



Universidade Estadual do Maranhão  
Curso de Medicina Veterinária  
Centro de Ciências Agrárias  
Mestrado em Ciência Animal

**Giovani Santos de Abreu Junior**

**Aspectos morfológicos e moleculares de carrapatos do complexo  
*Amblyomma maculatum***

São Luís-2017



Universidade Estadual do Maranhão  
Curso de Medicina Veterinária  
Centro de Ciências Agrárias  
Mestrado em Ciência Animal

Giovani Santos de Abreu Junior

**Aspectos morfológicos e moleculares de carrapatos do complexo *Amblyomma maculatum***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação do Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Área de concentração:** Medicina Veterinária Preventiva

**Orientador:** Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira – UEMA

**Co-orientador:** Dr. Francisco Borges Costa

São Luís-2017

Abreu Júnior, Giovani Santos de.

Avaliação morfológica e molecular de carrapatos do complexo *Amblyomma maculatum* / Giovani Santos de Abreu Júnior. – São Luís, 2017.

49 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2017.

Orientador: Profa. Rita de Maria Seabra Nogueira.

1. Carrapatos. 2. *A. maculatum*. 3. Maranhão. I. Título.



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO

Centro de Ciências Agrárias  
Curso de Medicina Veterinária  
Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA)  
Credenciamento Provisório - CONCEA/MCT  
Processo 01200.002200/2015-06 (449) - Emissão 19/06/2015

#### DECLARAÇÃO

Declaramos para devidos fins que o projeto intitulado “**Aspectos morfológicos e moleculares de carrapatos do complexo *Amblyomma maculatum***” foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal - CEEA do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, conforme protocolo nº 32/2016 aprovado em 27/03/2017, para a execução da pesquisa pela equipe coordenada pela Profa. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira e os membros Giovani Santos de Abreu Júnior, Thiago Fernandez Martins, Francisco Borges Costa, Hector Bennati, Sebastian Muñoz, Marcelo Bahia Labruna e Monize Gerardi por atender as normas de Bem Estar Animal da Resolução do CFMV nº 1000/2012 e a Lei 11.794/2008.

São Luís, 29 de março de 2017

Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa  
Presidente do CEEA/CMV/UEMA

**Giovani Santos de Abreu Júnior**

**Aspectos morfológicos e moleculares de carrapatos do complexo *Amblyomma maculatum***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação do Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Área de concentração:** Medicina Veterinária Preventiva

**Orientador:** Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira – UEMA

**Co-orientador:** Dr. Francisco Borges Costa

---

**Prof. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira**  
**1º membro**

---

**Prof. Dr. Francisco Borges Costa**  
**2º membro**

---

**Dr. Thiago Fernandes Martins**  
**3º membro**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a médica veterinária e pesquisadora mais dedicada que conheço, Sâmara Cristine Costa Pinto, pelo apoio soberano nas horas que mais necessitei, tanto no âmbito profissional quanto no pessoal, agradeço por me inspirar com sua própria dedicação e me motivar a tornar-me uma pessoa melhor a qualquer momento, foram nas suas palavras críticas que me fizeram escrever essa dissertação. Obrigado por tudo.

Agradeço ao meu co-orientador, Amigo, Irmão e Pai do ano, Francisco Borges Costa, pela paciência e consideração perante a minha pessoa. Foi da sua idéia que o fruto dessa pesquisa surgiu, e foi com sua vontade contagiante que prosseguimos e fomos em frente com ela. Obrigado Xico, eu espero encontrar na minha carreira um amor tão grande quanto o seu pela pesquisa.

Agradeço a Orientadora Rita de Maria Seabra Nogueira. Quando você abre uma porta à uma pessoa, você cria esperança e da ela um caminho...um futuro. Desde o começo da graduação estive sobre sua tutela e agradeço imensamente por isso, me ensinou como um profissional deve se comportar e como manter uma postura firme e ética até o fim. Obrigado por esses seis anos de estrada.

Agradeço as Professoras Alcina Vieira e Ana Clara Santos pela contribuição e correções da dissertação.

Agradeço aos meus pais Delânia e Giovani, por abrir os caminhos da minha graduação e fazer de mim quem sou. Agradeço pela educação em 25 anos e pelo amor inenarrável dado a mim todos os dias das suas vidas. Obrigado.

Um agradecimento mais do que especial a todos os colegas que fiz na Universidade de São Paulo, principalmente aos chefes de laboratório, os Doutores Marcelo Labruna e Hilda Pena, que me acolheram de braços abertos para dar continuidade à segunda etapa do projeto. Obrigado à Amanda, Hector, Sebastián, Alejandro, Igor, Amália, Renato, Pedro, Márcio, Sérgio, Ricardo, Mariana, Hebert e obrigado a meu saudoso professor de taxonomia, Dr. Thiago. Obrigado queridos, pelo apoio dentro do laboratório, e principalmente, ao apoio de vida, trocando experiências, emoções pessoais, alegrias,

tristezas, frustrações, conquistas e desejos. Obrigado pelo abraço quente e caloroso dado a mim.

Agradeço ao Mestrado em Ciência Animal pelo programa e suporte técnico-financeiro da minha ida a São Paulo para concluir minha pesquisa.

Agradeço ao Professor José Ribamar Júnior pelo apoio na estatística do trabalho e sua disponibilidade.

O destino me proporcionou a conhecer sempre boas pessoas, e não foi diferente com minha querida turma de Mestrado, obrigado Lorena, Dani Rosa, Dani Sales, Eldo, Karina, Alessandra, Márcia, Bruno, e em especial a Maximiliano e Ludmila que dentro de um meio, conseguiram extrair minhas ideias a outro nível, transformaram minha concepção de profissionalismo, e mudou toda a visão que eu havia construído de convívio social e capacitação de pessoas. Obrigado.

Agradeço aos meus amigos pessoais, todos sabem quem são, pois quem entra no meu quarto uma vez, sempre volta para contar um nova história. Obrigado pelo apoio moral que me passam sempre além de extrair sorrisos de mim ate quando o dia não é favorável.

Agradeço a CAPES pelo suporte nesses 2 anos de pos-graduação e a Univerdade Estadual do Maranhão que sempre me concedeu várias formas de conhecimento.

Obrigado a todos, e que essas folhas sejam a semente de bons frutos...

*“Dedico essa dissertação a todo profissional que tenha ambição...que honre sua graduação e seu juramento...mudemos o mundo, eu ainda acredito que posso...”*



## RESUMO

ABREU-JUNIOR, G.S. **Aspectos morfológicos e moleculares de carrapatos do complexo *Amblyomma maculatum***. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão.

O objetivo do presente estudo foi comparar os aspectos morfológicos e moleculares das populações de carrapatos do complexo *Amblyomma maculatum* do Estado do Maranhão com de outras localidades do Brasil, depositadas na Coleção Nacional de carrapatos da Universidade de São Paulo. Foram coletados espécimes do município de Bacurituba (02° 42' 21" S 44° 44' 16" O) no Estado do Maranhão e comparadas com espécimes da Coleção Nacional de Carrapatos da Universidade de São Paulo. Os carrapatos do Maranhão foram coletados de suínos (*Sus scrofa domesticus*) criados em regime extensivo e transportados para a Universidade de São Paulo. A primeira geração de carrapatos reproduzidas em laboratório foi obtida a partir de oito progenitoras nativas do Maranhão. Os carrapatos foram acondicionados em potes de plásticos devidamente identificados e acondicionados em estufa BOD com 27 °C e 90% UR Após a eclosão, as fases imaturas foram postas para a infestação em *Cavia porcellus* até a obtenção das fases adultas, alvo do estudo comparativo. Os espécimes foram identificados por chave e foram mensurados utilizando-se do Microscópio Carl Zeiss modelo SteREO Discovery.V12 e seu software ZEN para mensuração das variáveis: Comprimento da Coxa I e Espinho I (esquerdos e diretos), Coxa IV e Espinho IV (esquerdos e direitos), Comprimento e Largura do Capítulo. A extração de DNA para as análises moleculares foi realizada de acordo com o protocolo Isotiocianato de Guanidina (GT). Uma vez extraído o DNA, foram submetidos a dois protocolos de reação em cadeia pela polimerase (PCR). Dois marcadores foram utilizados buscando amplificar fragmentos de aproximadamente 460-pb do gene mitocondrial 16S rRNA e 1200-pb do segundo espaço transcrito interno (ITS2) do DNA ribossômico nuclear. Os espécimes de fêmeas e machos foram avaliados morfológicamente e identificados como *Amblyomma triste*. Indivíduos da Coleção Nacional de Carrapatos “Danilo Gonçalves Saraiva” foram comparados com os espécimes do presente estudo. Observou-se diferença estatística ( $P < 0,05$ ) para as dimensões (Coxa direita I/ Espinho direito I; Coxa direita IV/Espinho direito IV; Coxa esquerda IV/Espinho esquerdo IV) dos Espinhos da Coxa I e Coxa IV. Não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) para a razão do Comprimento do Capítulo pela Largura do Capítulo. Para as fêmeas, observou-se diferença estatística para espinho direito I, coxa esquerda I, espinho esquerdo I e largura do capitulo. As sequências obtidas quando comparadas, de acordo com o gene mitocondrial 16S rRNA e sequências derivadas do ITS2 ribossômico nuclear, observa-se que os espécimes encontrados no Maranhão apresentam similaridade com *Amblyomma maculatum* oriundo dos Estados Unidos.

**Palavras-chaves:** Carrapatos, Maranhão, *A. maculatum*, morfometria

## ABSTRACT

ABREU-JUNIOR, G.S. **Morphologic and molecular aspects of ticks of the *Amblyomma maculatum* complex**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão.

The objective of the present study was to compare the morphological and molecular aspects of the tick populations of the *Amblyomma maculatum* complex of the State of Maranhão with those of different regions of Brazil stored in Coleção Nacional de Carrapatos of Universidade de São Paulo. Specimens were collected from the municipality of Bacurituba (02 ° 42 '21 "S 44 ° 44' 16" W) in the State of Maranhão and compared with specimens from the National Collection of Ticks of the Universidade de São Paulo. Maranhão ticks were collected from swine (*Sus scrofa domesticus*) raised in an extensive regime and transported to the Universidade de São Paulo. The ticks were stored in properly identified plastic pots and placed in a BOD incubator with 27 °C and 90% RH. After the ticks were hatched, the immature phases were placed for infestation in *Cavia porcellus* until the adult phases were reached, the study's target comparative. The specimens were identified by key and were measured using the Carl Zeiss Microscope model SteREO Discovery.V12 and its ZEN software to measure the variables: Thigh and Thigh I length (left and right), Thigh IV and Thorn IV (left And rights), Chapter Length and Width. DNA extraction for the molecular analyzes was performed according to the Guanidine Isothiocyanate (GT) protocol. Once the DNA was extracted, they were submitted to two polymerase chain reaction (PCR) protocols. Two markers were used to amplify approximately 460-bp fragments of the mitochondrial 16S rRNA and 1200-bp gene from the second internal transcript space (ITS2) of nuclear ribosomal DNA. The specimens of females and males were morphologically evaluated and identified as *Amblyomma triste*. Specimens from the National Collection of Ticks "Danilo Gonçalves Saraiva" were compared with the specimens of the present study. Statistical difference ( $P < 0.05$ ) was observed for the dimensions (Right thigh I / Right thigh I, Right thigh IV / Right thigh IV, Left thigh IV / Left thigh IV) Thigh Thighs I and Thigh IV. There was no statistical difference ( $P > 0.05$ ) for the length of the Chapter Length by Chapter Width. For females, statistical difference was observed for right spur I, left thigh I, left spur I and section width. Sequences obtained when compared, according to the mitochondrial 16S rRNA gene and sequences derived from the nuclear ribosomal ITS2, it is observed that the specimens found in Maranhão have similarity to *Amblyomma maculatum* from the United States.

