

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

“Influência dos Métodos de Conservação Sobre a Recuperação e a Frequência de Amplificação de Marcadores Mitocondriais e Nucleares de Carrapatos das Espécies *Amblyomma parvum* e *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae)”

João Bosco Varela

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO SOBRE A RECUPERAÇÃO E
A FREQUÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO DE MARCADORES MITOCONDRIAIS E
NUCLEARES DE CARRAPATOS DAS ESPÉCIES *AMBLYOMMA PARVUM* E
AMBLYOMMA SCULPTUM (ACARI: IXODIDAE)**

JOÃO BOSCO VARELA

Sob a orientação do Professor
Douglas McIntosh

Projeto de Dissertação submetido como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

**Seropédica, RJ.
Fevereiro, 2016**

595.42

V293i

T

Varela, João Bosco, 1985-

Influência dos métodos de conservação sobre a recuperação e a frequência de amplificação de marcadores mitocondriais e nucleares de carrapatos das espécies *Amblyomma Parvum* e *Amblyomma Sculptum* (Acari: Ixodidae) / João Bosco Varela. - 2016.

72 f.: il.

Orientador: Douglas McIntosh.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2016.

Bibliografia: f. 61-69.

1. Carrapato - Teses. 2. Ácido desoxirribonucléico - Teses. 3. *Amblyomma* - Teses. 4. Biologia molecular - Teses. I. McIntosh, Douglas, 1964- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINARIAS

JOÃO BOSCO VARELA

Projeto de Dissertação submetido como requisito parcial para obtenção do grau **de Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, na área de Concentração em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 24 / 2 / 2016

Douglas McIntosh, PhD. – UFRRJ

Huarrisson Azevedo Santos, MSc., PhD. – UFRRJ

María Halina Ogrzewalska, MSc., PhD. – IOC / FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente minha família, minha mãe Vera, minhas irmãs Vera e Livia, meus tios Carlos Roberto, Cleusa e Neusa, por todo o carinho e confiança, pelo apoio e por nunca duvidarem de mim. Se não fosse por vocês, eu possivelmente nunca teria pensado em dar este primeiro grande passo.

Agradeço também a Anaís, por todo o seu apoio incondicional, pelo seu amor, e sobre tudo pelo companheirismo e dedicação. Espero que esta conquista seja a primeira de muitas que lograremos juntos.

Estou enormemente agradecido com o meu orientador, Douglas McIntosh. Obrigado por ter depositado em mim a sua confiança, obrigado por me orientar, pela ENORME paciência e principalmente por insistir em que “tem que saber como as coisas funcionam”.

Agradeço imensamente aos professores, coordenadores e funcionários do DPA e PPGCV, pelo companheirismo, pela ajuda e pela tutoria e conhecimentos compartilhados.

Gostaria de agradecer a Tassia Torres Furtado, colega de orientação, de laboratório, de cafés e picolés de paçoca. Muito obrigado pela sua amizade, sua sinceridade e sua paciência. E especialmente, pelas correções de portunhol e comentários na elaboração desta dissertação. Gracias chica!

Agradeço os amigos do HVPA e LQEPV que ofereceram a sua grande amizade nestes anos: Thiago, Rodolfo, Débora, André, Paula, Zé Ricardo, Monique, Bárbara, Diefrey. E os amigos do “clubinho – parasitoloucos” Carol, Cleide, Hermes, Rafael e Aline. Muito obrigado por sempre me apoiar e pelas forças.

Agradeço também os amigos do cortiço, pela grande amizade, festas, e churrascos com casamento.

Igualmente, agradeço as doutoras Michele Costa e Viviane Zeringota por ceder o material do estudo.

Aos colegas dos distintos laboratórios, pela amizade neste curto, mas importante passo da minha vida.

*Whoever fights monsters should see to it that
in the process he does not become a monster.*

*And if you gaze long enough into an abyss,
the abyss will gaze back into you*

F. Nietzsche

RESUMO

VARELA, João Bosco. **Influência dos Métodos de Conservação Sobre a Recuperação e a Frequência de Amplificação de Marcadores Mitocondriais e Nucleares de Carrapatos das Espécies *Amblyomma parvum* e *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

O estudo de carrapatos e doenças transmitidas por eles é cada vez mais dependente da utilização de técnicas de biologia molecular que são empregadas na detecção de patógenos, e a acurada identificação desses artrópodes, em particular os estágios imaturos. A aplicação bem-sucedida dos métodos moleculares, principalmente, a reação em cadeia da polimerase (PCR), só pode ser alcançada se o DNA presente no carrapato foi eficazmente preservado e extraído de forma eficiente. O estudo comparou três fixadores (RNAlater, sais de zinco (ZN) e isopropanol) avaliando a sua capacidade de preservar DNA mitocondrial (mtDNA) e nuclear de larvas e ninfas de *Amblyomma parvum* e larvas de *Amblyomma sculptum*. O DNA foi extraído dos carrapatos, em tempos entre 72h e 12 meses após a fixação por meio da técnica de fenol-clorofórmio e lise alcalina (“Hot Shot”) e examinadas usando ensaios de PCR para sequências nucleares (espaçador interno transcrito 2; ITS2) e mitocondriais (12S rDNA, subunidade 1 do citocromo c oxidase (COI) e D-loop). A eficiência de amplificação foi analisada quantitativamente (número de amostras que produziram “amplicon”) e qualitativamente (intensidade relativa das bandas observadas em géis de agarose). Foi observado que a sequência ITS2 foi amplificada na maioria (93,39%, n= 283/303) das amostras em cada um dos três fixadores, embora tenham sido observadas diferenças qualitativas, particularmente com *A. sculptum* preservado em ZN. Em contraste, a fixação em isopropanol afetou negativamente a capacidade de amplificar as sequências dos marcadores mitocondriais de *A. parvum* e também resultou na amplificação inferior (qualitativa), do alvo D-loop com *A. sculptum*. Esses efeitos foram observados em amostras fixadas por apenas 72 horas. Os efeitos prejudiciais de isopropanol também foram observados igualmente em amostras extraídas usando um método de lise alcalina (“HotShot”). As amostras de larvas de *A. parvum* preservadas em RNAlater durante 30 meses, mostrou uma eficácia de amplificação de 100% nos ensaios para ITS2 e COI, independentemente do método de extração usado. Sequências mitocondriais são um componente central da maioria das pesquisas moleculares com carrapatos. Os resultados deste estudo indicam que isopropanol deve ser evitado como um fixador para fases imaturas de carrapatos. Em vez disso, o uso de RNAlater é recomendado, a fim de permitir a recuperação consistente de mtDNA amplificável.

Palavras chave: DNA mitocondrial, DNA nuclear, preservação, PCR, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma sculptum*

ABSTRACT

VARELA, João Bosco. **Influence of Conservation Methods Upon Retrieval and Amplification Frequency of Mitochondrial and Nuclear Markers from *Amblyomma parvum* and *Amblyomma sculptum* Ticks (Acari: Ixodidae)**. Dissertation (Master of Sciences in Veterinary Science, Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

The study of ticks and tick-borne disease is increasingly dependent upon the use of molecular biological techniques that are employed in pathogen detection and for the accurate identification of ticks, particularly immature stages. The successful application of molecular methods, principally the polymerase chain reaction (PCR), can only be achieved if the DNA present in the tick was effectively preserved and could be extracted efficiently. The current study compared three fixatives (RNAlater, zinc salts (ZN) and isopropanol) for the ability to preserve the nuclear and mitochondrial (mt) DNA of larvae and nymphs of *Amblyomma parvum* and larvae of *Amblyomma sculptum*. DNA was extracted from ticks at times between 72h to 12 months post fixation using a phenol-chloroform procedure and examined using PCR assays for nuclear (internal transcribed spacer 2; ITS2) and mitochondrial (12S rDNA, subunit 1 of cytochrome c oxidase (COI) and D-loop) sequences. The efficiency of amplification was analyzed quantitatively (number of samples which produced amplicon) and qualitatively (relative intensity of bands observed on agarose gels). It was observed that the ITS2 sequence could be amplified in the majority (93,39%, n= 283/303) of the samples, in each of the three fixatives, although qualitative differences were observed, particularly with *A. sculptum* preserved in ZN. In contrast, fixation in isopropanol effectively abolished the ability to amplify the mitochondrial marker sequences of *A. parvum* and also resulted in inferior amplification (qualitative), of the D-loop target with *A. sculptum*. Those effects were observed in samples fixed for as little as 72h. The detrimental effects of isopropanol were also observed in samples extracted using an alkaline lysis method (Hotshot). Samples of *A. parvum* larvae preserved in RNAlater for 30 months showed an amplification efficacy of 100% in the ITS2 and COI assays, irrespective of the extraction method. Mitochondrial sequences are a central component of the majority of molecular studies of ticks. The findings of this study indicate that isopropanol should be avoided as a fixative for immature stages of ticks. Instead, the use of RNAlater is recommended in order to permit the consistent recovery of amplifiable mtDNA.

Keywords: mitochondrial DNA, nuclear DNA, preservation, PCR, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma sculptum*

Lista de Quadros

Quadro 1. Iniciadores, mistura para PCR e condições do ciclo da PCR utilizado para amplificação dos alvos 12S rDNA, 16S rDNA, COI, D-loop e ITS2..... 18

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Comparação da amplificação de marcadores mitocondriais e nucleares ao longo do tempo (3 meses a 12 meses) para DNA extraído de larvas de *Amblyomma parvum* em três fixadores diferentes, extraídas pela técnica de fenol-clorofórmio..... 25
- Tabela 2.** Comparação da amplificação de marcadores mitocondriais e nucleares ao longo do tempo (72 horas a 12 meses) para ninfas de *Amblyomma parvum* preservadas em três diferentes fixadores..... 29
- Tabela 3.** Comparação da amplificação de marcadores de DNA mitocondrial (D-loop) e nuclear (ITS2) ao longo do tempo (72 horas até 12 meses) para larvas de *Amblyomma sculptum* preservadas em três diferentes fixadores..... 33
- Tabela 4.** Comparação de amplificação de um alvo mitocondrial (COI) e nuclear (ITS2) de DNA extraído utilizando o método de lise alcalina, a partir de larvas e ninfas de *Amblyomma parvum* preservado em três fixadores diferentes para 17 meses (larvas) ou 14 meses (ninfas). 35
- Tabela 5.** Comparação da amplificação de marcadores mitocondrial (COI) e nuclear (ITS2) a partir de DNA extraído usando os métodos de fenol-clorofórmio ou lise alcalina de larvas de *Amblyomma parvum* (populações Chaco e Pantanal) preservada em RNAlater..... 38
- Tabela 6.** Quantificação do DNA extraído para carrapatos preservados em três diferentes fixadores..... 41

Lista de Figuras

- Figura 1.** Delineamento Experimental..... 29
- Figura 2.** Avaliação do limite de detecção para quatro ensaios de PCR para marcadores mitocondriais utilizando diluições seriadas de DNA de larvas de *Amblyomma parvum* e *Amblyomma sculptum*..... 23
- Figura 3.** Avaliação do limite de detecção para um ensaio de PCR para o marcador ITS2 utilizando DNA de larvas de *Amblyomma parvum* e *Amblyomma sculptum*..... 23
- Figura 4.** Comparação de amplificação de marcadores mitocondriais (COI e D-loop) e nuclear (ITS2) de DNA extraídos de larvas de *Amblyomma parvum* usando a técnica de fenol-clorofórmio após três meses de preservação em três diferentes fixadores. 26
- Figura 5.** Comparação da amplificação de marcador mitocondrial (D-loop) de DNA extraído de ninfas *Amblyomma parvum* usando a técnica de fenol-clorofórmio após 72 horas, sete dias, um mês e 12 meses de conservação em RNAlater ou isopropanol..... 30
- Figura 6.** Comparação da amplificação de marcador nuclear (ITS2) de DNA extraído de ninfas *Amblyomma. parvum* usando a técnica de fenol-clorofórmio após 72 horas, sete dias, um mês e 12 meses de conservação em RNAlater ou isopropanol..... 30
- Figura 7.** Comparação da amplificação de marcador mitocondrial (D-loop) em amostras de DNA extraído de larvas de *Amblyomma sculptum* usando a técnica de fenol-clorofórmio após 72 horas, sete dias, um mês, seis meses e 12 meses preservadas em RNAlater ou isopropanol..... 34
- Figura 8.** Comparação da amplificação de marcador mitocondrial (COI) e nuclear (ITS2) a partir de DNA extraído de larvas *Amblyomma parvum* usando os métodos de fenol-clorofórmio (12 meses) ou lise alcalina (17 meses) de conservação em RNAlater, isopropanol ou ZN..... 37
- Figura 9.** Comparação da amplificação de marcadores mitocondrial (COI) e nuclear (ITS2) a partir de DNA extraído a partir de larvas de *Amblyomma parvum* usando os métodos de fenol-clorofórmio ou lise alcalina, após 30 meses de conservação em RNAlater..... 39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Carrapatos	3
2.2 Fixadores	5
2.3 Extração de DNA em Carrapatos	10
2.4 Genes Mitocondriais e Nucleares.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Obtenção de Carrapatos	14
3.1.1. <i>Amblyomma parvum</i>	14
3.1.2. <i>Amblyomma sculptum</i> :	14
3.2. Preservação de Carrapatos	14
3.3. Extração de DNA de Carrapatos	15
3.3.1 Método de fenol-clorofórmio-alcool isoamílico	15
3.3.2 Método de lise alcalina ou “HotShot”	16
3.3.3. Quantificação de DNA	16
3.4. Amplificação de DNA por “Polimerase Chain Reaction” (PCR)	16
3.5. Visualização de Resultados em Gel de Agarose	17
3.6. Teste para Detecção da Presença de Inibidores da PCR	20
3.7 Sequenciamento do DNA.....	20
3.8 Delineamento Experimental.....	21
4. RESULTADOS	22
4.1 Testes de Limites de Detecção dos Ensaios de PCR para Marcadores Mitocondriais e Nucleares em Carrapatos.....	22
4.2. Amplificação de Genes de Larvas de <i>Amblyomma parvum</i>	24
4.3. Amplificação de Genes de Ninfas de <i>Amblyomma parvum</i>	26
4.4. Amplificação de Genes de Larvas de <i>Amblyomma sculptum</i>	31
4.5. Método de Extração de Lise Alcalina	34
4.7. Quantificação de DNA	39
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÕES.....	47
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
9. ANEXOS.....	58

1. INTRODUÇÃO

A aplicação de métodos de biologia molecular, em particular a reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de nucleotídeos, em pesquisas relacionadas à identificação dos carrapatos e os patógenos dos quais eles são vetores, complementa e aumenta os dados fornecidos pelas técnicas morfológicas tradicionais.

O processo de análise molecular começa com a coleta do material e geralmente é continuado por: a) armazenamento / preservação das amostras, b) extração (com ou sem purificação) dos ácidos nucleicos (DNA e/ou RNA), c) armazenamento dos ácidos nucleicos, d) manipulação do material extraído, mais comumente amplificação através da PCR, e finalmente e) processamento pós-amplificação (análise em géis de agarose e digestão com endonucleases de restrição ou sequenciamento).

Determinar a importância relativa de cada uma das etapas deste processo não é uma tarefa fácil. No entanto, pode-se argumentar que o passo mais importante, é a preservação eficiente dos carrapatos após a coleta. Esta afirmação baseia-se no fato de que, se o método de conservação escolhido não for capaz de manter a fidelidade e a integridade dos ácidos nucleicos, cada um dos passos subsequentes no processo será comprometido. Como tal, é um pouco surpreendente que a preservação é o passo que tem recebido menos atenção por parte dos pesquisadores no campo da acarologia.

O presente estudo procurou comparar a capacidade de três soluções (isopropanol, RNAlater®, e um fixador a base de sais de zinco) para preservar o DNA presente em fases imaturas (larvas e ninfas) de duas espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*. No entanto, foi levado em consideração o fato de que, conforme acontece com outros organismos eucariotas, carrapatos possuem dois tipos de DNA, especificamente DNA cromossômico/nuclear e DNA mitocondrial (mtDNA). O DNA nuclear representa entre 85 a 90% do DNA celular total. Está organizado na forma de cromossomos, grandes moléculas lineares de polinucleotídeos contendo mais de 10⁹ pares de bases (pb). Ele está localizado no núcleo de cada célula, onde é mantido em forma compactada devido a interações com proteínas histonas.

A quantidade exata de DNA mitocondrial presente numa célula é dependente do número de mitocôndrias encontradas no citoplasma e isto varia em resposta ao estado metabólico da célula. O mtDNA está presente sob a forma de múltiplas cópias de moléculas circulares relativamente pequenas (entre 15 a 20 Kilopares de bases; Kpb). Purificação diferencial destas moléculas requer o uso de ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl)- uma técnica cara, demorada e que não está disponível na maioria dos laboratórios que efetuam a pesquisas moleculares com carrapatos.

Ambos os tipos de DNA são utilizados nas análises moleculares de carrapatos, mas nada se sabe sobre como, ou mesmo se, estes diferentes tipos de moléculas são afetados pelos diferentes tipos de fixadores que foram ou que são atualmente utilizados por pesquisadores destes artrópodes.

O atual estudo foi projetado com os objetivos de determinar a capacidade de extrair DNA de fases imaturas de carrapatos e avaliar a eficiência, tanto quantitativa como qualitativa, de ensaios desenhados para amplificar alvos nucleares e mitocondriais através da PCR. O estudo avaliou o efeito dos fixadores ao longo do tempo (72 horas a

30 meses de fixação), além de investigar o potencial papel de diferentes métodos de extração no desempenho da manipulação do DNA extraído. Espera-se que os resultados desta pesquisa sirvam como primeiro passo para o estabelecimento de métodos padronizados para a preservação de DNA de carrapatos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Carrapatos

Os carrapatos pertencem ao filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acari. Eles são um dos grupos de artrópodes mais importantes na área médica, sendo considerados, junto com os mosquitos, como os principais vetores de patógenos a humanos e animais domésticos (DANTAS-TORRES; CHOMEL; OTRANTO, 2012). Os carrapatos são parasitas obrigatórios e especializados, não permanentes e de distribuição global. Alimentam-se do sangue, linfa ou de tecidos digeridos de mamíferos, aves, répteis e anfíbios. A hematofagia, além de ser obrigatória como fonte de alimento, é necessária para a ocorrência da ecdise e da ovoposição no caso das fêmeas (ANDERSON; MAGNARELLI 2008).

Em 2010 foi reportado cerca de 900 espécies de carrapatos distribuídos no mundo, classificados em três famílias: a família Ixodidae, ou carrapatos duros, composta por 14 gêneros. A família Argasidae ou carrapatos moles, composta aproximadamente 193 espécies, distribuídas em cinco gêneros: o gênero *Argas*, reportada somente uma espécie endêmica no Brasil: *A. miniatus*, parasita de galinhas. O gênero *Antrícota*, parasita de morcegos, constituído por três espécies. Finalmente, o gênero *Ornithodoros*, o mais abrangente de argasídeos, está constituído por 13 espécies (incluindo espécies do gênero *Carios* recentemente incluso em *Ornithodoros*), na qual a maioria parasitam animais morando em constante contato com solo e em condições rurais, na maioria, suínos e em algumas aves domésticas e silvestres. A família Nuttalliellidae está restrita ao continente africano, e possuindo uma única espécie, não apresentam importância médica (GUGLIELMONE et al., 2010; MATHISON; PRITT 2014).

No Brasil o gênero mais representativo de carrapatos é *Amblyomma*, constituído por 30 espécies, são parasitas principalmente de pequenos mamíferos, répteis e aves silvestres (MARTINS et al., 2010). O gênero *Dermacentor*, tendo unicamente uma espécie descrita no Brasil (GUIMARAES et al., 2001; GUGLIELMONE et al., 2006; DANTAS-TORRES; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2009), são parasitas encontrados em equinos e raras vezes em cães. O gênero *Ixodes*, cujos hospedeiros são principalmente aves, alguns mamíferos e répteis, está composta por oito espécies (ONOFRIO et al., 2009). O gênero *Haemaphysallis*, cujos carrapatos parasitam principalmente aves silvestres, coelhos e cervídeos silvestres, está representado no Brasil por três espécies (DANTAS-TORRES; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2009; MARTINS et al., 2010). O gênero *Hyalomma* não é comum no Brasil, e a sua presença já foi confirmada em animais importados do continente europeu (LABRUNA et al., 2001; MASSARD et al., 2002). O gênero *Rhipicephalus* no qual podem ser encontradas duas espécies no Brasil são parasitas principalmente de animais domésticos (DANTAS-TORRES; 2010). Outros gêneros dentro da família *Ixodidae* presentes no Brasil não possuem espécies cujo impacto seja reportado em medicina veterinária.

