



**Protocolos para
estudos de
variabilidade
genética em
populações de
carrapatos**



*Bárbara Guimarães Csordas
Poliana Fernanda Gianchetto
Renato Andreotti*



INTRODUÇÃO

Em 1995, Tabachnick e Black fizeram um apelo para estudos genéticos moleculares de vetores artrópodes para preencher as lacunas em nossa compreensão da dispersão e fluxo gênico em populações de vetores.

A importância da variação genética em vetores artrópodes também foi avaliada um ano depois por Gooding (1996), com foco na competência vetorial na estruturação genética de populações de mosquitos. Até então, poucos estudos voltados especificamente para genética de populações de carrapatos foram realizadas (WALLIS; MILLER, 1983; BULL et al.; 1984; HILBURN; SATTLER, 1986).

Entretanto, já era necessário verificar a dispersão e especificidade de patógenos em subpopulações de carrapatos devido aos esforços necessários no combate e controle destes vetores (SATTLER et al., 1986; KUBASU, 1992). Em trabalhos mais recentes, a aplicação da genética para demonstrar a evolução e a especialização de hospedeiros tem sido revistos (BARKER; MURRELL, 2002; McCOY et al., 2013). Um estudo alertando a relação entre a estrutura genética de carrapatos e a epidemiologia em doença humana foi publicado por McCoy (2008).

A maioria dos estudos em variação genética está focada em questões centrais como:

- A biologia do vetor incluindo o uso de ferramentas moleculares para identificar espécies crípticas (refere-se a duas ou mais espécies que foram classificadas como uma espécie nominal única, uma vez que elas são morfologicamente indistinguíveis) (BICKFORD et al., 2007);
- A importância de quantificar a variação genética da população (ARAYA-ANCHEITA, et al., 2015);
- O papel da dispersão do vetor em epidemiologia e estrutura genética de patógenos transmitidas por vetores (ARAYA-ANCHEITA et al., 2015).

O objetivo neste capítulo é definir os protocolos mais utilizados para estudos de variabilidade genética.

COLETA E ARMAZENAMENTO DE ESPÉCIMES PARA TRABALHOS MOLECULARES

Um protocolo de estudo de variabilidade genética inicia-se na coleta e armazenamento correto dos espécimes. Diversos estudos demonstraram que o método mais eficaz na preservação de espécimes para o trabalho molecular é o congelamento em ultrafreezer -80°C de espécimes vivos (POSI et al., 1993; REISS et al., 1995; DILLON et al., 1996).

Uma alternativa aceitável é o armazenamento em etanol a 100%. Amostras coletadas de outros meios devem ser transferidas para etanol a 100% e armazenadas a -20°C tão rapidamente quanto possível, para evitar degradação do material genético por meio de enzimas. Concentrações mais baixas de etanol dão resultados variáveis e deverão ser evitados na medida do possível (CRUICKSHANK, 2002).

EXTRAÇÃO DE DNA

Ao se extrair DNA de carrapatos para estudos de variabilidade genética é preferível que sejam de indivíduos isolados para evitar a mistura de genótipos distintos, parti-

cularmente se houver qualquer dúvida sobre a identidade dos carrapatos. O DNA extraído deve ser identificado e armazenado a -80°C (CRUICKSHANK, 2002).

Um trabalho realizado por Halos et al. (2004) demonstrou a eficiência da extração de DNA em carrapatos *Dermacentor* spp., *Rhipicephalus* spp. e *Ixodes ricinus*. Dentre três métodos utilizados, puderam concluir que após a trituração e digestão com proteínas, as técnicas de extração de DNA com fenol/clorofórmio juntamente com kit comercial podem ser utilizados.

O método que consegue oferecer máxima eficiência, em termos de rapidez, número e dimensão de amostras a ser tratada é o combinado *bead beater* – digestão de proteína – kit de extração.