**Key-words:** Ticks, Maranhão, *A. maculatum*, morphometry

1  
2

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Mensuração de parâmetros (coxa, espinhos e capítulo) de carrapatos machos do estado do Maranhão e da Coleção Nacional de Carrapatos “Danilo Gonçalves Saraiva”/FMVZ/USP.....	36
<b>Tabela 2.</b> Mensuração de parâmetros (coxa, espinhos e capítulo) de carrapatos fêmeas do estado do Maranhão e da Coleção Nacional de Carrapatos “Danilo Gonçalves Saraiva”/FMVZ/USP.....	37

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26

1  
2  
3

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Abertura genital de fêmea. <i>Amblyomma cajennense</i> (A); <i>Amblyomma sculptum</i> (B).....	23
<b>Figura 2.</b> Esquema de elementos da ornamentação em machos. Area Central (a); Ponto Ocular (b); Primeiro ponto lateral (c); Segundo ponto lateral (d); Terceiro ponto lateral (e); Ponto acessório posterior (f); Ponto médio posterior (g); Fóvea (h); Ramo posterior do ponto limitante (i); Ramo anterior do ponto limitante (j); Ponto limitante (k); Faixa marginal (l); Ponto acessório anterior (m); Ponto cervical (n).....	23
<b>Figura 3.</b> Esquema de elementos da ornamentação em fêmeas do complexo <i>A. cajennense</i> . Área central (a); Ponto ocular (b); Ponto cervical (c); Ponto acessório (d); Ponto limitante (e).....	24
<b>Figura 4.</b> Localidades dos carrapatos depositados da coleção nacional de carrapatos “Danilo Gonçalves Saraiva”.....	26
<b>Figura 5:</b> Vista ventral de carrapato do Complexo <i>A. maculatum</i> , mensuração de coxa e espinhos.....	28
<b>Figura 6.</b> Vista ventral de carrapatos do Complexo <i>maculatum</i> , mensuração de coxas e espinhos, macho (A) e fêmea (B) .....	28
<b>Figura 7.</b> Mensuração do capítulo de carrapato do Complexo <i>A. maculatum</i> .....	29
<b>Figura 8.</b> Espécimes machos de carrapatos do estado do Maranhão. Destaque para faixa longitudinal interrompida por mancha.....	33
<b>Figura 9.</b> Capítulo em carrapatos machos, destacando variáveis de Comprimento e largura; Carrapato do Maranhão (A); Carrapato da CNC “Danilo Gonçalves Saraiva”/FMVZ/USP (B).....	34
<b>Figura 10.</b> Visualização das dimensões dos Carrapatos; Visualização da Coxa IV e Espinho IV em espécime do Maranhão (A); Visualização da Coxa I e Espinho I em espécime Maranhão (B); Visualização da Coxa IV e Espinho IV em espécime da CNC “Danilo Gonçalves Saraiva”/FMVZ/USP (C); Visualização da Coxa I e Espinho I em espécime da CNC “Danilo Gonçalves Saraiva”/FMVZ/USP (D).....	34
<b>Figura 11.</b> <i>Amblyomma triste</i> . Vista dorsal de <i>Amblyomma triste</i> fêmea do Chile (A); Vista dorsal de macho do Chile (B); Vista dorsal de fêmea do Maranhão (C); Vista dorsal de macho do Maranhão (D).....	38

**Figura 12.** Metatarso de *Amblyomma maculatum* da Colômbia contendo dois espinhos grossos (A); Metatarso de *Amblyomma triste* do Chile contendo um espinho grosso e um espinho fino (B); Metatarso de *Amblyomma triste* do Brasil contendo um espinho grosso e uma cerda (C)..... 39

**Figura 13.** Metatarso de *Amblyomma triste* do Maranhão, visualização do espinho (seta preta) e da cerda (seta vermelha)..... 40

**Figura 14.** Árvore de máxima parcimônia dos espécimes de carrapatos do complexo *Amblyomma maculatum* a partir de sequências do gene 16S mitocondrial. Os valores de suporte são derivados de Bootstrap de 1000 repetições. O *Amblyomma tigrinum* corresponde a uma sequência utilizada para os grupos externos. Os códigos inseridos correspondem a seus números de acesso na plataforma GenBank..... 41

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20

1

2

## SUMÁRIO

1.	Introdução.....	14
2.	Revisão de literatura.....	15
	2.1 Morfologia .....	15
	2.2 Hábito alimentar .....	16
	2.3 Ciclo biológico .....	18
	2.4 Especificidade .....	20
	2.5 Gênero <i>Amblyomma</i> e o termo complexo.....	20
	2.5 <i>Amblyomma triste</i> e o estudo dos complexos .....	21
3	Objetivo Geral .....	24
	3.1 Objetivos específicos .....	24
4	Material e Métodos .....	25
	4. 1 Local .....	25
	4.2 Coleta e infestações .....	26
	4.3 Análises morfológicas .....	27
	4.4 Análises moleculares .....	29
	4.4.1 Extração do DNA .....	29
	4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase .....	30
	4.4.3 Purificação e Sequenciamento.....	31
	4.4.4 Análise das sequências.....	31
5	Análise estatística .....	31
6	Resultados e Discussão.....	32
7	Conclusão.....	42
	Referências.....	43

3

4

5

6

7

## 1 INTRODUÇÃO

Carrapatos são artrópodes ectoparasitas, da classe Arachnida, de distribuição mundial, parasitando vertebrados terrestres, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (VIEIRA et al., 2004). São importantes para a Saúde Pública e animal por transmitirem agentes infecciosos e causarem injúrias a seus hospedeiros durante a hematofagia (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Os carrapatos podem permanecer fixados à pele do hospedeiro por dias ou semanas, quando secretam uma saliva extremamente funcional, que impede a coagulação sanguínea e as reações de defesa do organismo no sítio de fixação. Além disso, esta saliva possui substâncias vasoativas, que induzem vasodilatação local, facilitando a ingestão de sangue (LABRUNA et al., 2004a). O tipo do seu hábito alimentar faz com que os carrapatos constituam um grupo de indivíduos vetores de agentes infecciosos tais como vírus, bactérias, helmintos e protozoários (VIEIRA et al., 2004).

Estes são classificados em duas grandes famílias, Ixodidae (carrapatos duros) e Argasidae (carrapatos moles). Uma terceira família, Nuttalliellidae, contém uma única espécie, e esta já foi usada para descobrir as origens das espécies, visto que, possui uma linhagem basal de características morfológicas e genéticas; e a partir do *Nuttalliella namaqua* foi possível traçar a origem desses artrópodes na porção que hoje se localiza a África no antigo continente de Gondwana (MANS et al., 2011; MANS et al. 2012).

Cerca de 840 espécies foram descritas em todo o mundo. Os carrapatos da família Ixodidae, se caracterizam por apresentar escudo dorsal, sendo a maior e mais importante família, compreende em torno de 670 espécies. Os da família Argasidae, tem exoesqueleto flexível, e cerca de 167 espécies. Espécies de ambas as famílias têm quatro estágios no ciclo de vida: ovo, larva, ninfa e adulto. Na família Ixodidae, encontram-se cinco subfamílias, das quais Amblyomminae abriga 130 espécies num só gênero, o *Amblyomma*, sendo que 33 delas tem ocorrência no Brasil (BURGER et al., 2012; GUGLIELMONE et al., 2010; KRANTZ; WALTER, 2009; MARTINS et al., 2010; SONENSHINE; ROE, 2014). O gênero *Amblyomma* é o de maior importância médica, porque inclui as principais espécies que parasitam humanos no Brasil. Dentre elas, destacam-se *A. aureolatum*, *A. cajennense* e *A. triste*, que são incriminados na transmissão da febre maculosa e outras

1 riquetsioses humanas (LABRUNA et al., 2004c; GUEDES et al., 2005; PINTER;  
2 LABRUNA, 2006; SILVEIRA et al., 2007; LABRUNA, 2009).

3 Devido ao abrangente número de discussões e revisões sobre a sistemática de  
4 carrapatos e a confirmação da ocorrência de espécies crípticas em diversos clados, ficaram  
5 então definidos “complexos” de espécies em certas regiões geográficas do globo. Dentre  
6 eles existe o “complexo *A. maculatum*”, em destaque o *Amblyomma triste*, presente no  
7 território nacional, com relevância por ser vetor competente da bactéria gram negativa do  
8 gênero *Rickettsia* (*R. parkeri*) (GUGLIELMONE et al., 2003; LABRUNA et al., 2011).

9

## 10 2 REVISÃO DE LITERATURA

11

### 12 2.1 MORFOLOGIA

13

14 O corpo do carrapato é caracterizado por dois segmentos fusionados. A porção  
15 anterior é denominada de capítulo constituído pelas peças bucais (hipostômio e quelíceras),  
16 palpos e um anel que envolve as peças denominado base do capítulo. A parte posterior que  
17 equivale ao corpo é chamado de idiossoma, inclui as patas, o poro genital (gonoporo), placa  
18 espiracular e abertura anal (SONENSHINE, 1991).

19 Carrapatos da família Ixodidae são caracterizados por possuírem escudo fortemente  
20 esclerotizado em todas as fases do desenvolvimento. Esta estrutura ocupa um terço do  
21 dorso das larvas, ninfas e fêmeas não alimentadas, porém, cobre inteiramente o dorso nos  
22 machos. O corpo é ovalado e com dimorfismo sexual acentuado nos adultos. O capítulo é  
23 sempre terminal em todos os estágios (KEIRANS; LITWAK, 1989; SONENSHINE, 1991,  
24 1993).

25 Os carrapatos adultos em jejum podem chegar de 2 mm a 20 mm fêmeas  
26 ingurgitadas podem chegar de 25 a 30 mm e podem pesar até 100 vezes seu peso pré-  
27 ingurgitamento. As estruturas do aparelho bucal são encontradas no capítulo e incluem dois  
28 palpos de quatro segmentos no qual os carrapatos ixodídeos possuem quimiorreceptores no  
29 quarto segmento distal. Os palpos não penetram na ferida, eles são pressionados  
30 lateralmente e horizontalmente contra a pele durante a alimentação. O hipostômio é



1 cilíndrico e longo nos ixodídeos onde a dentição se apresenta ventralmente. A ligação do  
2 capítulo ao idiossoma é realizada por uma membrana flexível, membrana essa que liga  
3 outros segmentos como patas (BALASHOV, 1972; SONENSHINE, 1993).

4 O dimorfismo sexual é acentuado com fêmeas, ninfas e larvas possuindo um escudo  
5 curto, não ultrapassando a região mediana do corpo; nos machos o escudo é longo se  
6 estendendo até a margem posterior. O aloescudo ou noto é extenso nas fêmeas, ninfas e  
7 larvas, e quase imperceptível nos machos. As placas espiculares estão situadas  
8 posteriormente ao quarto par de patas. O escudo, em alguns gêneros podem ser  
9 ornamentado, apresentar festões e um par de olhos. Sulcos podem estar presentes tais como,  
10 marginal, sulcos cervicais, laterais, entre outros. O sulco marginal, se presente, completo ou  
11 incompleto nos machos, ou sua ausência, é importante para o diagnóstico específico no  
12 gênero *Amblyomma* (BARROS-BATESTI et al., 2006).

## 14 2.2 HÁBITO ALIMENTAR

15  
16 Os carrapatos tem um sistema exclusivamente desenvolvido para obter nutrientes de  
17 seus hospedeiros. Eles se fixam à pele do hospedeiro utilizando seu hipostômio como  
18 âncora, criando uma lesão de onde irá ingerir sangue ou fluidos do tecido (BALASHOV  
19 1972; KEMP et al., 1982). Carrapatos moles (argasídeos) se ingurgitam totalmente dentro  
20 de minutos ou de algumas horas enquanto carrapatos duros (ixodídeos) podem levar dias  
21 para completar a alimentação no homem ou animal. Os agentes farmacológicos da saliva  
22 possuem atividades antihemostáticas, anti-inflamatórias, imunossupressoras e  
23 anticoagulantes (RIBEIRO, 1987; WIKEL, 1996). A alimentação é a fase que o carrapato  
24 causa danos diretos no hospedeiro e os microrganismos causadores de doenças são  
25 ingeridos ou expulsos. Waladde e Rice (1982) dividiram o processo de alimentação em  
26 algumas fases distintas: 1. **Procura**, a caça ao hospedeiro; 2. **Aderência**, à pele do  
27 hospedeiro; 3. **Exploração**, andando pelo hospedeiro procurando um local; 4. **Penetração**,  
28 aparelho bucal inserido na pele; 5. **Anexo**, local de alimentação estabelecido; 6. **Ingestão**,  
29 fluídos corporais sendo adquiridos; 7. **Ingurgitação**, alimentação completa adquirida; 8.  
30 **Destacamento**, retirada das peças bucais do hospedeiro; 9. **Retirada**, onde o carrapato  
31 totalmente ingurgitado cai de seu hospedeiro.

1 Os ixodídeos buscam e ao encontrar o hospedeiro, se fixam no pelo e pele com a  
2 garra tarsal, em seguida, cortam a epiderme com suas quelíceras permitindo que o  
3 hipostômio com seus dentes, seja inserido dentro da abertura; a saliva secretada irá agir  
4 como fixadora nos tecidos. O sangue e fluidos são ingeridos dentro do canal alimentar que  
5 é formado pela superfície dorsal do hipostômio, superfícies ventrais das quelíceras e ação  
6 de sucção da faringe, os ixodídeos secretam saliva em intervalos que se alternam com a  
7 ingestão dos fluídos, assim, os alimentos passam da faringe através do esôfago e para  
8 dentro do intestino com seus múltiplos divertículos; lá a digestão ocorre em um processo  
9 intracelular lento (KEMP et al., 1982).

10 Cada estágio de desenvolvimento de um ixodídeo normalmente precisa de 2 ou mais  
11 dias para a ingestão de uma única refeição. A maioria das larvas alimenta-se de 3 a 5 dias,  
12 ninfas entre 3 a 8 dias e os adultos chegam a passar de 6 a 12 dias. A alimentação de forma  
13 lenta permite que o carrapato desenvolva tecidos, suas glândulas salivares e a cutícula, onde  
14 irá permitir a expansão do corpo durante a fase final de ingurgitamento rápido que ocorre  
15 durante as suas últimas horas de fixação (BALASHOV, 1972).

16 A grande ingestão de sangue e fluidos é característica dos carrapatos, uma fêmea  
17 ingurgitada de ixodídeo pode pesar de 125 a 150 vezes a mais do seu peso pré alimentada.  
18 A transmissão de agentes causadores de doenças é favorecido pela secreção de grandes  
19 quantidades de saliva pelo longo período de fixação, excreção de fezes e fluidos semi  
20 digeridos podem resultar em concentrações de agentes patogênicos sendo depositados na  
21 pele perto dos locais de alimentação, podendo haver uma facilidade na sua transmissão  
22 (KAUFMAN & SAUER, 1982).