Os carrapatos moles não possuem escudo dorsal e o seu gnathostoma (ou capítulo) contendo as peças bucais está posicionado subterminalmente, excetuando nas larvas, cujo capítulo está posicionado de forma anterior (ANDERSON; MAGNARELLI 2008; MATHISON; PRITT 2014). Na mesma fase de desenvolvimento, a alimentação

dos argasídeos consiste em vários repastos sanguíneos de curta duração, durando em média 60 minutos, num mesmo hospedeiro, ou em outros, compartilhando o mesmo habitat. Raramente vistos parasitando os seus hospedeiros, podem ser encontrados em covas, ninhos e fendas de animais vertebrados ou em habitações de animais ou de seres humanos. As fases de desenvolvimento são: larva, dois ou mais estádios de ninfa, dependendo da espécie, e adultos com dimorfismo sexual. As fêmeas realizam ovoposição após cada repasto, depositando centenas de ovos fora do hospedeiro.

Os *ixodídeos* representam mais de dois terços dos carrapatos já descritos. Possuem escudo dorsal que chega a cobrir inteiramente o dorso em machos, e parcialmente em fêmeas, permitindo a ingurgitação durante a alimentação. O capítulo está posicionado de forma anterior sendo visível tanto dorsalmente quanto ventralmente em todas as etapas. A alimentação em *ixodídeos* consiste em um repasto único e de maior duração que o de carrapatos moles, podendo tomar no mínimo de quatro dias em larvas e até 12 dias em adultos (ANDERSON; MAGNARELLI 2008; MATHISON; PRITT 2014). Muitos dos *ixodídeos* são carrapatos de vida livre e alguns destes são caracterizados por possuir baixa especificidade de hospedeiro, principalmente em estados imaturos, eles são encontrados parasitando um grande número de vertebrados: desde anfíbios e répteis até seres humanos.

Estas qualidades de longos períodos de alimentação junto com a grande quantidade de hospedeiros que podem ser parasitados, favorecem a grande disposição geográfica de *Ixodídeos*, podendo ser encontrados em diversos ecossistemas ao redor do mundo (FACCINI et al., 2006). Os carrapatos duros realizam uma única muda entre cada estado de maturidade. Há *ixodídeos* que não abandonam o seu hospedeiro, unicamente para a ovoposição, como por exemplo, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (monoxênicos), mas a maioria dos outros gêneros são polixênicos, ou seja, após a ingurgitação, o carrapato se desprende do seu hospedeiro, realiza ecdise fora dele, e novamente procura um novo hospedeiro para realizar a sua alimentação (BOWMAN, 2009). A cópula da maioria dos *ixodídeos*, excetuando algumas espécies do gênero *Ixodes*, ocorre em cima do hospedeiro e a ovoposição toma lugar no ambiente, que ocorre uma única vez, e ovos são contados por milhares em cavernas, troncos ocos e fendas na terra (FACCINI et al., 2006). Após a cópula o macho morre, e a fêmea após a ovoposição.

O gênero *Amblyomma* corresponde a aproximadamente 50% (n=30) dos carrapatos presentes no Brasil (DANTAS-TORRES, ONOFRIO, BARROS-BATTESTI, 2009). Espécies de carrapatos *Amblyomma*, como o caso de *A. cajennense*, *A. aureolatum* e *A. dubitatum* tem sido identificados como transmissores de agentes patogênicos como *Rickettsia rickettsii* (SZABÓ et al., 2013), carrapatos *A. ovale* tem sido incriminados como transmissores de *Rickettsia* sp. da Mata Atlântica (SZABO et al., 2013) e *R. bellii* (LUGARINI et al., 2015), em *A. auricularium* tem-se detectado a nível molecular *R. amblyommi* (SARAIVA et al., 2013), *A. triste* contendo *R. parkeri* já tem sido relatado na região do Pantanal (MELO et al., 2015).

Outros microrganismos de interesse em medicina e veterinária reportados em carrapatos deste gênero no Brasil, são *Theileria equi* (PECKLE et al., 2013) e *Anaplasma phagocytophilum* (SANTOS et al., 2013) em carrapatos *A. cajennense*, e *Ehrlichia chaffensis* em carrapatos *A. parvum* na Argentina (TOMASSONE et al., 2008). A característica de ser um potencial vetor de doenças em humanos e animais domésticos, está relacionado ao ciclo trioxeno deste gênero de carrapatos, podendo

chegar a parasitar animais silvestres, domésticos e humanos na sua procura de alimento durante estádios imaturos. Animais silvestres, como aves, podem ser parasitados por espécies de *Amblyomma* e atuar como reservatório de patógenos (OGRZEWALSKA; UEZU; LABRUNA, 2011; LUGARINI et al., 2015).

Dentro do gênero *Amblyomma*, o carrapato *A. cajennense* recentemente tem sido redescrito com base na distribuição geográfica, habitat e hospedeiros. Espécies têm sido diferenciadas deste carrapato, formando um complexo de seis espécies: *A. cajennenses.s.*, *A. intermedium*, *A. mixtum*, *A. patinoi*, *A. sculptum* e *A. tonelliae*, os quais eram considerados antigamente um único carrapato segundo descrições morfológicas (NAVA et al., 2014). O carrapato *A. sculptum* é um carrapato amplamente distribuído em América do Sul, tem sido reportado como vetor de *R. rickettsii* em Piracicaba, no estado de São Paulo (SOUZA; PINTER; DONALISIO, 2015) e *Candidatus R. amblyommii* no Pantanal (ALVES et al., 2014). Outros carrapatos do complexo *A. cajennense* também têm sido reportados como transmissores de *Rickettsia* no caso *A. tonelliae* na Argentina associado à *R. monteiroi* e *Candidatus R. tarsevichiae* (TARRAGONA et al., 2015) e *A. patinoi* transmitindo *R. rickettsii* na Colombia (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2015), conseqüentemente à importância de *A. sculptum* como um carrapato potencialmente associado à transmissão de rickettsias, a animais e humanos na América do Sul e no Brasil.

O carrapato *A. parvum* foi reportado no Brasil em diferentes ecossistemas (NAVA et al., 2008). Também tem sido descrita sua presença no continente Americano desde a Argentina até o Sul de México (NAVA; MANGOLD; GUGLIELMONE, 2006), e na região do sul do estado da Florida, nos Estados Unidos segundo (CORN et al., 2014), quem especulou que o carrapato pode ter chegado por meio de movimento de animais, especificamente de aves migratórias. Esta espécie tem sido descrita parasitando diversos hospedeiros na Argentina e no Brasil, desde grandes e pequenos ruminantes, equinos, caninos, felinos domésticos e silvestres, vários tipos de roedores e marsupiais silvestres, aves e humanos (GUGLIELMONE et al., 2006; OLEGÁRIO et al., 2011; GERARDI et al., 2013).

Publicações sobre patógenos, que pode ser transmitido por este carrapato, incluem *Rickettsia* sp. estirpe Argentina (PACHECO et al., 2007), *Ehrlichia chaffensis*, agente da Erliquiose granulocítica humana (TOMASSONE et al., 2008), *Candidatus Rickettsia andeanae* em carrapatos parasitando equinos no Brasil, no bioma do cerrado, no nordeste brasileiro quanto carrapatos de vida livre coletados com armadilhas de CO₂ no bioma do Pantanal brasileiro (NIERI-BASTOS et al., 2014) e *Coxiella burnetii*, agente causal da Febre Q, em carrapatos *A. parvum* parasitando roedores na Argentina (PACHECO et al., 2013).

2.2 Fixadores

A identificação morfológica de um grande número de carrapatos coletados em campo pode resultar um trabalho cansativo e ao mesmo tempo demorado. Há falta de profissionais capacitados para esta finalidade no Brasil. Outro obstáculo surge quando estas amostras coletadas são carrapatos em estado imaturo ou ingurgitados, o qual dificulta grandemente a identificação morfológica por hipertrofia ou ausência de estruturas necessárias para sua identificação, podendo dificultar à identificação, que pode ser incorreta. Outros métodos para ajudar a identificação de carrapatos podem ser utilizados quando o volume de carrapatos é alto, como por exemplo, o uso da reação em

cadeia da polimerase (PCR) em combinação com técnicas de sequenciamento, porém em muitos laboratórios isto não é factível, devido à falta de equipamentos e equipe técnica ou falta de recursos para executar estes métodos.

O método de preservação dos carrapatos em campo e dentro do laboratório deve ser adequado para realizar identificação morfológica dos mesmos e também pesquisas moleculares posteriores à sua coleta. Nagy (2010) realizou um compendio de fixadores utilizados em tecidos, mas apontando o objetivo principal da fixação: se as amostras estão preservadas inadequadamente, o posterior uso da amostra não será satisfatório. A tendência de preservar a morfologia justifica o uso de soluções a base de álcool, que vem sendo utilizada desde a década de 1970 (RAKE 1972), mais os métodos para preservar diversos insetos variam de família para família (MANDRIOLI, 2008) e poderiam não reproduzir resultados satisfatórios em pesquisas e identificação a nível molecular.

A biologia molecular aplicada à parasitologia veterinária compreende um campo de estudo no qual a detecção de genes ou estruturas proteicas de parasitas são os principais alvos para realização de estudos de identificação, classificação, filogenia e detecção de agentes patogênicos de interesse à saúde pública. Nas últimas décadas a utilização destas técnicas permitiu aprofundar o conhecimento sob a ecologia de diversos parasitas, como os carrapatos, e o impacto deles como possíveis transmissores de agentes potencialmente patogênicos a humanos.

A integridade dos ácidos nucleicos é essencial para a adequada pesquisa em parasitologia veterinária. Muitos fixadores utilizados rotineiramente em medicina veterinária, como exemplo o formaldeído, constituem excelentes agentes fixadores de tecidos, mantendo a estrutura proteica destes para análise histopatológica. Mas com esta vantagem sob a preservação morfológica, a desvantagem que traz a utilização do formaldeído é a inviabilidade para utilizar ácidos nucleicos das amostras preservadas por este meio. Para isto, múltiplos outros fixadores foram estudados com o objetivo de preservar tanto morfológicamente quanto molecularmente amostras de tecidos.

O formaldeído, ou formalina (formol 10%), é um fixador líquido comumente utilizado para análise histológica em medicina veterinária, que atua mediante a reticulação (“crosslinking”) de aminas, amidas, anéis aromáticos, grupos hidroxilo, grupos de guanidina, grupos sulfitos e átomos reativos de hidrogênio, alterando e coagulando a estrutura proteica de tecidos, mantendo desta forma a integridade estrutural dos tecidos e inativação de enzimas (MOELANS et al., 2011), por isso é amplamente utilizado na preservação de tecidos em coleções de museus (SCHANDER; HALANYCH 2003). Seu uso, porém para estudos moleculares não é recomendado. Uma revisão realizada por Srinivasan e coautores (2002), afirma que o formaldeído atua hidrolisando os enlaces A-T do DNA de dupla fita, deixando estas moléculas disponíveis para que outras reações, como metilação. Igualmente a hidrólise pode ocorrer nos enlaces fosfodiéster do DNA (MOELANS et al., 2011). Apesar do amplo uso deste fixador em amostras de tecidos, pouco está relatado na literatura, quanto à preservação de insetos ou artrópodes utilizando formaldeído.

Outro aldeído, o glutaraldeído, atua de forma similar ao formaldeído reticulando proteínas, porém, pelas suas propriedades físico-químicas da reticulação ocorre de maneira mais rápida do que com o formaldeído (KIERNAN 2000). Contudo a capacidade de preservar DNA é superior ao formaldeído, como foi demonstrado por

Douglas e Rogers (1998) em plantas e posteriormente por Miething e coautores (2006) em tecidos.

O uso de aldeídos, apesar de sua capacidade para preservar estruturas proteicas com facilidade, o seu uso possui muitas limitações, como risco à saúde. Tanto o formaldeído quanto do glutaraldeído são substâncias que tem demonstrado seu caráter carcinogênico, mutagênico, teratogênico (FERON et al., 1991; DUONG et al., 2011; INCA, 2012).

Álcoois também são utilizados na preservação de amostras biológicas, tanto como fixador de tecidos (SPIGELMAN et al., 2001; NAGY, 2010), como de insetos (POST; FLOOK; MILLEST, 1993; BISANTI; GANASSI; MANDRIOLI, 2009; MOREAU et al., 2013). Alguns tipos de álcoois, como metanol, etanol e isopropanol são utilizados para esta finalidade, porém na literatura vem se diferenciando o uso de etanol, especialmente em altas concentrações, para fixação de amostras, porém existem autores que discordam em que amostras preservadas em etanol possam ser utilizadas para fins moleculares (PAABO, 1990; HOWAT; WILSON, 2014).

O etanol preserva amostras mediante precipitação de proteínas. Ao não realizar reticulação destas, este fixador é capaz de conservar estrutura tecidual das amostras sem comprometimento dos ácidos nucleicos (SRINIVASAN; SEDMAK; JEWELL, 2002; GILLESPIE et al., 2002; KING; PORTER 2004). Seu uso vem sendo reportado em estudos relacionado à precipitação proteica (YOSHIKAWA et al., 2012), estudos histopatológicos (GILLESPIE et al., 2002), imunohistoquímicos (ESSEN et al., 2010) e como preservante de amostras em museus (órgãos e insetos) (ZIMMERMANN et al., 2008; SPIGELMAN et al., 2001; MOREAU et al., 2013)

Diversos autores reportaram a utilização de etanol para preservar insetos, como moscas *Simulium damnosum* (POST; FLOOK; MILLEST, 1993), vespas parasíticas *Venturia canescens* e *Leptomastix dactylopii* (DILLON; AUSTIN; BARTOWSKY, 1996), afídeos *Acyrtosiphon pisum* (FUKATSU 1999), formigas *Solenopsis invicta*, *Camponotus floridanus* e *Dorymyrmex bureni* (KING; PORTER 2004), aracnídeos *Pardosa falcifera* e *Smeringurus mesaensis* (VINK et al., 2005), carrapatos *Rhipicephalus appendiculatus* (MTAMBO et al., 2006), ácaros *Balaustium* sp. (CORRIVEAU; UPPSTROM; KLOMPEN, 2010), besouros *Tenebrio molitor* (BISANTI; GANASSI; MANDRIOLI, 2009) e *Ips typographus* (STOECKLE et al., 2010).

Como observada, à preservação em etanol é utilizada em diversos tipos de artrópodes, e os autores já mencionados, relatam efeitos similares das amostras preservadas. Post e coautores (1993), um dos primeiros autores a utilizar etanol e realizar a comparação com outros métodos de preservação, encontrou que a temperatura na qual a preservação é realizada, pode alterar a qualidade dos ácidos nucleicos, concluindo que a refrigeração das amostras preservadas tem melhor resultado do que preservá-las a temperatura ambiente. Outro achado foi, quanto maior a concentração do etanol, melhor é a preservação de ácidos nucleicos, possivelmente devido à precipitação de DNAses, que podem degradar amostras após a morte do inseto. Dillon e coautores (1996) encontraram resultados similares em relação à concentração do etanol, igualmente observado por Fukatsu (1999), Vink et al. (2005), Mtambo et al. (2006), Bisanti et al. (2009), Corriveau et al. (2009), e recentemente Ammazalorso et al. (2015) que confirmaram a eficiência do etanol 70%, para preservar carrapatos.

O isopropanol foi inicialmente utilizado por Rake (1972) na preservação de amostras biológicas, no caso do estudo realizado por ele, em *Escherichia coli* cultivada em laboratório. Estas bactérias foram testadas para detecção de associação de DNA-DNA, sendo sua preservação eficaz. Porém, estudos realizados posteriormente em outros microrganismos, demonstraram que a eficácia do isopropanol, para preservar DNA para sua utilização em outras técnicas moleculares, como PCR. A eficácia do isopropanol foi demonstrada já na preservação da morfologia de formigas, (KING; PORTER, 2004), enquanto Post e coautores (1993) afirmam que a utilização de isopropanol pode-se considerar na preservação de insetos, unicamente se a integridade do DNA não é importante para a técnica que irá ser realizada, como experimentos de tipo dot-blot, pelo fato de ter sido observado alta degradação do DNA de simúleões preservados em isopropanol, em comparação ao etanol. Resultados similares foram observados por (FUKATSU, 1999), quem demonstrou que a amplificação de amostras de DNA extraído de afídeos *Acyrtosiphon pisum* foi ineficiente em ensaios de PCR para a detecção de um marcador mitocondrial (16S rDNA) ou para DNA procariota (especificamente de endossimbiontes do gênero *Buchnera*).

Apesar da falta de evidência para apoiar o uso de isopropanol como fixador em insetos, diversos estudos têm sido realizados em carrapatos dentro do Brasil e em outros países na América do Sul, sendo estes preservados em isopropanol (LABRUNA et al., 2002; LABRUNA et al., 2003; LABRUNA et al., 2007; AGUIAR et al., 2007; OGRZEWALSKA et al., 2009; TOLESANO-PASCOLI et al., 2010; MELO et al., 2011; OGRZEWALSKA, UEZU; LABRUNA 2011; OGRZEWALSKA et al., 2012; PACHECO et al., 2012; LONDOÑO et al., 2014; RAMOS et al., 2014; LUGARINI et al., 2015).

Outro fixador utilizado com sucesso é a acetona. Testado por Fukatsu (1999) em afídeos *Acyrtosiphon pisum*. O preservador proporcionou resultados ótimos quanto a preservação, tanto de proteínas como de ácidos nucleicos. O teste realizado envolveu a comparação da preservação em acetona e outras soluções como etanol, isopropanol, metanol e outros e comparativamente os resultados obtidos na amplificação de DNA tanto mitocondrial quanto nuclear. Igualmente importante foi o achado na mesma pesquisa, sob a preservação do simbiote *Buchnera* sp. dentro do afídeo estudado. Estudos mais recentes envolvendo a preservação em acetona para fins de análises moleculares foram realizados por Moreira e coautores (2013) em afídeos *Bombus terrestris* amplificando genes mitocondriais e nucleares. Igualmente, pode ser realizada a preservação em acetona de copépodos de zooplankton com resultados comparáveis, mas não superiores (especialmente amostras preservadas por períodos superiores a quatro meses) a aqueles obtidos com etanol 95%, amplificando genes nucleares e mitocondriais de forma eficaz (GOETZE; JUNGLUTH 2013).

Soluções que associam o ácido etileno diamino-tetra-acético (EDTA) com sais altamente concentrados com a finalidade de precipitar proteínas são uma alternativa para fixar ácidos nucleicos de tecidos (FUKATSU, 1999). Comercialmente disponível, o RNALater (Ambion, product# AM7021) vem sendo utilizado para preservar material biológico para estudos moleculares de distintos tipos de amostras. Insetos que tem sido testados incluem aracnídeos (VINK et al., 2006), formigas (MOREAU et al., 2013), mosquitos (DOWELL; NOUTCHA; MICHEL, 2011) e diversos ectoparasitas de animais e humanos, a saber: pulgas, carrapatos, ácaros e piolhos (REEVES; UTTER; DURDEN, 2012). Com exceção de Moreau e coautores (2013), os autores acima citados reportaram uma adequada preservação para estudos moleculares utilizando o

RNALater. Este fixador pode ser utilizado como uma alternativa ao uso de álcoois, os quais requerem cuidados especiais tanto na coleta quanto no transporte: podendo evaporar-se durante a coleta, requerendo recipientes que impeçam o vazamento desta substância e havendo restrições para transporte de substâncias inflamáveis em viagens de avião (IATA A180).