No entanto, apesar do protocolo combinado ser eficiente o custo benefício é mais alto. Trabalhos realizados por Sangioni et al. (2005) demonstraram uma alta eficiência da extração utilizando protocolo com isocianato de guanidina e fenol/clorofórmio que possuem custo intermediário. Logo, este protocolo é o mais utilizado nas pesquisas com carrapatos no Brasil.

Para realizar este protocolo então:

- Os carrapatos são identificados e colocados em tubos de 1,5mL, quando estas amostras estiverem em álcool, é necessário furá-los para evaporação. Triturar os carrapatos com ajuda de pistilos.
- Amostras são trituradas com 150 μl de TE pH 8,0 ou PBS. Depois, com a ajuda do agitador, as amostras são misturadas por 10 segundos e com o auxílio da centrifuga é realizado o spin de 6 segundos. Adiciona-se 450 μl do preparo Isocianato de Guanidina + Fenol.
- Posteriormente as amostras devem descansar por 10 minutos, logo após, são agitadas por 10 segundos e spin de 6 segundos alternado a cada 2 minutos. Adiciona-se 100 μl de clorofórmio e agita-se por 10 segundos, alternando em 2 minutos de descanso.
- Centrifuga-se a 12.000 rpm por 5 minutos. Recupera-se a fase aquosa e dispensa-se o restante do material. Adiciona-se 600 μl de isopropanol e deixar no freezer por 2 horas ou *overnight* (12-16 horas). Centrifugar a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C . Descartar o sobrenadante tomando o cuidado em limpar bem a borda do tubo. Adicionar 800 μl de etanol a 70%. Centrifugar a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C .
- Descartar o sobrenadante e secar o pellet a 37°C por 1 hora ou a 56°C no termobloco por 15 minutos, tendo o cuidado em deixar o tubo aberto. Ressuspender o *pellet* em água mili-Q autoclavada (50 μl). Homogeneizar bem e deixar em banho-maria ou no termobloco a 56°C por 15 minutos ou *overnight* a -4°C . Identificar e quantificar cada amostra e guardá-las a -20°C .

COMO ESCOLHER BONS MARCADORES PARA ESTUDOS DE VARIABILIDADE?

Após a extração de DNA será realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR). Porém existe um estudo minucioso para saber qual marcador molecular se encaixa melhor ao estudo proposto.

O segundo espaçador interno transcrito do gene ribossomal nuclear (18S) e o gene mitocondrial que codifica a proteína citocromo oxidase subunidade I (COX-I) em con-

junto fornecem uma poderosa ferramenta para a filogenética, auxiliando em baixos níveis taxonômicos. Os genes nucleares ribossomais (DNAr) 18S e 28S são ferramentas para a filogenética nos níveis mais profundos dentro da ordem Acari (CRUICKSHANK, 2002).

Marcadores diferentes são mais adequados para finalidades diferentes. Por exemplo, os genes ribossomais podem ser difíceis de alinhar, mas são susceptíveis de ter locais mais informativos do que os genes codificadores de proteínas. Mesmo que as regiões fiquem desalinhas, estas podem ser removidas. O marcador ribossomal ainda pode deixar os locais mais informativos do que os marcadores que estão presentes em um gene que codifica proteína (McLAIN et al., 1995; FENION et al., 2000).

Existe uma diversidade de marcadores que são utilizados em estudos com carrapatos, e todos eles têm os seus problemas e suas desvantagens. Um exemplo disso, é a evolução rápida de genes ITS que podem acarretar no não diferenciamiento entre as espécies. Entretanto, escolhendo o marcador mais apropriado para a tarefa, estes problemas podem ser minimizados antes que qualquer sequenciamento seja realizado, poupando tempo e dinheiro (CRUICKSHANK, 2002).

PROTOCOLO DE PCR

O DNA deve ser submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) e a concentração do DNA para a PCR é de 50-100 ng/μL, para amplificação dos fragmentos correspondentes as regiões de cada marcador molecular.

A PCR possibilita que determinada região do genoma de qualquer organismo seja multiplicada em milhões de cópias, o que facilita a análise genética e permite a caracterização de microrganismos causadores de doenças por exemplo.

