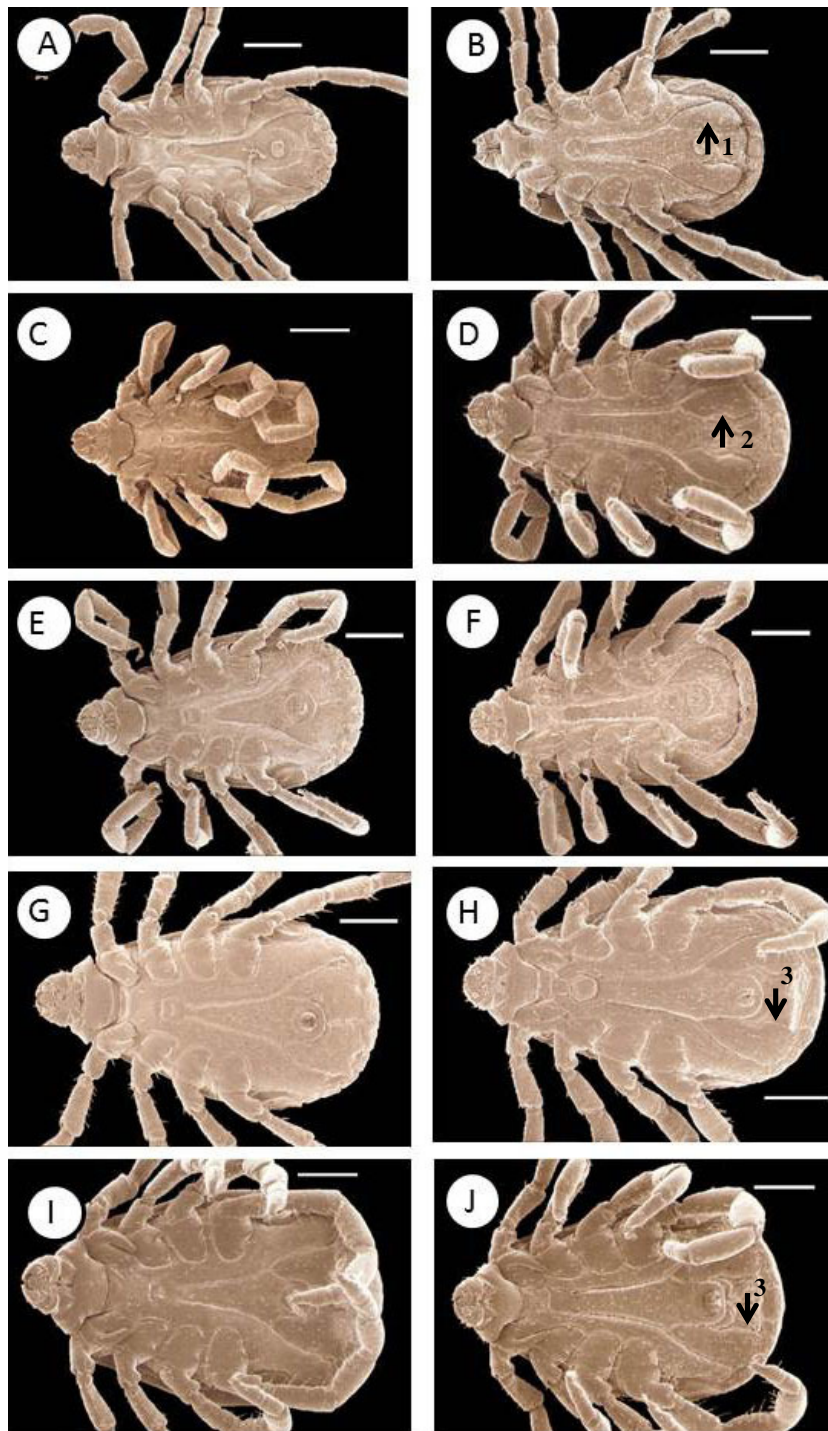


Figura 14. Idiossoma ventral de fêmeas (esquerda) e machos (direita) de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) (A e B), Brasil (Jaboticabal) (C e D), Tailândia (Bangkok) (E e F), Argentina (Rafaela) (G e H) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) (I e J). Barra de escala = 500 μ m. Setas indicando: 1 = placas adanais curtas; 2 = placas adanais alongadas; 3 = placas adanais com base posterior larga.

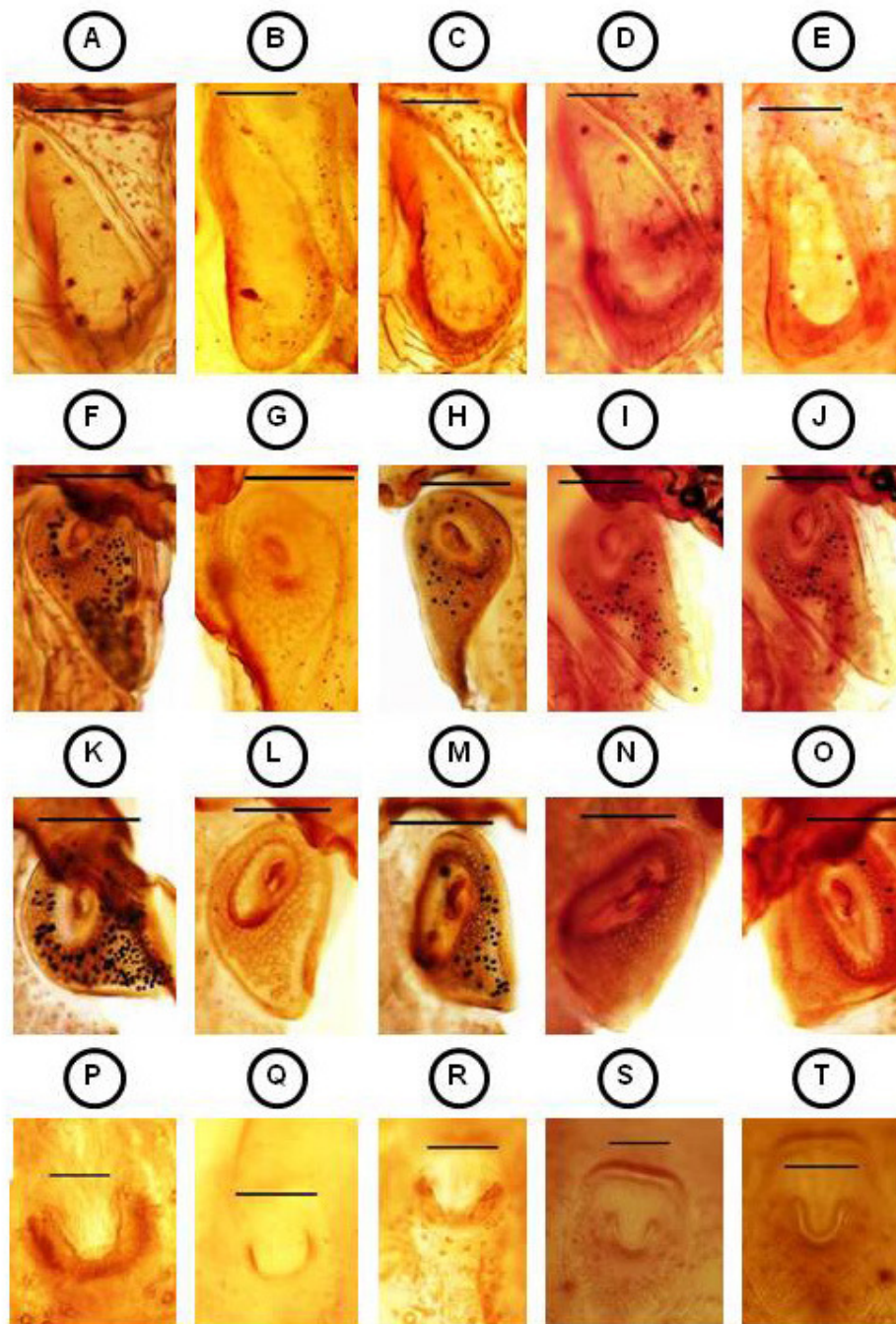


Figura 15. Placas adanaís de machos (A-E), placas espiraculares de machos (F-J), placas espiraculares de fêmeas (K-O) e abertura genital de fêmeas (P-T) de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) (A, F, K, P), Brasil (Jaboticabal) (B, G, L, Q), Tailândia (Bangkok) (C, H, M, R), Argentina (Rafaela) (D, I, N, S) e de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) (E, J, O, T). Barra de escala: A-O = 200µm; P-T = 50µm.

4.4 Comparações moleculares

4.4.1 Análise das sequências de fragmentos do gene 16S rDNA

A **Tabela 11** mostra o número de acesso no GenBank das sequências das espécies e isolados geográficos incluídos nas análises filogenéticas baseadas em fragmentos do gene do 16S rDNA, assim como as novas sequências obtidas no presente estudo.

Tabela 11. Espécies e isolados geográficos utilizados nas análises filogenéticas baseadas em fragmentos do gene 16S rDNA, localidade e código de acesso no Genbank.