O fixador de Carnoy, um fixador a base de etanol, clorofórmio e ácido acético, tem sido testado como alternativa na fixação de insetos quanto de tecidos (MIETHING et al., 2006; BISANTI; GANASSI; MANDRIOLI, 2009). Este fixador tem sido testado em diversos gêneros de insetos, porém com resultados não concordantes: em pesquisas com tecidos animais, Miething et al. (2006) testaram a amplificação de genes mitocondriais e nucleares de tecido cardíaco, muscular, hepático, renal e cerebral de humanos utilizando diversos fixadores, e encontraram que a fixação em solução de Carnoy não foi eficaz em preservar a morfologia dos tecidos para avaliações histológicas, porém foram preservados ácidos nucleicos para amplificação de genes mitocondriais e nucleares. Existe discordância destes resultados com aqueles encontrados por Post et al. (1993), que encontraram resultados não consistentes quanto à quantidade de DNA recuperável em insetos simulídeos. Uma questão a considerar é a fórmula mencionada para preparação da solução de Carnoy utilizada por Post et al. (1993) unicamente aponta que é feita a base de etanol e ácido acético (3:1) sem outras informações relevantes.

Alguns anos depois, Gurdebeke e Maelfait (2002) demonstraram que a preservação de aracnídeos *Coelotes* terrestres utilizando uma solução de Carnoy modificada (adicionando formaldeído e tampão TE) não foi satisfatória. Mais recentemente foi testada esta solução utilizando coleópteros *Tenebrio molitor* pela equipe de Bisanti e coautores (2009) concluindo que a preservação de insetos em solução de Carnoy resulta em alta fragmentação de DNA, impossibilitando o seu uso após certo tempo para fins moleculares. A conclusão destes autores foi que a capacidade de penetração da solução de Carnoy varia entre gêneros de insetos e entre tecidos e que isto é fundamental para a preservação dos ácidos nucleicos nesta solução, enquanto substâncias como etanol penetram com maior facilidade nos tecidos e precipitam as proteínas em menos tempo.

Substâncias já comentadas, como aldeídos, têm sido utilizadas com a adição de sais de zinco segundo vários autores. Seu uso foi bem-conceituado em décadas anteriores (MUGNAINI; DAHL, 1983; DAPSON, 1993) como fixador de tecidos destinados a recuperação de antígenos. Beckstead (1994) avaliou primeiramente o uso destes sais de zinco como preservadores primários, comparando as associações destes sais com aldeídos e álcoois como aditivos. Os resultados encontrados por Beckstead (1994) foram satisfatórios, enquanto à associação de tampão Tris-Ca com acetato de zinco e cloreto de zinco, sugerindo a utilização para fixação de tecidos em estudos imunohistoquímicos, no lugar de substâncias como aldeídos, que são consideradas prejudiciais à saúde. Um estudo posterior realizado por Lykidis e coautores (2007), com base nas observações de Beckstead (1994), testaram novas soluções à base de sais de zinco, substituíram o acetato de zinco com outros sais de zinco e compararam sua capacidade igualmente para fixar proteínas, além de testar este fixador para preservação de ácidos nucleicos mediante a realização de PCR e PCR de transcriptase reversa (RT-PCR). Os resultados obtidos demonstraram que a substituição de acetato de zinco por trifluoroacetato de zinco foi superior na preservação de estruturas proteicas e capacidade de preservar DNA para realização de testes moleculares.

2.3 Extração de DNA em Carrapatos

As técnicas de extração para DNA de carrapatos têm sido investigadas principalmente com a finalidade de obter DNA de patógenos que os carrapatos podem abrigar e transmitir (CROWDER et al., 2010). Dentro dos primeiros trabalhos que relatam especificamente a extração de DNA de carrapatos, Hubbard e coautores (1995), relatam a utilização satisfatória do tiocianato de guanidina junto com a terra diatomácea e lavagem com etanol e acetona para a detecção do gene 16S rDNA de procariotas em diversos gêneros de carrapatos ixodídeos e argasídeos preservados em etanol. Segundo os autores, esta técnica pode ser utilizada para amplificar DNA de amostras preservadas por cerca de 100 anos.

No ano 2000, a equipe de Hernandez e coautores, testou a extração de um “pool” de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (informação em relação ao método de fixação destes carrapatos não foi fornecida), com a utilização de tampão de lise composto por Tris, 10 mM; EDTA, 100 mM e SDS, 0.5%; pH 8.0 e extração utilizando fenol-clorofórmio e precipitação com etanol e NaCl, seguido de digestão com proteinase K, tratamento com RNAase, extração com fenol e precipitação novamente com etanol, o qual foi utilizado para PCR, sequenciamento e Southern blotting com resultados satisfatórios.

No ano 2003, Hill e Gutierrez avaliaram a eficácia de extração de larvas de carrapato *Amblyomma americanum* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por meio de pulverização de larvas em nitrogênio líquido com “pestle”, seguido de lise celular e digestão com tampão feito a base de (10mM Tris-Cl pH8.0, 100mM EDTA e 1% SDS) e adição de proteinase K a 100 µg/mL por uma hora a 50°C e RNase por 2 a 3 horas a 50°C. A purificação de DNA foi realizada mediante a técnica de fenol-clorofórmio, seguido de lavagem com etanol 70%. Com esta extração, obteve-se DNA genômico suficiente para realização de hibridização do tipo Southern (>24Kbp), com degradação mínima do DNA. Os autores afirmaram que o DNA de *ixodídeos* foi altamente susceptível a degradação, e especularam que essa degradação possa ter sido causada pela desidratação após a lise dos carrapatos e as precipitações realizadas com etanol.

Outra publicação consultada, foi o estudo realizado por Halos e coautores (2004) no qual se comparam três métodos de extração de carrapatos adultos (*Dermacentor* sp., *Rhipicephalus* sp., e *Ixodes ricinus*) preservados em etanol (70%). O primeiro método foi realizado utilizando um kit comercial descrito no texto como “Qiap DNA extraction kit for tissue protocol (Qiagen, Hilden, Germany)”. O segundo método compreendeu maceração dos carrapatos utilizando pérolas de vidro, digestão com proteinase K e purificação com fenol e fenol-clorofórmio seguida por precipitação em álcool. O terceiro método envolveu lise física dos carrapatos previamente congelados com nitrogênio líquido utilizando pérolas de vidro em um agitador de pérolas (“BeadBeater”), seguido de extração com o kit comercial “QIAamp DNA Extraction”. A avaliação dos resultados foi realizada através da amplificação por PCR de um fragmento do gene mitocondrial (16S rDNA). Foi observada amplificação acima de 70% nos três métodos de extração testados, e nos três gêneros de carrapatos utilizados, sendo os resultados obtidos (100%) com o terceiro método de extração, considerados como os mais eficientes.

Em 2006, Mtambo e coautores compararam três métodos de extração de DNA em múltiplos grupos de carrapatos preservados de formas distintas: um grupo de

carrapatos frescos de colônias de laboratório foi mantido a temperatura ambiente; outro grupo de carrapatos foi coletado de colônias e secos após mortos a 4°C; um terceiro grupo de carrapatos coletados de animais, foi fixado diretamente em etanol 70% e preservados a temperatura ambiente, um quarto grupo de carrapatos foi coletado do ambiente e transportado a -150°C para após ser fixado a -80°C (criopreservado) e um quinto grupo de carrapatos, que foram mortos em etanol 70%, lavados com água, dissecados com sílica gel e conservados a 4°C. Os métodos de extração testados foram os seguintes: maceração em tampão TE seguido por armazenagem a -20°C; um segundo método baseado em lise mecânica dos carrapatos (cortado com bisturi), seguido de lise química com SDS e precipitação em etanol; e um terceiro método adaptado de Hubbard e coautores (1995) que utiliza hidrocloreto de guanidina, lise com proteinase K e lavagem com etanol (HUBBARD; CANN; WRIGHT, 1995). Os resultados obtidos pelos pesquisadores demonstram que o primeiro método de extração não foi eficiente. Isto pode ter acontecido, possivelmente, devido a ativação e ação de nucleares liberadas, resultado do dano causado após o corte dos carrapatos e a falta de métodos para purificação de DNA e remoção de substâncias inibidoras da PCR.

O segundo método de extração apresentou melhores resultados que o primeiro na amplificação de genes nucleares em amostras conservadas frescas (temperatura ambiente), enquanto as criopreservadas (-80°C), as amostras dissecadas (temperatura ambiente) e aquelas preservadas em etanol apresentaram uma baixa eficiência de amplificação nuclear e mitocondrial. O terceiro método de extração, foi satisfatório em amplificar o marcador mitocondrial COI em 70% das amostras preservadas em etanol, 70% das amostras criopreservadas; 96% das amostras refrigeradas e 100% das frescas. Para genes nucleares o terceiro método de extração teve resultado igualmente satisfatório, obtendo amplificação da região ITS2 de 87% das amostras preservadas em etanol, em 70% das amostras criopreservadas, 90% das amostras refrigeradas e em 96% das amostras frescas. Os autores sugerem que a preservação a temperatura ambiente das amostras fixadas em etanol a 70% pode ser a causa dos resultados não concordantes com outros autores, que reportam índices de recuperação acima de 90% em amostras preservadas em etanol, porém com concentrações superiores a 70% e temperaturas inferiores ou igual a 4°C (VINK et al., 2005).

Mais recentemente, Rodríguez e coautores (2014) testaram três protocolos diferentes para extração de DNA em ninfas e adultos de carrapatos, *R. sanguineus* e *R. (Boophilus) microplus* estando ingurgitados ou não e preservados em 78% etanol. Foram utilizados diversos protocolos para extração de DNA: o primeiro baseia-se na extração de DNA utilizando acetato de potássio, utilizado por De Armas 2005, porém os autores realizam diversas modificações deste protocolo. O protocolo consiste na adição de 500 µL de tampão de lise 0.1M Tris-HCl (pH 8.25), 0.05M EDTA, 0.2M sucrose, 0.5% SDS) com ou sem adição de proteinase K (10µg/µL) e incubação a temperaturas e tempos diferentes (10 min a 65°C sem proteinase K, 60 minutos a 56°C com proteinase K). Após isto, foram adicionados 120 µL de acetato de potássio 5M e as amostras incubadas a 4°C por 10 minutos e centrifugadas por outros 10 minutos. A precipitação foi realizada com uma mistura de acrilamida com acetato de sódio e etanol absoluto a temperatura ambiente ou -20°C, seguido de centrifugação a 12000 g por 20 minutos e posterior lavagem com etanol. As amostras foram secas a temperatura ambiente e resuspendidas em tampão TE e conservadas a -20°C. Este protocolo de extração foi comparado com um protocolo de extração de fenol-clorofórmio e com outro protocolo de extração com base na fervura dos carrapatos em hidróxido de amônia.

A comparação da eficiência da extração foi realizada por meio da visualização direta do DNA em gel de agarose após eletroforese, e pela amplificação de um fragmento de 320 bp do gene 16s rDNA. Os resultados obtidos por este grupo mostraram que a extração utilizando hidróxido de amônia foi inferior aos outros dois métodos, principalmente no caso de carrapatos ingurgitados, possivelmente devido à presença de inibidores da PCR presentes no sangue que não foram removidos durante a extração. A recomendação entre a técnica de fenol-fenol-clorofórmio e acetato de potássio foi justificada pela melhor intensidade das bandas e o menor tempo para realização da extração. Os autores afirmam que foram observadas bandas para o método de extração utilizando acetato de potássio em todos os estados de desenvolvimento e alimentação. Além disso, os autores demonstram a amplificação de patógenos como *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophylum* e *Borrelia burgdorferi* utilizando a técnica de extração a base de acetato de potássio.

Recentemente, Ammazalorso e coautores (2015) estudaram distintos métodos de extração comerciais com base em colunas de sílica e um método a base de fervura em hidróxido de amônia sob carrapatos *Ixodes scapularis* em estado de ninfa e adultos preservados em álcool 70% a temperatura ambiente. Um aspecto notável deste estudo foi a importância dada à quantificação fluorométrica do DNA total de adultos e ninfas como avaliador da eficiência da extração de ácidos nucleicos, dado que este aspecto não foi reportado nos estudos citados anteriormente. A análise qualitativa foi realizada por meio da amplificação de: a) o marcador mitocondrial COI, b) um marcador nuclear-especificamente um microssatélite descrito por (CHAN et al, 2012) e c) o gene *ompA* para avaliar possíveis efeitos da extração sob o DNA procariota (especificamente DNA de *Rickettsia*). Com base na análise, os autores recomendaram o uso do kit “Thermo GeneJET Genomic DNA”. Este kit produziu consistentemente quantidades elevadas de DNA, a partir de adultos e ninfas, e teve um bom desempenho em cada um dos três ensaios de PCR. O método de hidróxido de amônio funcionou bem com formas adultas, mas forneceu resultados insatisfatórios quando usados com ninfas. Este resultado foi considerado importante pelos autores com base no fato de que o método de hidróxido de amônio tem sido amplamente utilizado por pesquisadores europeus que trabalham com ninfas de *Ixodes ricinus*. (GUY; STANEK, 1991; RIJPKEMA et al., 1996; PICHON et al., 2003; HUMAIR et al., 2007; PANGRACOVA et al., 2013).

2.4 Genes Mitocondriais e Nucleares

O DNA é uma molécula complexa cuja função está vinculada ao armazenamento de informação e transmissão desta informação à progênie. Existem dois principais tipos de DNA em animais: o DNA nuclear e o DNA mitocondrial.

O DNA mitocondrial (mtDNA) em carrapatos é um DNA circular que varia de tamanho, entre 15 e 20 kbp e possuem mais de dez genes codificadores de proteínas, dois RNA ribossomais e 22 genes para RNA de transferência (tRNA) (BURGER; SHAO; BARKER, 2014). O mtDNA é utilizado em pesquisas como marcador filogenético por ser um DNA que não usufrui recombinação, tem alta percentagem relativa de mutação e múltiplo número de cópias (GU et al., 2014). Em parasitologia, os genes mais utilizados para estudos moleculares em carrapatos incluem o gene 12S rRNA, 16s rRNA, COI mtDNA, os quais proveem informação para diferenciar espécies críticas de carrapatos (LV et al., 2014). É sugerido que, devido à alta pressão seletiva, os genes mitocondriais são mais utilizados para detecção no nível de espécie e análise filogenética, (CRUICKSHANK 2002).

O uso de DNA nuclear, que está presente em unicamente duas cópias por células (no caso de células diploides), contém maior quantidade de pares de bases. Em carrapatos está mais restrito à genes ribossomais nucleares (rDNA). A região do genoma que codifica o rRNA está organizada da seguinte forma: o gene codificador para 18s rRNA (subunidade pequena ribossomal), o espaçador interno transcrito 1 (ITS1), gene codificador para 5.8s rRNA, espaçador interno transcrito 2 (ITS2) e o gene codificador para 28s rRNA (subunidade grande ribossomal). Estas regiões têm sido utilizadas como marcadores moleculares em carrapatos. O fato de 5.8s ser muito conservado e pequeno não permite o seu adequado uso em estudos filogenéticos. Em contrapartida, as regiões intergênicas tendem a apresentar alta variabilidade em termos de sequência e tamanho, sendo os genes 18s e os espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2), as principais fontes de uso de regiões nucleares pode providenciar com informação específica até o nível de família e subfamília (DABERT 2006).

Estes genes e marcadores utilizados podem sofrer uma serie de danos, tanto durante a preservação e durante a extração, e posterior aplicação em técnicas moleculares (SRINIVASAN; SEDMAK; JEWELL, 2002). Por um lado, a utilização de protocolos que empreguem detergentes e enzimas durante a extração, como SDS ou proteinase K podem interromper a atividade das polimerases durante a PCR. No outro lado, protocolos de extração que utilizam solventes orgânicos como o fenol, podem produzir coagulação do RNA. Além disso, um estudo realizado por Guo et al. (2009), demonstrou que pode ocorrer uma maior perda na quantidade de DNA mitocondrial em relação ao DNA nuclear durante extração de ácidos nucleicos utilizando kits de coluna de sílica. Isso ocorre devido que à ligação do DNA na coluna de sílica depende da concentração de sais e pH, para poder formar enlaces com a coluna de fosfato e ribose presente no DNA (carregados negativamente) junto com a coluna de sílica, carregada positivamente. Sendo o DNA nuclear de maior tamanho (>50 kbp), a retenção destes fragmentos será maior que a retenção do DNA mitocondrial (< 20kbp). Por último, outros fatores que podem influenciar a perda de DNA mitocondrial é a presença de lipídios e a quantidade de mitocôndrias na célula a ser analisada (GUO et al., 2009).

Em resumo, os fatores de preservação dos carrapatos e extração de DNA como pode ser observado pela literatura, tem efeito sobre a amplificação dos genes de interesse mitocondriais e nucleares na pesquisa filogenética e possivelmente também sobre a detecção de genes de microrganismos patogênicos de interesse para pesquisas relacionadas a transmissão de doenças. Os carrapatos são vetores amplamente estudados e por este motivo é surpreendente que não exista nenhum consenso sobre os métodos de preservação ou de extração de DNA, que devem ser empregados com estes ectoparasitas. Esta lacuna precisa ser abordada para assegurar o desenvolvimento eficiente de pesquisas envolvendo a identificação de carrapatos, detecção de patógenos, classificação taxonômica e estudos bioecológicos. Neste contexto, o presente estudo procura realizar uma contribuição para o estabelecimento de métodos padronizados para fixação e extração de DNA de carrapatos do gênero *Amblyomma*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção de Carrapatos

3.1.1. *Amblyomma parvum*

Os carrapatos *A. parvum* foram gentilmente fornecidos pela Dra. Michelle da Costa Pinheiro, UFRRJ, Brasil. Estes carrapatos foram separados, em três populações baseado na sua procedência: a) Chaco-Argentina, b) Cerrado-Brasil, c) Pantanal-Brasil, e coletados de colônias de laboratório, mantidos pelo grupo de pesquisa comandado pela Profa. Katia M. Famadas, DPA, UFRRJ e João Luiz Horacio Faccini, DPA, UFRRJ. Foram coletados carrapatos nas fases de larva e ninfa provenientes de uma mesma postura de fêmeas de cada uma das populações de *A. parvum*. Parte da postura dos carrapatos, na fase de larva, foi coletada recém eclodida, antes da primeira alimentação e a outra parte foi submetida à infestação experimental em coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) para alcançar a fase de ninfa.

Larvas de *A. parvum* após o período de repasto sanguíneo se desprenderam livremente do hospedeiro. Seguidamente, estas foram colocadas em estufas tipo B.O.D. com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $80 \pm 5\%$ para realizar ecdise para a fase de ninfa (Protocolo de experimentação animal UFRRJ/COMEP 23083.010016/2011-14, Anexo 1). Adicional ao material acima descrito, amostras de larvas não ingurgitadas das populações Chaco e Pantanal fixadas à -20°C em RNAlater em abril de 2013, foram utilizadas em 30 meses após a preservação inicial.

3.1.2. *Amblyomma sculptum*:

As larvas de *A. sculptum* foram fornecidas pela pesquisadora Viviane Zeringóta, UFJF, Brasil. Estes carrapatos são provenientes de fêmeas ingurgitadas obtidas por meio de infestações artificiais em coelhos *Oryctolagus cuniculus*, Linnaeus, (1758), através da técnica proposta por Neitz et al., (1971). As infestações foram realizadas no Laboratório de Artrópodes Parasitos da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil (Protocolo UFJF/CEUA 02/2016, Anexo 2). As larvas foram coletadas recém eclodidas, antes da primeira alimentação.

3.2. Preservação de Carrapatos

Os carrapatos coletados (total de 90 larvas e 90 ninfas por população) foram distribuídos em grupos de 30 indivíduos e armazenados em tubos para microcentrifuga (de capacidade 1.5 mL), com tampa de rosca contendo 500 μL de cada um dos três diferentes fixadores: (1) RNAlater® (Ambion, product# AM7021), (2) Isopropanol (MERCK) e (3) fixador a base de sais zinco (ZN), relatado por (Lykidis et al., 2007); (0.5% de cloreto de zinco, 17.16mM de Tri-fluoroacetato de zinco, 0.05% de acetato de cálcio em 0.1M de Tris pH 6.4 a 6.7 – concentrações finais). As amostras foram conservadas a temperatura ambiente (25°C) durante as primeiras 72 horas na tentativa de simular as condições encontradas durante uma coleta de campo. Após isto, as amostras conservadas em Isopropanol e ZN foram armazenadas a 4°C (refrigeradas),

enquanto as amostras em RNAlater foram armazenadas a -20°C (congeladas) conforme indicado pelo fabricante. As amostras foram testadas nos seguintes tempos após a fixação: 72 horas, uma semana, um mês, três meses, seis meses e um ano.