Os reagentes da PCR devem ser manipulados em um ambiente adequado, que vai desde um projeto físico que separe os laboratórios ao uso de equipamentos e pipetas, evitado desta forma o risco de contaminação por DNA que não pertence às amostras trabalhadas.

TABELA 7.1. Tipos e primers utilizados em estudos de variabilidade genética em *Rhipicephalus microplus*

PRIMERS	Sequência PRIMERS (5' ---- 3')	(PB*)	REFERÊNCIAS
ITS2 F	TCGGATCACATATCAAGAGAG	749	Dados dos autores
ITS2 R	CCCAACTGGAGTGGCCAGTTT		
COX-1.2F	CTTCAGCCATTTACCGCGA	681	Dados dos autores
COX-1.2R	CTCCGCCTGAAGGGTCAA		
16SF	GCTCAATGATTTTTAAATTGCTGT	450	(NORRIS et al., 1986; MANGOLD et al., 1998)
16SR	CCGGTCTGAACAGATCAAGT		
18SF	CCTGAGAAACGGTACCACATC	63	GUERRERO et al., 2014
18SR	GTGCCGGAGTGGGTAATT		

*(pb) pares de base

A solução em que ocorre a reação (*master mix*) é preparada em gelo ou em suportes congelados que são próprios para realização do protocolo e posteriormente são colocadas em micro tubos de plástico de 0,2 mL esterilizados.

A PCR pode ser padronizada para um volume final de 25 µl, contendo Tampão 10X, 50 mM de MgCl₂, 25 mM de dNTPs, 10 µM de cada primer (F e R), 0,5U de *Taq* DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen by Life Technologies™, North America, USA), 1µL de DNA a 50 ng/µL e água suficiente para o volume final.

Os primers que estão sendo mais utilizados para estudos de filogenia molecular que permitem distinguir espécies crípticas, são os marcadores moleculares de DNAmT COX-1 e 16S (BURGER et al., 2014).

Para produzir os amplicons da PCR, é necessário ter equipamento chamado de termociclador. As condições de PCR podem ser otimizadas para cada reação, como a temperatura de anelamento que são ajustadas de acordo com os oligonucleotídeos utilizados.

As condições gerais e padronizadas de temperatura para cada primer são: 95°C durante 2 min., seguido por 40 ciclos de 95°C durante 1 min., (56°C por 30 seg, no caso do primer COX-1) (60°C para os primers IIS2, 16S e 18S, por 30 seg), 72°C durante 1 min, 30 seg e, extensão final de 72°C por 7 min.

Os produtos da PCR devem ser analisados em gel de agarose (1,5%), corado com brometo de etídio e observados em transluminador UV.

As bandas visualizadas no gel de agarose, referentes aos produtos amplificados pela PCR, são purificados e utilizando protocolos de *kits* comerciais, por exemplo, o *kit* Purelink™Kit (Invitrogen by Life Technologies™, North America, USA). Posteriormente, se faz a clonagem em vetor pGem1-Easy®(Promega, Madison, WI-USA), segundo manual do fabricante, para sequenciamento.

ANÁLISE GENÉTICA

O sequenciamento dos produtos da PCR, com tamanho superior a 500pb, é realizado pelo método Sanger, utilizando-se o sequenciador ABI 3730 DNA Analyser, Applied Biosystems. As reações de sequenciamento devem ser realizadas utilizando-se o *primer* universal para sequenciamento 17 Transcription Start (5'-CTAATACGAC1ACAC1A-TAGGG-3') (IROWER; ELGAR, 1994) e o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As corridas são realizadas em capilares de 36 cm utilizando-se o polímero POP7 e as sequências geradas, analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1, por meio do programa Base Caller KB Phred (EWING-GREEN, 1998; EWING et al., 1998).

As sequências do plasmídeo são identificadas e removidas, utilizando-se o algoritmo de busca *hash*, do NCBI (VecScreen) (ALISCHUL et al., 1997). Posteriormente, são obtidas as sequências consenso e alinhadas com os dados do GenBank por meio da plataforma online BLASTn (ALISCHUL et al., 1997), para encontrar as regiões similares com as sequências já depositadas.

ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS E CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA

As sequências dos marcadores moleculares são alinhadas separadamente. Para cada marcador, forma-se um banco de dados contendo todas as sequências semelhantes

obtidas da análise realizada pelo programa BLASIn. O programa Mega 6.0 (IAMURA et al., 2013) alinha as seqüências retiradas do GenBank utilizando a ferramenta *Clustal W* ou o *Muscle*.

Para que possa ser realizada esta análise é necessário que o formato do arquivo seja modelo FASIA.

A ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> é utilizada para encontrar regiões de similaridade local entre seqüências (ALTSCHUL et al., 1997). A ferramenta BLASIn compara seqüências de nucleotídeos e calcula a significância estatística dos resultados.

Após copiar a seqüência de interesse inicia-se a entrada na ferramenta BLASIn, selecionando a função BLAST; não há necessidade de mudar nenhum parâmetro desta ferramenta e é recomendado deixar em funcionamento padrão. A ferramenta começa a buscar no banco de dados do GenBank, todas as seqüências nucleotídicas semelhantes a seqüência de interesse.

A análise fornecerá uma pontuação dependendo do número de bases nucleotídicas lidas e alinhadas corretamente com as seqüências do banco de dados, sendo (≥ 200) o maior valor que pode ser obtido.

Quanto menor forem os valores de *E value*, mais confiável será a análise realizada pela ferramenta; valores (0.0) são considerados estatisticamente significativos. A identidade ou semelhança (*Match*) da seqüência alvo com aquelas achadas no banco de dados é demonstrado através de uma porcentagem.

Para selecionar todas as seqüências, deve-se selecionar a tecla *All* e logo após em *Download*, escolher o modelo FASIA (*aligned sequences*). Selecionar em *Continue* e o banco de dados exportará todas as seqüências em formato de arquivo (.txt), porém, dentro deste formato de arquivo as seqüências estarão alinhadas em formato FASIA. Esta etapa é necessária para formar o banco de dados para a construção da árvore filogenética.

```
>KP226164_Rhipicephalus_microplus_MS_COX-1f
--cttcagccattttaccgcatgaataactcaactaatcataaagacattggaacaa
tatatttaattttgggtcatgagcaggaataattaggattaagtaagaatattaattc
gacttgagctaggccaaccaggaagattaatggtaatgatcaaatataatgtaatcg
taactgcccatgcatttatgatatttctttatagtaatacctattataattgggggat
ttgaaattggctgtccctattatattagggccctgatatagctttccacgtataaf
ataatataagattttggctttaccocctcattatttttaattaattcatctttagf
ttgaatcaggagcagggactggatgaactgtgatccccattatcatcaaatttatctc
attacggccctctgttgattagccatttttctctcacttagctggggcatcatcaaf
tttagggccaatattttattacaactatttaaatatagcttctatggcatatctaf
tagaacgtatacctttattgtctgactgttttaattacagccattctttattatfatf
ctttacctgttttagcagggctattactatattgttaacagaccgaaatttaacttf
catttttgaccctcagggcgagf
```

FIGURA 7.1. Exemplo de arquivos modelo FASTA: Estes arquivos podem ser abertos no programa da Microsoft, Office Word ou em bloco de notas.

Abrir o arquivo, copiar todas as informações e colar no programa Mega 6.0 (<http://www.megasoftware.net/>). Este passo é necessário para visualizar todo o alinhamento e realinhar as sequências seguindo as ferramentas do programa (IAMURA et al., 2013).

No programa Mega 6.0, se deve selecionar *Align* e em seguida em *Edit/Build Alignment*.

Logo após, abrirá uma janela que já estará selecionada em *Create a new alignment*, clicar em *OK* (Figura 7.2A). Abrirá outra janela que estará perguntando que tipo de sequência que será inserida no programa, escolha a opção *DNA*.