Espécie	Localidade	Genbank
<i>R. sanguineus</i> *	Jaboticabal, Brasil	JX997391
<i>R. sanguineus</i> *	Rio Claro, Brasil	JX997392
<i>R. sanguineus</i> *	Libertad, Colômbia	JX997390
<i>R. sanguineus</i> *	Havana, Cuba	JX997389
<i>R. sanguineus</i> *	Cuba	JX997388
<i>R. sanguineus</i> *	Tailândia	JX997387
<i>R. sanguineus</i>	Alemanha	JF928517
<i>R. sanguineus</i>	Alemanha	JF928495
<i>R. sanguineus</i>	China	JF979378
<i>R. sanguineus</i>	França	JQ362400
<i>R. sanguineus</i>	França	JQ362409
<i>R. sanguineus</i>	França	JQ362405
<i>R. sanguineus</i>	França	JQ362401
<i>R. sanguineus</i>	Espanha	GU553081
<i>R. sanguineus</i> sp2	Espanha	KC243843
<i>R. sanguineus</i> sp1	Grécia	KC243839
<i>R. sanguineus</i> sp3	Índia	KC243848
<i>R. sanguineus</i> sp4	Nigéria	KC243849
<i>R. sanguineus</i> s. l.	Brasil	KC243836
<i>R. sanguineus</i> s. l.	África do Sul	KC243835
<i>R. sanguineus</i>	Rafaela, Argentina	GU553078
<i>R. sanguineus</i>	Chile	GU553077

<i>R. sanguineus</i>	Itália	GU553083
<i>R. sanguineus</i>	Haplotipo Tropical A ¹	GU553074
<i>R. sanguineus</i>	Haplotipo Tropical B ²	GU553075
<i>R. sanguineus</i>	Haplotipo Temperado ³	GU553084
<i>R. sanguineus</i>	Colômbia	GU553076
<i>R. sanguineus</i>	África do Sul	GU553079
<i>R. sanguineus</i>	Formosa, Argentina	JX195172
<i>R. sanguineus</i>	Buenos Aires, (ARG)	JX195171
<i>R. sanguineus</i>	Misiones, Argentina	JX195170
<i>R. sanguineus</i>	Misiones, Argentina	JX195169
<i>R. sanguineus</i>	Corrientes, Argentina	JX195167
<i>R. sanguineus</i>	Corrientes, Argentina	JX195168
<i>R. sanguineus</i>	África do Sul	JX195174
<i>R. sanguineus</i>	Formosa, Argentina	JX206980
<i>R. sanguineus</i>	Salta, Argentina	JX206981
<i>R. sanguineus</i>	Moçambique	JX195173
<i>R. sanguineus</i>	Israel	L34302
<i>R. sanguineus</i>	Taiwan	DQ093297
<i>R. sanguineus</i>	Tailândia	DQ016293
<i>R. turanicus</i> *	Espanha	JX997393
<i>R. turanicus</i>	Espanha	GU553082
<i>R. turanicus</i>	Israel	L34303
<i>R. turanicus</i>	Itália, Sicília	KC243857
<i>H. dromedarii</i>	-	L34306
<i>H. lusitanicum</i>	-	Z97881
<i>H. marginatum</i>	-	L34307

* = novas sequências obtidas no presente estudo.

¹= Brasil: Uberlândia (MG), Cuiabá (MT), Sinop (MT), Guarantã do Norte (MT), Recife (PE), Fortaleza (CE), Cumbuco (CE).

²= Brasil: Garopaba (SC), Jaboticabal (SP), Seropédica (RJ), Itabira (MG), Nova Venêcia (ES), João Pessoa (PB), Teresina (PI), Macapá (AP), Porto Velho (RO); Venezuela: El Vigia (Mérida), Los Roques Archipelago.

³= Brasil: Santa Maria (RS); Uruguai: Montevideo.

Primeiramente foram analisadas as sequências de fragmentos do gene 16S rDNA de carrapatos *R. sanguineus* encontrados nas Américas pelo método “Pairwise distances”, pelo qual também foi computado o número de

diferenças encontradas entre cada par. Esses resultados encontram-se na **Figura 16**.

Em seguida, foram incluídas sequências de linhagens de *R. sanguineus* e de *R. turanicus* dos demais continentes para as análises filogenéticas. As análises filogenéticas utilizando os métodos de Agrupamento de Vizinhos são apresentadas na **Figura 17**, Máxima Verossimilhança na **Figura 18** e Máxima Parcimônia na **Figura 19**.

OTUs	TropA	TropB	TempE	RsJ	RsRC	RsCu	RsCH	RsCL	Isol1	Isol2	Isol3	Isol4	Isol6	Isol7	Isol10	Isol11	ChiD	ColC	RaF
TropA	-	1	22	0	0	1	1	1	22	21	22	22	22	23	0	0	20	2	21
TropB	0,3	-	23	1	1	0	0	0	23	22	23	23	23	24	1	1	21	1	22
TempE	5,5	5,8	-	22	22	23	23	23	0	1	0	2	2	3	22	22	2	24	1
RsJ	0,0	0,3	5,5	-	0	1	1	1	22	21	22	22	22	23	0	0	20	2	21
RsRC	0,0	0,3	5,5	0,0	-	1	1	1	22	21	22	22	22	23	0	0	20	2	21
RsCu	0,3	0,0	5,8	0,2	0,2	-	0	0	23	22	23	23	23	24	1	1	21	1	22
RsCH	0,3	0,0	5,8	0,2	0,2	0,0	-	0	23	22	23	23	23	24	1	1	21	1	22
RsCL	0,3	0,0	5,8	0,2	0,2	0,0	0,0	-	23	22	23	23	23	24	1	1	21	1	22
Isol1	5,5	5,8	0,0	5,4	5,4	5,7	5,7	5,7	-	1	0	2	2	3	22	22	2	24	1
Isol2	5,3	5,5	0,3	5,2	5,2	5,4	5,4	5,4	0,2	-	1	1	1	2	21	21	1	23	0
Isol3	5,5	5,8	0,0	5,4	5,4	5,7	5,7	5,7	0,0	0,2	-	2	2	3	22	22	2	24	1
Isol4	5,5	5,8	0,5	5,4	5,4	5,7	5,7	5,7	0,5	0,2	0,5	-	2	1	22	22	2	24	1
Isol6	5,5	5,8	0,5	5,4	5,4	5,7	5,7	5,7	0,5	0,2	0,5	0,5	-	3	22	22	2	24	1
Isol7	5,8	6,0	0,8	5,7	5,7	5,9	5,9	5,9	0,7	0,5	0,7	0,2	0,7	-	23	23	3	25	2
Isol10	0,0	0,3	5,5	0,0	0,0	0,2	0,2	0,2	5,4	5,2	5,4	5,4	5,4	5,7	-	0	20	2	21
Isol11	0,0	0,3	5,5	0,0	0,0	0,2	0,2	0,2	5,4	5,2	5,4	5,4	5,4	5,7	0,0	-	20	2	21
ChiD	5,0	5,3	0,5	5,0	5,0	5,3	5,3	5,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,8	5,0	5,0	-	22	1
ColC	0,5	0,3	6,0	0,5	0,5	0,3	0,3	0,3	6,0	5,8	6,0	6,0	6,0	6,3	0,5	0,5	5,5	-	23
RaF	5,3	5,5	0,3	5,3	5,3	5,5	5,5	5,5	0,3	0,0	0,3	0,3	0,3	0,5	5,3	0,1	0,3	5,8	-

Figura 16. Análise das sequências de fragmentos do gene 16S rDNA de *R. sanguineus* das Américas. Distâncias entre pares abaixo da diagonal, em porcentagem, e número de diferença entre pares acima da diagonal. TropA = haplotipo tropical A; Trop B = haplotipo tropical B; TempE = haplotipo temperado E; RsJ = *R. sanguineus* Jaboticabal; RsRC = *R. sanguineus* Rio Claro; RsCu = *R. sanguineus* Cuba; RsCH = *R. sanguineus* Cuba (Havana); RsCL = *R. sanguineus* Colômbia (Libertad); Isol1 = (JX195167); Isol2 = (JX195168); Isol3 = (JX195169); Isol4 = (JX195170); Isol6 = (JX195171); Isol 7 = (JX195172); Isol10 = (JX206980); Isol11 = (JX206981); ChiD = haplotipo Chile; ColC = haplotipo Colômbia; RaF = haplotipo Rafaela.

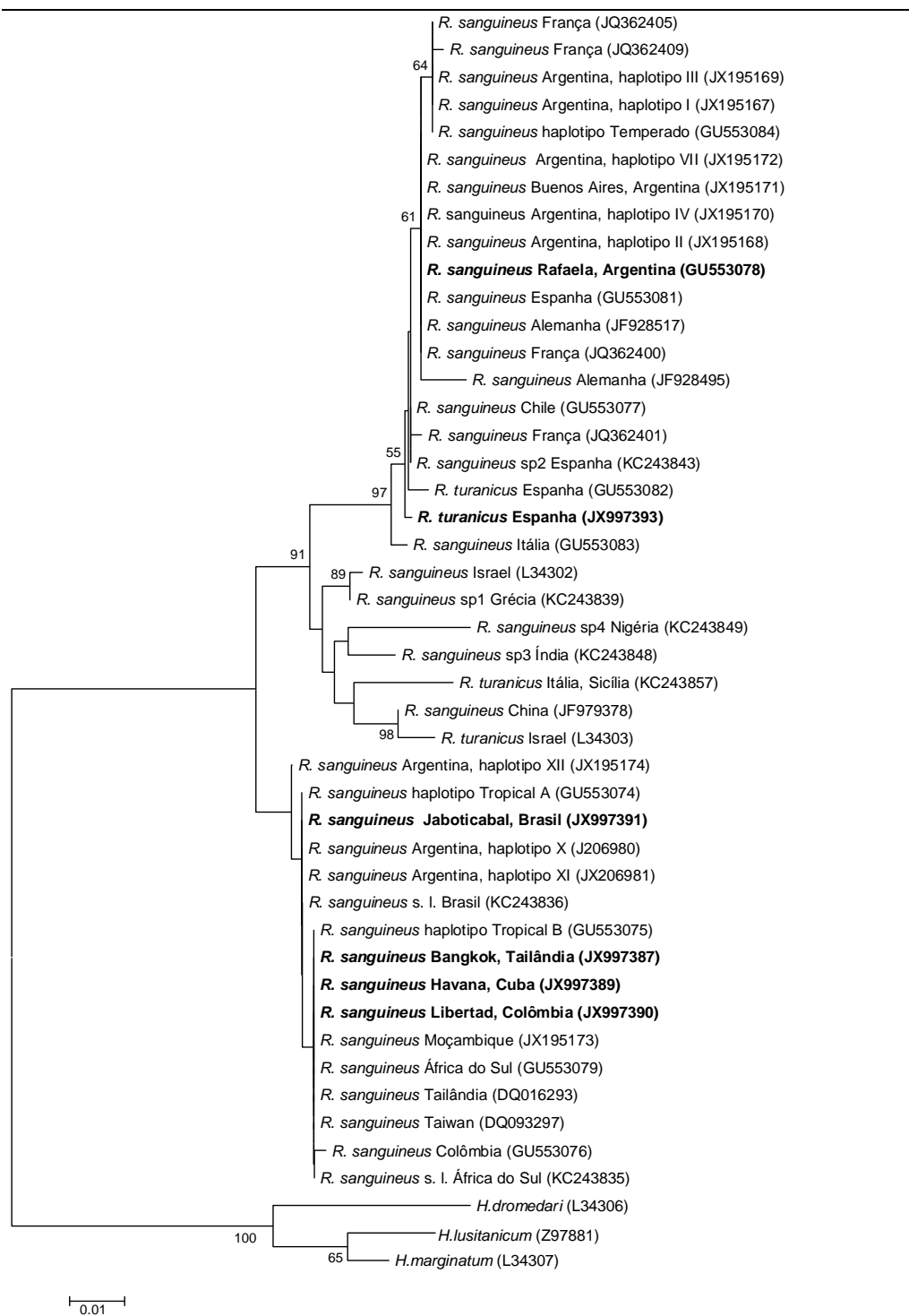


Figura 17. Árvore filogenética baseada em um fragmento de 460 pares de bases do gene 16S rDNA de *R. sanguineus* e *R. turanicus* obtida com o método de Agrupamento de Vizinhos. O bootstrap está representado nos nós da árvore e os números de acessos no GenBank estão indicados entre parênteses. *H. marginatum* foi usado como "outgroup".