3.3. Extração de DNA de Carrapatos

3.3.1 Método de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico

Foi empregado um protocolo modificado de SANTOLIN, FAMADAS, MCINTOSH, 2013. Antes da extração, os carrapatos foram submetidos à lavagem em tampão fosfato-salino autoclavado (“phosphate-buffered saline”, PBS), pH 7,2 para remover o excesso de cada fixador. Foram acrescentados 1000 μl de PBS estéril nos tubos de tampa com rosca contendo um único carrapato cada, submetendo-os a uma leve agitação e em seguida foram centrifugados por três minutos à rotação de 16000 x g. Este procedimento foi repetido três vezes em cada tubo de amostra.

Após a lavagem, cada carrapato foi transferido para um tubo para microcentrifuga (de capacidade de 0.5 ml) com tampa de rosca, contendo 200 μl de PBS (pH 7,2) estéril e 50 mg de pérolas de vidro - “glassbeads” (425-600 μm ; Sigma-Aldrich; product # G8772). As amostras foram agitadas por 60 segundos num Mini-Beadbeater-16 (Biospec; Bartlesville, OK, USA Cat. No. 607EUR) e imediatamente foram colocadas em bloco frio (4°C) para evitar a ativação de nucleases. Se acrescentou em cada amostra 200 μL de tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 400 mM NaCl, 1% Dodecil Sulfato de Sódio, 10 mM cloreto de cálcio) e 20 μl proteinase K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich; product # P2308). As amostras foram logo incubadas por três horas a 56°C . Passado o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas durante 1 minuto (16000 x g) e retirados 400 μl de cada lisado e transferidos a novos tubos de 1,5 ml com tampa de rosca, contendo 200 μl de PBS (pH 7,2).

Em uma cabine de exaustão de gases, foram acrescentados 600 μl de fenol tamponado (pH 7,4 – 7,8) (BioAgency FE-001N produto 11593) e depois misturadas manualmente para formar uma emulsão. As amostras foram centrifugadas por cinco minutos em 16000 x g para separar ambas as fases (fenol e DNA em solução aquosa). Após esse período, foram retirados 550 μl do sobrenadante (fase superior aquosa) sendo o mesmo transferido para um novo tubo com tampa de rosca de 1,5 ml. Foram adicionados 550 μl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) (Bioagency produto # 3879), e novamente misturados manualmente até que a solução forme uma emulsão e centrifugados por cinco minutos em 16000 x g para separar ambas as fases.

Após, foi retirado 500 μl do sobrenadante (fase superior aquosa) e transferidos para novo tubo com tampa de rosca de 1,5 ml. Foi adicionado 500 μl de Isopropanol (MERCK) e 10 μl de tRNA de levedura (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Sigma-Aldrich product # R5636), para coadjuvar a precipitação. Os tubos foram incubados durante 20 minutos em temperatura ambiente (aproximadamente 24°C), para precipitar o DNA das amostras. Passado esse período, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos em 16000 x g e depois invertidas para decantar o líquido deixando o “pellet” de DNA no fundo do tubo.

As amostras foram lavadas com 500 µl de etanol 70%, (para remoção do excesso de sal), e centrifugadas por três minutos a 16000 x g. O sobrenadante foi eliminado invertendo o tubo e a lavagem foi repetida por mais uma vez com o mesmo volume de etanol 70%. Para remover o restante do álcool, os tubos foram colocados invertidos e sem tampa em cima de papel absorvente durante 1 minuto e em seguida incubados sem tampa a 70°C durante cinco minutos para evaporar qualquer quantidade de etanol que restou dentro do tubo. Após seco, o DNA foi ressuspense em 50 µl de tampão AE (10 mM Tris-HCl + 0,5 mM EDTA pH 9.0; Qiagen), e foi colocado em incubação a 4°C durante a noite. No dia seguinte, o DNA foi aquecido a 56°C por dez minutos. Após o uso do DNA, este foi conservado a -20°C.

3.3.2 Método de lise alcalina ou “HotShot”

Para este método, larvas e ninfas de *A. parvum*, preservadas por um tempo maior à um ano, igualmente que larvas de *A. parvum* coletados em 2013, foram lavadas três vezes com PBS (conforme descrito acima) em tubos de tampa rosca de 1,5 ml. contendo aproximadamente 20 µg de “glassbeads”. Posterior à lavagem foi acrescentado 25 µl da solução #1 de “HotShot”, consistindo em 25 mM NaOH e 0,2 mM EDTA. Em seguida os carrapatos foram triturados com “micro-pestles” estéreis (SIGMA), e colocados imediatamente em gelo para evitar a ativação de nucleases liberadas pela lise do carrapato. Foi realizada uma centrifugação rápida para assegurar que o conteúdo do tubo esteja suspenso na solução e os tubos foram levados a um banho seco e aquecido a 99°C durante 30 minutos.

Após o período de incubação, foi realizada uma centrifugação rápida para assegurar que o conteúdo do tubo seja precipitado e os tubos foram colocados em gelo durante 5 minutos. Em seguida, foram acrescentados 25 µl da solução #2 de “HotShot” (40 mM Tris-HCl; pH 5,0) Os tubos foram guardados a -20 °C até a reação de PCR.

3.3.3. Quantificação de DNA

O DNA foi quantificado utilizando o “Qubit™ dsDNA HS assay kit”, de acordo com as instruções do fabricante.

3.4. Amplificação de DNA por “Polimerase Chain Reaction” (PCR)

Posterior à extração do DNA de carrapatos, foram realizados ensaios baseados em PCR para a confirmação da eficácia do protocolo de extração do DNA dos carrapatos. Inicialmente foram avaliados cinco ensaios. Os alvos destes ensaios foram fragmentos de quatro regiões do DNA mitocondrial; especificamente 12S rDNA, 16S rDNA, subunidade I da *citocromo c oxidase* (COI), e D-loop (região rica em A+T), e uma única sequência nuclear - o segundo espaçador interno transcrito (ITS2). As condições para cada um dos ensaios de PCR estão detalhadas no quadro 1.

Em todos os ensaios, controles positivos foram utilizados para garantir o desempenho nos limites de detecção da PCR sendo estes provenientes do DNA extraído usando o protocolo fenol-clorofórmio, de amostras de *A. parvum* e *A. sculptum* sem preservação (mortos por congelamento (-20°C) antes do processo de extração). Os DNAs foram quantificados e, com base nos valores obtidos, os lisados foram serialmente diluídos (fator de 10), para proporcionar uma gama de concentrações (100 picogramas/µl à 10 fentogramas/µl). Os controles do DNA (1 µl) foram submetidos a

PCR (quadro 1), e analisados através de eletroforese em gel de agarose para determinar a última diluição capaz de gerar um produto visível de amplificação. A última e penúltima diluição, determinada para cada ensaio, foram então utilizadas como controles positivos, fornecendo um meio de assegurar que os ensaios foram reprodutíveis (especificamente que os ensaios funcionaram dentro dos limites predefinidos de detecção), e para assegurar que os “amplicons” derivados dos lisados de carrapatos apresentaram o peso molecular correto utilizando o “ladder” de peso molecular: 100 bp DNA ladder, Invitrogen, cat # 15628-019 (Anexo 3).

Todas as reações de PCR incorporaram dois controles negativos. O primeiro destes compreendia uma amostra em que o DNA de teste foi substituído pela mesma quantidade de água para biologia molecular, que foi adicionada ao tubo antes destes serem retirados do ambiente (livres de DNA) no qual as misturas para a reação da PCR foram preparadas e distribuídas para os tubos de reação individuais. Este controle, denominado “água dentro”, serviu para confirmar que os componentes da mistura da reação estavam livres de DNA contaminante. O segundo controle negativo denominado “água fora”, também foi composto de um tubo pelo qual o DNA foi substituído por um volume equivalente de água para biologia molecular. No entanto, este tubo controle foi mantido no ambiente (potencialmente contaminado por DNA), durante o período em que o DNA teste foi adicionado aos tubos individuais, contendo alíquotas da mistura principal para PCR. Este foi sempre o último tubo a ser preparado. Deste modo, o controle que foi intitulado água fora, serviu para determinar se havia ocorrido contaminação durante o processo de adição de amostras de DNA teste nos tubos individuais de reação. Uma reação positiva em qualquer controle negativo invalidava todas e quaisquer reações positivas registradas com o DNA teste das amostras.

3.5. Visualização de Resultados em Gel de Agarose

Em todas as reações de PCR o peso molecular dos “amplicons” foi confirmado através da comparação com o marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, Invitrogen cat # 15628-019; Anexo 3). A eletroforese de todos os ensaios acima descritos foi realizada em gel de agarose 1,5% ou 2,0%, com tampão de corrida Tris-Acetato com EDTA (TAE) (1X= 40 mM Tris base; 40 mM ácido acético; 1 mM EDTA pH 8,0), a uma tensão elétrica constante de 5V/cm durante 60 minutos. Após a corrida, os fragmentos de DNA presentes no gel de agarose foram corados em Brometo de Etídeo (BE: 0,5µg/mL) durante 10 minutos e posteriormente submersos em água destilada por 30 minutos para remoção do excesso de BE. A observação e fotografia foram feitas digitalmente sob iluminação ultravioleta com exposição de 120ms em um fotodocumentador L-Pix STi (Loccus biotecnologia) e as imagens resultantes foram analisadas utilizando o software Quantity-One (Bio-Rad).

Quadro 1. Iniciadores, mistura para PCR e condições do ciclo da PCR utilizado para amplificação dos alvos 12S rDNA, 16S rDNA, COI, D-loop e ITS2.

Alvo e Tamanho do Produto	Iniciadores	Mistura para PCR 12,5µL	Condições da PCR	Referências
12S rDNA mitocondrial (≈ 340 bp)	Primer Forward 5' AAACT AGGAT TAGAT ACCCT 3' Primer Reverse 5' ATTGA GAGCG ACGGG CGATGT 3'	1x Tampão 1,6 mM MgCl ₂ 200 µM dNTPs 10 µM cada iniciador 0,75 U Platinum Taq DNA polimerase 1µL do DNA	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos. Seguido, 40 ciclos constituídos por: Desnaturação a 95°C por 30 segundos, Anelamento a 54°C por 20 segundos e Extensão a 72°C por 20 segundo. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C.	BEATI; KEIRANS, 2001
16S rDNA mitocondrial (≈ 460bp)	Primer Forward 5' CCGGT CTGAA CTCAG ATCAA GT 3' Primer Reverse 5' GCTCA ATGAT TTTT AAATT GCTGT 3'	1x Tampão 2,5 mM MgCl ₂ 200 µM dNTPs 5 µM cada iniciador 0,75 U Platinum Taq DNA polimerase 1µL do DNA	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos. Seguido, sete ciclos constituídos por: Desnaturação a 94°C por 30 segundos, Anelamento a 47°C por 30 segundos e Extensão a 72°C por 45 segundo, seguido de 33 ciclos adicionais constituídos por: Desnaturação a 94°C por 30 segundos, Anelamento a 50°C por 30 segundos e Extensão 72°C por 45 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C.	MANGOLD; BARGUES; MAS-COMA, 1998
COI mtDNA mitocondrial (≈ 690 bp)	Primer Forward 5' ATTCA ACCAA TCATA AAGAT ATTGG3' Primer Reverse 5' TAAAC TTCTG GATGT CCAA AAATC A 3'	1x Tampão 2,5 mM MgCl ₂ 200 µM dNTPs 7,5 µM cada iniciador 0,5 U Platinum Taq DNA polimerase 1µL do DNA	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido, cinco ciclos constituídos por Desnaturação a 94°C por 40 segundos, Anelamento a 45°C por 40 segundos e Extensão 72°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos adicionais constituídos por Desnaturação a 94°C por 40 segundos, Anelamento a 51°C por 40 segundos e Extensão 72°C por 1 minuto. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C.	HEBERT, et al., 2004

Quadro 1 (continuação). Iniciadores, mistura para PCR e condições do ciclo da PCR utilizado para amplificação dos alvos 12S rDNA, 16S rDNA, COI, D-loop e ITS2 .

Alvo e Tamanho do Produto	Iniciadores	Mistura para PCR 12,5µL	Condições da PCR	Referências
D-loop mitocondrial (≈ 450 bp)	Primer forward 5' TAACC GCKGC KGCTG GCACA A 3' Primer reverse 5' AGATA AYCCT TTAYT CAGGC AT 3'	1x tampão 2,5 mM MgCl ₂ 200 µM dNTPs 7,5 µM cada iniciador 0,5 U Platinum Taq DNA polimerase 1µL do DNA	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido de 40 ciclos de: Desnaturação a 95°C por 20 segundos, Anelamento a 52°C por 15 segundos e Extensão a 72°C por 20 segundos. Extensão final de 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C.	BEATI et al., 2013.
ITS2 nuclear (≈1200 bp)	Primer Forward 5' ACATT GCGGC CTTGG GTCTT 3' Primer Reverse 5' TCGCC TGATC TGAGG TCGAC 3'	1x tampão 1,75 mM MgCl ₂ 200 µM dNTPs 10 µM de cada iniciador 0,75 U Platinum Taq DNA polimerase 1µL do DNA	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido de 40 ciclos de: Desnaturação a 95°C por 20 segundos, Anelamento a 53°C por 25 segundos, Extensão a 72°C por 45 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C.	LV et al. 2014

3.6. Teste para Detecção da Presença de Inibidores da PCR

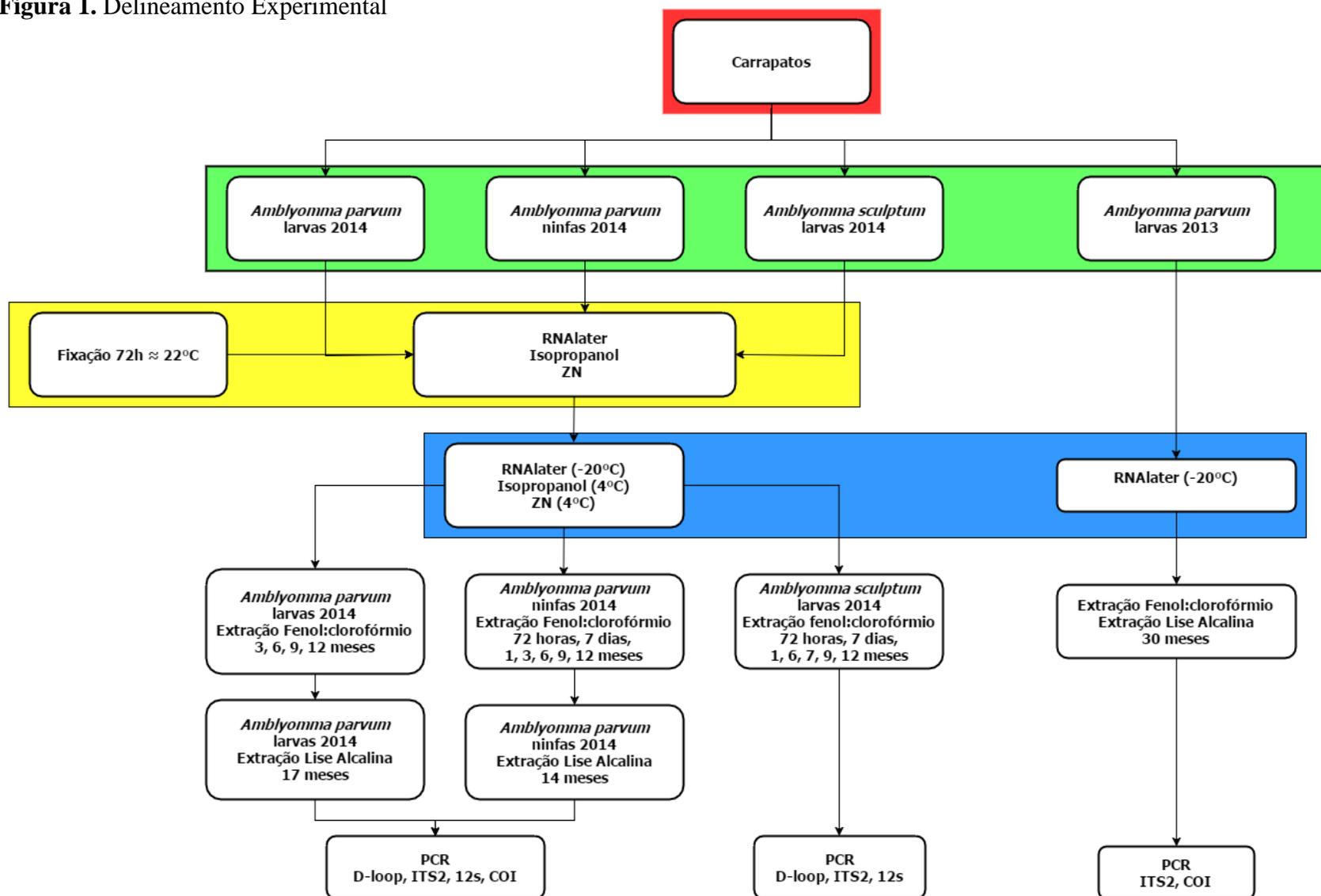
As amostras que foram negativas para a amplificação de todos os genes foram submetidas a análises adicionais para avaliar a possibilidade de presença de inibidores. Em primeiro lugar, as amostras foram simplesmente diluídas em tampão AE por um fator de 1:10 ou 1:100 e as reações de PCR foram repetidas. As amostras que falharam em produzir “amplicon” após a diluição, foram examinadas num segundo ensaio. Este ensaio foi desenhado para determinar se os DNAs testes foram capazes de inibir a amplificação de um DNA controle obtido de carrapatos *A. parvum* e *A. sculptum* frescos. O alvo nestes ensaios foi o fragmento COI (Quadro 1). Cada ensaio utilizou dois tubos por amostra. Cada tubo continha um "mastermix" para a amplificação do fragmento de COI, juntamente com 10 picogramas de DNA extraído de *A. parvum*. O primeiro tubo recebeu 1µL de água para biologia molecular (“Ultrapure, DNasefree, RNasefree”; SIGMA W4502), enquanto o segundo tubo recebeu o mesmo volume de DNA teste. Após a PCR, as amostras foram aplicadas, lado a lado, em géis de agarose e a presença de inibição foi avaliada. A inibição foi considerada se a banda produzida no tubo dois (DNA teste) foi mais fraca do que a banda produzida no tubo 1 (DNA controle positivo de reação), ou, se nenhuma amplificação foi observada no tubo 2.

3.7 Sequenciamento do DNA

Os produtos das PCR foram purificados com Exo-SAP-IT (*GE Healthcare Life Sciences* Code number US77702) e submetidos ao sequenciamento através do “Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Kit” (*Applied Biosystems* Catalog number: 4337455). Os “amplicons” foram sequenciados em ambas as direções utilizando os mesmos iniciadores empregados na PCR, e a reação de “cycle-sequencing” foi realizada no termociclador modelo 9700 (*Applied Biosystems*), utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C durante 60 segundos, seguidos de 30 ciclos de 10 segundos a 96°C, cinco segundos à 50°C para o anelamento quatro minutos à 60°C para a extensão. Após a reação, a remoção dos nucleotídeos não incorporados foi feita através de precipitação com EDTA/etanol seguido por ressuspensão em 10 µl de formamida (*Applied Biosystems*). Todo o sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador de DNA automático (modelo 3500 *Applied Biosystems*), localizado no Departamento de Parasitologia Animal, UFRRJ. Alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa Sequencher® (Versão 5.3; *Genecodes Corporation*), e as sequências obtidas foram identificadas usando o programa BlastN, junto ao banco de dados GenBank.