Irá aparecer uma nova janela onde deverão ser adicionadas as sequências, utilizando o comando *Ctrl+V*.

Selecionar todas as sequências para que ocorra o alinhamento das mesmas; selecionar em *Align by ClustalW* e escolher o o ajuste padrão para que ocorra o alinhamento.

Exportar o alinhamento para que ele fique em formato *FASTA*.

Para a construção da árvore filogenética por inferência Bayesiana a maioria dos programas utiliza o modelo do arquivo em formato *NEXUS* que pode ser aberto no Office Word e ser transformado de modelo *FASTA* para *NEXUS*.

Para transformar o modelo *FASTA* em *NEXUS*:

- Abra o arquivo já exportado em *FASTA*, gerado pelo programa Mega 6.0, no programa Office Word;
- Acrescentar ao topo, antes de começar o texto:

```
#NEXUS
BEGIN DATA;
  DIMENSIONS NTAX=59 NCHAR=681;
```

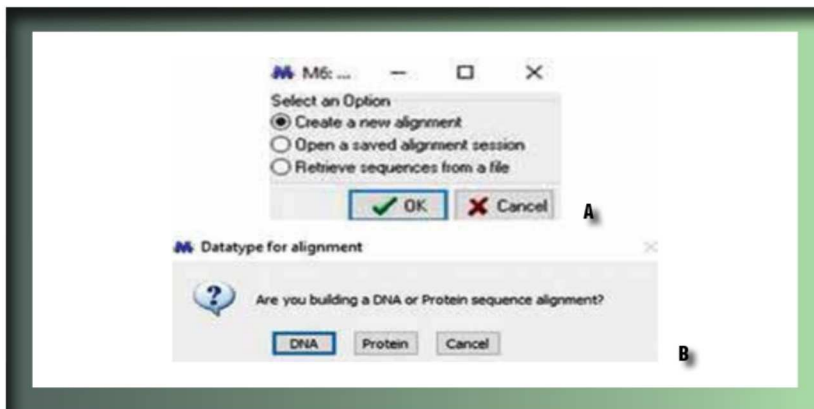


FIGURA 7.2. Preparando o programa para receber as sequências nucleotídicas retiradas do *GenBank*. **(A)** Janela para criar as sequências. **(B)** Janela para escolher o tipo de sequência.


```
FORMAT DATATYPE=DNA missing=N gap=-;
MATRIX
```

- No final de cada nome das sequências terá um parágrafo, troque todos por espaço;
- No ícone substituir do Word, substitua todos (>) por (nada), assim será retirado de todo o texto;
- Ao final da última letra da última sequência, colocar (;) antes do parágrafo;
- Adicionar ao final da última sequência, o que segue abaixo:

END;

BEGIN MRBAYES;

```
log start filename=NomeOutput.txt;
setautoclose=yes;
lsetnst=6 rates=invgamma;
mcmcngen=10000000 samplefreq=10000 printfreq=10000
diagnfreq=10000 nruns=2 nchains=4 temp=0.10000 savebrlens=yes;
sumpburnin=250;
sumtburnin=250;
log stop;
END;
```