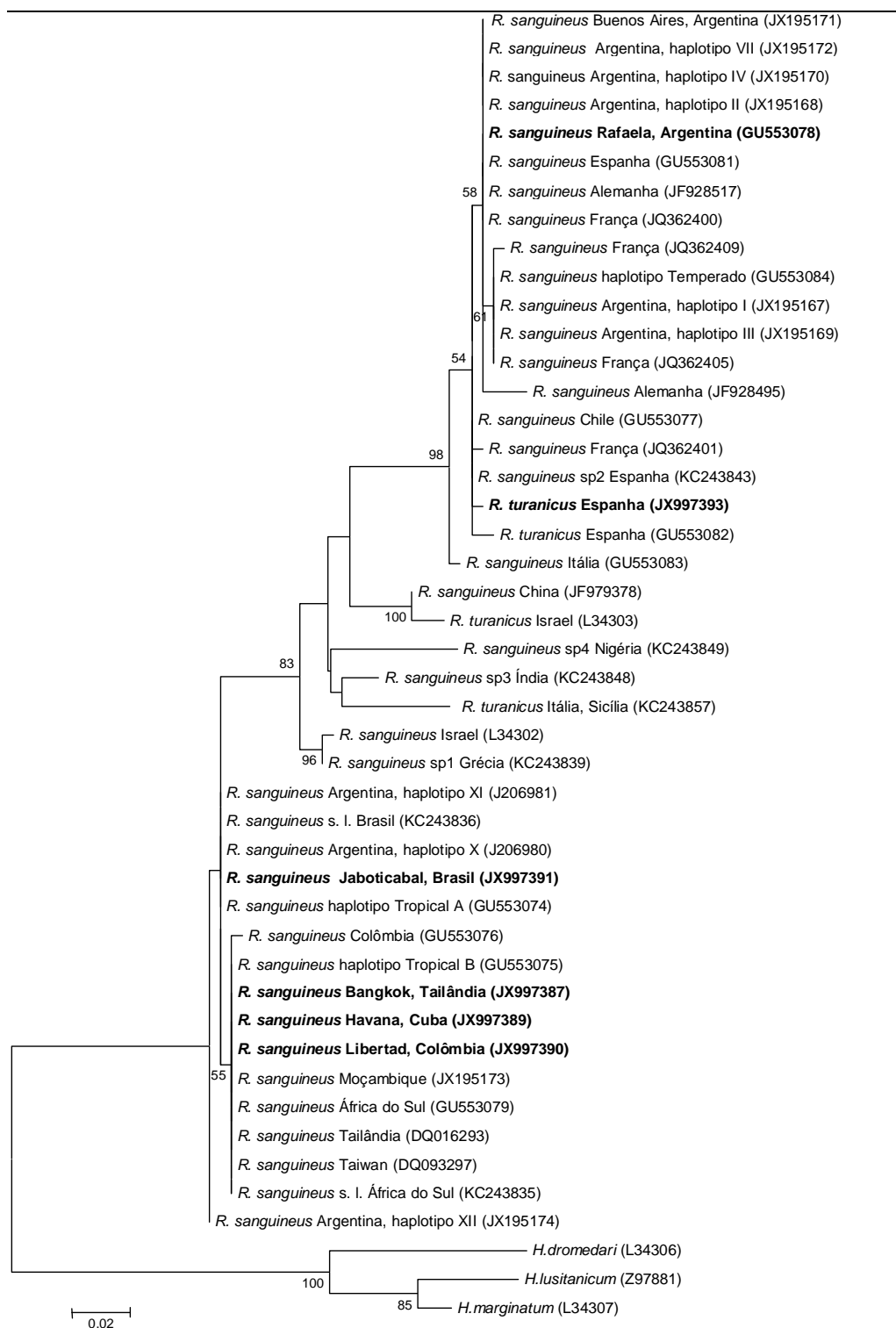


Figura 18. Árvore filogenética baseada em um fragmento de 460 pares de bases do gene 16S rDNA de *R. sanguineus* e *R. turanicus* obtida com o método de Máxima Verossimilhança. O bootstrap está representado nos nós da árvore e os números de acessos no GenBank estão indicados entre parênteses. *H. marginatum* foi usado como "outgroup".

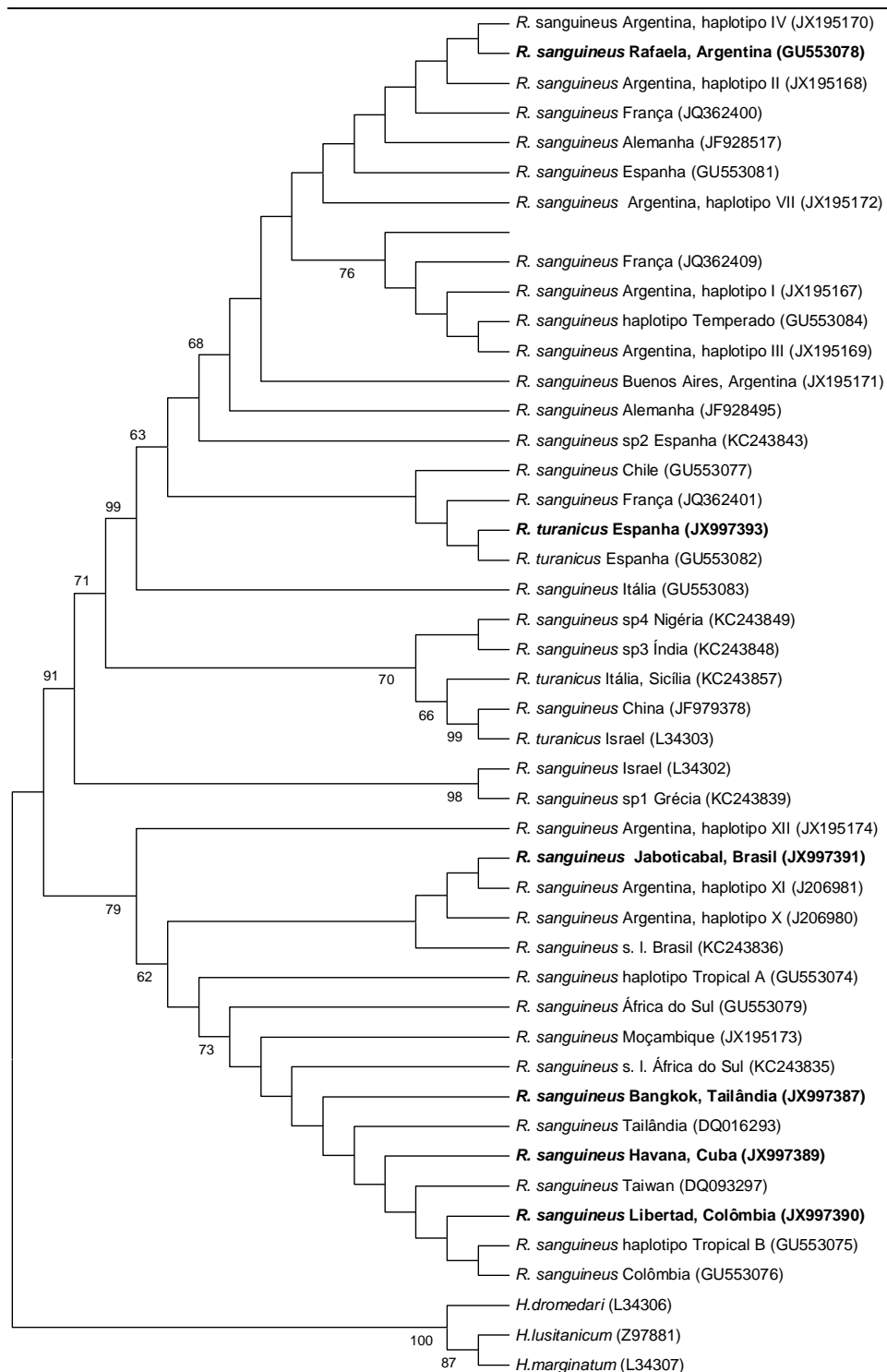


Figura 19. Árvore filogenética baseada em um fragmento de 460 pares de bases do gene 16S rDNA de *R. sanguineus* e *R. turanicus* obtida com o método de Máxima Parcimônia. O bootstrap está representado nos nós da árvore e os números de acessos no GenBank estão indicados entre parênteses. *H. marginatum* foi usado como "outgroup".

4.4.2 Análise das sequências de fragmentos do gene 12S rDNA

A **Tabela 12** mostra o número de acesso no GenBank das sequências das espécies e isolados geográficos incluídos nas análises filogenéticas baseadas em fragmentos do gene do 12S rDNA, assim como as novas sequências obtidas no presente estudo.

Tabela 12. Espécies e isolados geográficos utilizados nas análises filogenéticas baseadas em fragmentos do gene 12S rDNA, localidade e código de acesso no Genbank.