3.8 Delineamento Experimental

Figura 1. Delineamento Experimental



4. RESULTADOS

4.1 Testes de Limites de Detecção dos Ensaios de PCR para Marcadores Mitocondriais e Nucleares em Carrapatos.

Os resultados dos experimentos executados para determinar o limite de detecção de cada ensaio de PCR para os marcadores mitocondriais estão demonstrados na Figura 2. O PCR para o marcador 16S rDNA mostrou um limite de detecção de 100 pg/μl de DNA extraído de ambas as espécies de carrapatos. No entanto, a intensidade da amplificação foi marginalmente melhor para *A. sculptum* (Fila A, amostra S1).

Os limites de detecção para o marcador 12S rDNA foram superiores aos observados para 16S. Especificamente, foi observada amplificação forte para as amostras de *A. parvum* em concentrações de 100 e 10 pg/μl, e uma banda visível, porém mais fraca, observada na concentração de 1 pg/μl (Fila B, amostra P3). No caso de *A. sculptum*, a amplificação nítida foi registrada apenas na concentração de 100 pg/μl (Fila B, amostra S1) enquanto a amostra de 10 pg/μl (Fila B, amostra S2) produziu uma banda que mostrou uma intensidade semelhante à observada na amostra de 1 pg/μl de *A. parvum*. (Fila B, amostra P3). Em carrapatos da espécie *A. parvum*, o ensaio com COI como alvo, mostrou um limite de detecção muito semelhante ao observado para o ensaio para 12S rDNA. Assim, observou-se forte amplificação para as amostras de 100 pg/μl e 10 pg/μl, enquanto uma banda fraca foi observada para as amostras de 1 pg/μl (Fila C, amostras P1, P2 e P3). Em contraste, este ensaio teve um limite de detecção de 100 pg/μl no caso de *A. sculptum* (Fila C, amostra S1).

O ensaio usando o marcador D-loop como alvo, apresentou os maiores níveis de detecção entre os quatro ensaios testados. Especificamente, amplificação forte das amostras de 100, 10 e 1 pg foram registrados para *A. parvum* (Fila D, amostras de P1, P2, P3) e uma banda fraca foi observada na amostra de 100 fg (Fila D, amostra P4). Com relação a *A. sculptum*, amplificação forte deste marcador foi observada em concentrações de 100 pg/μl e 10 pg/μl (Fila D, amostras S1 e S2) e uma banda clara também foi registrado nas amostras pg 1/μl (Fila D, amostra S3).

Os resultados para o teste de limite de detecção do ensaio usando o marcador ITS2 como alvo estão fornecidos na Figura 3. Observou-se que este ensaio foi altamente sensível para a DNA extraído de ambas as espécies de carrapatos. Assim, foi observada amplificação forte em 100 pg/μl, 10 pg/μl, 1 pg/μl e concentrações de 100 fg/μl (amostras P1 a P4 e S1 a S4). Além disso, uma banda mais fraca, porém claramente visível foi observada na concentração 10 fg/μl (amostras P5 e S5). Com base nestes resultados, ficou claro que o ensaio para o alvo 16S possui valor limitado para ambas as espécies de carrapato. Os outros três marcadores mitocondriais foram julgados como adequados para a detecção de DNA de *A. parvum*. No entanto, no caso de *A. sculptum* apenas o ensaio utilizando D-loop como alvo foi considerado adequado para a detecção de níveis de picogramas de DNA.

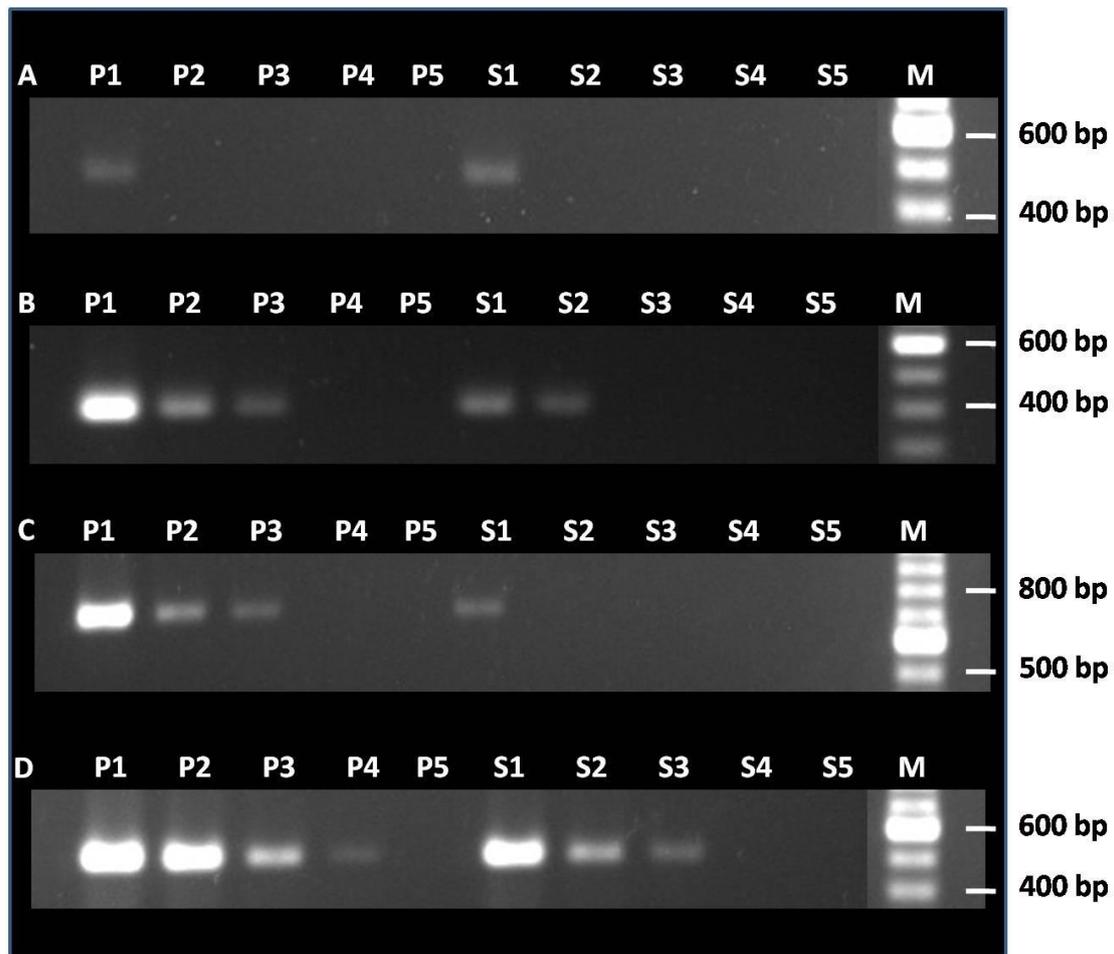


Figura 2. Avaliação do limite de detecção para quatro ensaios de PCR para marcadores mitocondriais utilizando diluições seriadas de DNA de larvas de *Amblyomma parvum* e *Amblyomma sculptum*. **A** = 16S, **B** = 12S **C** = COI **D** = D-loop. **P** = DNA de *A. parvum*, **S** = DNA de *A. sculptum*. **1** = 100 pg/μl, **2** = 10pg/μl, **3** = 1 pg/μl, **4** = 100 fg/μl, **5** = 10 fg/μl. **M** = 100 bp “ladder” (Invitrogen). Peso molecular das bandas do “ladder” indicados na extrema direita da figura.

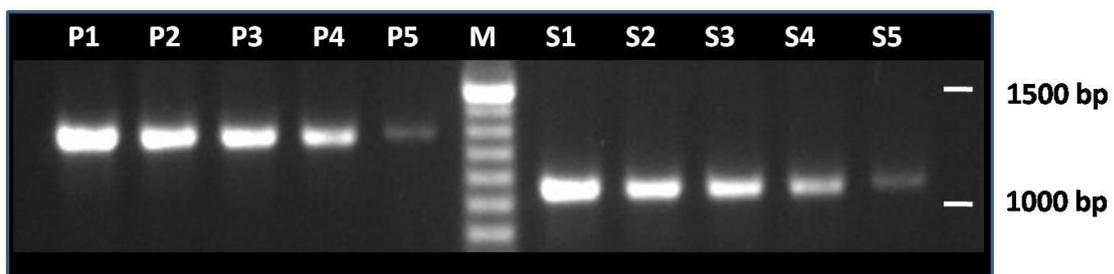


Figura 3. Avaliação do limite de detecção para um ensaio de PCR para o marcador ITS2 utilizando DNA de larvas de *Amblyomma parvum* e *Amblyomma sculptum*. **P** = DNA de *A. parvum*, **S** = DNA de *A. sculptum*. **1** = 100 pg/μl, **2** = 10pg/μl, **3** = 1 pg/μl, **4** = 100 fg/μl, **5** = 10 fg/μl. **M** = 100 bp “ladder” (Invitrogen). Peso molecular das bandas do “ladder” indicados na extrema direita da figura.

4.2. Amplificação de Genes de Larvas de *Amblyomma parvum*

Dados quantitativos com relação à eficiência de amplificação de marcadores mitocondriais (12S rDNA, COI e D-loop) e nuclear (ITS2) de DNA, extraído a partir de larvas de *A. parvum* conservados nos três fixadores estão apresentados na Tabela 1. No caso de larvas preservadas em RNAlater, foi observada amplificação forte em 100% das amostras (n= 24), utilizando os quatro ensaios de PCR. Em contraste, amostras fixadas em isopropanol mostraram níveis reduzidos (50% a 0%) de amplificação para os marcadores mitocondriais em cada um dos pontos de tempo examinados (Tabela 1). Além disso, um nível de eficiência de 83% de amplificação foi registrado para o marcador ITS2 no terceiro e sexto mês (Tabela 1). No entanto, verificou-se que os valores de eficiência real para os alvos mitocondriais foram variáveis. Assim, no terceiro, sexto e nono mês, foi observado que a eficiência de amplificação usando o ensaio para D-loop foi superior (50%), aos valores obtidos para os marcadores COI e 12S. Porém no décimo segundo mês todos os ensaios geraram níveis equivalentes (16,6%) de amplificação. A larva que não gerou “amplicon” para o alvo ITS no terceiro mês, também foi negativa para os três marcadores mitocondriais, contudo não foram detectados inibidores da reação de PCR na amostra, e a quantidade de DNA (134 pg/ μ L) encontrava-se dentro do faixa detectável pelos diversos ensaios de PCR. Os dados em relação às amostras fixadas em ZN demonstram que a eficiência de amplificação foi superior àquela observada para isopropanol, porém inferior a RNAlater (Tabela. 1). No terceiro e sexto mês, as amostras preservadas neste fixador amplificaram os alvos mitocondriais COI, 12S e D-loop com uma eficiência de 83,3%, e o ITS2 com um valor de 100%. No nono mês foi observado que o marcador COI amplificou em apenas 66,6% dos carrapatos testados, enquanto 12S, D-loop e ITS2 amplificaram em 100% das amostras. Após um ano fixadas em ZN, 83,3% das larvas amplificaram COI, e 100% amplificaram os outros marcadores mitocondriais e nucleares (Tabela 1).

Além da análise quantitativa das amostras, as mesmas foram avaliadas qualitativamente com base na visualização das intensidades de bandas. Um exemplo deste tipo de análise é fornecido na Figura 4 para larvas processadas três meses após a fixação. Verificou-se que o marcador ITS2 gerou bandas fortes em 100% (6/6) das amostras fixadas em RNAlater (Fila A, colunas 1-6) e ZN (Fila A, colunas 13 a 18). A situação com o material fixado em isopropanol foi mais complexa. Apenas cinco das seis amostras produziram “amplicon” detectável para o marcador ITS2 (Fila A, colunas 7-12). Entre essas cinco amostras, três produziram bandas com intensidades semelhantes a aquelas registradas para as amostras fixadas em RNAlater e ZN. As duas amostras restantes produziram bandas claras, no entanto, de intensidade reduzida (Fila A, colunas 7 e 9).

Em relação aos marcadores mitocondriais, verificou-se que a intensidade da amplificação foi maior para o PCR D-loop do que para o ensaio COI. Este efeito foi mais evidente para as amostras fixadas em ZN onde uma amostra foi negativa (Fila B, coluna 14) e uma segunda amostra (Fila B, coluna 16), gerou bandas fracas no ensaio COI, mas cada amostra produziu bandas claras no ensaio de PCR para D-loop. No caso das amostras fixas em isopropanol, uma única amostra (Fila C, coluna 8), gerou um “amplicon” no ensaio COI, e a mesma amostra produziu uma banda de intensidade maior quando submetido ao PCR para D-loop. Além disso, duas amostras (Fila C, colunas 9 e 10), produziram bandas visíveis, porém fracas, no PCR para D-loop, mas não produziram “amplicon” pelo ensaio COI (Figura 4).

Tabela 1. Comparação da amplificação de marcadores mitocondriais e nucleares ao longo do tempo (3 meses a 12 meses) para DNA extraído de larvas de *Amblyomma parvum* em três fixadores diferentes, extraídas pela técnica de fenol-clorofórmio.

Tempo	RNAlater				Isopropanol				ZN			
	12S	COI	D-loop	ITS2	12S	COI	D-loop	ITS2	12S	COI	D-loop	ITS2
Três Meses	^a 100% ^b (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	33,3% (2/6)	16,6% (1/6)	50% (3/6)	83,3% (5/6)	83,3% (5/6)	83,3% (5/6)	100% (6/6)	100% (6/6)
Seis Meses	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	16,6% (1/6)	16,6% (1/6)	50% (3/6)	83,3% (5/6)	83,3% (5/6)	83,3% (5/6)	83,3% (5/6)	100% (6/6)
Nove Meses	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	50% (3/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	66,6% (4/6)	100% (6/6)	100% (6/6)
Doze Meses	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	16,6% (1/6)	16,6% (1/6)	16,6% (1/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	83,3% (5/6)	100% (6/6)	100% (6/6)

^aValores da frequência de amplificação providenciados como percentagens. ^bValores em parênteses fornecem detalhes de número de amostras positivas / numero de amostras testadas.

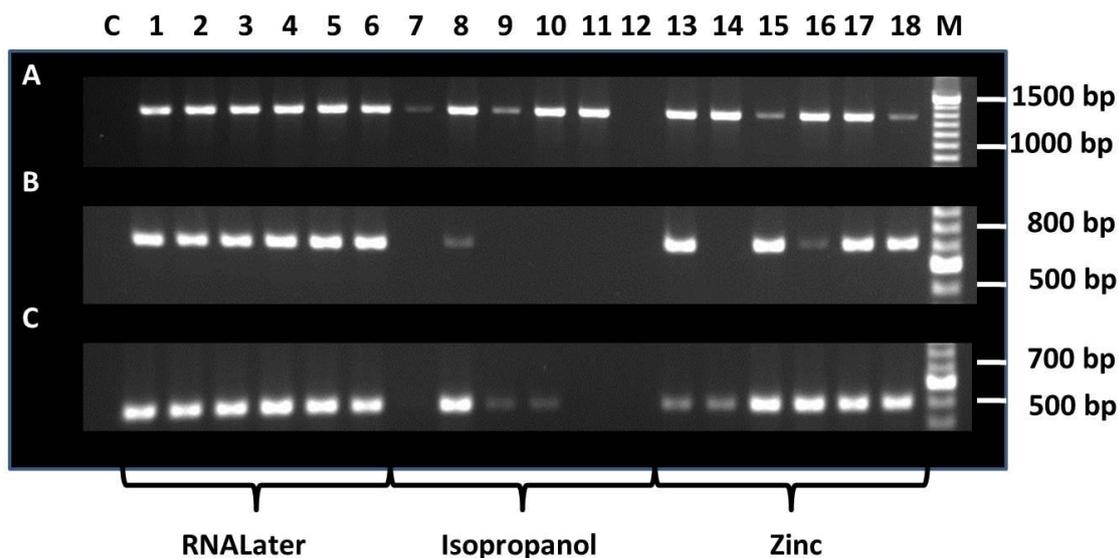


Figura 4. Comparação de amplificação de marcadores mitocondriais (COI e D-loop) e nuclear (ITS2) de DNA extraídos de larvas de *Amblyomma parvum* usando a técnica de fenol-clorofórmio após três meses de preservação em três diferentes fixadores. **Fila A= ITS2, Fila B= COI, Fila C= D-loop.** **Colunas 1-6=** amostras conservadas em RNAlater, **7-12 =** amostras conservadas em isopropanol **13-18=** amostras conservadas em ZN. **C=** controle de amplificação negativo (água). **M=** 100 bp “ladder” (Invitrogen). Peso molecular das bandas do “ladder” indicados na extrema direita da figura.

4.3. Amplificação de Genes de Ninfas de *Amblyomma parvum*.

Os dados quantitativos em relação à eficiência de amplificação de marcadores mitocondriais (12S rDNA, COI e D-loop) e marcadores nucleares (ITS2) de DNA extraído a partir de ninfas de *A. parvum* mantidas nos três fixadores estão apresentados na Tabela 2. Em contraste com os dados obtidos das larvas desta espécie de carrapato, as ninfas também foram processadas em 72 horas, sete dias e um mês após a fixação. Estes pontos no tempo foram considerados importantes, uma vez que forneceriam dados essenciais em relação à velocidade com que as diferenças na eficiência de amplificação podem ter ocorrido. Em comum com o observado nas larvas, 98% (n= 41/42) das ninfas fixadas em RNAlater mostraram excelente amplificação para cada uma das quatro sequências alvo (Tabela 2). Uma única ninfa processada aos três meses pós-fixação não conseguiu produzir “amplicon” nos ensaios COI ou 12S, porém gerou uma banda visível na PCR para D-loop. Os resultados obtidos para as ninfas conservadas em Zn foram semelhantes aos das amostras RNAlater. Assim, em ninfas 72 horas após a fixação os marcadores mitocondriais e nucleares amplificaram em 100% dos carrapatos. Uma semana após a fixação inicial, COI foi amplificado em 100% das amostras, porém 12S, D-loop e ITS2 amplificaram em apenas 66,6% das amostras. No primeiro, terceiro, sexto, nono e décimo segundo mês, 100% das amostras amplificaram todos os marcadores mitocondriais e o ITS2.

Os dados gerados a partir das ninfas fixadas em isopropanol confirmaram e estenderam as observações obtidas com as larvas. Observou-se que a eficiência de amplificação de marcadores mitocondriais foi drasticamente reduzida em relação ao observado para as amostras conservadas nos outros fixadores (Tabela 2). Além disso, os

efeitos deletérios de fixação em isopropanol sob o DNA mitocondrial foram registrados dentro das primeiras 72 horas de fixação. Assim, às 72 horas, o marcador COI amplificou apenas em 33,3% das amostras, enquanto 12S e D-loop amplificaram em 50% das amostras e o marcador ITS2 amplificou em 66,6% dos carrapatos. Como foi observado com as larvas, duas amostras não amplificaram nenhum marcador, porém a quantificação revelou que as amostras possuíam DNA em quantidades dentro dos limites de detecção (70 pg/μl e 203 pg/μl), para todos os ensaios de PCR, e os testes de inibição não apresentaram resultados que indicassem presença de inibidores da PCR. Na amostra fixada por uma semana os marcadores COI e 12S amplificaram apenas 16,6% das amostras, enquanto o ensaio para D-loop gerou “amplicon” em 33,3% das amostras e o ITS2 foi amplificado em 50% das amostras.

Mais uma vez, aquelas amostras que não amplificaram ITS2 não apresentaram resultados que indiquem a presença de inibição e na quantificação apresentaram resultados (222 pg/μl, 136 pg/μl) compatíveis com a presença de DNA em níveis mais do que suficiente para ser amplificado. No primeiro mês, encontramos amplificação de 12S, COI e D-loop em 50% das amostras e de ITS2 em 100%. No terceiro mês novamente houve uma queda na amplificação de produtos mitocondriais, encontrando amplificação de COI e D-loop em 16,6% das amostras e de 12S em 33,3% das amostras. O marcador ITS2 novamente apresentou 100% de amplificação. No sexto mês foi observado que apenas 16,6% dos carrapatos amplificaram COI, enquanto 66,6% amplificaram 12S e 83,3% amplificaram D-loop. De novo houve uma amostra que não amplificou nenhum dos marcadores mitocondriais, porém todas as amostras amplificaram satisfatoriamente ITS2. No novo mês, nenhum carrapato amplificou o marcador COI, e 33,3% amplificaram 12S e D-loop e 100% das amostras deste mês amplificaram ITS2. Após um ano fixadas, nenhum carrapato amplificou COI ou 12S, apenas 16,6% dos carrapatos amplificou D-loop, e novamente, 100% amplificaram ITS2.