23 A saliva injetada pode suprimir a resposta inflamatória do hospedeiro, reduzindo as  
24 defesas do hospedeiro que poderiam prejudicar sua alimentação. Entretanto, muitas  
25 espécies de animais são capazes de resistir a alimentação devido as repetidas infestações  
26 por carrapatos. Eles em resposta desenvolvem complexo de anticorpos, células  
27 apresentadoras de antígeno e linfócitos T. A resistência adquirida dos hospedeiros pode  
28 resultar na redução da ingestão de sangue, perda de peso, redução dos ovos e sua  
29 viabilidade, inibição da muda e morte (WIKEL, 1996).

30

31

## 2.3 CICLO BIOLÓGICO

Todos os ixodídeos e argasídeos têm ciclos de vida relativamente complexos. Os estágios de desenvolvimento dos argasídeos incluem ovos; larva hexópoda; ninfa octópode, esta podendo possuir até oito estágios evolutivos; e adultos fêmeas e machos octópodes. Os ixodídeos se diferenciam por possuir apenas um estágio ninfal (BALASHOV 1972; SONENSHINE, 1993).

Nos Argasídeos, para cada estágio imaturo, ocorre uma refeição antes da ecdise, porém, em algumas espécies, as ninfas podem mudar do primeiro para o segundo estágio sem alimentação, ou ainda, pode haver dois repastos sanguíneos antes da muda. Os adultos alimentam-se múltiplas vezes, geralmente antes da cópula e oviposições. Na maioria das espécies, ninfas e adultos alimentam-se rapidamente (cerca de 30 a 40 minutos) enquanto as larvas permanecem fixas ao hospedeiro de 7 a 10 dias (BARROS-BATESTI et al. 2006).

A alimentação dos ixodídeos nos estágios pós embrionários perdura por diversos dias. Com exceção das poucas espécies partenogênicas, a maioria dos carrapatos copula sobre o hospedeiro (BARROS-BATESTI et al. 2006). As larvas dos carrapatos não possuem estigmas respiratórios, são imaturas sexualmente e apresentam três pares de pernas. Ao saírem do ovo elas já têm um aspecto semelhante ao do carrapato adulto. Após alimentação, as larvas sofrem ecdise e mudam para ninfas. Estas também são imaturas sexualmente, mas já apresentam placas espiraculares e têm quatro pares de pernas. Da mesma forma, após a alimentação, as ninfas sofrem uma muda, dando origem aos adultos, machos e fêmeas (GUIMARÃES et al., 2001). Estes, antes de se alimentarem, são do mesmo tamanho das ninfas ingurgitadas, sendo o único estágio que apresenta dimorfismo sexual. De modo geral, metade das ninfas muda para machos, e a outra metade para fêmeas (VIEIRA et al., 2004).

As mudas ocorrem no meio ambiente, com exceção de algumas espécies, pós desprendimento ativo da larva ou ninfa ingurgitada do hospedeiro (VIEIRA et al., 2004). As condições climáticas e a latitude representam os principais fatores reguladores do ciclo biológico dos carrapatos. A temperatura exerce um papel dominante, regulando a duração de cada fase de desenvolvimento passada fora do hospedeiro como ovoposição, incubação dos ovos e ecdises (BARROS-BATESTI et al. 2006).

1 Os carrapatos não nidícolas como também podem ser chamados são representados  
2 principalmente por carrapatos duros que existem em ambientes abertos como florestas,  
3 savanas, pastagens e pradarias. O número e tipo de hospedeiros podem variar muito de  
4 acordo com o carrapato, tratando-se de ixodídeos (SONENSHINE, 1993). O carrapato  
5 *Boophilus microplus*, é um exemplo das espécies que possui um número estreito de  
6 hospedeiros, onde alimenta-se quase exclusivamente de bovinos e outros ruminantes. Em  
7 contraste, o *Ixodes scapularis* se alimenta de várias espécies tais como mamíferos, aves e  
8 répteis. E embora esta última espécie tem sido relatada parasitando mais de 100 espécies,  
9 ele possui suas preferências e algumas diferenças com região, como as larvas e ninfas no  
10 nordeste dos Estados Unidos tem preferência por roedores e ao sudeste elas tem por  
11 lagartos (SAUER et al. 1986; OLIVER et al. 1993; SPIELMAN et al. 1985; SPIELMAN et  
12 al. 1997).

13 O hábito alimentar hematófago e suas alterações, refletem seu modo de vida livre e  
14 a presença de um à três hospedeiros no seu ciclo biológico. Carrapatos trioxenos, como os  
15 pertencentes ao gênero *Amblyomma*, consomem sangue três vezes durante a vida. No Brasil  
16 e em regiões de clima tropical, o tempo de uma geração é muitas vezes de 1 a 2 anos,  
17 embora nos climas mais frios, uma geração pode ter 5 ou 6 anos. Larvas e ninfas se  
18 alimentam de pequenos mamíferos, aves, répteis e em algumas situações animais maiores.  
19 Adultos tendem a se alimentar de animais de grande porte como cavalos (*Equus caballus*)  
20 (MARTINS et al. 2016), entretanto, diversos trabalhos relatam esse parasitismo também  
21 sendo realizado por outras espécies em répteis como Jurarás (*Kinosternon scorpioides*)  
22 (SOARES et al. 2015) e pequenos mamíferos como Gambás (*Didelphis albiventris*)  
23 (KRAWCZAK et al. 2016) Independente do tempo das gerações, a maior parte do tempo é  
24 passada no solo ou na vegetação, enquanto nos hospedeiros passam de 3 a 5 semanas  
25 (SONENSHINE, 1993).

26

27

28

29

30 2.4 ESPECIFICIDADE

31

1 Algumas espécies de carrapatos selecionam grupos mais específicos de hospedeiros,  
2 ao passo que outras são menos específicas, sendo encontradas numa variedade de espécies  
3 hospedeiras. Essas ações são influenciadas por alguns fatores: **Fatores relacionados ao**  
4 **carrapatos**, como o comportamento na hora da procura por hospedeiros e fatores  
5 estimulantes como odor e concentração de CO<sup>2</sup> resultante da expiração dos possíveis  
6 hospedeiros; **Fatores relacionados ao hospedeiro**, como mecanismos de defesa, barreiras  
7 físicas do corpo, comportamento de limpeza e reações imunológicas; **Fatores relacionados**  
8 **ao ambiente**, como a disponibilidade quantitativa e qualitativa de hospedeiros para o  
9 carrapato (BARROS-BATESTI et al. 2006).

## 10 11 12 2.5 GÊNERO *AMBYOMMA* E O TERMO “COMPLEXO”

13  
14 Dentro da família Ixodidae encontram-se cinco subfamílias, das quais  
15 Amblyomminae abriga 130 espécies num só gênero, *Amblyomma*, e 33 delas tem  
16 ocorrência no Brasil (BURGER et al., 2012; GUGLIELMONE et al., 2010; KRANTZ;  
17 WALTER, 2009; MARTINS et al., 2010; SONENSHINE; ROE, 2014). O gênero  
18 *Amblyomma* é o de maior importância médica, já que inclui as principais espécies que  
19 parasitam humanos neste país. Dentre elas, destacam-se *A. aureolatum*, *A. cajennense* e *A.*  
20 *triste*, que são incriminados na transmissão da febre maculosa e outras riquetsioses para  
21 humanos (LABRUNA et al., 2004b; GUEDES et al., 2005; PINTER; LABRUNA, 2006;  
22 SILVEIRA et al., 2007; LABRUNA, 2009).

23 Fazendo o uso de técnicas moleculares ao longo dos anos, diversos autores como  
24 Black e Piesman (1994), Barker e Murrel (2002), Estrada-Peña et al. (2005), Aguirre et al.  
25 (2005), Tomassone et al. (2010), Burger et al. (2012) e Nadolny et al. (2015) compararam  
26 seus resultados com as descrições morfológicas preexistentes cruzando seus dados para  
27 chegar em um resultado em comum, a presença de uma divisão de espécies a partir de um  
28 indivíduo comum, ou seja, um carrapato que geneticamente se divide em duas ou mais  
29 espécies formando o que se chama de complexo.

30 Devido ao abrangente número de discussões e revisões sobre a sistemática de  
31 carrapatos e a confirmação da ocorrência de espécies crípticas em diversos clados, ficaram

1 então definidos “complexos” de espécies em certas regiões geográficas do globo, como é o  
2 caso do “complexo *A. cajennense*” na América do Sul, deixando clara a necessidade de  
3 novos estudos abordando aspectos de ecologia, biogeografia, morfologia e biologia  
4 molecular para a resolução dos problemas desta ordem, buscando uma abordagem completa  
5 e mais robusta da sistemática destes ectoparasitas (GUGLIELMONE et al., 2003;  
6 LABRUNA et al., 2011).

7 Existem três complexos do gênero *Amblyomma* de relevância para a medicina  
8 veterinária e para a saúde pública que ocorrem na América: O “complexo *A. cajennense*”, o  
9 “complexo *A. ovale*” e o “complexo *A. maculatum*”, as espécies *Amblyomma cajennense*  
10 (publicada como *A. sculptum*), *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma triste*, ocorrem no  
11 Brasil e estão relacionadas com a transmissão da bactéria gram negativa do gênero  
12 *Rickettsia*, agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (LABRUNA et al., 2011;  
13 GUGLIELMONE et al., 2003; NAVA et al., 2014)

14

## 15 2.6 *Amblyomma triste* E O ESTUDO DOS COMPLEXOS

16

17 O *Amblyomma triste* foi descrito pela primeira vez por Koch em 1844 em  
18 Montevideo no Uruguai, e era relatado pelos autores como um sinônimo do *Amblyomma*  
19 *maculatum* da América do Norte. Depois da revisão feita por Kohls (1956) foi confirmado  
20 que o *Amblyomma maculatum*, o *Amblyomma triste* e o *Amblyomma tigrinum* são espécies  
21 distintas. A distribuição do *Amblyomma triste* e *Amblyomma tigrinum* é restrita a América  
22 do Sul e o *Amblyomma maculatum* ao Estados Unidos, América Central e algumas áreas da  
23 Colômbia e Venezuela (KOHLS 1956; JONES et al. 1972; GUGLIELMONE et al. 1982;  
24 EVANS et al. 2000)

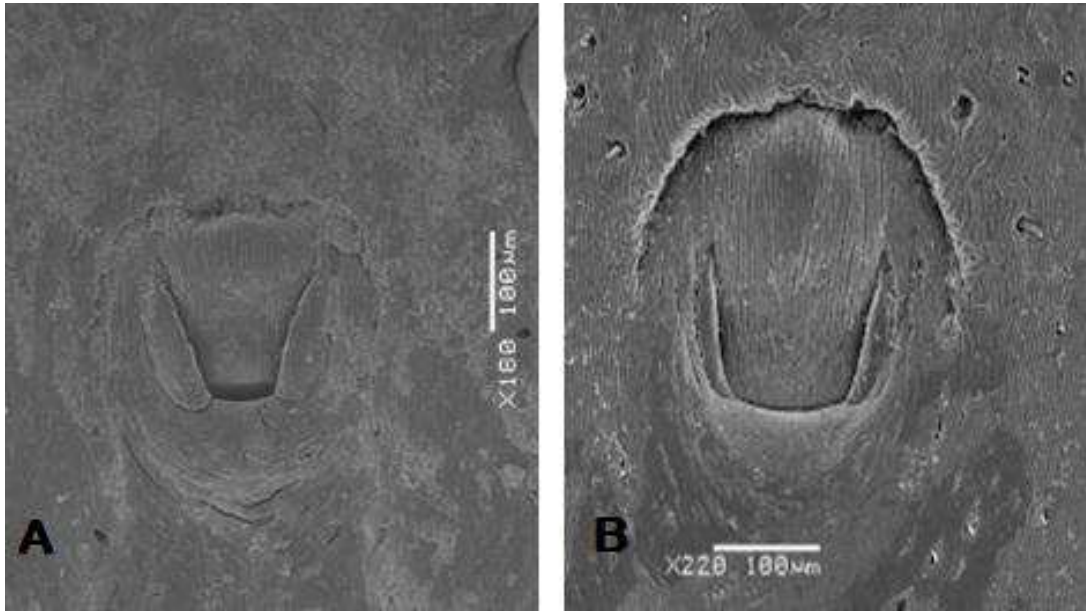
25

26 A distribuição do *Amblyomma triste* esta limitada a Argentina (Ivancovich 1980),  
27 Brasil (KOHLS 1956; SZABÓ et al., 2003), Equador (KEIRANS, 1984), Uruguai  
28 (SAMPAIO et al., 1992; VENZAL et al., 2004) e Chile (ABARCA et al., 2012). No Brasil  
29 há registros de parasitismo por *Amblyomma triste* em antas (*Tapirus terrestris*) (KOHLS,  
30 1956), em cão doméstico (FREIRE, 1967), em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*)  
31 (SINKOC et al. 1997), tamanduá (*Myrmecophaga tridactyla*) (LABRUNA et al., 2002) e o  
32 maior número de registros em Cervos do pantanal, considerado hospedeiro primário  
(*Blastocerus dichotomus*) (SZABÓ et al., 2003).