Espécie	Localidade	Genbank
<i>R. sanguineus</i> *	Jaboticabal, Brasil	KC018070
<i>R. sanguineus</i> *	Rio Claro, Brasil	KC018071
<i>R. sanguineus</i> *	Libertad, Colômbia	KC018072
<i>R. sanguineus</i> *	Villavicêncio, Colômbia	KC018073
<i>R. sanguineus</i> *	Havana, Cuba	KC018074
<i>R. sanguineus</i> *	Tailândia	KC018075
<i>R. sanguineus</i>	Jaboticabal, Brasil	AY559842
<i>R. sanguineus</i>	Saint Kitts, EUA	HM138902
<i>R. sanguineus</i>	Oklahoma, EUA	HM138900
<i>R. sanguineus</i>	Colorado, EUA	U95915
<i>R. sanguineus</i>	Arizona, EUA	HM138903
<i>R. sanguineus</i>	Atlanta, EUA	AF150020
<i>R. sanguineus</i>	Califórnia, EUA	HM014443
<i>R. sanguineus</i>	México	HM012572
<i>R. sanguineus</i>	Guatelama	JF523338
<i>R. sanguineus</i>	Portugal	FJ536553
<i>R. sanguineus</i> sp1	Grécia	KC243791
<i>R. sanguineus</i> sp2	Espanha	KC243802
<i>R. sanguineus</i> sp3	Índia	KC243808
<i>R. sanguineus</i> sp4	Nigéria	KC243810
<i>R. sanguineus</i> s. l.	Brasil	KC243787
<i>R. sanguineus</i>	Rafaela, Argentina	AY559841

<i>R. sanguineus</i>	Salta, Argentina	JX206970
<i>R. sanguineus</i>	Formosa, Argentina	JX206972
<i>R. sanguineus</i>	Chaco, Argentina	JX206973
<i>R. sanguineus</i>	Misiones, Argentina	JX206974
<i>R. sanguineus</i>	Bahia Blanca, Argentina	JX206975
<i>R. sanguineus</i>	Paraguai	JX206976
<i>R. sanguineus</i>	Peru	JX206977
<i>R. sanguineus</i>	Moçambique	JX206978
<i>R. sanguineus</i>	África do Sul	JX206979
<i>R. sanguineus</i>	Reunión, África do Sul	JQ425164
<i>R. sanguineus</i>	Uruguai	AY559843
<i>R. sanguineus</i>	Suíça	AF483236
<i>R. sanguineus</i>	França	AY947467
<i>R. sanguineus</i>	Israel	HM138901
<i>R. sanguineus</i>	Jerusalém	JQ480851
<i>R. sanguineus</i>	Jerusalém	JQ480843
<i>R. sanguineus</i>	Tailândia	AY987377
<i>R. sanguineus</i>	China	JQ625664
<i>R. sanguineus</i>	Taiwan	DQ03001
<i>R. turanicus</i> *	Espanha	KC018076
<i>R. turanicus</i>	Suíça	AF483244
<i>R. turanicus</i>	França	AF150018
<i>R. turanicus</i>	Basilicata, Itália	KC243787
<i>R. turanicus</i>	Itália	HM014442
<i>R. turanicus</i>	Israel	JQ480848
<i>R. turanicus</i>	Israel	AF150013
<i>R. turanicus</i>	Uzbequistão	FJ536579
<i>R. turanicus</i>	Quirgistão	FJ536578
<i>R. turanicus</i>	Zâmbia	DQ849232
<i>R. turanicus</i>	Zimbabwe	AF150017
<i>H. dromedarii</i>	-	U95874
<i>H. marginatum</i>	-	AF150034

* = novas sequências obtidas.

Primeiramente foram analisadas as sequências de carrapatos encontrados nas Américas pelo método “Pairwise distances”, pelo qual também

foi computado o número de diferenças encontradas entre cada par. Esses resultados encontram-se na **Figura 20**.

Em seguida, foram incluídas sequências de linhagens de *R. sanguineus* e de *R. turanicus* dos demais continentes para as análises filogenéticas. As análises filogenéticas utilizando os métodos de Agrupamento de Vizinhos são apresentadas na **Figura 21**, Máxima Verossimilhança na **Figura 22** e Máxima Parcimônia na **Figura 23**.

OTUs	RsJ	RsRC	RsBR	RsCL	RsCV	RsCH	RsUR	RsRAF	Iso1	Iso2	Iso3	Iso4	Iso5	Iso7	Iso8	Iso9	RsPA	RsPE	RsMEX	RsGUA	RsCOL	RsLA	RsAT	RsARI	RsOK	RsSK
RsJ	-	0	2	2	2	2	28	28	0	0	2	0	28	28	28	28	1	2	4	4	29	31	30	28	28	3
RsRC	0,0	-	2	2	2	2	28	28	0	0	2	0	28	28	28	28	1	2	4	4	29	31	30	28	28	3
RsBR	0,5	0,5	-	0	0	0	28	28	2	2	4	2	28	28	28	28	1	0	2	2	29	31	30	28	28	1
RsCL	0,5	0,5	0,0	-	0	0	28	28	2	2	4	2	28	28	28	28	1	0	2	2	29	31	30	28	28	1
RsCV	0,5	0,5	0,0	0,0	-	0	28	28	2	2	4	2	28	28	28	28	1	0	2	2	29	31	30	28	28	1
RsCH	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	-	28	28	2	2	4	2	28	28	28	28	1	0	2	2	29	31	30	28	28	1
RsUR	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	-	0	28	28	30	28	0	0	0	0	27	28	30	30	14	4	2	7	12	29
RsRAF	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	0,0	-	28	28	30	28	0	0	0	0	27	28	30	30	14	4	2	7	12	29
Iso1	0,0	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	6,9	6,9	-	0	2	0	28	28	28	28	1	2	4	4	29	31	30	28	28	3
Iso2	0,0	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	6,9	6,9	0,0	-	2	0	28	28	28	28	1	2	4	4	29	31	30	28	28	3
Iso3	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	7,4	7,4	0,5	0,5	-	2	30	30	30	30	3	4	6	6	31	33	32	30	30	5
Iso4	0,0	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	6,9	6,9	0,0	0,0	0,5	-	28	28	28	28	1	2	4	4	29	21	30	28	28	3
Iso5	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	0,0	0,0	6,9	6,9	7,4	6,9	-	0	0	0	27	28	30	30	14	4	2	7	12	29
Iso7	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	0,0	0,0	6,9	6,9	7,4	6,9	0,0	-	0	0	27	28	30	30	14	4	2	7	12	29
Iso8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	0,0	0,0	6,9	6,9	7,4	6,9	0,0	0,0	-	0	27	28	30	30	14	4	2	7	12	29
Iso9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	0,0	0,0	6,9	6,9	7,4	6,9	0,0	0,0	0,0	-	27	28	30	30	14	4	2	7	12	29
RsPA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	6,7	6,7	0,2	0,2	0,7	0,2	6,7	6,7	6,7	6,7	-	1	3	3	28	30	29	27	27	2
RsPE	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	6,9	6,9	0,5	0,5	1,0	0,5	6,9	6,9	6,9	6,9	0,2	-	2	2	29	31	30	28	28	1
RsMEX	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	7,4	7,4	1,0	1,0	1,5	1,0	7,4	7,4	7,4	7,4	0,7	0,5	-	0	29	29	28	26	26	1
RsGUA	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	7,4	7,4	1,0	1,0	1,5	1,0	7,4	7,4	7,4	7,4	0,7	0,5	0,0	-	29	29	28	26	26	1
RsCOL	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	3,5	3,5	7,2	7,2	7,7	7,2	3,5	3,5	3,5	3,5	6,9	7,2	7,2	7,2	-	16	14	19	20	28
RsLA	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	1,0	1,0	7,7	7,7	8,2	7,7	1,0	1,0	1,0	1,0	7,4	7,7	7,2	7,2	4,0	-	2	3	12	30
RsAT	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	0,5	0,5	7,4	7,4	7,9	7,4	0,5	0,5	0,5	0,5	7,2	7,4	6,9	6,9	3,5	0,5	-	5	10	29
RsARI	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	1,7	1,7	6,9	6,9	7,4	6,9	1,7	1,7	1,7	1,7	6,7	69,0	6,4	6,4	4,7	0,7	1,2	-	9	27
RsOK	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	3,0	3,0	6,9	6,9	7,4	6,9	3,0	3,0	3,0	3,0	6,7	6,9	6,4	6,4	5,0	3,0	2,5	0,0	-	27
RsSK	0,7	0,7	0,2	0,2	0,2	0,2	7,2	7,2	0,7	0,7	1,2	0,7	7,2	7,2	7,2	7,2	0,5	0,2	0,2	0,2	6,9	7,4	7,2	6,7	6,7	-

Figura 20. Análise das sequências de fragmentos do gene 12S rDNA de *R. sanguineus* das Américas. Distâncias entre pares abaixo da diagonal, em porcentagem, e número de diferença entre pares acima da diagonal. J = Jaboticabal; BR = Brasil; CL = Colômbia, Libertad; CV = Colômbia, Villavicêncio; CH = Cuba; UR = Uruguai; RAF = Rafaela; Iso1 = (JX206968); Iso2 = (JX206969); Iso3 = (JX195170); Iso4 = (JX206971); Iso5 = (JX206972); Iso7 = (JX206973); Iso8 = (JX206974); Iso9 = (JX206975); PA = Paraguai; PE = Peru; MEX= México; GU = Guatemala; COL = Colorado; LA = Los Angeles; AT Atlanta; AR = Arizona; OK = Oklahoma; SK = Saint Kitts.