Ninfas de *A. parvum* foram analisadas qualitativamente com base na visualização da intensidade das bandas. Um exemplo deste tipo de análise é fornecido na Figura 5. Ninfas fixadas em 72 horas, sete dias, um mês e 12 meses foram avaliadas baseado na fixação com RNAlater e com isopropanol, utilizando o ensaio para D-loop. Foi observado que, ao longo do tempo, 100% das amostras fixadas em RNAlater amplificaram o marcador D-loop, produzindo bandas de intensidade forte (Fila A). Os resultados das amostras fixadas em isopropanol, novamente, foram mais complexos. Em 72 horas após a fixação inicial, foi observado que 50% (3/6) das ninfas fixadas em isopropanol amplificaram o marcador D-loop.

Foi notado neste ensaio que as intensidades das bandas geradas pelas amostras fixadas em isopropanol (Fila B, colunas 1 a 6), foram abundantemente reduzidas em comparação com as bandas observadas nas amostras fixadas com RNAlater. Das amostras fixadas em isopropanol que tiveram o seu DNA extraído após sete dias, 33,3% (2/6) amplificaram o marcador D-loop. No caso de uma destas amostras (Fila B, coluna 8), foi observado que a sua intensidade de banda foi superior que a da outra amostra que amplificou neste ensaio (Fila B, coluna 9) e igualmente superior que as amostras fixadas em 72 horas. Contudo, a intensidade desta banda, que foi o mais forte entre as amostras fixadas em isopropanol, não chegou perto à intensidade das bandas observadas nas amostras fixadas em RNAlater (Fila A, colunas 7 a 12). Um mês após a fixação, foi observado que 50% (3/6) das amostras fixadas em isopropanol (Fila B, colunas 13 a 18), produziram “amplicon” para o alvo D-loop, mas, novamente, de intensidade muito

menor do que aquela observada para as amostras fixadas em RNAlater e extraídas no mesmo tempo. No décimo segundo mês, unicamente 16,6% das amostras (1/6) amplificou o marcador D-loop, porém, produzindo uma banda visível de baixa intensidade.

A análise qualitativa da amplificação do marcador ITS2 é mostrada na Figura 6. Em comum com o marcador de D-loop, todas as amostras conservadas em RNAlater geraram bandas fortes, os resultados para este marcador para ninfas fixadas em isopropanol indicaram que para a maioria das amostras (19 de 24), a amplificação foi tão boa quanto as amplificações observadas para o material fixado em RNAlater. No entanto, cinco amostras não conseguiram produzir "amplicon" do alvo ITS2. Não foram encontradas provas da presença de substâncias inibidoras nestas amostras e cada um delas continha DNA suficiente (entre 70 a 222 ng/ μ l) para permitir a sua detecção pelo ensaio ITS2.

Tabela 2. Comparação da amplificação de marcadores mitocondriais e nucleares ao longo do tempo (72 horas a 12 meses) para ninfas de *Amblyomma parvum* preservadas em três diferentes fixadores.

	RNAlater				Isopropanol				ZN			
	12S	COI	D-loop	ITS2	12S	COI	D-loop	ITS2	12S	COI	D-loop	ITS2
72 Horas	^a 100% ^b (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	50% (3/6)	33,3% (2/6)	50% (3/6)	66,6% (4/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)
Sete Dias	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	16,6% (1/6)	16,6% (1/6)	33,3% (2/6)	50% (3/6)	66,6% (4/6)	83,3% (5/6)	83,3% (5/6)	83,3% (5/6)
Um Mês	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	50% (3/6)	50% (3/6)	50% (3/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)
Três Meses	83,3% (5/6)	83,3% (5/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	33,3% (2/6)	16,6% (1/6)	16,6% (1/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)
Seis Meses	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	66,6% (4/6)	16,6% (1/6)	83,3% (5/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)
Nove Meses	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	33,3% (2/6)	0% (0/6)	33,3% (2/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)
Doze Meses	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	16,6% (1/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)

^aValores da frequência de amplificação providenciados como percentagens. ^bValores em parênteses fornecem detalhes de número de amostras positivas / numero de amostras testadas.

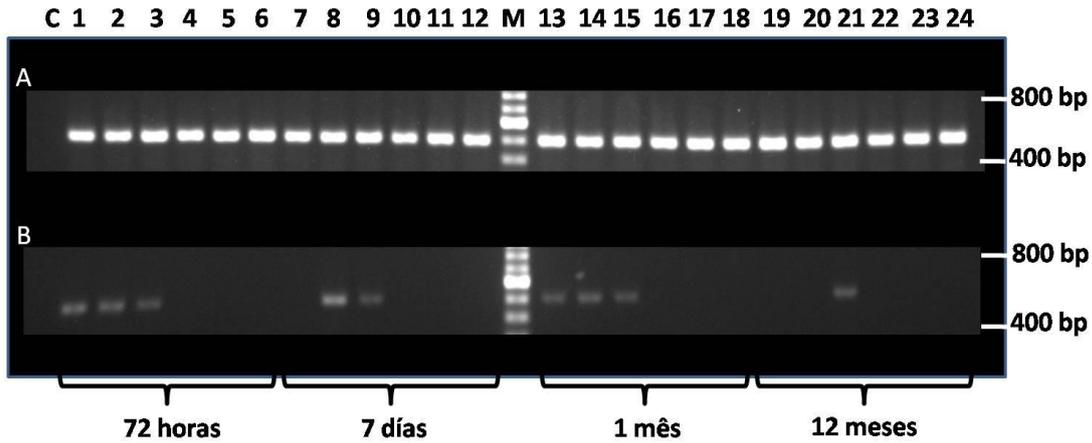


Figura 5. Comparação da amplificação de marcador mitocondrial (D-loop) de DNA extraído de ninfas *Amblyomma parvum* usando a técnica de fenol-clorofórmio após 72 horas, sete dias, um mês e 12 meses de conservação em RNAlater ou isopropanol. **Fila A=** RNAlater, **Fila B=** Isopropanol, **Colunas 1-6=** fixação de 72h, **7-12 =** fixação de 7 dias, **13-18=** fixação de 1 mês, **19-24=** fixação de 12 meses. **C=** controle de amplificação negativo (água). **M=** 100 bp “ladder” (Invitrogen). Peso molecular das bandas do “ladder” indicados na extrema direita da figura.

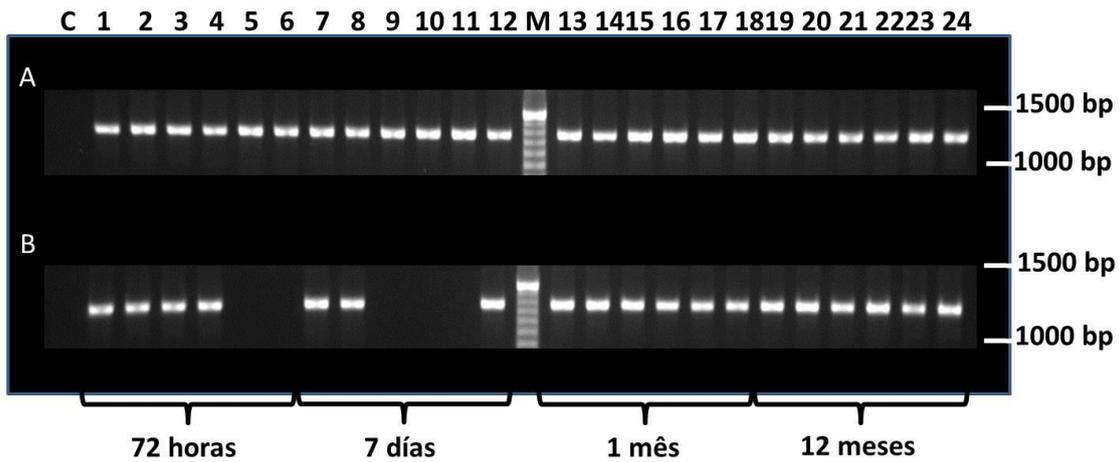


Figura 6. Comparação da amplificação de marcador nuclear (ITS2) de DNA extraído de ninfas *Amblyomma parvum* usando a técnica de fenol-clorofórmio após 72 horas, sete dias, um mês e 12 meses de conservação em RNAlater ou isopropanol. **Fila A=** RNAlater, **Fila B=** Isopropanol, **Colunas 1-6=** fixação de 72h, **7-12 =** fixação de 7 dias, **13-18=** fixação de 1 mês, **19-24=** fixação de 12 meses. **C=** controle de amplificação negativo (água). **M=** 100 bp “ladder” (Invitrogen). Peso molecular das bandas do “ladder” indicados na extrema direita da figura.

4.4. Amplificação de Genes de Larvas de *Amblyomma sculptum*

Os dados quantitativos com relação à eficiência de amplificação de marcadores mitocondriais (12S e D-loop) e nucleares (ITS2) de DNA extraído a partir de larvas de *A. sculptum* conservadas nos três fixadores estão apresentados na tabela 3. As larvas de *A. sculptum* preservadas em RNAlater, similar ao observado para larvas e ninfas de *A. parvum*, apresentaram amplificação para o alvo mitocondrial 12S em 97% (n= 33/34) e para D-loop em 100% (n= 34/34) das amostras fixadas em RNAlater. Para o alvo ITS2, 100% (n= 34/34) das amostras preservadas em RNAlater amplificaram. Entre as amostras fixadas em RNAlater, uma única amostra que teve seu DNA extraído no sexto mês não amplificou para o marcador 12S (Tabela 3), porém, a mesma amplificou satisfatoriamente quando foi submetida ao ensaio de PCR para D-loop e ITS2.

No caso de larvas de *A. sculptum* fixadas em isopropanol, os resultados obtidos foram diferentes a aqueles observados para larvas de *A. parvum*. Especificamente “amplicons” foram registrados na maioria das amostras fixadas em isopropanol em todos os tempos de extração. Nos ensaios para o alvo 12S rDNA, foi notada amplificação em 92,1% (n= 35/38) das amostras, enquanto para D-loop foi observada amplificação em 97,3% (n= 37/38) dos casos (Tabela 3). Amplificação do alvo ITS2 foi observado em 100% dos casos (n=38/38). No primeiro mês observou-se que 66,6% dos carrapatos amplificaram o marcador 12S e 100% amplificaram os marcadores D-loop e ITS2. No sexto, sétimo e nono mês 100% dos carrapatos amplificaram para os genes 12S e D-loop. No décimo segundo mês, a amplificação ocorreu para 83,3% (n=5/6) das amostras.

No caso das amostras fixadas em ZN, os resultados obtidos foram diferentes dos registrados para larvas de *A. parvum*. Assim, um total de 94,1% (n=32/34), amplificaram o alvo 12S rDNA e 100% produziram bandas para o alvo D-loop, e apenas 22 amostras (64,7%) amplificaram o alvo ITS2. Assim, os resultados para *A. sculptum* fixados em ZN foram considerados inconsistentes. De tal modo, em 72 horas, os marcadores 12S e D-loop amplificaram em 100% das amostras, igualmente que o ITS2 nuclear. Em sete dias, os marcadores mitocondriais amplificaram em 100% das amostras, enquanto para o alvo nuclear ITS2 apenas 66,6% das amostras geraram “amplicon”. No primeiro mês após a fixação, o marcador D-loop amplificou em 100% das amostras, enquanto 12S e ITS2 amplificaram em 66,6% das amostras. No sexto mês, os marcadores mitocondriais amplificaram em 100% das amostras, enquanto o ITS2 somente em 50% dos carrapatos. No sétimo mês, os alvos mitocondriais amplificaram em 100% das amostras, e ITS2 amplificou em 33,3%. No nono mês, da mesma maneira, os marcadores mitocondriais amplificaram em 100% das amostras, mas o ITS2 amplificou em 66,6% dos carrapatos. No décimo segundo mês, todos os carrapatos amplificaram para todos os marcadores (Tabela 3).

Igualmente ao realizado para as amostras anteriores, análises qualitativas das amostras foram também feitas com base na visualização da intensidade das bandas. Um exemplo deste tipo de análise para larvas de *A. sculptum* submetidas a fixação com RNAlater (Fila A) e com isopropanol (Fila B), está apresentado na Figura 7. Foi observado que as amostras de *A. sculptum* fixadas em RNAlater foram capazes de produzir bandas de intensidade forte para o marcador D-loop em todos dos tempos analisados (Figura 8, fila A).

Quando analisada quantitativamente, a maioria das amostras fixadas em isopropanol gerou “amplicons”. Porém, com base na análise qualitativa, ficou claro que a preservação em isopropanol foi prejudicial para a amplificação dos marcadores mitocondriais (Figura 7). As intensidades das banda observadas nas amostras presentes na Fila B (isopropanol), são claramente inferiores as bandas presente na Fila A (RNAlater). É importante assinalar que, como todas as outras figuras, estas amostras foram todas amplificadas ao mesmo tempo e que o ensaio da PCR foi confirmado funcional dentro dos limites pré-determinados de detecção.

A análise qualitativa de amplificação do marcador ITS2 não indicou que a preservação em isopropanol foi prejudicial para a detecção do referido alvo. Assim, amostras fixadas em RNAlater ou isopropanol produziram bandas com intensidades similares.

Tabela 3. Comparação da amplificação de marcadores de DNA mitocondrial (D-loop) e nuclear (ITS2) ao longo do tempo (72 horas até 12 meses) para larvas de *Amblyomma sculptum* preservadas em três diferentes fixadores.

	RNAlater			Isopropanol			ZN		
	12S	D-loop	ITS2	12S	D-loop	ITS2	12S	D-loop	ITS2
72 Horas	^a 100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
Sete Dias	^b 100% (3/3)	100% (3/3)	100% (3/3)	100% (3/3)	100% (3/3)	100% (3/3)	100% (3/3)	100% (3/3)	66,6% (2/3)
Um Mês	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	66,6% (4/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	66,6% (4/6)	100% (6/6)	66,6% (4/6)
Seis Meses	83,3% (5/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	50% (3/6)
Sete Meses	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	33,3% (2/6)
Nove Meses	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	66,6% (4/6)
Doze Meses	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	83,3% (5/6)	83,3% (5/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)

^aValores da frequência de amplificação providenciados como percentagens. ^bValores em parênteses proveem detalhes de número de amostras positivas / numero de amostras testadas.

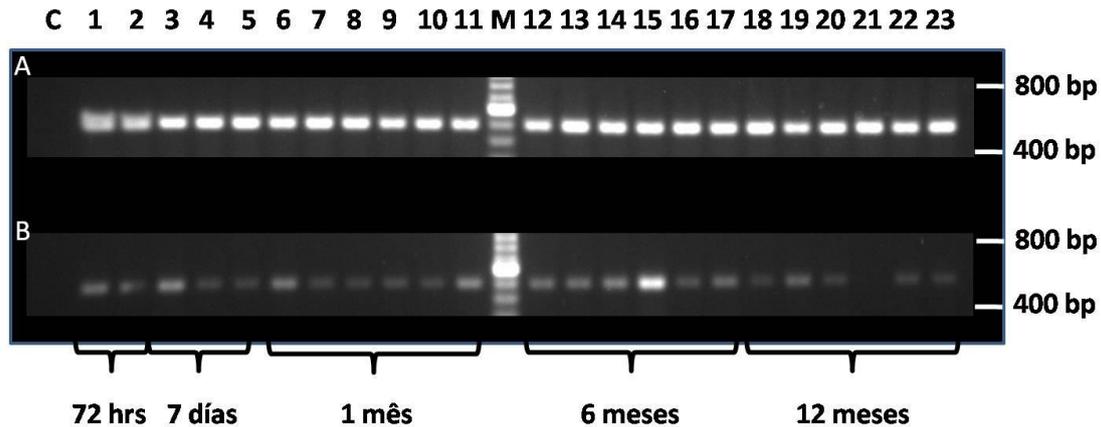


Figura 7. Comparação da amplificação de marcador mitocondrial (D-loop) em amostras de DNA extraído de larvas de *Amblyomma sculptum* usando a técnica de fenol-clorofórmio após 72 horas, sete dias, um mês, seis meses e 12 meses preservadas em RNAlater ou isopropanol. **Fila A=** RNAlater, **Fila B=** Isopropanol, **Colunas 1-2=** fixação de 72h, **3-5 =** fixação de sete dias, **6-11=** fixação de um mês, **12-17=** fixação de seis meses, **18-23=** fixação de 12 meses. **C=** controle de amplificação negativo (água). **M=** 100 bp “ladder” (Invitrogen). Peso molecular das bandas do “ladder” indicados na extrema direita da figura.

4.5. Método de Extração de Lise Alcalina

Dados quantitativos com relação à eficiência de amplificação dos marcadores COI e ITS2 para DNA de larvas e ninfas de *A. parvum* conservadas nos três fixadores por tempos superiores a doze meses e extraídos utilizando a técnica de lise alcalina (“HotShot”) são apresentados na Tabela 4. Larvas de *A. parvum* fixadas em RNAlater amplificaram os marcadores COI e ITS2 em 100% das amostras. Em contraste carrapatos fixados em isopropanol amplificaram COI em apenas 16,6% (n=1/6) das amostras, enquanto ITS2 amplificou em 33,3% (n= 2/6). Carrapatos fixados em ZN geraram “amplicon” para 83,3% (n=5/6) no ensaio para COI e em 100% (n= 6/6) no caso de ITS2 (Tabela 4). Os dados referentes a ninfas foram os seguintes, ninfas fixadas em RNAlater amplificaram 100% para os marcadores COI e ITS2; ninfas fixadas em isopropanol amplificaram COI em 50% (n= 3/6) destas amostras e 100% amplificaram ITS2, e as amostras fixadas em ZN amplificaram COI e ITS2 em 100% das amostras.

Tabela 4. Comparação de amplificação de um alvo mitocondrial (COI) e nuclear (ITS2) de DNA extraído utilizando o método de lise alcalina, a partir de larvas e ninfas de *Amblyomma parvum* preservado em três fixadores diferentes para 17 meses (larvas) ou 14 meses (ninfas).

	COI	ITS2
<i>A. parvum</i> Larva RNAlater	^a 100% ^b (6/6)	100% (6/6)
<i>A. parvum</i> Larva Isopropanol	16,6% (1/6)	33,3% (2/6)
<i>A. parvum</i> Larva ZN	83,3% (5/6)	100% (6/6)
<i>A. parvum</i> Ninfa RNAlater	100% (6/6)	100% (6/6)
<i>A. parvum</i> Ninfa Isopropanol	50% (3/6)	100% (6/6)
<i>A. parvum</i> Ninfa ZN	100% (6/6)	100% (6/6)

^aValores da frequência de amplificação providenciados como percentagens. ^bValores em parênteses proveem detalhes de número de amostras positivas / número de amostras testadas.

Amostras de larvas preservadas nos três fixadores e extraídas utilizando a técnica de lise alcalina foram analisadas qualitativamente e os resultados são apresentados na Figura 8. Além disso, esta figura tem o objetivo de fornecer uma comparação da eficiência de amplificação dos marcadores COI e ITS2 em DNA extraído através das técnicas de lise alcalina (17 meses) ou fenol-clorofórmio (12 meses).

Larvas fixadas em RNAlater e extraídas usando fenol-clorofórmio produziram bandas para amplificação do marcador ITS2 de intensidade forte em 100% das amostras (Fila A, colunas 1 a 6). As amostras fixadas em isopropanol e ZN também amplificaram em 100% das amostras (Fila A, colunas 7 a 12), porém em quatro das amostras fixadas em isopropanol a amplificação foi de menor intensidade (Fila A, colunas 7, 8, 11 e 12). No caso de ZN, todas as amostras foram inferiores aos carrapatos fixados em RNAlater. Os resultados para a amplificação de larvas extraídas utilizando o método de lise alcalina estão apresentados na Fila B. Observou-se que em comum com o material extraído por fenol-clorofórmio, as amostras conservadas em RNAlater e ZN mostraram amplificação forte. Em contraste, apenas 33,3% (2/6) das amostras fixadas em isopropanol geraram "amplicon". Em termos de intensidade de bandas, as amostras conservadas em ZN produziram bandas mais fracas do que as amostras RNAlater. No entanto, a intensidade das bandas de ZN foi maior do que aquelas produzidas pelas amostras fixadas em isopropanol (Fila B, colunas 9 e 10).