1           No Equador há registro de *A. triste* em gado (KEIRANS, 1984), na Argentina em  
2 cães (IVANCOVICH, 1980) e no Uruguai há relatos de parasitismo até em humanos  
3 (VENZAL et al. 2004), fazendo com essa relação tenha uma relevância maior, visto que é o  
4 carrapato principal vetor de uma riquetisiose cutânea ganglionar (*R. parkeri*) neste país  
5 (CONTI-DÍAZ, 2001)

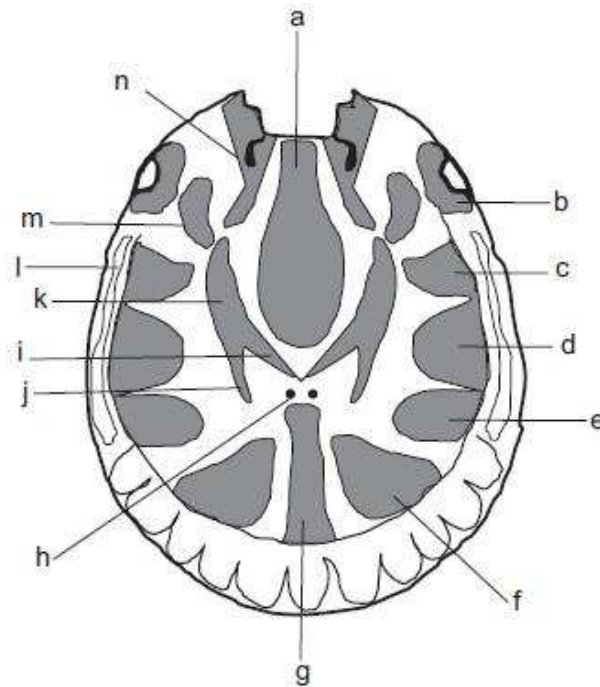
6           No Brasil o hospedeiro primário natural dessa espécie é o cervo do Pantanal  
7 (SZABÓ et al., 2003), e o parasitismo em espécies como cão e o próprio homem é  
8 explicado pela extinção desse cervo em alguns países da América Latina.

9           Em comparação com o complexo *A. maculatum* o complexo *A. cajennense* também  
10 foi alvo de estudos entre pesquisadores da América (LABRUNA et al., 2011;  
11 MASTROPAOLO et al., 2011; BEATI et al., 2013; NAVA et al., 2014) que indicaram o  
12 mesmo ser composto por seis espécies: *A. cajennense*, *A. interandinum*, *A. mixtum*, *A.*  
13 *patimoi*, *A. sculptum* e *A. tonellie*. Diferentemente do complexo *A. maculatum*, a união dos  
14 fatores como características morfológicas, distribuição geográfica e análise molecular  
15 foram fundamentais para a distinção das espécies. As localidades dos achados tiveram uma  
16 amplitude geográfica considerável visto que espécies como o *Amblyomma cajennense*  
17 foram coletadas na região Amazônica e *Amblyomma mixtum* foram coletadas no Texas, nos  
18 Estados Unidos. Entre as diferenças morfológicas que foram abordadas no estudo do  
19 complexo *A. cajennense* podemos citar a abertura genital da fêmea onde o *Amblyomma*  
20 *cajennense* se diferencia do *A. sculptum* pela sua estrutura em forma de “V”, caracterizando  
21 a espécie *sensu strictum* (Figura 1).



1  
2 **Figura 1.** Abertura genital de fêmea. *Amblyomma cajennense* (A); *Amblyomma sculptum*  
3 (B). Fonte: NAVA et al. 2014

4 A ornamentação das espécies é uma característica marcante dentro de um complexo,  
5 Nava et al. (2014) adotaram as marcações do escudo principalmente em machos para  
6 definição e caracterização dentro do complexo *A. cajennense* (Figura 2)



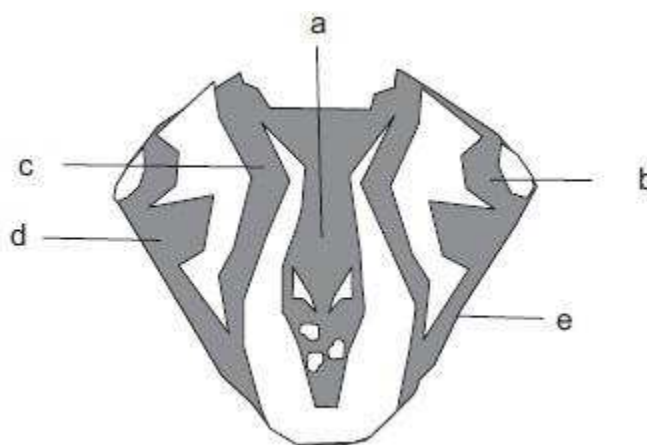
7  
8 **Figura 2.** Esquema de elementos da ornamentação em machos. Area central (a); Ponto  
9 Ocular (b); Primeiro ponto lateral (c); Segundo ponto lateral (d); Terceiro ponto lateral (e);



1 Ponto acessório posterior (f); Ponto médio posterior (g); Fóvea (h); Ramo posterior do  
2 ponto limitante (i); Ramo anterior do ponto limitante (j); Ponto limitante (k); Faixa  
3 marginal (l); Ponto acessório anterior (m); Ponto cervical (n). Fonte: NAVA et al. 2014

4

5 Em fêmeas, apesar do escudo possuir um tamanho menor a complexidade da análise  
6 morfológica surge a partir do ingurgitamento que é influenciado por fatores externos como  
7 hospedeiro, temperatura e umidade. Os elementos que compõe sua ornamentação são  
8 distribuídos, na maioria das espécies em uma área central e uma área lateral que se divide  
9 em pontos, como os cervicais, acessórios e limitantes (Figura 3).



10

11 **Figura 3** . Esquema de elementos da ornamentação em fêmeas do complexo *A. cajennense*.  
12 Área central (a); Ponto ocular (b); Ponto cervical (c); Ponto acessório (d); Ponto limitante  
13 (e). Fonte: NAVA et al. 2014

14

### 15 3. OBJETIVOS

#### 16 3.1 Objetivo geral:

- 17 • Analisar parâmetros morfométricos e moleculares de carrapatos do complexo  
18 *Amblyomma maculatum* do estado do Maranhão e de outras localidades do Brasil,  
19 depositados na Coleção Nacional de Carrapatos (CNC) “Danilo Gonçalves  
20 Saraiva”, da Universidade de São Paulo.

#### 21 3.2 Objetivos específicos:

- 22 • Analisar as diferenças morfométricas entre os exemplares de carrapatos do  
23 complexo *A. maculatum* através de microscopia ótica.

- 1       • Analisar as possíveis variações genéticas entre os carrapatos do complexo *A.*  
2       *maculatum* oriundos do Maranhão com as sequencias dos carrapatos previamente  
3       depositados (GenBank).

4

#### 5   **4. MATERIAL E MÉTODOS**

6       Este trabalho foi submetido ao comitê de ética da Universidade Estadual do  
7   Maranhão com o número de protocolo 32/2016.

8

##### 9       **4.1 Amostras**

10       Foram coletados 21 espécimes de carrapatos do complexo *Amblyomma maculatum*  
11   no município de Bacurituba (02° 42' 21" S 44° 44' 16" O) no estado do Maranhão.  
12   Espécimes da Coleção Nacional de Carrapatos (CNC) “Danilo Gonçalves Saraiva” da  
13   Universidade de São Paulo, oriundos dos municípios de Nova Alvorada do Sul (21° 27' 57"  
14   S 54° 23' 02" O) e Bataguassu (21° 42' 50" S 52° 25' 19" O), localizados no estado do Mato  
15   Grosso do Sul; Poconé (16° 15' 25" S 56° 37' 22" O), no estado do Mato Grosso e do  
16   Parque Nacional Grande Sertões Veredas, Chapada Gaúcha (15° 18' 21" S 45° 37' 04" O),  
17   localizado no estado de Minas Gerais foram utilizados para fins comparativos com os  
18   espécimes do Maranhão.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14

**Figura 4.** Localidades dos carrapatos depositados da coleção nacional de carrapatos “Danilo Gonçalves Saraiva”

#### 4.2 Obtenção das progênes

Os carrapatos coletados no Maranhão foram liberados para o interior de câmaras de alimentação previamente montadas sobre *Cavia porcellus*. As câmaras foram examinadas diariamente e os carrapatos ingurgitados que se desprenderam naturalmente foram recolhidos. Destes, 8 fêmeas foram acondicionadas em potes de plásticos devidamente identificados e acondicionados em estufa BOD (demanda bioquímica de oxigênio) 27 °C e 90% UR, para a realização da postura, incubação dos ovos e posterior eclosão das larvas.

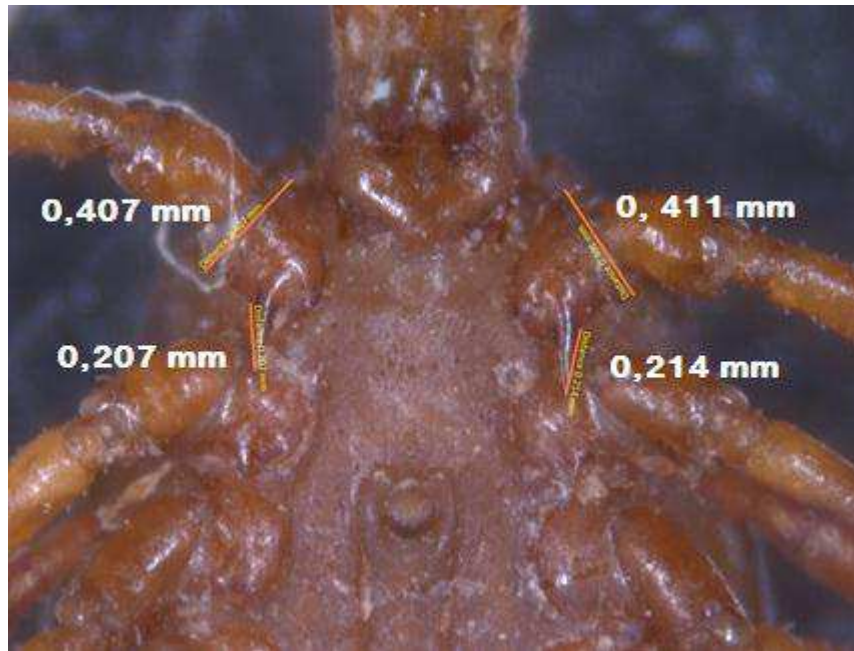
Após a eclosão, as larvas foram infestadas em *Cavia porcellus* até a obtenção dos adultos, alvo do estudo comparativo.

### 1           **4.3 Análises morfológicas**

2           Para identificação taxonômica baseada nas características morfológicas, segundo  
3 Barros-Battesti et al. (2006), sessenta carrapatos (trinta machos e trinta fêmeas)  
4 provenientes do estado do Maranhão, produtos da infestação experimental foram utilizados  
5 além de cinco espécimes do Grande Sertões Veredas (estado de Minas Gerais), três de  
6 Poconé (estado do Mato Grosso), dois de Alvorada do Sul e dez de Bataguassu (estado do  
7 Mato Grosso do Sul), para comparação, totalizando vinte espécimes machos. Para fêmeas,  
8 foram selecionadas sete espécimes do Grande Sertões Veredas, uma espécime de  
9 Bataguassu e dois espécimes de Porto Jofre, totalizando dez espécimes fêmeas disponíveis  
10 na Coleção Nacional de carrapatos da Universidade de São Paulo.

11           Após a comparação morfológica dos espécimes, utilizando-se o estereomicroscópio  
12 *Carl Zeiss* modelo SteREO Discovery. V12 acoplado ao software ZEN foi realizada a  
13 mensuração dos seguintes parâmetros: comprimento da coxa I e espinho I (direito e  
14 esquerdo), coxa IV e espinho IV (direito e esquerdo), comprimento e largura do capítulo.

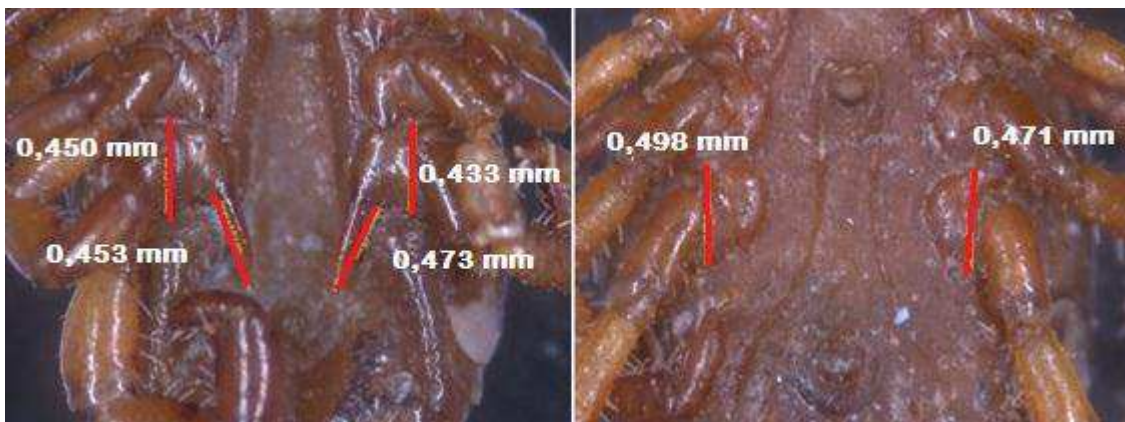
15           Para estabelecer um parâmetro na mensuração das estruturas foi adotado um padrão;  
16 na mensuração da Coxa I, foram utilizados dois pontos que formam a base da junção  
17 (largura) com trocanter conforme mostra a Figura 5; Para espinhos da Coxa I foi utilizado  
18 um ponto que incide da inserção externa do espinho com a coxa e segue até o ponto final do  
19 espinho (comprimento), este podendo chegar ate a borda da coxa II (Figura 5).