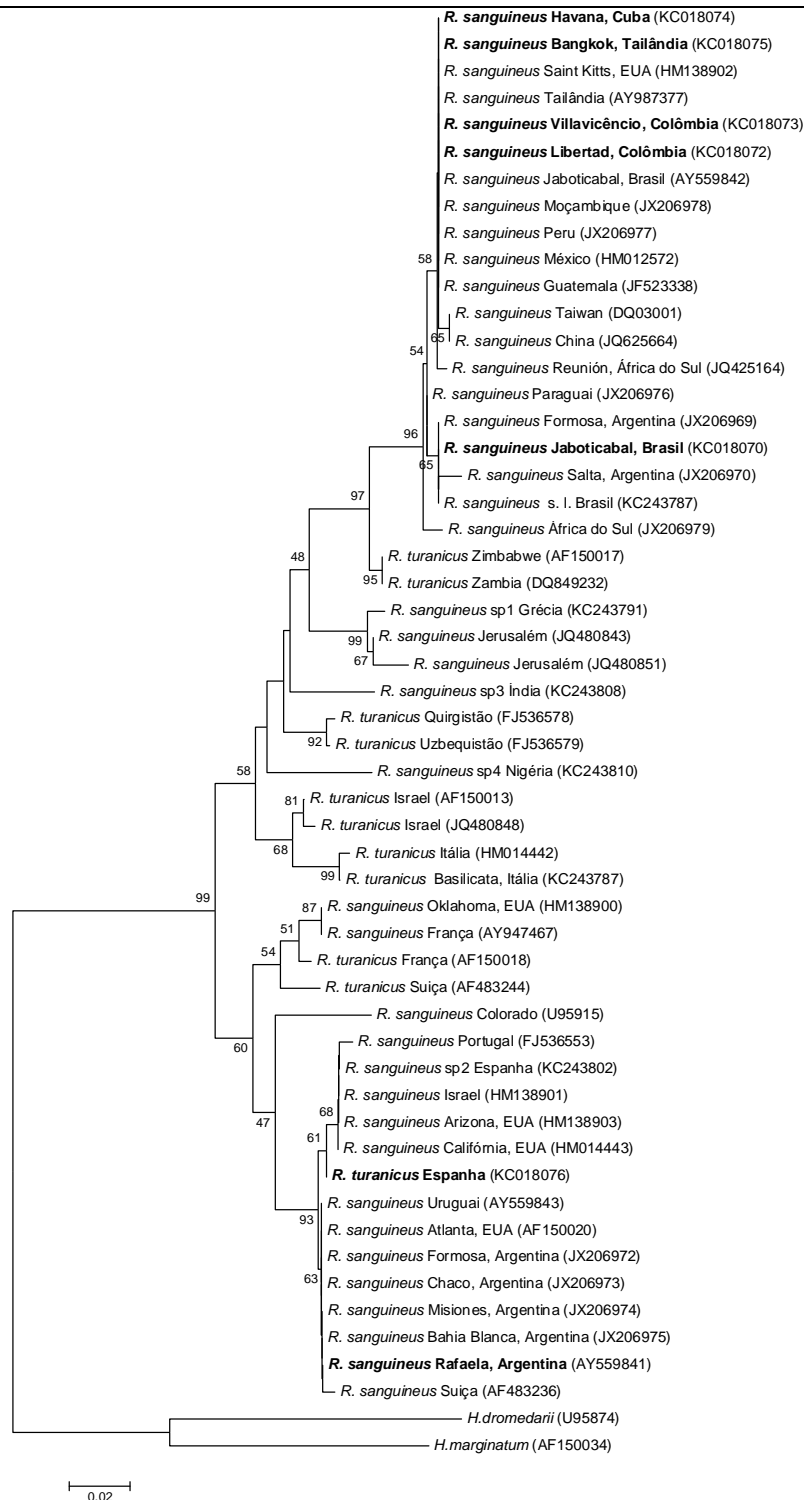


Figura 21. Árvore filogenética baseada em um fragmento de 400 pares de bases do gene 12S rDNA de *R. sanguineus* e *R. turanicus* obtida com o método de Agrupamento de Vizinhos. O bootstrap está representado nos nós da árvore e os números de acessos no GenBank estão indicados entre parênteses. *H. marginatum* foi usado como “outgroup”.

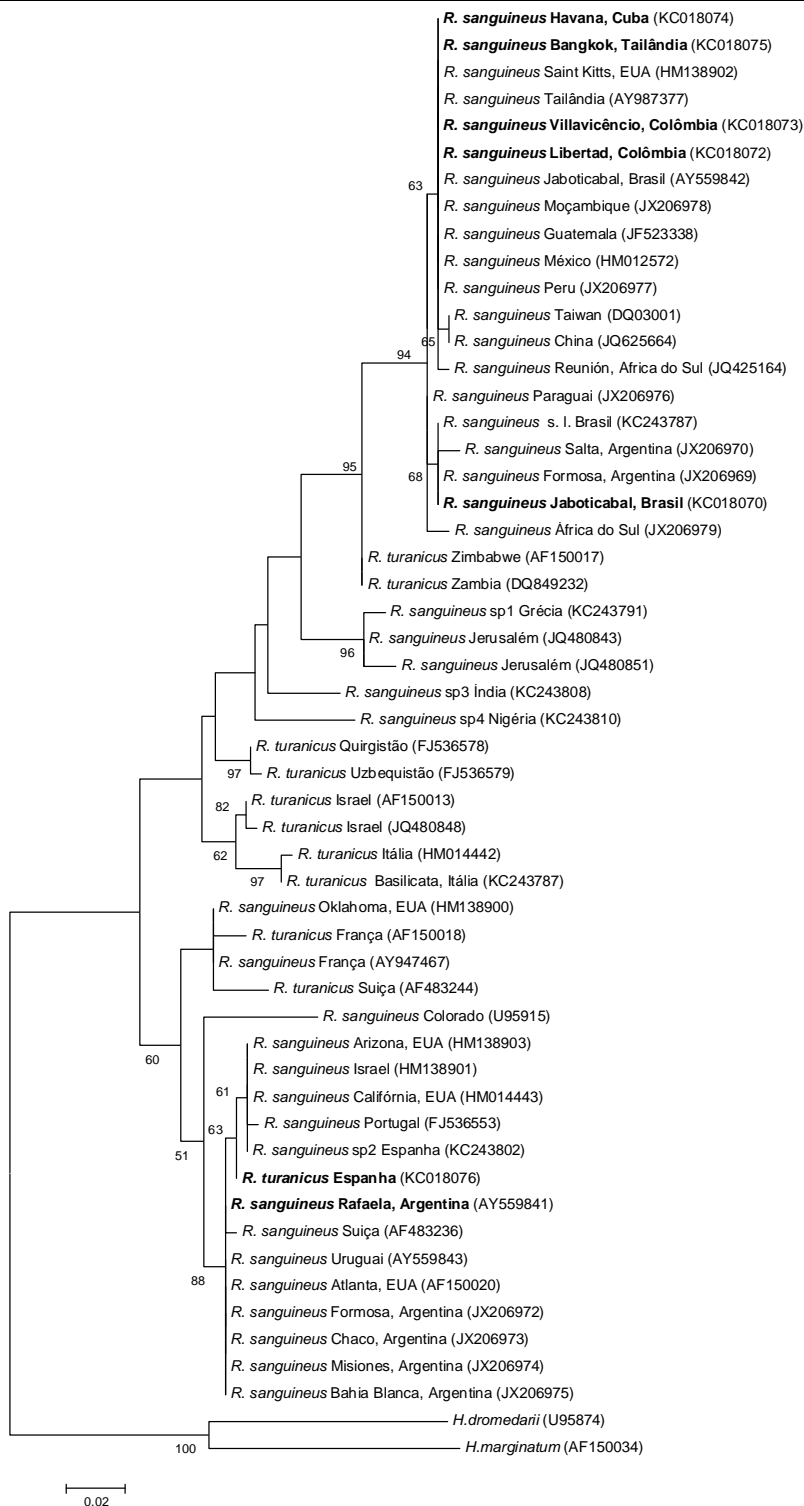


Figura 22. Árvore filogenética baseada em um fragmento de 400 pares de bases do gene 12S rDNA de *R. sanguineus* e *R. turanicus* obtida com o método de Máxima Verossimilhança. O bootstrap está representado nos nós da árvore e os números de acessos no GenBank estão indicados entre parênteses. *H. marginatum* foi usado como “outgroup”.

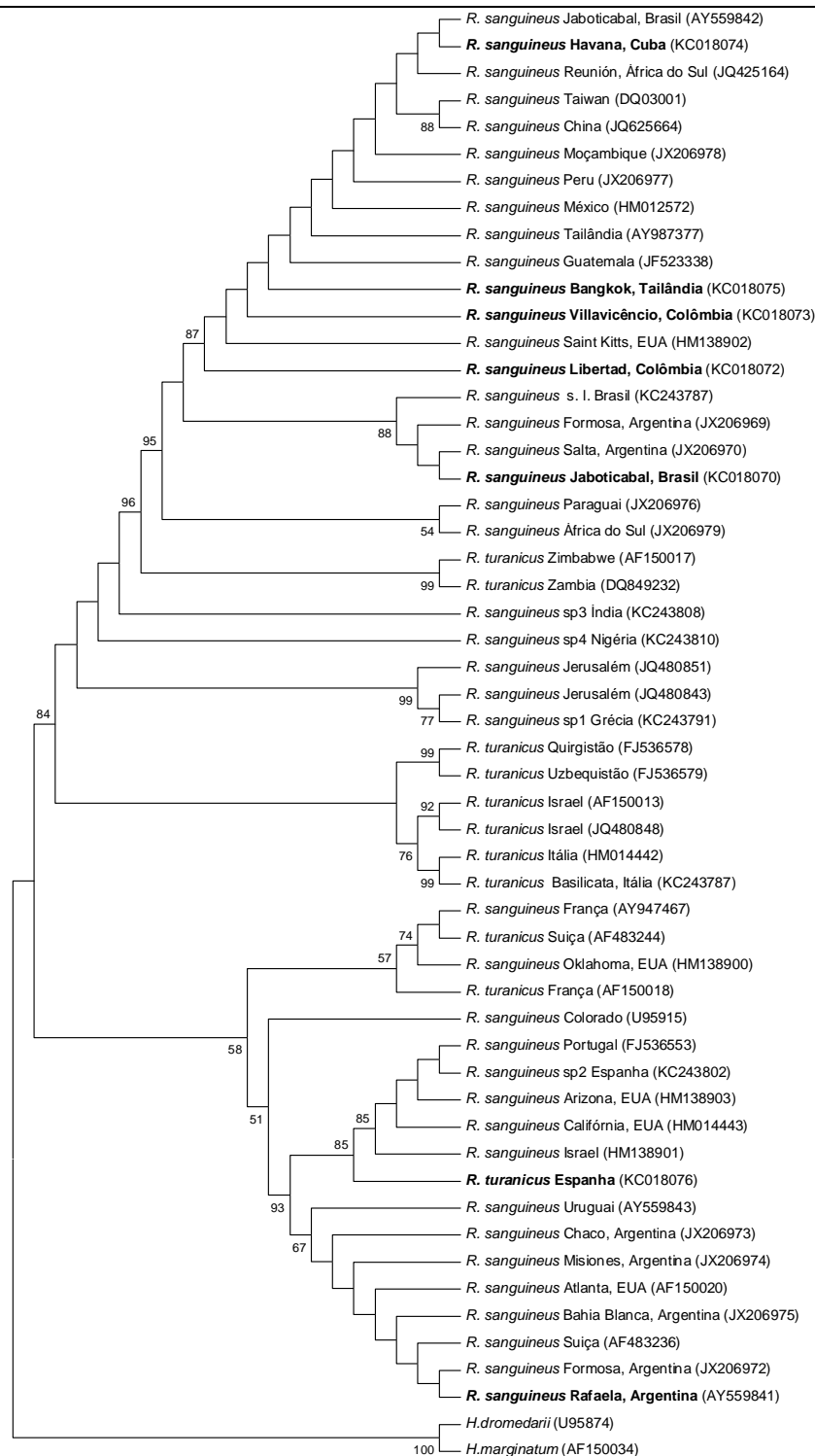


Figura 23. Árvore filogenética baseada em um fragmento de 400 pares de bases do gene 12S rDNA de *R. sanguineus* e *R. turanicus* obtida com o método de Máxima Parcimônia. O bootstrap está representado nos nós da árvore e os números de acessos no GenBank estão indicados entre parênteses. *H. marginatum* foi usado como “outgroup”.