Os resultados de uma análise similar, realizada utilizando o marcador COI, estão apresentadas nas Filas C e D. As amostras fixadas em RNAlater geraram "amplicon" em 100% das amostras, independentemente do método de extração utilizado (Filas C e D, amostras 1-6). No caso das amostras fixadas em ZN, ambos os métodos de extração produziram cinco amostras que foram positivas para o marcador COI. No entanto, a intensidade das bandas foi ligeiramente mais fraca do que o observado nas amostras conservadas em RNAlater. O DNA extraído a partir de carrapatos conservados em

isopropanol falhou para amplificar na maioria (83%, $n= 5/6$) das amostras. As duas amostras que amplificaram (Fila C, amostra 6 e Fila D, amostra 4) foram inferiores em termos de intensidade da banda quando comparado com as amostras fixadas em RNAlater.

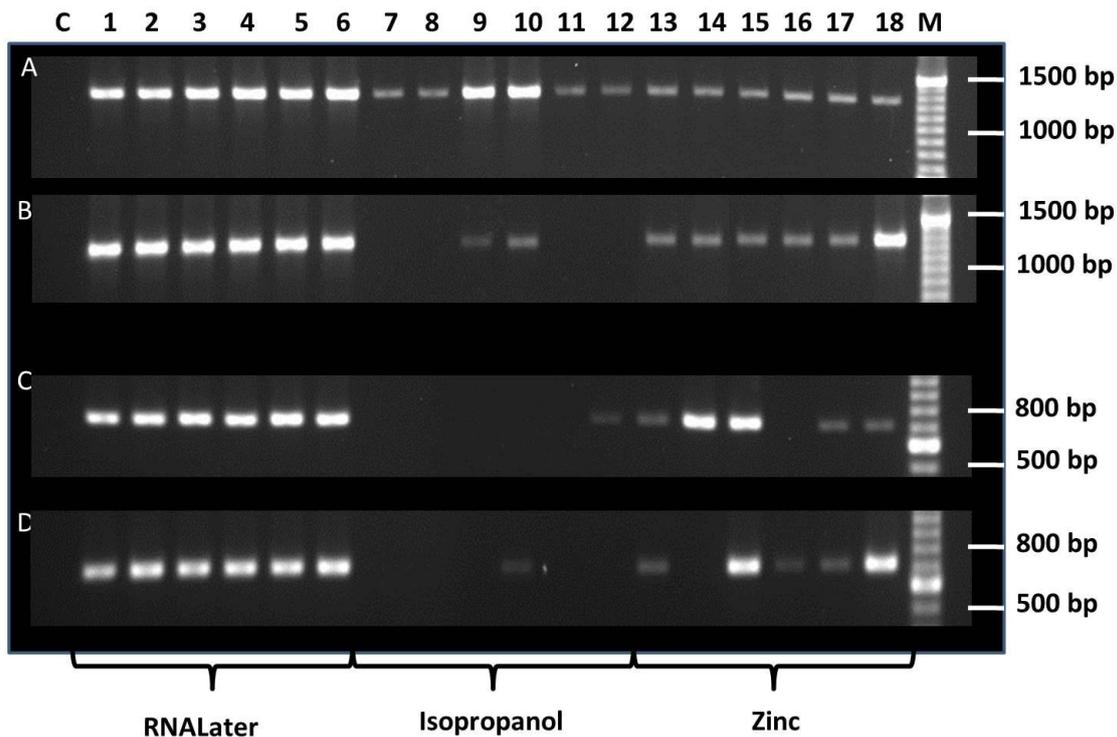


Figura 8. Comparação da amplificação de marcador mitocondrial (COI) e nuclear (ITS2) a partir de DNA extraído de larvas *Amblyomma parvum* usando os métodos de fenol-clorofórmio (12 meses) ou lise alcalina (17 meses) de conservação em RNALater, isopropanol ou ZN. **Fila A=** ITS2 (fenol-clorofórmio), **Fila B=** ITS2 (Lise alcalina), **Fila C=** COI (fenol-clorofórmio), **Fila D=** COI (Lise alcalina), **Colunas 1-6=** amostras conservadas em RNALater, **7-12=** amostras conservadas em isopropanol, **13-18=** amostras conservadas em ZN. **C=** controle de amplificação negativo (água). **M=** 100 bp “ladder” (Invitrogen). Peso molecular das bandas do “ladder” indicados na extrema direita da figura.

4.6. Amplificação de Genes de Larvas de *A. parvum* preservadas em RNALater por 30 meses.

Larvas derivadas de duas das populações de *A. parvum* (Chaco-Argentina e Pantanal-Brasil) e mantidas em RNALater por um tempo de 30 meses foram submetidos a extração usando as técnicas de fenol-clorofórmio ou lise alcalina. O resultado da análise quantitativa da eficiência de amplificação dessas amostras utilizando os marcadores COI e ITS2 é mostrado na Tabela 5. Esta análise comparativa foi executada com a finalidade de observar se houve alteração ou perda de DNA ao serem fixadas em RNALater a longo prazo. Observou-se que ambos os marcadores foram amplificados de forma eficiente, em 100% das amostras.

Os resultados da análise qualitativa são mostrados na Figura 9. Observou-se que 100%, das amostras de Chaco-Argentina (Fila A, amostras 1 a 4, e Fila B, amostras 1 a 4) e do Pantanal-Brasil (Fila A, amostras 9 a 12, e Fila B, amostras 9 a 12) extraídas com fenol-clorofórmio amplificaram fortemente para ambos os marcadores (COI e ITS2). Os resultados obtidos usando a extração de lise alcalina foram ligeiramente diferentes. Especificamente, verificou-se que a amplificação do marcador ITS foi

reduzida em duas das oito amostras examinadas (Fila A, amostra 5 = Chaco) e Fila A (amostra 15 = Pantanal). O marcador COI produziu bandas fortes para cada uma das oito amostras extraídas utilizando o método de lise alcalina.

Tabela 5. Comparação da amplificação de marcadores mitocondrial (COI) e nuclear (ITS2) a partir de DNA extraído usando os métodos de fenol-clorofórmio ou lise alcalina de larvas de *Amblyomma parvum* (populações Chaco e Pantanal) preservada em RNAlater.

		COI	ITS2
Fenol-clorofórmio	<i>A. parvum</i> “Chaco”	^a 100% ^b (8/8)	100% (8/8)
	<i>A. parvum</i> “Pantanal”	100% (8/8)	100% (8/8)
Lise Alcalina	<i>A. parvum</i> “Chaco”	100% (8/8)	100% (8/8)
	<i>A. parvum</i> “Pantanal”	100% (8/8)	100% (8/8)

^aValores da frequência de amplificação providenciados como percentagens. ^bValores em parênteses proveem detalhes de número de amostras positivas / número de amostras testadas.

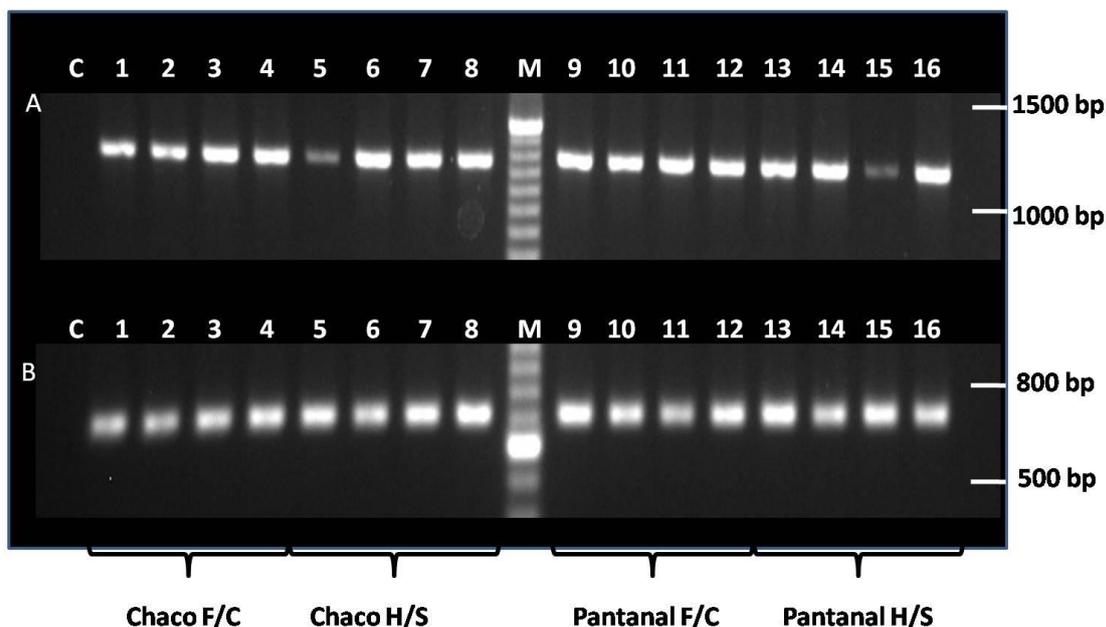


Figura 9. Comparação da amplificação de marcadores mitocondrial (COI) e nuclear (ITS2) a partir de DNA extraído a partir de larvas de *Amblyomma parvum* usando os métodos de fenol-clorofórmio ou lise alcalina, após 30 meses de conservação em RNAlater. **Fila A= ITS2, Fila B= COI, Colunas 1-4=** amostras de *Amblyomma parvum* Pop. Chaco-Argentina extraídas pelo método de fenol-clorofórmio, **5-8=** amostras de *Amblyomma parvum* Pop. Chaco-Argentina extraídas pelo método de lise alcalina, **9-12=** amostras de *Amblyomma parvum* Pop. Pantanal-Brasil extraídas pelo método de fenol-clorofórmio, **13-16=** amostras de *Amblyomma parvum* Pop. Pantanal extraídas pelo método de lise alcalina. **C=** controle de amplificação negativo (água). **M=** 100 bp “ladder” (Invitrogen). Peso molecular das bandas do “ladder” indicados na extrema direita da figura.

4.7. Quantificação de DNA

Os dados em relação às quantidades de DNA recuperado a partir dos carrapatos conservados nos três fixadores estão apresentados na tabela 6. Observou-se que no caso das larvas e ninfas de *A. parvum*, as maiores quantidades médias de DNA foram obtidas utilizando o método de extração de fenol-clorofórmio de carrapatos conservados em RNAlater. As amostras fixadas em ZN produziram cerca de 25% menos DNA do que as amostras conservadas em RNAlater. O menor rendimento médio de DNA para larvas e ninfas de *A. parvum* foi registrado para as amostras conservadas em isopropanol, em que os valores médios foram cerca de 50% menores dos registrados para as amostras fixadas em RNAlater. Achados similares foram observados, no caso de larvas de *A. parvum* preservadas em RNAlater e tendo seu DNA extraído usando o método de lise alcalina. No entanto, ninfas fixadas em isopropanol e ZN produziram concentrações médias maiores de DNA, enquanto que o material fixado em RNAlater teve um rendimento médio que era aproximadamente 50% do que o observado para os outros dois fixadores.

No caso das larvas de *A. parvum* preservada em RNAlater por 30 meses sendo extraído seu DNA pela técnica de fenol-clorofórmio, a quantidade média de DNA (1,21 ng/μl) foi similar ao observado para a média entre as amostras conservadas entre três e 12 meses (1,09 ng/μl). A quantidade média de DNA (232 pg/μl) a partir das mesmas

larvas extraídas utilizando o método de lise alcalina foi 80% inferior ao valor observado para fenol-clorofórmio.

Os dados para larvas de *A. sculptum* foram diferentes do que para *A. parvum*. Especificamente foi observado que as amostras fixadas em RNAlater e isopropanol apresentaram valores médios semelhantes quando tendo seu DNA extraído utilizando a técnica de fenol-clorofórmio, com o rendimento médio mais baixo obtido para amostras conservadas em ZN.

Como mostrado na tabela 6, a concentração de DNA variou de um valor mínimo de 20 pg/μL, no caso de uma larva de *A. parvum* fixada em RNAlater durante 30 meses e tendo o seu DNA extraído por “HotShot”, a um máximo valor de 5,3 ng/μL no caso de uma ninfa de *A. parvum* fixada em RNAlater tendo o seu DNA extraído pela técnica de fenol-clorofórmio. Estes valores estavam dentro dos limites de detecção determinado para os ensaios de PCR utilizados no estudo.

Tabela 6. Dados de Quantificação do DNA extraído para carrapatos preservados nos três diferentes fixadores

		Carrapatos Quantificados	Média (ng/μL)	Faixa
Fenol-clorofórmio	<i>A. parvum</i> Larvas RNAlater	12 (50%)	1,0915	0,241 – 2,230
	<i>A. parvum</i> Larvas Isopropanol	16 (66,66%)	0,5545	0,086 – 1,200
	<i>A. parvum</i> Larvas ZN	13 (54,16%)	0,7902	0,026 – 2,330
	<i>A. parvum</i> Ninfas RNAlater	16 (38,09%)	1,9287	0,390 – 5,300
	<i>A. parvum</i> Ninfas Isopropanol	13 (30,95%)	0,8515	0,070 – 3,040
	<i>A. parvum</i> Ninfas ZN	16 (38,09%)	1,6042	0,030 – 4,350
	<i>A. sculptum</i> Larvas RNAlater	11 (31,42%)	0,7894	0,401 – 1,450
	<i>A. sculptum</i> Larvas Isopropanol	11 (28,94%)	0,7060	0,250 – 1,490
	<i>A. sculptum</i> Larvas ZN	30 (85,71%)	0,4767	0,093 – 0,955
<i>A. parvum</i> Larvas RNAlater 30 meses	6 (37,50%)	1,2083	0,020 – 2,660	
Lise alcalina	<i>A. parvum</i> Larvas RNAlater	3 (25%)	0,330	0,239 – 0,379
	<i>A. parvum</i> Larvas Isopropanol	3 (25%)	0,17	0,097 – 0,202
	<i>A. parvum</i> Larvas ZN	5 (41,66%)	0,203	0,110 – 0,250
	<i>A. parvum</i> Ninfas RNAlater	5 (41,66%)	0,484	0,042 – 1,130
	<i>A. parvum</i> Ninfas Isopropanol	4 (33,3%)	1,00	0,818 – 1,850
	<i>A. parvum</i> Ninfas ZN	3 (25%)	1,061	0,984 – 1,170
	<i>A. parvum</i> Larvas RNAlater 30 meses	7 (87,5%)	0,2318	0,072 – 0,190

5. DISCUSSÃO

A fixação do material biológico é um procedimento comum na medicina veterinária. Em parasitologia e entomologia, a conservação de amostras para análises morfológicas é realizada rotineiramente usando álcoois, principalmente o etanol. A crescente utilização de técnicas moleculares em estudos de artrópodes demonstrou que a escolha do fixador pode exercer efeitos sobre a qualidade e quantidade de ácidos nucleicos (DNA e RNA), que podem ser recuperados a partir de carrapatos, pulgas e outros artrópodes. No entanto, até o momento, o tema de métodos de conservação tem recebido atenção limitada. Assim, como resultado, não existe um método padrão para a preservação e análise molecular. Como mostrado na revisão da literatura, uma vasta gama de fixadores tem sido empregada, com apenas alguns estudos relatando dados comparativos referentes aos efeitos dos métodos de preservação e subsequente análise molecular de carrapatos (MTAMBO et al, 2006; RODRÍGUEZ et al, 2014; AMMAZZALORSO et al, 2015). O presente trabalho procurou realizar uma análise sistemática dos possíveis efeitos de três diferentes tipos de fixadores, mediante a recuperação e funcionalidade (valor na análise molecular), do DNA de duas espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*.

O método escolhido para avaliar a utilidade das amostras de DNA para análise molecular foi à reação em cadeia da polimerase (PCR). No entanto, a fim de determinar quais genes seriam os mais adequados como alvos para as espécies investigadas, foi necessário realizar uma análise comparativa de diversos ensaios da PCR, para alvos tanto mitocondriais como nucleares. A seleção desses alvos foi realizada com base nas sequências mais frequentemente relatadas em estudos moleculares de carrapatos: 16S e 12S rDNA mitocondrial e do ITS2 região nuclear (MANGOLD; BARGUES; MASCOMA, 1998; BEATI; KEIRANS, 2001; LV et al. 2014), bem como duas sequências mitocondriais incomuns: COI (LV et al., 2014) e D-loop (BEATI et al., 2013). Os resultados desta análise comparativa demonstraram que o ensaio utilizado para a sequência 16S rDNA foi de valor limitado neste estudo, sendo isto baseado na fraca amplificação a partir de DNA de ambas as espécies de carrapatos. Os ensaios para 12S rDNA e COI deram resultados satisfatórios para *A. parvum*. No entanto, estes ensaios mostraram limites de detecção inferiores para *A. sculptum*, com o ensaio COI sendo 100 vezes menos sensível. O ensaio para D-loop, que tem sido pouco usado em estudos com carrapatos, mostrou-se como o ensaio mais sensível para DNA mitocondrial para ambas as espécies de carrapatos. Especificamente, o ensaio foi capaz de detectar quantidades baixas (picogramas) de DNA em ambas as espécies e produziu bandas fracas, porém visíveis quando utilizado com 100 fg de DNA de *A. parvum*. O marcador ITS2 foi mostrado ser altamente sensível para ambas as espécies. Assim, este marcador foi capaz de produzir amplificação clara a uma concentração de 100 fg e uma banda fraca, mas visível, em 10 fg. A razão mais provável para justificar o limite de detecção superior deste ensaio (aproximadamente 100 vezes mais sensível), é o fato de que o DNA mitocondrial está presente em quantidades menores (entre 5 a 15 por cento do DNA total em caso de leveduras e outros eucariotas) que o DNA nuclear (FUKUHARA, 1969). Deve notar-se que não existe informação disponível na literatura em relação as quantidades relativas destes tipos de DNA nos carrapatos. Além disso, as proporções relativas são influenciadas pelo estado metabólico do organismo.

Com base nos resultados do teste de limite de detecção, foi decidido utilizar os ensaios 12S rDNA, COI, D-loop e ITS2 para avaliar *A. parvum* e apenas os ensaios de 12S, D-loop e ITS2 para *A. sculptum*. O primeiro fixador testado foi RNAlater, uma solução de sais concentrados, que tem sido utilizado com alguns insetos (SIKULU et al., 2011; MOREAU et al., 2013; BHATT et al., 2014) e em estudos com diversas espécies de carrapatos (CHEN et al., 2014, DEDKOV et al., 2014, LOMMANO et al., 2014).

No presente trabalho, observou-se que o DNA poderia ser efetivamente recuperado de larvas de *A. sculptum* preservadas em RNAlater por até 12 meses, das larvas de *A. parvum* após 30 meses de fixação e de ninfas de *A. parvum* armazenadas há 14 meses. A quantificação fluorométrica do DNA revelou que as concentrações médias recuperadas a partir dos três tipos de amostra foram as seguintes: Larvas de *A. parvum* 1,09 ng/μL, ninfas de *A. parvum* 1,92 ng/μL e larvas de *A. sculptum* 0,79 ng/μL. Estes valores foram determinados em amostras extraídas utilizando a técnica de fenol-clorofórmio. DNA extraído a partir de todos os carrapatos preservados em RNAlater (n= 101), produziram bandas fortes tanto nos ensaios de PCR para D-loop, como para ITS2. Amplificação dos alvos COI e 12S também foram eficientes, embora para algumas amostras as intensidades das bandas foram inferiores aos registados pelo ensaio D-loop. Estas observações foram um provável reflexo do menor limite de detecção desses ensaios, tal como descrito acima.