1  
2  
3  
4

**Figura 5.** Vista ventral de carrapato fêmea do Complexo *A. maculatum*, mensuração de coxas e espinhos

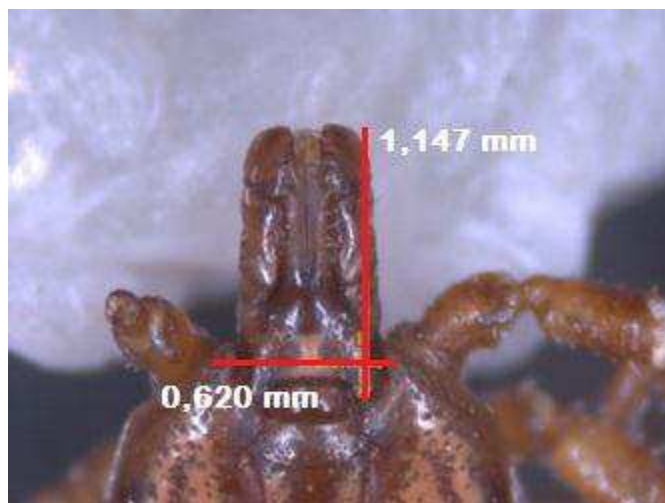
5 Na Coxa IV, existe a presença de dimorfismo sexual entre os carrapatos, apenas nos  
6 machos foram calculados o comprimento do espinho da coxa IV, utilizando os mesmos  
7 padrões adotados na mensuração da coxa I das fêmeas (Figura 6).



8  
9  
10  
11

**Figura 6.** Vista ventral de carrapatos do Complexo *A. maculatum*, mensuração de coxa e espinho, macho (A) e fêmea (B)

1 No que diz respeito à mensuração do Capítulo, padronizou-se uma medida de  
2 comprimento que partiu do ponto distal até o ponto anterior do Hipostômio; e para largura  
3 que foi mensurada da cornua à base apical do Capítulo (Figura 7).



5  
6 **Figura 7.** Mensuração de capítulo de carrapato do Complexo *A. maculatum*

## 7 8 **4.4 Análises Moleculares**

### 9 **4.4.1 Extração de DNA**

10 A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo Isotiocianato de  
11 Guanidina (GT) previamente modificado (CHOMKZYNSKI, 1993). Um total de 8  
12 carrapatos, oriundo da infestação experimental foi colocado em um microtubo contendo  
13 150  $\mu$ L de tampão TE (Tris HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 7,4) e triturados com  
14 ponteira queimada, após perfurados através de uma agulha estéril. Em seguida, foram  
15 homogeneizados no Vortex por 10 segundos e centrifugados por cinco segundos. Foi então  
16 adicionado 450  $\mu$ L de Isotiocianato de Guanidina e incubado por 10 minutos em  
17 temperatura ambiente homogeneizando brevemente no vortex a cada dois minutos.  
18 Posteriormente, 100  $\mu$ L de clorofórmio foram acrescentados, fazendo a inversão deste por  
19 algumas vezes e deixando descansar por dois minutos. O microtubo foi então centrifugado  
20 a 12.000 g por cinco minutos para a separação da fase aquosa formada, a qual foi pipetada e  
21 transferida para outro microtubo previamente identificado. Foram incorporados à fase

1 aquosa 600  $\mu$ L de isopropanol com posterior incubação a  $-20^{\circ}\text{C}$  de duas a 18 horas. Na  
2 etapa seguinte, o microtubo foi centrifugado a 12.000 g a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, o  
3 sobrenadante foi descartado e adicionou-se 800  $\mu$ L de etanol a 70%. Novamente o  
4 microtubo foi centrifugado a 12.000 g por cinco minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante foi  
5 desprezado e o pellet no microtubo aberto ficou secando a  $56^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos no  
6 termobloco. O pellet foi ressuspenso em TE, de 45  $\mu$ L, sendo incubado novamente,  
7 porém com o microtubo fechado, a  $56^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos no termobloco. O microtubo  
8 contendo DNA foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização na PCR.

9

#### 10 **4.4.2 Reação de Polimerase em Cadeia**

11 O DNA extraído foi submetido a dois protocolos de reação em cadeia pela polimerase  
12 (PCR). Dois iniciadores foram utilizados buscando amplificar fragmentos de  
13 aproximadamente 460-pb do gene mitocondrial 16S rRNA segundo Mangold et al., 1998 e  
14 1200-pb do segundo espaço transcrito interno (ITS2) do DNA ribossômico nuclear,  
15 presente em todas as espécies de carrapatos (ZÄHLER et al., 1995 e McLAIN et al., 1995).  
16 A reação de amplificação para o ITS2 foi realizada em microtubos de 200 $\mu$ L adicionando  
17 1,0 $\mu$ L de DNA extraído acrescido de 24,0 $\mu$ L de Mix Dream Taq Green PCR Master Mix (2x)  
18 (Thermo Scientific®), sendo utilizado 12,6 $\mu$ L de Dream Taq, 1 $\mu$ L de primer senso, 1 $\mu$ L de  
19 primer anti senso e 9,4 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. O protocolo térmico utilizado e realizado em  
20 termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®) para o gene ITS2 foi o seguinte:  $95^{\circ}\text{C}$   
21 por 5 minutos, seguidos de 36 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos,  $55^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto e  $72^{\circ}\text{C}$   
22 por 1 minuto e 30 segundos seguido de  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos finalizando com a temperatura  
23 de  $4^{\circ}\text{C}$ . Para o gene 16S a desnaturação inicial seguiu a temperatura de  $94^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos  
24 seguidos de 35 ciclos de 45 segundos a  $94^{\circ}\text{C}$ , 45 segundos para o anelamento e 45  
25 segundos para a extensão a  $72^{\circ}\text{C}$ . A temperatura de anelamento nos 7 primeiros ciclos  
26 aumenta  $0,3^{\circ}\text{C}$  a cada segundo de 47 a  $48,8^{\circ}\text{C}$ , seguidos de 28 ciclos de  $50^{\circ}\text{C}$ . O passo  
27 final da extensão foi seguida de 7 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ . A revelação foi feita com Syber Safe de  
28 acordo com as especificações do fabricante e a visualização das bandas em transiluminador  
29 ultravioleta. As amostras que revelaram bandas de DNA na altura do controle positivo

1 (exemplar de *Ixodes arboricola* previamente confirmado por sequenciamento de DNA),  
2 foram consideradas positivas para a reação da PCR utilizada.

3

#### 4 **4.4.3 Purificação e Sequenciamento**

5 Os produtos da PCR foram purificados utilizando o produto comercial ExoSAP-IT ,  
6 que consiste em Exonuclease I (Exo I) para digerir excesso de primers e Shrimp Alkaline  
7 Phosphatase (SAP) para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR. Para tal,  
8 em microtubo identificado colocou-se 4 µL de ExoSAP e adicionou-se 10 µL da amostra  
9 amplificada na PCR, em seguida as amostras foram colocadas no termociclador, nas  
10 temperaturas de 37°C por 15 minutos e 80°C por mais 15 minutos.

11 Após a purificação os nucleotídeos estavam prontos para serem utilizados na reação  
12 de seqüenciamento com o kit comercial BigDye TM Terminator (Perkin Elmer) de acordo  
13 com especificações do fabricante. As amostras foram seqüenciadas em sequenciador  
14 automático modelo ABI 377 (Applied Biosystem, Foster, CA), disponível no  
15 Departamento da FMVZ/USP.

16

#### 17 **4.4.4 Análise das sequências**

18 As sequências obtidas foram editadas no computador usando o programa SeqMan, e  
19 submetidas a análise de similaridade através do programa Basic Local Alignment Search  
20 Tool (BLAST two sequences analysis) (ALTSCHUL et al., 1990) para verificar homologia  
21 com sequências correspondentes disponíveis no GenBank previamente depositadas  
22 (ESTRADA-PEÑA et al., 2005; OGRZEWALSKA et al., 2014; NADOLNY et al., 2015).  
23 Para a construção da árvore filogenética das espécies utilizou-se o *software* de análises de  
24 sequencias moleculares MEGA 6.

### 25 **5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

26 Para analisar e comparar as variáveis (Coxa I, Coxa IV, Espinho I, Espinho IV,  
27 comprimento do Capítulo e largura do Capítulo) entre os espécimes de carrapato do  
28 complexo *Amblyomma maculatum*, foi utilizado o software Statistical Analysis System



1 (SAS). Utilizou-se o Teste T Student para as variáveis não paramétricas, com nível de  
2 significância de 5% ( $p < 0,05$ ), previamente analisados pelo teste de Brown e Forsythe para  
3 avaliar se possuíam normalidade entre si.

4

## 5 **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

6 Neste estudo os espécimes de *Amblyomma triste* foram coletados em suínos  
7 domésticos (*Sus scrofa domesticus*), diferentemente dos dados registrados em capivaras  
8 (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e cervos do pantanal (*Blastocerus dichotomus*) se encontram  
9 como hospedeiros primários desse carrapato (SINKOC et al. 1997; SZABÓ et al. 2003). No  
10 que se refere à América Latina o achado nesse hospedeiro também se diferencia de achados  
11 da Bolívia em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (MASTROPAOLO et al. 2011), dos  
12 achados no Paraguai em Antas (*Tapirus* sp.) (NAVA et al. 2007), em Cães no Chile e  
13 Argentina (ABARCA et al. 2012; IVANOVICH, 1980) e também em rebanho bovino no  
14 Equador (KEIRANS, 1984).

15 Formas imaturas do carrapato não foram encontradas nos suínos, corroborando com  
16 a literatura (VIEIRA et al. 2004) onde as mesmas possuem predileção por pequenos  
17 mamíferos (como roedores) e por aves na maioria das espécies da família Ixodidae,  
18 entretanto as larvas e ninfas do gênero *Amblyomma* podem em alguns casos se alimentar  
19 dos seus hospedeiros primários. No Brasil, Labruna et al.(2003) trabalharam aspectos do  
20 ciclo de vida do *Amblyomma triste* em *Cavia porcellus* (e outros hospedeiros como galinha  
21 e cão), destacando que em pequenos roedores, fatores como período de ingurgitamento e  
22 ecdise ocorrem de maneira mais rápida e eficiente, podendo interferir no desenvolvimento  
23 de estruturas externas.

24 A chave utilizada para a identificação taxonômica permitiu identificar os espécimes  
25 oriundos do Estado do Maranhão como *Amblyomma triste*, não sendo neste caso a  
26 ornamentação do escudo um caracter levado em consideração já que não foi observado  
27 uniformidade na ornamentação dentre os espécimes identificados. Entretanto, Barros-  
28 Battesti et al. (2006) consideram a interrupção no terço médio da faixa central um caracter  
29 importante na identificação desta espécie de carrapato.

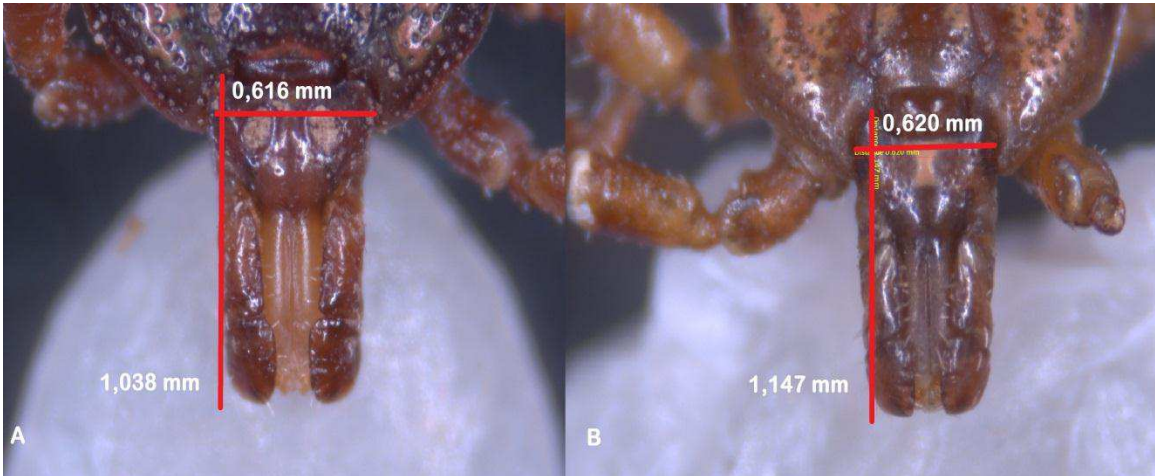
1 A interrupção na faixa escura longitudinal central pode ser visualizada na Figura 8,  
2 e a presença desta em nosso estudo não se fez presente em todos os espécimes, sendo uma  
3 característica descartada para confirmação e comparação com os outros carrapatos.