- Em todo o texto onde se encontram os nomes das sequências, não poderá haver espaços. O único espaço será depois do nome das sequências e, antes de começar as sequências;

```
#NEXUS
BEGIN DATA;
- DIMENSIONS NTAX=59 NCHAR=681;
- FORMAT DATATYPE=DNA missing=N gap=-;
- MATRIX
KF224159_R_micropilus_AC
CTTCAGCCATTTACCGGATGAATATACTCAACTAATCATAAAGACATTGGAACAATATATTTAATTTTGG
FGCATGAGCAGGAATATTAGGATTAAGTATAGAATATTAATTCGACTTGAGCTAGGTCACACGGAAGATTA
ATTGGTAATGATCAAAATTTATAATGTAATCGAACTGCCATGCAATTTATATGATTTTCTTTATAGTAAAC
CTATTATAATGGGGATTGGGAATGGCTTCTCCCTATTATATTAGGGGCCCTGATATAGCTTTCCAGC
IATAAATAATATAAGATTTGGCTTTTACCCCTTCATTATTTTATAAATAATCATCTTTAGTTGAATCA
GGAGAGGGACTGGATGAACCTGTATCCCCATTATCATCAATTTATCTCATTACGGCCCTTCTGTGATT
TAGCCATTTTCTCTTCACTTAGCTGGGGCATCATCAATTTAGGGCAATTAATTTATACACTATTTT
AAATATAAGTTTATTTGGCATATCTATAGAAGCATACCTTTATTTGTCTGATCTGTTTAAATACAGCCATT
CTTTATTATTATCTTACCTGT-
TTAGCAGGGGCTATTACTATATTGTTAACAGACGGAAATTTAATACTTCATTTTTGACCTTCAGGGGGAGI
KF224162_R_micropilus_AH
CTTCAGCCATTTACCGGATGAATATACTCAACTAATCATAAAGACATTGGAACAATATATTTAATTTTGG
FGTATGAGCAGGAATATTAGGATTAAGTATAGAATATTAATTCGACTTGAGCTAGGTCACACGGAAGATTA
```

FIGURA 7.3. Início do formato NEXUS utilizado em análises filogenéticas com inferência Bayesiana. Onde (NTAX=) é o número de sequências que serão analisadas e (NCHAR=) é o tamanho que todas as sequências possuem – este tamanho não pode variar entre as sequências que serão analisadas.

A estatística Bayesiana, aplicada a análises filogenéticas, constrói tanto uma árvore estimada quanto o grau de incerteza de cada grupo naquela árvore. Esse método estatístico está relacionado com a Máxima Verossimilhança. A hipótese é aquela com a máxima probabilidade posterior, que entende por ser, a verossimilhança multiplicada pela probabilidade *a priori* desta hipótese (HOLDER; LEWIS, 2003).

Para iniciar o programa MrBayes (<http://mrbayes.sourceforge.net/download.php>) é necessário que o arquivo criado esteja no mesmo local onde o programa foi instalado. Ao abrir o programa escrever “execute”, e colocar um espaço. Em seguida, escrever exatamente como foi dado o nome do arquivo, acrescentando “.nex” no final, selecionando, então, *Enter*. O programa iniciará e mostrará o tempo em que terminará de gerar a árvore (HUELSENBECK; RONQUISI, 2001; RONQUISI; HUELSENBECK, 2003).

Após o término da construção, o arquivo gerado terá como o modelo de arquivo (.tre), exemplo: COX-1.nex.con.tre. Este arquivo pode ser lido no programa livre, Figtree <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

A leitura da árvore filogenética é feita segundo o valor da porcentagem: valores que mostram 1, significam que o ramo ou nó tem 100% de probabilidade de pertencer àquela espécie. O valor estatístico mínimo para aceitar a hipótese proposta varia entre 60 a 70%, ou seja, 0,60 a 0,70.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 17, p.3389-3402, Sept. 1997.
- ARAYA-ANCHETTA, A.; BUSCH, J. D.; SCOLES, G. A.; WAGNER, D. M. Thirty years of tick population genetics: a comprehensive review. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 29, p.164-79, 2015.
- BARKER, S.; MURRELL, A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. *Experimental Applied Acarology*, v. 28, n. 1-4, p. 55-68, 2002.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SOHDI, N. S.; NG, P. K. L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K. K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 22, n. 3, p.148-155, 2007.
- BURGER, T. D.; SHAO, R.; BARKER, S. C. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 76, p. 241-253, 2014.
- BULL, C. M.; ANDREWS, R. H.; ADAMS, M. Patterns of genetic variation in a group of parasites, the Australian reptile ticks. *Heredity*, v. 53, p.509-525, 1984.
- CRUICKSHANK, R. H. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic & Applied Acarology*, v. 7, p.3-14, 2002.
- DILLON, N.; AUSTIN, A. D.; BARTOWSKY, E. Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopteran insects. *Insect Molecular Biology*, v. 5, n. 1, p.21-24, 1996.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, v. 8, n. 3, p.186-94, 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, v. 8, n. 3, p.175-185, 1998.
- FENTON, B.; BIRCH, A. N.; MALLOCH, G.; LANHAM, P. G.; BRENNAN, R. M. 2000. Gall mite molecular phylogeny and its relationship to the evolution of plant host specificity. *Experimental Applied Acarology*, v. 24, n. 10, p. 831-861, 2000.
- GOODING, R. H. Genetic variation in arthropod vectors of disease-causing organisms: obstacles and opportunities. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 9, n. 3, p. 301-320, 1996.