5 DISCUSSÃO GERAL

Warburton (1912) denotou que as espécies de carrapatos pertencentes ao gênero *Rhipicephalus* são extremamente difíceis de serem identificadas morfológicamente devido ao elevado nível de uniformidade intergenérica e também à variabilidade intraespecífica.

Neste contexto, estudos morfológicos devem ser aplicados conjuntamente com estudos biológicos e moleculares para promover reconstruções taxonômicas mais consistentes.

A comparação dos parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos previamente identificados como *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), Cuba (Havana), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e também *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) mostraram, analisando principalmente o peso médio das fêmeas ingurgitadas, que as fêmeas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) assemelham-se as fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza). Por outro lado, as fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana) apresentaram o menor peso de ingurgitamento, seguidas pelas fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e da Tailândia (Bangkok).

Ioffe-Uspensky et al. (1997) mencionaram que os carrapatos da espécie *R. sanguineus* são ecologicamente flexíveis e tolerantes a uma grande variedade de condições climáticas, podendo, dessa forma, sofrer diferentes pressões seletivas e desenvolver estratégias de adaptação distintas para cada espécie e também para diversas linhagens geográficas de uma mesma espécie.

Analisando os parâmetros biológicos dos estágios imaturos e adulto de *R. sanguineus* do Brasil (Zaragoza), comparativamente ao *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) observou-se que o último apresenta larvas menos ingurgitadas que as de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), porém, a partir do estágio de ninfa, o *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) apresenta maior taxa de crescimento em relação ao *R. sanguineus*, com as fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) apresentando-se em média 2,5 vezes mais pesadas do que as de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal).

Observa-se também que o período de ingurgitamento das larvas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) é menor do que de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal), e que para as ninfas o período de ingurgitamento é praticamente o mesmo, porém o peso das ninfas ingurgitadas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) é maior.

As diferenças observadas no ciclo biológico destas duas espécies estão de acordo com as diferenças ecológicas entre elas, já relatadas na literatura (FELDMAN-MUHSAM, 1952; GILOT ET AL., 1990; HOOGSTRAAL, 1956).

A espécie *R. turanicus*, embora amplamente distribuída, é ecologicamente mais limitada que *R. sanguineus*, sendo restrita a áreas com variações mais estreitas de temperatura e umidade e tendo um período de atividade menor (IOFFE-USKENSKY et al., 1997; WALKER et al., 2000). Além disso, esta espécie parasita uma ampla gama de hospedeiros, principalmente carnívoros e ungulados, que não oferecem condições estáveis para o carrapato uma vez que estão sujeitos a predação e expostos a condições climáticas adversas (GUGLIELMONE et al., 2006; WALKER et al., 2000). Dessa forma, tais ixodídeos são fortemente dependentes do habitat, das condições climáticas e de fatores do hospedeiro.

Como estratégia, a espécie *R. turanicus* desenvolveu adaptações fisiológicas e ecológicas que consistem em um ciclo de vida com elevada taxa reprodutiva, taxa de desenvolvimento mais rápido, incluindo um maior crescimento compensatório entre estágios e um aumento na taxa de metabolismo (IOFFE-USPENSKY et al., 1997).

Considerando ainda a maior semelhança no peso das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) com as fêmeas da espécie identificada como *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza), é importante ressaltar que as duas populações são originalmente de clima temperado, e que possivelmente desenvolveram estratégias adaptativas semelhantes em relação à taxa reprodutiva e a facilidade de ingerir grande quantidade de sangue.

Os cruzamentos entre fêmeas de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) com machos de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) e fêmeas de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) com machos de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) não surtiram em sucesso reprodutivo, fato que pode ser comprovado pela igualdade estatística entre os parâmetros destes cruzamentos com os das fêmeas virgens das duas espécies e pela obtenção de pequena quantidade de ovos inférteis resultantes destes cruzamentos, indicando uma estreita separação entre elas.

De acordo com Sonenshine et al. (1982), os machos de uma espécie de carrapato podem explorar o gonóporo das fêmeas de uma espécie próxima, porém, nesses casos, o espermatóforo não é formado e proteínas do macho não são transferidas para a fêmea.

Weiss e Kaufman (2004) estudando *Amblyomma hebraeum* relataram que dois peptídeos específicos produzidos nos testículos e nos vasos deferentes seriam transferidos para a fêmea durante o cruzamento, estimulando o completo ingurgitamento. Donohue et al. (2009), investigando os estímulos químicos em *Dermacentor variabilis*, sugeriram que o fator de ingurgitamento seria uma proteína não secretada ou uma mistura de proteínas derivadas da glândula acessória, dos testículos e dos vasos deferentes a qual seria introduzida durante a alimentação e cópula com a fêmea, sendo moléculas espécie-específicas.

Estes estudos corroboram o achado deste trabalho, de que as fêmeas virgens das duas espécies e as cruzadas com machos da outra espécie apresentaram pesos inferiores aos das fêmeas que tiveram cruzamentos conspecíficos.

O fato de algumas fêmeas virgens de *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) terem realizado a postura, embora com número pequeno de ovos, assim como as fêmeas das duas espécies cruzadas transpecificamente, pode ser explicado pelo processo denominado vitelogênese abortiva. Germond e Aeschlimann (1977) observaram a vitelogênese abortiva em *Ornithodoros moubata*, onde vitelogeninas são incorporadas aos ovócitos, no entanto, estes raramente atingem o estágio final, sendo reabsorvidos. A reabsorção do vitelo pode ser induzida por ecdisteróides que atuam no ovário. Quando o cruzamento conspecífico ocorre, uma contínua secreção de substâncias semelhantes ao hormônio juvenil desencadeia a vitelogênese (CONAT et al., 1983).

Szabó et al. (2005), realizando cruzamentos entre as linhagens brasileira e argentina de *R. sanguineus* obtiveram algumas larvas híbridas, porém inférteis, sugerindo uma separação entre essas duas populações. Considerando o conceito biológico de espécie e suas complexidades, alguns autores sugerem que a produção de progênes viáveis seja um forte indicativo de espécie (GUGLIELMONE et al., 2003). Dessa forma, *R. sanguineus* do Brasil seria uma espécie diferente de *R. sanguineus* da Argentina e também da espécie identificada como *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza). Assim, a realização de cruzamentos entre *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) poderiam indicar se estas seriam uma mesma espécie.

A morfometria realizada para machos e fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) mostrou-se importante para mensurar diferenças existentes entre cada linhagem populacional, criando assim, referências para fins de comparação.

Para Perez-Neto et al. (1995), a forma e o tamanho de um organismo podem caracterizar mais precisamente aspectos como alimentação, uso de micro-habitat, pressão seletiva, competição, predação, entre outros, visto que a morfometria de um organismo é o resultado final, ao menos em um determinado momento, de sua evolução.

Nesse contexto, a medida de algumas estruturas como a largura do tarso I, largura do escudo, largura do idiossoma, largura do hipostômio e do palpo das fêmeas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) são bastante semelhantes entre si e diferentes das demais populações de carrapatos estudadas.

Morfologicamente, algumas diferenças foram observadas entre as diferentes populações de carrapatos. É importante ressaltar que Oliveira et al. (2005), comparando morfologicamente espécimes de *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) com aquelas de *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela), confirmaram que se tratam de espécies diferentes. Dados obtidos no presente estudo mostraram que *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) também pode ser considerada uma espécie diferente de *R. turanicus* da Espanha (Espanha), a qual esta está mais relacionada com *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela).

Walker et al. (2000), em suas chaves taxonômicas para identificação de espécies do gênero *Rhipicephalus* separam as fêmeas de *R. sanguineus* do *R. turanicus* pela forma da abertura genital.

Guglielmone et al. (2006) também consideraram que as fêmeas de *R. sanguineus*, *R. camicasi* e *R. turanicus* poderiam ser diferenciadas pela morfologia da abertura genital, sendo em *R. sanguineus* em forma de U e nas outras duas espécies na forma de V.

Além desta característica, a largura do prolongamento dorsal das placas espiraculares em relação à largura do festão adjacente, tanto de machos quanto de fêmeas também é considerada taxonomicamente relevante para diferenciação de espécies pertencentes ao complexo *Rhipicephalus sanguineus* (FILIPPOVA, 1997; WALKER et al., 2000).

Walker et al. (2000), consideram que em *R. sanguineus*, o prolongamento dorsal da placa espiracular é estreito, correspondendo a

aproximadamente metade da largura do festão adjacente, enquanto que, em *R. turanicus*, este prolongamento corresponde praticamente a largura do festão adjacente.

Analisando a largura do prolongamento dorsal das placas espiraculares de machos e fêmeas de *R. sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal), Tailândia (Bangkok), Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) foi possível observar que todas essas populações apresentam o prolongamento dorsal da placa espiracular estreito em relação à largura do festão adjacente. Estes apontam fortemente para que a espécie identificada e tratada neste estudo como *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) seja *R. sanguineus* pertencente a linhagem temperada, assim como o *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela).

É importante destacar que, devido à similaridade das espécies do complexo *Rhipicephalus sanguineus*, muitas vezes torna-se difícil a separação destas apenas considerando características morfológicas, e que algumas delas podem ser facilmente confundidas.