4 Por outro lado, em machos e fêmeas, a observação das características dos espinhos  
5 da coxa I, presença de esporões nos tarsos II, III e IV, e a dentição do hipostômio foram  
6 determinantes para identificação morfológica. Em se tratando da coxa IV, apenas machos  
7 apresentam espinhos maiores.



10  
11 **Figura 8.** Espécimes machos de carrapatos do Maranhão. Destaque a faixa  
12 longitudinal interrompida por mancha.  
13

14 Nos espécimes machos, observou-se diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os  
15 carrapatos oriundos do Maranhão e os da CNC para as dimensões: Coxa direita I/ Espinho  
16 direito I; Coxa direita IV/Espinho direito IV; Coxa esquerda IV/Espinho esquerdo IV dos  
17 Espinhos da Coxa I e Coxa IV. Não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) para a razão do  
18 comprimento do Capítulo pela Largura do Capítulo (Tabela 1, Figura 9 e 10).



1  
2  
3  
4

**Figura 9.** Capítulo em carrapatos machos, destacando variáveis de comprimento e largura; Carrapato do Maranhão (A); Carrapato da Coleção Nacional de Carrapatos (B).



5  
6  
7  
8  
9  
10

**Figura 10.** Visualização das dimensões dos carrapatos; Visualização da Coxa IV e Espinho IV em espécime do Maranhão (A); Visualização da Coxa I e Espinho I em espécime do Maranhão (B); Visualização da Coxa IV e Espinho IV em espécime da CNC (C); Visualização da Coxa I e Espinho I em espécime da CNC (Bataguassu) (D).

11 A morfometria demonstrou um carrapato com mensurações das estruturas selecionadas  
12 inferiores à media dos outros espécimes, onde os valores de suas estruturas articulares

1 como coxa IV, apresentaram valores médios menores tanto para machos ( $0,41 \pm 0,04$  )  
2 quanto para fêmeas ( $0,47 \pm 0,02$ ), diferindo dos espécimes da CNC onde os valores entre si  
3 permanecem uniforme quanto a região que foram coletados em relação a coxa e espinhos,  
4  $0,48 \pm 0,07$  e  $0,41 \pm 0,1$ , respectivamente (Tabela 1).

5

**Tabela 1.** Mensuração de parâmetros (coxa, espinhos e capítulo) de carrapatos machos do estado do Maranhão e da Coleção Nacional de Carrapatos “Danilo Gonçalves Saraiva” /FMVZ/USP

ORIGEM DA AMOSTRA		VARIÁVEIS														
		CDIV	EDIV	FUNÇÃO	CEIV	EEIV	FUNÇÃO	CDI	EDI	FUNÇÃO	CEI	E EI	FUNÇÃO	CC	LC	FUNÇÃO
<b>MARANHÃO</b>		0,41 <sup>a</sup>	0,23 <sup>a</sup>	1,89 <sup>a</sup>	0,42 <sup>a</sup>	0,23 <sup>a</sup>	1,88 <sup>a</sup>	0,32 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a</sup>	2,73 <sup>a</sup>	0,32 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a</sup>	2,65 <sup>a</sup>	0,92 <sup>a</sup>	0,51 <sup>a</sup>	1,80 <sup>a</sup>
		± 0,04	± 0,05	± 0,33	± 0,35	± 0,05	± 0,37	± 0,02	± 0,02	± 0,42	± 0,02	± 0,02	± 0,45	± 0,08	± 0,03	± 0,09
<b>Grande Sertão Veredas</b>		0,39 <sup>a</sup>	0,3 <sup>ab</sup>	1,39 <sup>b</sup>	0,4 <sup>a</sup>	0,31 <sup>ab</sup>	1,39 <sup>b</sup>	0,33 <sup>ab</sup>	0,19 <sup>b</sup>	1,81 <sup>b</sup>	0,33 <sup>ab</sup>	0,18 <sup>b</sup>	1,81 <sup>b</sup>	0,8 <sup>b</sup>	0,5 <sup>a</sup>	1,60 <sup>b</sup>
		±0,05	±0,11	±0,43	±0,05	±0,12	±0,35	±0,05	±0,07	±0,32	±0,03	±0,04	±0,24	±0,05	±0,07	±0,15
<b>Poconé</b>		0,49 <sup>b</sup>	0,43 <sup>bc</sup>	1,14 <sup>b</sup>	0,48 <sup>ab</sup>	0,43 <sup>bc</sup>	1,14 <sup>b</sup>	0,38 <sup>b</sup>	0,16 <sup>ab</sup>	2,35 <sup>ab</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,17 <sup>b</sup>	2,17 <sup>ab</sup>	0,99 <sup>ac</sup>	0,57 <sup>ab</sup>	1,72 <sup>ab</sup>
		±0,03	±0,04	±0,18	±0,07	±0,04	±0,31	±0,01	±0,02	±0,33	±0,003	±0,002	±0,04	±0,09	±0,03	±0,07
<b>Nova Alvorada do Sul</b>		0,5 <sup>b</sup>	0,35 <sup>bc</sup>	1,4 <sup>ab</sup>	0,49 <sup>ab</sup>	0,35 <sup>ac</sup>	1,41 <sup>ab</sup>	0,34 <sup>ab</sup>	0,15 <sup>ab</sup>	2,24 <sup>ab</sup>	0,33 <sup>ab</sup>	0,13 <sup>ab</sup>	2,45 <sup>ab</sup>	0,8 <sup>ab</sup>	0,54 <sup>ab</sup>	1,47 <sup>b</sup>
		±0,06	±0,01	±0,13	±0,04	±0,03	±0,01	±0,007	±0,01	±0,2	±0,01	±0,01	±0,43	±0,02	±0,01	±0,09
<b>Bataguassu</b>		0,51 <sup>b</sup>	0,45 <sup>c</sup>	1,14 <sup>b</sup>	0,51 <sup>b</sup>	0,44 <sup>c</sup>	1,17 <sup>b</sup>	0,38 <sup>b</sup>	0,18 <sup>b</sup>	2,03 <sup>a</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,18 <sup>b</sup>	2,03 <sup>a</sup>	1,12 <sup>c</sup>	0,59 <sup>b</sup>	1,87 <sup>a</sup>
		±0,04	±0,06	±0,11	±0,05	±0,06	±0,18	±0,03	±0,02	±0,28	±0,03	±0,03	±0,25	±0,09	±0,03	±0,13
<b>TESTE DE HOMOGENEIDADE (Brown and Forsythe)</b>	<b>F</b>	0,33	1,15	2,93	0,63	0,71	1,02	0,97	2,54	1,21	0,99	2,07	2,81	0,15	1,02	0,60
	<b>p</b>	0,8	0,34	0,6	0,59	0,55	0,39	0,41	0,07	0,32	0,41	0,12	0,06	0,93	0,39	0,62

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey a  $p > 0,05$ . Teste de normalidade de Shapiro-wilk ( $w: 0,96/p=0,09$ ). CDIV= coxa direita do espinho IV; EDIV= espinho direito do espinho IV; CEIV= coxa esquerda espinho IV; EEIV= espinho esquerdo IV; CDI= coxa direita I; EDI= espinho direito I; CEI= coxa esquerda I; EEI= espinho direito I; CC= comprimento do capítulo; LC= largura do capítulo; FUNÇÃO= Relação entre espinho e coxa / largura e comprimento.

1 Para as fêmeas, observou-se diferença estatística ( $P < 0,05$ ) para espinho direito I  
 2 (EDI) coxa esquerda I (CCEI), espinho esquerdo I (EEI) e (CL) largura do capítulo. Não  
 3 houve diferença ( $P > 0,05$ ) em relação ao comprimento do capítulo (Tabela 2).

4 **Tabela 2.** Mensuração de parâmetros (coxa, espinhos e capítulo) de carrapatos fêmeas  
 5 do estado do Maranhão e da Coleção Nacional de Carrapatos (CNC)/USP/SP.

Origem da Amostra	VARIÁVEIS										
	CDIV	CEIV	CDI	EDI	FUNÇÃO	CEI	EEI	FUNÇÃO	CC	CL	FUNÇÃO
Maranhão	0,47 <sup>a</sup>	0,47 <sup>a</sup>	0,38 <sup>a</sup>	0,17 <sup>a</sup>	2,25 <sup>a</sup>	0,38 <sup>a</sup>	0,16 <sup>a</sup>	2,44 <sup>a</sup>	1,45 <sup>a</sup>	0,67 <sup>a</sup>	2,18 <sup>a</sup>
	±0,02	±0,05	±0,02	±0,02	±0,37	±0,02	±0,03	±0,45	±1,73	±0,02	±2,67
Grandes Sertões	0,46 <sup>a</sup>	0,47 <sup>a</sup>	0,39 <sup>a</sup>	0,18 <sup>ab</sup>	2,16 <sup>a</sup>	0,4 <sup>a</sup>	0,17 <sup>ab</sup>	2,33 <sup>a</sup>	1,07 <sup>a</sup>	0,67 <sup>a</sup>	1,58 <sup>a</sup>
	±0,02	±0,03	±0,02	±0,02	±0,36	±0,02	±0,03	±0,45	±1,17	±0,02	±2,67
Poconé	0,49 <sup>a</sup>	0,51 <sup>a</sup>	0,39 <sup>a</sup>	0,22 <sup>b</sup>	1,82 <sup>a</sup>	0,39 <sup>a</sup>	0,22 <sup>b</sup>	1,71 <sup>a</sup>	1,23 <sup>a</sup>	0,73 <sup>b</sup>	1,68 <sup>a</sup>
	±0,06	±0,007	±0,02	±0,06	±0,4	±0,02	±0,01	±0,01	±0,02	±0,02	±0,01
Teste de Homogeneidade (Brown and Forsythe)	<b>0,12</b>	<b>0,01</b>	<b>6,03</b>	<b>0,14</b>	<b>0,51</b>	<b>5,4</b>	<b>1,12</b>	<b>0,51</b>	<b>0,18</b>	<b>0,55</b>	<b>0,21</b>
	<b>0,73</b>	<b>0,93</b>	<b>0,6</b>	<b>0,7</b>	<b>0,48</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,48</b>	<b>0,67</b>	<b>0,46</b>	<b>0,65</b>

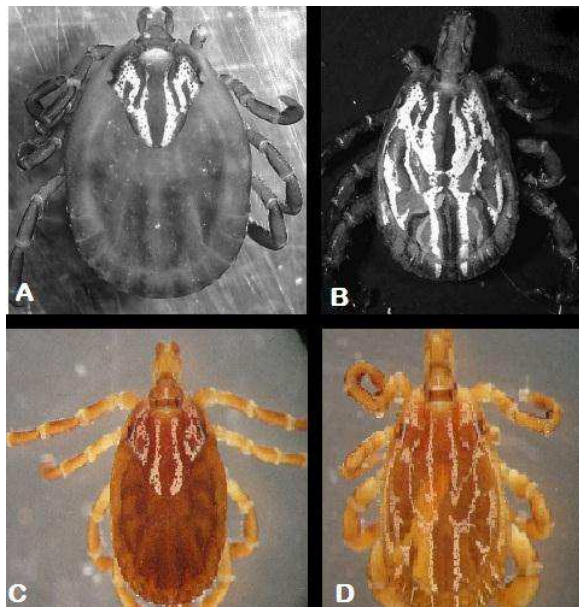
6 CDIV= coxa direita IV; CEIV= espinho esquerdo IV; CDI= coxa direta I; EDI= espinho direito I; EEI=  
 7 espinho esquerdo I; CC= Comprimento do capitulo; CL= largura do capitulo. Médias seguidas de letras  
 8 iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey a  $p > 0,05$ . Teste de normalidade de Shapiro-  
 9 wilk ( $w: 0,99/p=0,99$ ).

10 Os resultados das tabelas demonstraram a diferença entre os carrapatos de  
 11 origem Maranhense e os obtidos na CNC, apresentando uma diferença entre espécimes  
 12 machos e fêmeas, visto que, em fêmeas, variáveis como coxa I e espinhos (direito e  
 13 esquerdo) da coxa I não apresentaram diferença estatística se comparado aos machos  
 14 (que apresentaram entre si), entretanto a ausência de diferença é comum para ambos ao  
 15 se tratar da mensuração de capítulo. Hosseini et al. (2011) ao realizarem um estudo  
 16 morfométrico em *Hyalomma anatolicum*, de diferentes regiões no oeste do Irã, percebeu  
 17 que algumas estruturas apresentaram diferença estatística entre as regiões. Descreveram  
 18 uma morfologia similar de sucos cervicais e formato de escudo, entretanto uma  
 19 mensuração distinta para elas, corroborando com o presente estudo onde a similaridade  
 20 de estruturas como número de espinhos e formato de coxa permanece inalterado, porem  
 21 a mensuração mostra uma diferença entre espécimes do Maranhão e CNC.