- GUERRERO, F. D.; ANDREOTTI, R.; BENDELE, K. G.; CUNHA, R. C.; MILLER, R. J.; YEATER, K.; PÉREZ DE LEÓN, A. A. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. **Parasites & Vectors**, v. 7, p.475-487, 2014.
- HALOS, L.; JAMAL, T.; VIAL, L.; MAILLARD, R.; SUAU, A. L. E.; MENACH, A.; BOULOUIS, H. J.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. **Veterinary Research**, v. 35, n. 6, p.709-713, 2004.
- HILBURN, L.; SATTLER, P. Electrophoretically detectable protein variation in natural populations of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Heredity**, v. 57, n. 1, p. 67-74, 1986.
- HOLDER, M.; LEWIS, P. O. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. Review. **Nature Reviews Genetics**, v.4, p. 275-284, 2003.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754-755, 2001.
- KUBASU, S. S. The ability of *Rhipicephalus appendiculatus* (Acarina, Ixodidae) stocks in Kenya to become infected with *Theileria parva*. **Bulletin of Entomological Research**, v.82, n. 3, p.349-353, 1992.
- MANGOLD, A. J.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among *Metastricata* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 84, n. 6, p.478-484, 1998.
- McCOY, K. D. The population genetic structure of vectors and our understanding of disease epidemiology. **Parasite**, v. 15, p. 444-448, 2008.
- McCOY, K.D.; LEGER, E.; DIETRICH, M. Host specialization in ticks and transmission of tick-borne diseases: a review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 57-69, 2013.
- McLAIN, D. K.; WESSON, D. M.; OLIVER, J. H.; COLLINS, F. H. Variation in ribosomal DNA internal transcribed spacers 1 among eastern populations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 3, p. 353-360, 1995.
- NORRIS, D. E.; KLOMPEN, J. S. H.; KEIRANS, J. E.; BLACK, W. C. Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 1, p. 78-89, 1996.
- POST, R. J.; FLOOK, P. K.; MILLEST, A. L. Methods for the preservation of insects for DNA studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, n. 1, p. 85-92, 1993.
- REISS, R. A.; SCHWARTZ, D. P.; ASHWORTH, A. C. Field preservation of Coleoptera for molecular genetic analyses. **Environmental Entomology**, v. 24, n. 3, p. 716-719, 1995.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v.19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.
- SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A.; SCHUMAKER, T. T.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Disease**, v. 11, n. 2, p. 265-70, 2005.
- SATTLER, P. W.; HILBURN, L. R.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E.; ROJAS AVALOS, J. B. Genetic similarity and variability between natural populations and laboratory colonies of North American *Boophilus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitology**, v. 72, n. 1, p. 95-100, 1986.
- TABACHNICK, W. J.; BLACK, W. C. Making a case for molecular population genetic studies of arthropod vectors. **Parasitology Today**, v. 11, n. 1, p. 27-30, 1995.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.
- TROWER, M. K.; ELGAR, G. S. PCR cloning using T-vectors. In: Methods in Molecular Biology, 31, 1994, Totowa, New Jersey. **Proceedings...** Protocols for Gene Analysis. HARWOOD, A. J. ed. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 1994. p. 19-33.
- WALLIS, G. P.; MILLER, B. R. Electrophoretic analysis of the ticks *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus* and *O. (P.) sonrai* (Acari: Argasidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 20, p. 570-571, 1983.