Somando-se a isso, o espécime tipo de *R. sanguineus* foi perdido e considerando a descrição original não há uma definição de base morfológica para a espécie (NAVA et al., 2012).

Os resultados obtidos nesse estudo mostram ainda, que o *R. sanguineus* é bastante polimórfico, corroborando Ribeiro et al. (1996). Ademais, *R. turanicus* também é uma espécie polimórfica. Pegram et al. (1987) encontraram diferenças morfológicas consideráveis entre as populações da África e de Chipre, porém, tais linhagens eram completamente compatíveis geneticamente.

Num contexto mais amplo, West-Eberhard (1989) definiu como plasticidade fenotípica a habilidade de um único genótipo produzir mais de uma forma alternativa de morfologia, estado fisiológico e comportamento em resposta a diferentes condições ambientais. A plasticidade fenotípica inclui uma grande diversidade de tipos de variabilidade, dentre elas o polimorfismo, ou seja, a existência de alternativas morfológicas distintas em uma população.

No âmbito molecular, a análise das sequências de fragmentos do gene 16S rDNA mostraram que *R. sanguineus* de Jaboticabal (Brasil), Cuba (Havana), Colômbia (Libertad) e Tailândia (Bangkok) são geneticamente semelhantes, agrupando-se juntamente com linhagens de *R. sanguineus* de Moçambique, África do Sul e áreas tropicais da Argentina. Já a espécie identificada como *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) mostrou-se geneticamente próxima de *R. sanguineus* da Europa (Espanha, Alemanha e França), Chile e regiões temperadas da Argentina.

Além disso, as sequências de fragmentos dos genes 16S rDNA e 12S rDNA publicadas por Dantas-Torres et al. (2013), juntamente com características morfológicas, permitiram confirmar que a espécie identificada como *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) agrupa-se com o *R. sanguineus* sp2 da Espanha, e não com o *R. turanicus* da Itália, como se esperava.

Devido a disponibilidade de mais sequências de fragmentos do gene 12S rDNA no Genbank foi possível fazer novas comparações, principalmente com sequências das Américas Central e do Norte. No entanto, as sequências de fragmentos do gene 12S rDNA forneceram árvores filogenéticas com a mesma topologia que as apresentadas utilizando-se o 16S rDNA.

Dessa forma, observam-se dois grupos bastante sólidos, um formado por *R. sanguineus* de Jaboticabal, Colômbia, regiões tropicais da Argentina, Peru, Paraguai, México, Guatemala, ilha de Saint Kitts, Cuba, Taiwan, Tailândia, China, África do Sul e Moçambique e o outro formado por *R. sanguineus* da Europa, regiões temperadas da Argentina, Uruguai, Israel e Estados Unidos.

Moraes-Filho et al. (2011), analisando sequências do gene 16S rDNA de *R. sanguineus* de diversas localidades, propuseram a formação de dois grupos, um formado por espécimes tropicais e subtropicais e outro por espécimes de regiões temperadas.

Szabó et al. (2005), comparando *R. sanguineus* de Jaboticabal, Brasil, que pertenceria a linhagem tropical com o *R. sanguineus* de Rafaela, Argentina, da linhagem temperada, observaram diferenças genéticas

significativas utilizando sequências de fragmentos do gene 12S rDNA. Dessa forma, sugere-se que o táxon *R. sanguineus* seria composto por pelo menos duas linhagens no Neotrópico.

Moraes-Filho et al. (2012) verificaram diferenças na competência vetorial para *Ehrlichia canis* entre estas duas linhagens genéticas de carrapatos, o que poderia ocorrer também para outros patógenos. Outras diferenças poderiam existir para estas duas populações, principalmente em relação ao comportamento, ecologia e resistência a acaricidas.

Nava et al. (2012) analisando sequências dos genes 12S e 16S rDNA de *R. sanguineus* de diversas localidades no Cone Sul da América do Sul também sugeriram a existência de duas linhagens: uma Norte, próxima de *R. sanguineus* da África do Sul e Moçambique, e uma Sul, próxima da linhagem européia, que corresponderia ao *R. sanguineus* verdadeiro, uma vez que a espécie tipo descrita localizava-se na França.

Considerando espécies de carrapatos *R. sanguineus* na América do Norte, Levin et al. (2012) realizaram a comparação do gene 12S rDNA e o cruzamento de linhagens de Oklahoma, Israel e África do Sul, e observaram que a linhagem de Oklahoma é próxima da de Israel e a linhagem da África do Sul é significativamente distante.

As análises filogenéticas baseadas em sequências do gene 12S rDNA realizadas no presente estudo mostraram que linhagens de *R. sanguineus* de Los Angeles, Atlanta e Arizona são bastante próximas do *R. sanguineus* de Rafaela, Argentina, pertencente ao grupo temperado. A linhagem de Saint Kitts pertence ao grupo tropical e as linhagens de Colorado e Oklahoma, apesar de estarem no grupo temperado apresentam diferenças de 3,5 % e 3% em relação à linhagem Argentina. Dessa forma, tais resultados poderiam ser discutidos de forma mais ampla após a realização de cruzamentos entre as várias linhagens de *R. sanguineus* existentes nos Estados Unidos.

Levin et al. (2012) chamam a atenção para sequências de carrapatos de diferentes países e continentes identificados morfológicamente como *R. sanguineus* misturadas em várias clades filogenéticas com sequências de carrapatos identificados como *R. turanicus*. Esta observação mostra a

dificuldade de se identificar corretamente espécies morfológicamente semelhantes e com ocorrência de variabilidade intraespecífica.

Apesar disto, autores russos consideram *R. sanguineus* e *R. turanicus* espécies válidas e que características morfológicas permitem a separação de espécies de todos os estágios dentro do grupo complexo *R. sanguineus* (FILIPPOVA, 1989, 1997).

Parafrazeando Gray et al. (2013), variações locais e regionais destas espécies de carrapatos são comuns, portanto, é importante reconhecer limites morfológicos que definem cada uma das espécies, considerando ainda informações biológicas, ecológicas e genéticas.

6 CONCLUSÕES

1. Fêmeas de diferentes populações geográficas apresentam diferenças no padrão de alimentação e ingurgitamento, com *R. sanguineus* da Argentina (Rafaela) assemelhando-se ao *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza);
2. As diferenças nos padrões de alimentação e ingurgitamento de cada população refletem na morfometria uma vez que esta pode caracterizar indiretamente aspectos como alimentação, uso de micro-habitat e pressão seletiva;
3. O cruzamento realizado entre *R. sanguineus* do Brasil (Jaboticabal) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) confirmou que realmente tratam-se de espécies distintas;
4. A comparação morfológica entre as diferentes populações geográficas revelou a existência de polimorfismo;
5. *Rhipicephalus sanguineus* de Cuba (Havana), Brasil (Jaboticabal) e Tailândia (Bangkok) são geneticamente semelhantes e pertencentes a linhagem tropical;

-
6. *Rhipicephalus sanguineus* da Argentina (Rafaela) e *R. turanicus* da Espanha (Zaragoza) são geneticamente semelhantes e pertencentes a linhagem temperada;
 7. Estudos adicionais envolvendo o cruzamento entre diversas populações são importantes para obter comprovações acerca da definição de espécies.

7 REFERÊNCIAS

APANASKEVICH D. A.; HORAK, I. G.; MULUMBA-MFUMU, L. K. 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**. v. 50, n. 3, p. 479-484, 2013.

BARKER, S. C.; MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Parasitology**, v. 129, n. 7 p. 15-36, 2004.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTDD-3/Butantan, 2006. 223p.

BLACK, W. C.; PIESAN, J. Phylogeny of hard and soft tick taxa (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 91, n. 21, p. 10034-10038, 1994.

BEATI, L.; KEIRANS, J. E. Analysis of the systematic relationship among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12s ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 32-48, 2001.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J.; FERREIRA, B. R.; GARCIA, M. V. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 61-66, 1995.

BURLINI, L.; TEIXEIRA, K. R.; SZABÓ, M. P.; FAMADAS, K. M. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? **Experimental and Applied Acarology**, v. 50, n. 4, p. 361-374, 2010.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribución de las rickettsias en México. **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**. n. 8, p. 3-14, 1947.

CAMICAS, J. L.; HERVY, J. P.; ADAM, F.; MOREL, P. C. **Les Tiques du Monde**. Paris: Éditions de l'Orstom, Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, 1998. 223p.

CONNAT, J. L.; DIEHL, P. A.; DUMONT, N.; CARMINATI, S.; THOMPSON, M. J. Effects of exogenous ecdysteroids on the female tick *Ornithodoros moubata*: Induction of supermolting and influence on oogenesis. **Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie**, v. 96, n. 1-5, p. 520-530, 1983.

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 leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149-155, 2005.

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.; LETROFA, M. S.; ANNOSCIA, G.; GIANNELLI, A.; PARISI, A.; OTRANTO, O. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 213, p. 2-17, 2013.

DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E.; MILLER, R. J. Comparison of the reproductive biology between acaricide-resistant and acaricide-susceptible *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 211-220, 2006.

DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON JR., J.; ZAKI, S. R.; CHEEK, J. E.; SWERDLOW, D. L.; McQUISTON, J. H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 587-594, 2005.

DONOHUE, K. V.; KHALIL, S. M. S.; ROSS, E.; MITCHELL, R. D.; ROE, R. M.; SONENSHINE, D. E. Male engorgement factor: Role in stimulating engorgement to repletion in the ixodid tick, *Dermacentor variabilis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 10, p. 909-918, 2009

EREMEEVA, M. E.; STROMDAHL, E. Y. Short Report: New Spotted Fever Group *Rickettsia* in *Rhipicephalus turanicus* tick removed from a child in Eastern Sicily, Italy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 1, p. 99-102, 2011.

ESTRADA-PEÑA, A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. **Experimental and Applied Acarology**, v. 23, p. 685-715, 1999.

FAMADAS, K. M.; SERRA-FREIRE, N. M.; FACCINI, J. L. H.. A note on slide-mounting technique of unfed immature stages of *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 139-140, 1996.

FELDMAN-MUHSAM, B. On the identity of *Rhipicephalus sanguineus*. **Bulletin of the Research Council of Israel**, v. 2, p. 187-194, 1952.

FELDMAN-MUHSAM, B. The *Rhipicephalus sanguineus* complex. **Vector Biology and Control**, v. 68, n. 57, p. 113-120, 1967.