22 Sanches et al. (2016), ao realizarem um estudo morfométrico da CNC entre  
 23 espécimes de *Rhipicephalus sanguineus* de diferentes regiões geográficas, perceberam  
 24 diferença significativa no tamanho de estruturas como comprimento e largura do

1 idiossoma e escudo, entretanto, assim como no presente estudo, o comprimento de  
2 capítulo não representou uma alteração significativa entre indivíduos da mesma espécie.  
3 O *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* da região tropical no Brasil nos estudos de  
4 Sanches et al. (2016) apresentou dimensões de idiossoma menores que os espécimes da  
5 região temperada na Argentina, diferentemente do presente estudo onde o *Amblyomma*  
6 *triste* do Maranhão apresentou estruturas com mensurações menores apesar de ser  
7 comparado com espécimes de localidades que possuem um conjunto de características  
8 climáticas similares. Bacurituba, área de coleta dos espécimes no Maranhão, possui uma  
9 umidade relativa que varia de 60 a 90%, e assemelha-se as áreas de Chapada Gaúcha,  
10 localidade do Parque Nacional Grande Sertão Veredas (45 a 90%); e Porto Jofre, Nova  
11 Alvorada do Sul e Bataguassu (30 a 85%), localidades do Mato Grosso do Sul (INMET,  
12 2016).

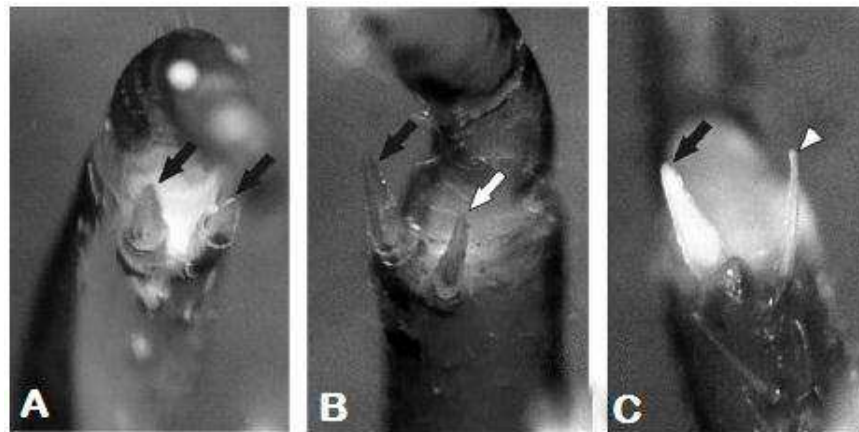
13 Abarca et al. (2012) no Chile coletaram de cães, espécimes de *Amblyomma triste*  
14 e também realizaram análises morfológicas e moleculares onde compararam seus  
15 espécimes com *Amblyomma maculatum* da Colômbia e o próprio *Amblyomma triste* do  
16 Brasil (localidades do estudo). Morfologicamente, o *Amblyomma triste* do Chile  
17 apresentou uma ornamentação mais densa e sem falhas se comparado aos espécimes do  
18 presente estudo (Figura 11).



19  
20 **Figura 11.** *Amblyomma triste*. Vista dorsal de *Amblyomma triste* fêmea do Chile (A);  
21 Vista dorsal de *Amblyomma triste* macho do Chile (B); Vista dorsal de *Amblyomma*  
22 *triste* fêmea do Maranhão (C); Vista dorsal de *Amblyomma triste* macho do Maranhão  
23 (D); Fonte: ABARCA et al. 2012

24

1           Entretanto, Abarca et al. (2012) exploraram um caracter para diferenciar esses  
2 carrapatos, que foi os espinhos e cerdas presentes no metatarso de indivíduos  
3 independente do gênero. Foi observado que no *Amblyomma maculatum* em seu  
4 metatarso possui dois espinhos grossos, o *Amblyomma triste* do Chile possui um  
5 espinho grosso e um espinho fino e o *Amblyomma triste* do Brasil se diferencia por  
6 possuir um espinho grosso e uma cerda (Figura 13).



7  
8 **Figura 12.** Metatarso de *Amblyomma maculatum* da Colômbia contendo dois espinhos  
9 grossos (A); Metatarso de *Amblyomma triste* do Chile contendo um espinho grosso e  
10 um espinho fino (B); Metatarso de *Amblyomma triste* do Brasil contendo um espinho  
11 grosso e uma cerda (C). Fonte: ABARCA et al., 2012.

12  
13           Levando essa estrutura como forma de comparação entre esses carrapatos, o  
14 *Amblyomma triste* do Maranhão se assemelhou aos espécimes do Brasil, contendo um  
15 espinho grosso e uma cerda como pode ser observado na Figura 13.





1

2 **Figura 13.** Metatarso de *Amblyomma triste* do Maranhão, visualização de espinho (seta  
3 preta) e cerda (seta vermelha).

4

5 As sequências obtidas quando comparadas, de acordo com gene  
6 mitocondrial 16S rRNA e sequências derivadas do ITS2 ribossômico nuclear, observa-  
7 se que os espécimes encontrados no Maranhão apresentam similaridade acima de 90%  
8 tanto para *Amblyomma maculatum* quanto para *Amblyomma triste*. Quando avaliadas,  
9 as sequências do gene 16S chegaram a apresentar uma similaridade em relação ao  
10 *Amblyomma maculatum* dos Estados Unidos de 99% (403/407). Utilizando-se das  
11 sequências obtidas pelo gene mitocondrial 16S rRNA, Abarca et al. (2012) analisaram  
12 pelo programa BLAST a similaridade do *Amblyomma triste* do Chile com o mesma  
13 espécie oriunda do Uruguai (AY498563) e obtiveram 99,5% (397/399) de similaridade  
14 e o *Amblyomma maculatum* oriundo dos Estados Unidos (L34318) e 99,0% (404/408).  
15 Dados que corroboram com os encontrados nas sequências dos carrapatos do Maranhão  
16 visto que para os espécimes do Uruguai (AY498563) a similaridade chegou a 98,5%  
17 (390/399), para o *Amblyomma maculatum* dos Estados Unidos (L34318) chegou 97,7%  
18 (402/408), e quando comparado ao *Amblyomma triste* do Chile (JN180848) a  
19 similaridade foi 98,2% (401/408). O *Amblyomma triste* do Maranhão ao ser comparado  
20 com as sequências chilenas do gene 16S rRNA confirma sua espécie perante o estudo,



1 pertencente ao clima tropical, se encontrou no mesmo clado que o *Amblyomma*  
2 *maculatum* dos Estados Unidos, que pertence a um clima subtropical, e em clado  
3 diferente dos espécimes da Argentina, Chile e Uruguai, onde possuem um clima  
4 temperado na grande parte de seu território. Entretanto, o *Amblyomma triste* de outra  
5 região do Brasil (Pantanal), não permaneceu no clado apesar de suas semelhanças  
6 climáticas.

7 Morfologicamente, os carrapatos do Maranhão se apresentam como *Amblyomma*  
8 *triste* com caracteres evidentes se comparado com espécimes de outros países e da  
9 CNC, entretanto, geneticamente, a similaridade com *Amblyomma maculatum* do  
10 Estados Unidos aparece evidente, fazendo com que os estudos envolvendo esse  
11 carrapato continuem pois o mesmo possui hospedeiros com relações antrópicas muito  
12 forte, fazendo expressivo o seu papel na Saúde Pública e Medicina Veterinária.

13

## 14 7 CONCLUSÃO

- 15 • O *Amblyomma triste* morfologicamente identificado neste estudo representa o  
16 primeiro registro da espécie para o estado do Maranhão;
- 17 • A morfometria realizada no presente estudo demonstrou a diferença entre as  
18 dimensões de coxas e espinhos do *Amblyomma triste* maranhense com os demais  
19 espécimes da CNC/USP.
- 20 • *Amblyomma triste* do Maranhão possui uma similaridade genética maior com o  
21 *Amblyomma maculatum* oriundo dos Estados Unidos do que com os indivíduos da  
22 sua mesma espécie pertencentes ao Chile, Uruguai e outras regiões do Brasil.

23

## 24 REFERÊNCIAS

- 25 ABARCA, K.; LOPEZ, J.; ACOSTA-JAMETT, G.; LEPE, P.; SOARES, J. F.;  
26 LABRUNA, M. B. A third *Amblyomma* species and the first tick-borne rickettsia in  
27 Chile. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 1, p. 219–222, 2012.
- 28 AGUIRRE, D.H.; MANGOLD, A.J.; CAFRONE, M.M.; GUGLIELMONE, A.A.  
29 *Amblyomma tigrinum* (Acari:Ixodidae): New data on hosts and biology of immature  
30 stages and on DNA composition. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 3-4, p. 267-272,  
31 2005.

- 1 ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic  
2 local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- 3 BALASHOV, Y.S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) vectors of diseases of man and  
4 animals. Miscellaneous **Publications of the Entomological Society of America**, v. 8,  
5 p. 161–376, 1972.
- 6
- 7 BARKER, S. C.; MURRELL, A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of  
8 ticks: a review of recent progress. **Experimental and Applied Acarology**. V. 28, n. 1-  
9 4, p.55-68, 2002.
- 10 BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de**  
11 **importância Médico-Veterinária da região neotropical um guia ilustrado de**  
12 **espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006.
- 13
- 14 BEATI, L., NAVA, S., BURKMAN, E.J., BARROS-BATTESTI, D.M., LABRUNA,  
15 M.B., GUGLIELMONE, A.A., CÁCERES, A.G., GUZMAN CORNEJO, C., LÉON,  
16 R., DURDEN, L.A., FACCINI, J.L.H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)  
17 (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric  
18 speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, p. 267, 2013.
- 19 BLACK, W. C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard and soft tick taxa (Acari: Ixodida)  
20 based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proceedings of the National Academy**  
21 **of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 21, p. 10034–10038, 1994.
- 22 BURGUER, T.D., SHAO, R., BEATI, L., MILLER, H., BARKER, S.C. Phylogenetic  
23 analysis of ticks (Acari: Ixodida) using mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes  
24 indicates that the genus *Amblyomma* is polyphyletic. **Molecular Phylogenetics and**  
25 **Evolution**, v.64, p. 45–55, 2012.
- 26 CONTI-DÍAZ, I.A. Rickettsiosis por *Rickettsia conorii* (fiebre botonosa del  
27 Mediterráneo o fiebre de Marsella). Estado actual en Uruguay. **Revista Médica del**  
28 **Uruguay**, v. 17, p. 119–124, 2001.
- 29 ESTRADA-PEÑA, E.; VENZAL, J.M.; MANGOLD, A.J.; CAFRUNE M.M.;  
30 GUGLIELMONE, A.A. The *Amblyomma maculatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae)  
31 tick group: diagnostic characters, description of the larva of *A. parvitarsum* Neumann,  
32 1901, 16S rDNA sequences, distribution and host. **Systematic Parasitology**, v. 60, n. 2,  
33 p. 99-112, 2005.
- 34 EVANS, D.E., MARTINS, J.R. AND GUGLIELMONE, A.A. A review of the ticks  
35 (Acari: Ixodidae) of Brazil, their hosts and geographic distribution – 1. The state of Rio  
36 Grande do Sul, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 453–  
37 470, 2000.
- 38 FREIRE, J.J. Fauna parasitária riograndense. II. Cabra, búfalo, camelo, cavalo, porco,  
39 furão, grachaim, gato doméstico, gato do mato e coelho. **Revista Medicina Veterinária**  
40 v. 3, p. 143–158, 1967.
- 41 GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C.; PACHECO, R. C.; WALKER D. H.;  
42 LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense*

- 1 in a new Brazilian spotted fever-endemic área in the state of Minas Gerais **Memórias**  
2 **do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 841-845, 2005.
- 3 GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PENÃ, A.; MANGOLD, A.J.; BARROS-  
4 BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; MARTINS, J.R.; VENZAL, J.M.; ARZUA, M.;  
5 KEIRANS, J.E. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch,  
6 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Veterinary**  
7 **Parasitology**, v. 113, n. 3-4, p. 273–288, 2003.
- 8 GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R.G.; APANASKEVICH, D.; BARKER, S. The  
9 argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: A list of valid  
10 species names. **Zootaxa**, v. 28, n. 2528, p. 1–28, 2010
- 11 GUGLIELMONE, A.A., MANGOLD, A.J. AND HADANI, A. *Amblyomma tigrinum*  
12 Koch, 1844 en la Argentina. Su diagnóstico erróneo como *Amblyomma maculatum* y su  
13 distribución geográfica. **Gaceta Veterinaria** v. 44, p. 57–63, 1982.
- 14 GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ectoparasitas de  
15 Importância Veterinária. São Paulo: **Editora Plêiade/FAPESP**, p. 52-104, 2001.  
16
- 17 HOSSEINI, A; DALIMI, A.; ABDIGOUDARZI, M. Morphometric Study on Male  
18 Specimens of *Hyalomma anatolicum* (Acari: Ixodidae) in West of Iran. **Iran Journal of**  
19 **Arthropod-Borne diseases**. v. 5, n. 2, p. 23-31, 2011.
- 20 INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Acesso online:  
21 <http://www.inmet.gov.br/portal/> Acessado no dia 25/09/2016.
- 22 IVANCOVICH, J.C. Reclassificación de algunas especies de garrapatas del genero  
23 *Amblyomma* (Ixodidae) en la Argentina. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v.  
24 15, p. 673–682, 1980.
- 25 JONES, E.K., CLIFFORD, C.M., KEIRANS, J.E. AND KOHLS G.M. The ticks of  
26 Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the Western  
27 hemisphere. Brigham Young Univ. Sci. Bull., **Biological. Series.**, v. 17, p. 1–40, 1972.
- 28 KAUFMAN, W.R, SAUER, J.R. Ion and water balance in feeding ticks: mechanisms of  
29 tick excretion. In: Obenchain FD, Galun R, editors. Physiology of ticks. Oxford (UK):  
30 **Pergamon Press**, p. 213–44, 1982.
- 31 KEIRANS, J.E. George Henry Falkiner Nuttall and the Nuttall Tick Catalogue. **U.S.**  
32 **Department of Agriculture Miscellaneous Publications**, n. 1438, p. 1–1785, 1984.  
33
- 34 KEIRANS, J.E; LITWAK, T.R. Pictorial Key to the Adults of Hard Ticks, Family  
35 Ixodidae (Ixodida: Ixodoidea), East of the Mississippi River. **Journal Of Medical**  
36 **Entomology**, v. 26, n. 5, p. 435-448, 1989.
- 37 KEMP, D.H, STONE, B.F, BINNINGTON, K.C. Tick attachment and feeding: role of  
38 the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions, and the host response. In:  
39 Obenchain FD, Galun R, editors. **Physiology of ticks. Oxford (UK): Pergamon Press;**  
40 p. 119–68, 1982.