FILIPPOVA, N. A. On the species diagnosis in the genus *Rhipicephalus* Koch (Ixodoidea, Ixodidae) of the fauna of the USSR and adjacent countries by the nymphal stage. **Parazitologiya**, v. 30, p. 47-68, 1981.

FILIPPOVA, N. A.; PANOVA, I. V. The significance of external ultrastructures in taxonomy of ixodid ticks of the genus *Rhipicephalus* Koch (Ixodoidea, Ixodidae). **Parazitologiya**, v. 31, p. 17-36, 1983.

FILIPPOVA, N.A. Diagnosis of species by the larval phase in the genus *Rhipicephalus* Koch (Ixodidae) in USSR fauna. **Parazitologiya**, v. 23, p. 104-117, 1989.

FILIPPOVA, N.A. **Fauna of Russia and Neighbouring Countries. Ixodid Ticks of Subfamily Amblyomminae**. Moscow: Nauka Publishing House, 1997. 436p.

GERMOND, J. E.; AESCHLIMANN, A. Influence of copulation on vitellogenesis and egg-laying in *Ornithodoros moubata* (Ixodoidea: Argasidae), in: **Advances in invertebrate reproduction**. ADIYODI, K. G.; ADIYODI, R. G. (Eds.), Amsterdam/New York: Elsevier, 1977, p. 308-318.

GILLOT, B.; LAFORGE, M. L.; PICHOT, J.; RAOULT, D. Relationships between the *Rhipicephalus sanguineus* complex ecology and Mediterranean spotted fever epidemiology in France. **European Journal of Epidemiology**, v. 6; p. 357-362, 1990.

GRAY, J.; DANTAS-TORRES, F.; ESTRADA-PEÑA, A. A.; LEVIN, M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 1, p. 171-180, 2013.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBINS, R. G. **Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical zoogeographic region**. Atlanta: International Consortium on Ticks and Tick-borne Disease, 2003. 173p.

GUGLIELMONE, A. A.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R. S.; ESTRADA-PEÑA, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies**. BARROS-BATESTI, D.; BECHARA, G.H.; ARZUA, M. (eds.), 1. ed. São Paulo: Vox/ICTDD-3/Butantan, 2006, p. 122-123.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PE A, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v. 2528, n. 6, p. 1-28, 2010.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HOOGSTRAAL, H. **African Ixodidae. I. Ticks of the Sudan (with special reference to Equatoria Province and with preliminary reviews of the genera *Boophilus*, *Margaropus* and *Hyaloma***. Washington DC: Department of the Navy, Bureau of Medicine and Surgery, 1956. 1101p.

HORAK, I. G.; APANASKEVICH, D. A.; KARIUKI, E. K. A new species of *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae), a parasite of giraffes in Kenya. **Journal of Medical Entomology**. v. 50, n. 4, p. 685-690, 2013.

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

KIRKLAND, B. H.; WESTWOOD, G. S.; KEYHANI, N. O. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 705-711, 2004.

KOLONIN, G. V. **Fauna of Ixodid ticks of the world**. Moscow, 2009. Disponível em: <<http://www.kolonin.org>>. Acesso em: 10 de julho de 2013.

KRANTZ G. W.; WALTER, D. E. **A Manual of Acarology**. 3 Ed. Texas Tech University Press. Lubbock, Texas. 2009. 807 p.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.B.; NEI, M. MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p. 1244-1245, 2001.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G., Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LATREILLE, P. A. **Genera crustaceorum et insectorum secundum ordinem naturalem in famílias disposita, iconibus exemplique plurimis explicata**. Paris: Argentorati, 1806. 302p.

LEVIN, M. L.; STUDER, E.; KILLMASTER, L.; ZEMTSOVA, G.; MUMCUOGLU, K. Y. Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 58, n. 1, p. 51-68, 2012.

MARIOTTE, C. O.; BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Hallazgo del *Rhipicephalus sanguineus* Latreille infectado naturalmente com fiebre manchada de lãs Montañas Rocosas, em Sonora (México). **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, v. 5, p. 297-300, 1944.

MATSUMOTO, K.; BROUQUI, P.; RAOULT, D.; PAROLA, R. Experimental infection models of ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group with *Rickettsia conorii*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 5, p. 363-372, 2005a.

MATSUMOTO, K.; OGAWA, M.; BROUQUI, P.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Transmission of *Rickettsia massiliae* in the tick *Rhipicephalus turanicus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 19, n. 3, p. 26-270, 2005b.

MILLER, R. J.; GEORGE, J. E.; GUERRERO, F.; CARPENTER, L.; WELCH, J. B. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 2, p. 298-302, 2001.

MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Genetic analysis of ticks belonging to *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, v. 117, p. 51-55, 2011.

MORAES-FILHO, J.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B., 2012. Study on the vector competence for *Ehrlichia canis* of four Neotropical populations of *Rhipicephalus sanguineus*. In: **FAMERP-UTMB: Emerging infections in the Americas? Common interests and collaboration between Brazil and USA**. Sociedade de Medicina e Cirurgia. São José do Rio Preto, Brasil.

MOREL, P. C.; VASSILIADES, G. Les *Rhipicephalus bergeoni* n. sp. (Acariens: Ixodoidea). **Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v. 15, p. 343-386, 1963.

MURA, A.; MASALA, G.; TOLA, S.; SATTÀ, G.; FOIS, F.; PIRAS, P.; ROLAIN, J. M.; RAOULT, D.; PAROLA, P. First direct detection of rickettsial pathogens and a new rickettsia, 'Candidatus Rickettsia barbariae', in ticks from Sardinia, Italy. **Clinical Microbiology Infection**, v. 14, n. 11, p. 1028-1033, 2008.

NAVA, S.; MASTROPAOLO, M.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. **Veterinary Parasitology**, v. 21, n. 3-4, p. 547-555, 2012.

OSMAN, O. M. Preliminary notes on the distribution of ticks (Acarina: Ixodidae) in Darfur Province, Sudan. **Bulletin of Animal Health and Production in Africa**, v. 26, p. 329-333, 1978.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; SAITO, K. C.; NUNES, E.; SZABÓ, M. P. J.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1-2, p. 139-147, 2005.

PAPADOPOULOS, B.; NUNCIO, M. S.; FILIPE, A. R. The occurrence of *Rhipicephalus turanicus* Pomerantzev, Matikashvilly e Lototsky, 1940, a species of *R. sanguineus* group, in Portugal. **Acarologia**, v. 33, p. 331-333, 1992.

PEGRAM, R. G.; CLIFFORD, C. M.; WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari: Ixodidae). Part II: *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. **Systematic Parasitology**, v. 10, p. 27-44, 1987.

PEREZ, M.; RIKISHA, Y.; WEN, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2133-2139, 1996.

PEREZ-NETO, P. R. Introdução a análises morfométricas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 2, p. 57-89, 1995.

PEREZ-PEREZ, D.; BECHARA, G.H.; MACHADO, R.Z.; ANDRADE, G.M.; DEL VECCHIO, R.E.M.; PEDROSO, M.S.; FARNÓS, O. Efficacy of the Bm86 antigen against immature instars and adults of the dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.167, 321-326, 2010.

POMERANTSEV, B. I.; MATIKASHVILY, N. V.; LOTOTSKY, B. V. An ecological and faunistic outline of Ixodidae ticks occurring in Transcaucasia. **Pazariologicheskii Sbornik**, v. 7, p. 100-133, 1940.

RIBEIRO, A. L.; FACCINI, J. L. H; DAEMON, E. Estudo das variações morfológicas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) no Brasil. **Revista Universidade Rural Série Ciências da Vida**, v. 18, n. 1, p. 25-33, 1996.

RODRÍGUEZ-MALLON, A.; FERNÁNDEZ, E.; ENCINOSA, P. E.; BELLO, Y.; MÉNDEZ-PÉREZ, L.; RUIZ, L. C.; PÉREZ, D.; GONZÁLEZ, M.; GARAY, H.; REYES, O.; MÉNDEZ, L.; ESTRADA, M. P. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Vaccine**, n. 30, p. 1782-1789, 2012.

ROHR, C. J. **Estudos sobre ixódidas do Brasil**. Rio de Janeiro: Gomes Irmãos, 1909. 220p.

ROVEDA, R. J. Ixodoidea. Contribución biológica. **Revista de Medicina Veterinária**, Buenos Aires, v. 36, n. 1, p. 105-119, 1954.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. S289-S403, 2004.

SZABÓ, M. P. J.; MANGOLD, A. J.; JOÃO, 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, n. 1, p. 131-140, 2005.

SZABÓ, M. P. J.; PASCOLI, G. V. T.; JÚNIOR, O. M.; FRANCHIN, A. G.; TORGA, K. Brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* parasitizing the bird *Coereba flaveola* in the Brazilian Cerrado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 543-545, 2008.

SONENSHINE, D. E.; KHALIL, G. M.; HOMSHER, P. J. *Dermacentor variabilis* and *Dermacentor andersoni*: genital sex pheromones. **Experimental Parasitology**, v. 54, n. 3, p. 317-330, 1982.

TAGLE, I. Accidental presence of *Rhipicephalus sanguineus*: sequential histopathology at host-arthropod interface. **Experimental Parasitology**, v. 36, p. 77-105, 1974.

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

VITALE, G.; MANSUELO, S.; ROLAIN, J. M.; RAOULT, D. *Rickettsia massilliae* human isolation. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 17-175, 2006.

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. 643p.

WALKER, A. R.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J. L.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G.; LATIF, A. A.; PEGRAM, R. G.; PRESTON, P. M. **Ticks of Domestic Animals in Africa: a Guide to Identification of Species**. Edinburgh: Bioscience Reports, 2013. 221p.

WARBURTON, C. Notes on the genus *Rhipicephalus*, with the description of new species, and the consideration of some species hitherto described. **Parasitology**, v. 5, p. 1-20, 1912.

WEISS, B. L.; KAUFMAN, W. R. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 16, p. 5874-5879, 2004.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic plasticity and the origins of biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 20, p. 249-278, 1989.

YERUHAM, I.; HADANI, A.; GALKER, F.; ROSEN, S. The seasonal occurrence of ticks (Acari: Ixodidae) on sheep and in the field in the Judean area of Israel. **Experimental and Applied Acarology**, v. 20, p. 47-56, 1996.