- 1 KOCH, C. L. Systematische Übersicht über die Ordnung der Zecken. **Archiv für**  
2 **Naturgeschichte**, v. 10, p. 217–239, 1844.
- 3 KOHLS, G.M. Concerning the identity of *Amblyomma maculatum*, *A. tigrinum*, *A. triste*  
4 and *A. ovatum* of Koch, 1844. Proc. Ent. Soc. Wash., v. 58, p. 143–147, 1956.
- 5 KRANTZ, G. W.; WALTER, D. E. **A Manual of Acarology**, v. 3, ed. Lubbock: Texas  
6 Tech University Press, 2009.
- 7  
8 KRAWCZAK, F.S.; BINDER, L.C.; OLIVEIRA, C.S.; COSTA, F.B.; MORAES-  
9 FILHO, J.; MARTINS, T.F.; SPONCHIADO, J.; MELO, G.L.; GREGORI, F.; POLO,  
10 G.; OLIVEIRA, S.V.; LABRUNA, M.B. Ecology of a tick-borne spotted fever in  
11 southern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 70, p. 219-229, 2016.
- 12 LABRUNA, M. B. Ecology of Rickettsia in South America. **Annals of the New York**  
13 **Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156-166, 2009.
- 14 LABRUNA, M. B; SOARES, J. F.; MARTINS, T. F., SOARES, H. S., CABRERA, R.  
15 R. Cross-mating experiments with geographically different populations of *Amblyomma*  
16 *cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 54, n. 1, p.  
17 41–49, 2011.
- 18  
19 LABRUNA, M.B; FUGISAKI, E.Y.M.; PINTER, A.; DUARTE, J.M.B; SZABÓ,  
20 M.J.P. Life cycle and host specificity of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) under  
21 laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 30, p. 305-316, 2003.
- 22 LABRUNA, M. B.; LEITE, R. C.; GOBESSO, A. A. O.; GENNARI, S. M.; KASAI, N.  
23 Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. **Ciência Rural**,  
24 v. 34, p. 195-200, 2004a.
- 25 LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região  
26 Neotropical. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. (Ed.).  
27 **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia**  
28 **ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, p. 155-  
29 164, 2006.
- 30 LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; BOUYER, D. H.; CAMARGO, L. M. A.;  
31 CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in  
32 *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Journal of**  
33 **Medical Entomology**, v. 41, p. 1073-1081, 2004c.
- 34 LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C; BOUYER, D. H.; MCBRIDE,  
35 J.W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D.H. Rickettsia Species  
36 Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of São Paulo, Brazil,  
37 Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42,  
38 n.1, p.90–98, 2004b.
- 39 LABRUNA, M.B., PAULA, C.D., LIMA, T.F. AND SANA, D.A. Ticks (Acari:  
40 Ixodidae) on wild animals from the Porto-Primavera Hydroelectric power station area,  
41 Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1133–1136, 2002.

- 1 LABRUNA, MB. Ecology of *Rickettsia* in South America. Rickettsiology and  
2 Rickettsial Diseases-Fifth International Conference: Ann. N.Y. Acad. Sci. New York  
3 **Academy of Sciences**, v. 11, 2009.  
4
- 5 LABRUNA, M.B., SOARES, J.F., MARTINS, T.F., SOARES, H.S., CABRERA, R.R.  
6 Crossmating experiments with geographically different populations of *Amblyomma*  
7 *cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 54, p. 41–49,  
8 2011.
- 9 LEVIN, M.I.; STUDER, E.; KILLMASTER, L.; ZEMTSOVA, G.; MUMCUOGLU,  
10 K.Y. Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick,  
11 *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**,  
12 n.58, p.51–68, 2012.  
13
- 14 MANGOLD, A.J. ; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rRNA  
15 sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick  
16 genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research** , v. 84, n.6, p.  
17 478-484, 1998.
- 18 MANS, B.J., DE KLERK, D., PIENAAR, R., DE CASTRO, M.H., LATIF, A.A.  
19 Themitochondrial genomes of *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae) and  
20 *Argas africanus* (Ixodidae: Argasidae): estimation of divergence dates for the  
21 major tick lineages and reconstruction of ancestral blood-feeding characters. **PLoS**  
22 **ONE**, v. 7, e. 49461, 2012.
- 23 MANS, B.J., DE KLERK, D., PIENAAR, R., LATIF, A.A. Nuttalliella namaqua: a  
24 livingfossil and closest relative to the ancestral tick lineage: implications for  
25 theevolution of blood-feeding in ticks. **PLoS ONE**, v. 6, e. 23675, 2011.  
26
- 27 MARTINS, T.F.; BARBIERI, A.R.M.; COSTA, F.B.; TERASSINI, F.A.; CAMARGO,  
28 L.M.A.; PETERKA,C.R.L.; PACHECO,R.C.; DIAS, R.A.; NUNES, P.H.;  
29 MARCILI,A.; SCOFIELD, A.; CAMPOS, A.K.; HORTA,M.C.; GUILLOX,G.A;  
30 BENATTI, H.R.; RAMIREZ, D.G.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.  
31 Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes:  
32 Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto).  
33 **Parasites & Vectors**, v. 9:186, p.2-14, 2016.  
34
- 35 MARTINS, T.F., ONOFRIO, VC, BARROS-BATTESTI, D.M., LABRUNA, M.B.  
36 Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: Descriptions,  
37 redescriptions, and identification key. **Ticks Tick Borne Diseases**; v. 1, p. 75-99, 2010.
- 38
- 39 MASTROPAOLO, M., NAVA, S., GUGLIELMONE, A.A., MANGOLD, A.J.  
40 Biological differences between two allopatric populations of *Amblyomma cajennense*  
41 (Acari: Ixodidae) in Argentina. **Experimental and Applied Acarology**, v. 53, p. 371–  
42 375, 2011.  
43

- 1 McLAIN, D.K., WESSON, D.M., OLIVER, J.H., COLLINS, F.H. Variation in  
2 Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers 1 Among Eastern Populations of *Ixodes*  
3 *scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 32, p. 353–360,  
4 1995.
- 5 NADOLNY, R., GAFF, H., CARLSSON, J., GAUTHIER, D. Comparative population  
6 genetics of two invading ticks: Evidence of the ecological mechanisms underlying tick  
7 range expansions. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 35, p. 153–162, 2015.
- 8 NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M.B.; CÁCERES, A.G.; MANGOLD, A.J.;  
9 GUGLIELMONE, A.A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma*  
10 *cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma*  
11 *tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and  
12 reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n.  
13 3, p. 252-276, 2014.  
14
- 15 NAVA, S.; LARESCHI, M; REBOLLO, C; USHER, C.B.; BEATI, L.; ROBBINS,  
16 R.G.; DURDEN, L.A.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. **Annals of Tropical**  
17 **Medicine & Parasitology**, v. 101, n. 3, p. 255-270, 2007.
- 18  
19 OGRZEWALSKA, M.; LITERAK, I; MARTINS, T.; LABRUNA, M. B. Rickettsial  
20 infections in the ticks form wild birds in Paraguay. **Ticks and Tick Borne Diseases**, v.  
21 5, n. 2, p. 83-89, 2014.
- 22 OLIVER, J.H, OWSLAY, M.R, HUTCHESON, H.J. Conspicificity of the ticks *Ixodes*  
23 *scapularis* and *I. dammini* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 30, p.  
24 54–63, 1993.
- 25 PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in  
26 cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York**  
27 **Academy of Sciences**, v. 1078, p. 523-529, 2006.
- 28 RIBEIRO, J.M.C. The role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual Review of**  
29 **Entomology**, v. 32, p. 463–478, 1987.
- 30 SAMPAIO, I., CARBALLO, M. AND PARIETTI, S. Comprobación de la presencia de  
31 *Amblyomma triste* (Acari, Ixodidae) en Uruguay. **Boletín de la Sociedad Zoológica del**  
32 **Uruguay**, v. 7, p. 75–76, 1992.  
33
- 34 SANCHES, G.S.; ÉVORA, P.M; MANGOLD, A.J. JITTAPALAPONG, S;  
35 RODRIGUEZ-MALLON, A; GUZMÁN, P.E.E.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-  
36 MATHIAS, M. I. Molecular, biological, and morphometric comparisons between  
37 different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari:  
38 Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 215, p. 78-87, 2016.

39



- 1 SAUER, J.R, MANE, S.D, SCHMIDT, S.P, ESSENBERG, R.C. Molecular basis for  
2 salivary fluid secretion in Ixodid ticks. *In* Sauer JR, Hair JA (eds): Morphology,  
3 Physiology and Behavioral Biology of Ticks. **Chichester, Halsted**, pp 55-74, 1986.
- 4 SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA,  
5 M. B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1111-  
6 1113, 2007.  
7
- 8 SINKOC, A. L.; BRUM, J.G.W.; MULLER, G.; BEGROW, A.; PAULSEN, R. M. M.  
9 Ocorrência de ixodidae parasitos de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris* LINNAEUS,  
10 1766) na estação ecológica do Taim, Rio Grande – RS, Brasil, v. 27, n. 1, p 119-122,  
11 1997.
- 12 SOARES, H.S.; BARBIERI, A.R.M.; MARTINS, T.F.; MINERVINO, A.H.H.; LIMA,  
13 J.T.R.; MARCILLI, A.; GENNARI, S.M.; LABRUNA, M.B. Ticks and rickettsial  
14 infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **Experimental and**  
15 **Applied Acarology**. v. 65, p. 125-140, 2015
- 16 SONENSHINE, D.E: Biology of Ticks, **New York, Oxford University Press**, v. 2,  
17 1993.
- 18 SONENSHINE, D.E: Biology of Ticks, **New York, Oxford University Press**, v. 1,  
19 1991.
- 20 SONENSHINE D.E., ROE R.M. Overview. Biology of Ticks. **Oxford University**  
21 **Press**, v. 1, 2014.
- 22 SPIELMAN, A, CLIFFORD, C.M, PIESMAN, J., et al: Human babesiosis on  
23 Nantucket Island, USA: Description of the vector, *Ixodes* (*Ixodes*) *dammini*, n. sp.  
24 (Acarina: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 15, p. 218–234, 1997.
- 25 SPIELMAN, A., WILSON, M.L, LEVINE, J.E. Ecology of *Ixodes dammini*–borne  
26 human babesiosis and Lyme disease. **Annual Review Entomology**, v. 30, p. 439–460,  
27 1985.
- 28 SZABÓ, M.P.J., LABRUNA, M.B., PEREIRA, M.C. AND DUARTE, J.M.B. Ticks  
29 (Acari: Ixodidae) on wild marsh-deer (*Blastocerus dichotomus*) from Southeast of  
30 Brazil: infestations prior and after habitat loss. **Journal of Medical Entomology**, v. 40,  
31 n. 3, p. 268-274, 2003.
- 32 TOMASSONE, L., CONTE, V., PARRILLA, G., MENEGHI, D. Rickettsia Infection in  
33 Dogs and *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma tigrinum* Ticks, Cochabamba Department,  
34 Bolivia. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n.10, 2010.  
35
- 36 VENZAL, J.M.; PORTILLO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; CABRERA,  
37 P.A.; OTEO, J.A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging**  
38 **Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, 2004.

- 1 VIEIRA, A. M. L.; SOUZA, C. E.; LABRUNA, M. B.; MAYO, R. C.; SOUZA, S. S.  
2 L.; CAMARGO-NEVES, V. L. F. **Manual de Vigilância Acarológica do Estado de**  
3 **São Paulo**. São Paulo: SUCEN, 2004.  
4
- 5 WALADDE, S.M.; RICE, M.J. The sensory basis of tick feeding behaviour. In:  
6 Obenchain FD, Galun R, editors. **Physiology of ticks**. **Oxford (UK): Pergamon Press**,  
7 p. 71–118, 1982.
- 8 WIKEL, S.K. Host immunity to ticks. **Annual Review Entomology**, v. 41, p. 1–22,  
9 1996.  
10
- 11 ZAHLER, M.; GOTHE, R.; RINDER, H. Genetic evidence against a morphologically  
12 suggestive conspecificity of *Dermacentor reticulatus* and *D. marginatus*. **International**  
13 **Journal for Parasitology**, v. 25, p. 1413-1419, 1995.
- 14  
15  
16  
17