O segundo fixador investigado foi ZN. Mais uma vez, quantidades razoáveis de DNA foram recuperadas a partir das amostras conservadas nesta solução (Larvas de *A. parvum* 0,79 ng/μL, ninfas de *A. parvum* 1,604 ng/μL, larvas de *A. sculptum* 0,462 ng/μL). Igualmente observado com RNAlater, a maioria das amostras (99/101), produziram “amplicons” para o ensaio D-loop, indicando que este fixador preservou o DNA mitocondrial quase tão eficazmente quanto RNAlater. Em contraste, os dados em relação ao ensaio de ITS2, mostraram que este fixador falhou em conservar eficazmente o DNA nuclear de *A. sculptum*. Assim, apenas 24 das 35 amostras (68,5%), produziram “amplicons”. Análise qualitativa dos dados forneceu uma evidência adicional de que ZN foi menos eficaz do que RNAlater. Especificamente observou-se que a preservação nesta solução resultou na amplificação reduzida dos alvos mitocondriais e também do marcador ITS2 na maioria das amostras de *A. sculptum*. No caso de larvas de *A. parvum* (n= 23) e ninfas de *A. parvum* (n= 41) os quais geraram bandas com o ensaio D-loop, apenas 70% das amostras produziram “amplicons” com uma intensidade equivalente as bandas observadas com amostras fixadas em RNAlater. Este valor foi maior (83%), no caso de larvas de *A. sculptum* (n= 35).

Uma redução na intensidade das bandas também foi observada para o alvo ITS2 para aproximadamente 25% das amostras de *A. parvum*. Este valor aumentou para 54% (13/24) no caso de *A. sculptum*. Os motivos para esta redução na eficiência da amplificação das amostras em ZN em relação ao RNAlater não são claros. Todas as amostras testadas continham concentrações de DNA que estavam dentro da faixa de concentrações registradas para as amostras em RNAlater. Além disso, não foi encontrada evidência que confirmasse a presença de inibidores de PCR nas amostras. É possível que o DNA nuclear de *A. sculptum* tenha sofrido fragmentação durante o processo de preservação e de extração, que comprometeu a capacidade de amplificar um fragmento de tamanho relativamente grande (1200 pb). A fim de confirmar isto, seria necessário desenhar “primers” para a amplificação de fragmentos menores da região do ITS2 de *A. sculptum* e determinar se a eficiência de amplificação melhora.

O terceiro fixador examinado foi isopropanol. A decisão para avaliar este álcool foi influenciada pelo fato do isopropanol, em vez de etanol, ter sido amplamente utilizado por acarologistas da América do Sul, brasileiros e outros. Em comum com os outros fixadores, demonstrou-se que o DNA pode ser recuperado a partir de carrapatos conservados em isopropanol. No entanto, observou-se que as quantidades de DNA recuperado a partir de carrapatos preservados em isopropanol sempre foi inferior que com os outros fixadores (Tabela 6). No entanto, os valores estavam dentro dos limites de detecção dos diferentes ensaios de PCR. A avaliação de ambos os dados quantitativos e qualitativos em relação à eficiência da amplificação demonstrou que a preservação em isopropanol foi altamente prejudicial para a amplificação dos marcadores mitocondriais, e, em menor medida, da sequência nuclear ITS2.

Em relação aos dados quantitativos, observou-se que apenas $\approx 40\%$ das amostras de larvas de *A. parvum* produziram “amplicons” no ensaio para D-loop. Os valores observados com os ensaios de COI e 12S foram ainda mais baixos (Tabelas 1 e 2). No caso do ensaio para ITS2, 91,6% (22/24), das larvas de *A. parvum* produziram “amplicons”, enquanto 88% (n= 37/42) foi registrado para as ninfas desta espécie. No caso de *A. sculptum* 97,4% (n= 37/38) produziram amplificação no ensaio D-loop e 100% das amostras foram positivas na PCR para ITS2 (Tabela 3). Análises qualitativas dos dados demonstraram que os efeitos prejudiciais do isopropanol foram de fato ainda maiores do que tinha sido notado por meio da análise quantitativa. Para larvas de *A. parvum* apenas 20% (n= 2/10) das amostras do ensaio para D-loop geraram bandas com intensidades equivalentes a aquelas observadas com amostras preservadas em RNAlater. Um valor de 35% (n= 6/17) foi observado para ninfas para este mesmo ensaio. No caso de *A. sculptum*, 75% (n= 28/37) das amostras produziram bandas claras no ensaio para D-loop, porém apenas 35% (n=13/37) das amostras produziram bandas com intensidades semelhantes a aquelas observadas com DNA extraído de amostras fixadas em RNAlater. Os efeitos qualitativos sobre o ensaio para ITS2 foram relativamente menores e menos aparentes do que os observados para as amostras de ZN, especificamente, 72% (n= 16/22) das larvas de *A. parvum* produziram bandas fortes. O valor registrado para ninfas foi de 86% (n= 32/37) e para larvas de *A. sculptum* 100% das amostras produziram bandas com intensidades equivalentes às observadas para as amostras preservadas em RNAlater.

Os efeitos prejudiciais observados com isopropanol foram dirigidos principalmente ao DNA mitocondrial e foram observados durante as primeiras 72 horas de fixação. O método de quantificação utilizado forneceu um valor para a quantidade total de DNA nas amostras, mas não fornece nenhum meio para determinar a quantidade de DNA mitocondrial. Como tal, é impossível determinar se a redução na eficiência da amplificação foi causada por extração limitada de DNA mitocondrial ou se resultou de uma modificação na natureza físico-química da molécula que antecedeu o impedimento da sua funcionalidade nos ensaios da PCR. DNA mitocondrial, na forma de pequenas moléculas circulares, está localizado nas mitocôndrias, que podem ser encontradas em quantidades elevadas (centenas), dentro do citoplasma. Em contraste, a molécula de DNA nuclear possui formato linear e de peso molecular elevado, encontrada compactada em associação com grandes quantidades de proteínas histona (RANSOM; DENNEHEY; TYLER, 2010). As diferenças de tamanho e localização destas moléculas podem desempenhar um papel importante nos efeitos observados. Apesar de extensa pesquisa, não encontrou-se literatura que forneça informações sobre os efeitos do isopropanol ou outros álcoois sobre estes dois tipos de molécula. Claramente, mais

pesquisas são necessárias para determinar se este efeito prejudicial seria observado em outras espécies de carrapatos e também se ela iria ter impacto sobre a capacidade de detectar DNA procariótico ou até mesmo o DNA de endoparasitas eucarióticos transmissíveis pelos carrapatos.

Os resultados discutidos acima foram obtidos a partir de amostras que tinham sido extraídas, utilizando a técnica fenol-clorofórmio e foi considerado possível que as diferenças observadas entre os fixadores podem ter sido induzidas em parte pela natureza prolongada e/ou por causa dos múltiplos passos deste método de extração. Esta possibilidade foi levantada por outros autores (HUBBARD; CANN; WRIGHT, 1995; CROWDER et al., 2010). O DNA extraído seria exposto a uma variedade de pHs e temperaturas, além de ter contato com uma variedade de soluções que podem ou não ter interagido de forma diferente com o DNA presente nas diferentes amostras.

Assim, é importante ter em mente que cada um dos fixadores, possuíam modos de ação distintos sobre os componentes celulares. Para abordar esta possibilidade, um segundo método de extração foi avaliado utilizando carrapatos, que tinham sido conservados por até 17 meses, no caso de larvas de *A. parvum* e 14 meses, no caso de ninfas de *A. parvum*. O método utilizado (“Hotshot”), baseia-se na lise alcalina a temperatura elevada, seguido de neutralização com tampão Tris-HCl. O método é rápido e envolve manipulação limitada das amostras. No entanto, este método carece de qualquer passo de purificação do DNA ou a remoção de substâncias que poderiam atuar como inibidores de reações enzimáticas subsequentes.

Os resultados desta análise foram muito similares aos observados utilizando na técnica de fenol-clorofórmio. Especificamente, observou-se que o DNA pode ser extraído em níveis semelhantes aos registados com fenol-clorofórmio (Tabela 6). Em termos de eficiência de amplificação, 100% das amostras fixados em RNAlater produziram amplificação forte nos ensaios de PCR para COI e ITS2. Mais uma vez, amostras fixadas em ZN mostraram um padrão de amplificação semelhante ao observado para RNAlater com 91% (n= 11/12) sendo positivas no ensaio de amplificação para COI e 100% observado no ensaio para ITS2. No caso de amostras fixadas em isopropanol apenas 33,3% (n= 4/12), foram positivas no ensaio de COI, e 66,6% das amostras (n= 8/12) foram positivas no ensaio para ITS2.

Tomado como um todo, os dados a partir destes experimentos indicaram que os efeitos vistos no DNA mitocondrial eram independentes do processo de extração.

Verificou-se que o método “HotShot” foi menos eficaz do que o fenol-clorofórmio para a amplificação da sequência ITS2. Discute-se que as razões para isso se encontram mais uma vez na diferença entre a natureza dos dois tipos de DNA e como eles responderiam à desnaturação, causada pela combinação de pH e temperatura alta seguido por neutralização junto com uma rápida redução da temperatura.

A eficácia de RNAlater como um fixador foi claramente demonstrada utilizando os carrapatos que tinham sido preservados por até 17 meses. No entanto, e com o intuito a determinar se este efeito foi mantido durante períodos mais prolongados, O DNA foi extraído a partir de duas populações de larvas de *A. parvum* que tinham sido conservados durante 30 meses. Além disso, este material foi utilizado para avaliar mais profundamente possíveis diferenças associadas com os dois métodos de extração.

Observou-se que, no caso de o ensaio COI 100% as amostras apresentaram amplificação forte do fragmento, independentemente do método de extração. No caso do ensaio para ITS2, também foi observada amplificação em 100% das amostras. No entanto, 25% (n= 2/8) das amostras extraídas utilizando o método “HotShot” produziram bandas mais fracas embora ainda claramente visíveis para o marcador nuclear (Figura 9).

Como discutido durante a análise realizada anteriormente, as quantidades de DNA extraídas a partir das amostras foram menores para as amostras fixadas em isopropanol. No entanto, considera-se improvável que as diferenças na concentração de DNA foram a razão para a falta de desempenho dos carrapatos preservados em isopropanol. Para justificar esta posição, as quantidades de DNA que foram detectadas nas amostras estavam dentro dos limites de detecção para os distintos ensaios de PCR usados neste estudo. No entanto, como já foi mencionado, os dados de quantificação estão baseados na quantidade total de DNA em fita dupla presente em uma amostra e não podem distinguir entre DNA mitocondrial e DNA nuclear.

Como tal, pode-se concluir que os valores de quantificação são insignificantes em termos de prever se uma amostra de DNA pode ou não gerar amplificação nos ensaios usando sequências mitocondriais como alvos. Evidentemente, esforços devem ser feitos para o desenvolvimento de melhores métodos para a quantificação diferencial dos dois tipos de DNA.

Com base nas observações deste estudo, recomenda-se que RNAlater deve ser a primeira escolha como fixador. Entretanto, a observação de que o marcador nuclear (ITS2) foi amplificável para a maioria das amostras, incluindo aquelas fixadas em isopropanol, pode proporcionar um meio para ultrapassar os efeitos negativos sobre o DNA mitocondrial.

Porém, deve ser destacado que há um número limitado de sequências para este marcador depositadas em bases de dados públicos. No caso do gênero *Amblyomma*, sequências de ITS2 foram depositadas no GenBank para apenas 18 das 32 espécies que foram registradas no Brasil.

O presente estudo gerou quantidade considerável de dados, e considera-se que estas conclusões sirvam como plataforma para continuar a investigação deste tema complexo, instigante e largamente ignorado.

6. CONCLUSÕES

O RNAlater é um conservante muito eficaz tanto de DNA mitocondrial quanto de DNA nuclear nas duas espécies de carrapatos examinados neste estudo.

Larvas de *A. parvum* preservadas em RNAlater por até 30 meses podem ser usadas em combinação com os métodos de extração fenol-clorofórmio ou lise alcalina “Hotshot”.

No caso de amostras conservadas em ZN, a amplificação de sequências mitocondriais por PCR é qualitativamente inferior para *A. parvum*. No caso de *A. sculptum*, conservação em ZN causa efeitos prejudiciais (qualitativa e quantitativa) sobre a amplificação da sequência nuclear ITS2.

A fixação em isopropanol é extremamente prejudicial para a funcionalidade do DNA mitocondrial, em ambas as espécies de carrapatos examinados. Os danos causados por este método de fixação ocorreram dentro das primeiras 72 horas de preservação.

O DNA nuclear extraído a partir de carrapatos fixados em isopropanol manteve a funcionalidade, e pode ser usado para a detecção da sequência ITS2 por PCR.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Deve ser notado que o objetivo original do projeto foi examinar os efeitos da quantidade e da qualidade do DNA de procariotas que podem ser extraídos a partir de carrapatos conservados nas três soluções. No entanto, tornou-se evidente desde o início do estudo, que a eficiência da amplificação do DNA eucariota foi afetada devido à escolha do método de fixação. Como tal, o foco do estudo foi deslocado para uma análise mais detalhada sobre o assunto.

Pesquisas futuras podem ser desenvolvidas para examinar os efeitos dos conservantes sobre a capacidade de amplificar o DNA procariota das amostras. Tal como proposto no projeto original isto poderia ser alcançado usando “primers” universais para o gene que codifica 16S rDNA de procariotas. Em termos de análise qualitativa, seria possível determinar a eficiência relativa de amplificação através do exame das bandas observadas em géis de agarose. Além disso, os possíveis efeitos sobre o DNA de espécies diferentes de bactérias podem ser determinados utilizando o método de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação “denaturing gradient gel electrophoresis” (DGGE), em que a composição da microbiota seria determinada (ZAHNER et al., 2008).

Métodos podem ser desenvolvidos para proporcionar um meio para a quantificação diferencial de DNA nuclear e mitocondrial extraído a partir de carrapatos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D. M. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. *Journal of medical entomology*, v. 44, n.1, p. 126-132, 2007.
- ALVES, A.D.S. et al. Seroprevalence of *Rickettsia* spp. in Equids and Molecular Detection of 'Candidatus Rickettsia amblyommii' in *Amblyomma cajennense* Sensu Lato Ticks From the Pantanal Region of Mato Grosso, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 51, n. 6, p. 1242-1247, 2014.
- AMMAZZALORSO, A.D. et al. To beat or not to beat a tick: Comparison of DNA extraction methods from ticks (*Ixodes scapularis*) (No. e1042). *PeerJ PrePrints*, p. 1-17, 2015.
- ANDERSON, John F.; MAGNARELLI, Louis A. Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 22, n. 2, p. 195–215, 2008.
- DE ARMAS, Y.; RODRÍGUEZ, M.M.; BISSET, J.A., Modificación de un método de extracción de ADN genómico de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, v. 31, n. 2, p. 203–206, 2005.
- BEATI, Lorenza; KEIRANS, James E. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters, *Journal of Parasitology*, v. 87, n. 1, p. 32-48, 2001.
- BEATI, L. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evolutionary Biology*, v. 13, n. 1, p. 267, 2013.
- BECKSTEAD, Jay H. A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, v. 42, n. 8, p. 1127–1134, 1994.
- BISANTI, M.; GANASSI, S.; MANDRIOLI, M. Comparative analysis of various fixative solutions on insect preservation for molecular studies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 130, n. 3, p. 290–296, 2009
- BURGER, T.D., SHAO, R. and BARKER, S.C. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, v. 76, p. 241-253, 2014
- CHAN Cynthia Tak Wan. Comparative analysis of microsatellite and mitochondrial genetic variations in *Ixodes scapularis*. Tese de Mestrado, Georgia Southern University, 2012.

- CHEN Z., et al. Tick-borne pathogens and associated co-infections in ticks collected from domestic animals in central China. *Parasite & Vectors*, v. 7, n. 1, p.237, 2014
- CORN et al., First at-large record of *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae) in the United States, *Systematic & Applied Acarology*, n. 17, v. 1, p. 3-6, 2012.
- CORRIVEAU, M., UPPSTROM, K.; KLOMPEN, H. Effect of eight storage modes on DNA preservation. *Trends in Acarology*, p. 553–556, 2010. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-90-481-9837-5_95.
- CROWDER, C. D. et al. Extraction of total nucleic acids from ticks for the detection of bacterial and viral pathogens. *Journal of Medical Entomology*, v. 47, n. 1, p. 89–94, 2010.
- CRUICKSHANK, Robert H. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic & Applied Acarology*, v. 7, p. 3–14, 2002
- DABERT, Miroslawa. DNA markers in the phylogenetics of the Acari. *Biological Letters*, v. 43, n. 2, p. 97–107, 2006
- DANTAS-TORRES, Filipe. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & vectors*, v. 3, p. 26, 2010
- DANTAS-TORRES, F; CHOMEL, B.B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective. *Trends in Parasitology*, v. 28, n. 10, p. 437–446, 2012. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.003>.
- DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. The ticks (Acari : Ixodida : Argasidae , Ixodidae) of Brazil. *Systematic & Applied Acarology*, v. 14, p. 30–46, 2009.
- DAPSON, R.W. Fixation for the 1990's: a review of needs and accomplishments. *Biotechnic & histochemistry*, v. 68, n. 2, p. 75-82, 1993.
- DEDKOV, V.G., et al. Prevalence of Kemerovo virus in ixodid ticks from the Russian Federation. *Ticks and Tick-borne Diseases*. v. 5, n. 6, p. 651-655, 2014.
- DILLON, N.; AUSTIN, A.D; BARTOWSKY, E. Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect molecular biology*, v. 5, n. 1, p. 21–24, 1996.
- DOUGLAS, Michael P.; ROGERS, Scott O. DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutation Research*, v. 401, n. 1, p. 77–88, 1998.
- DOWELL, F.E.; NOUTCHA, A.E.M.; MICHEL, K. Short Report: The Effect of Preservation Methods on Predicting Mosquito Age by Near Infrared Spectroscopy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, n. 6, p. 1093–1096, 2011.
- DUONG, A. et al. Reproductive and developmental toxicity of formaldehyde : A systematic review. *Mutation Research*, v. 728, n. 3, p. 118–138, 2011. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.07.003>.

- VAN ESSEN, H.F. et al. Alcohol based tissue fixation as an alternative for formaldehyde : influence on immunohistochemistry. *Journal of clinical pathology*, v. 63, n. 12, p. 1090–1095, 2010.
- FACCINI-MARTÍNEZ, Á.A. et al. *Rickettsia rickettsii* in *Amblyomma patinoi* Ticks, Colombia. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 3, p. 2010–2012, 2015.
- FERON, V.J. et al. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutation Research*, v. 259, n. 3, p. 363–385, 1991.
- FUKATSU, Takema. Acetone preservation: A practical technique for molecular analysis. *Molecular Ecology*, v. 8, n. 11, p. 1935–1945, 1999.
- FUKUHARA, H. Relative proportions of mitochondrial and nuclear DNA in yeast under various conditions of growth. *European Journal of Biochemistry*, v. 11, n. 1, p. 135-139, 1969.
- GERARDI, M. et al. Comparing feeding and reproductive parameters of *Amblyommaparvum* tick populations (Acari : Ixodidae) from Brazil and Argentina on various host species. *Veterinary Parasitology*, v. 197, n. 1, p. 312–317, 2013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.06.018>.
- GILLESPIE, J.W. et al. Evaluation of Non-Formalin Tissue Fixation for Molecular Profiling Studies. *American Journal of Pathology*, v. 160, n. 2, p. 449–457, 2002.
- GOETZE, Erica.; JUNGBLUTH, Michelle J. Acetone preservation for zooplankton molecular studies. *Journal of Plankton Research*, v. 35, n. 5, p. 972–981, 2013.
- GU, X. et al. The complete mitochondrial genome of the scab mite *Psoroptes cuniculi* (Arthropoda: Arachnida) provides insights into Acari phylogeny. *Parasites & vectors*, v. 7, n. 340, p. 1-10, 2014.
- GUGLIELMONE, A.A. et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Experimental & Applied Acarology*, v. 40, n. 2, p. 83–100, 2006.
- GUGLIELMONE, A.A. et al. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: A list of valid species names. *Zootaxa*, v. 28, n. 2528, p. 1–28, 2010.
- GUO, W. et al. DNA Extraction Procedures Meaningfully Influence qPCR-Based mtDNA Copy Number Determination. *Mitochondrion*, v. 9, n. 4, p. 261–265, 2009.
- GURDEBEKE, Shirley; MAELFAIT, Jean-Pierre. Pitfall Trapping in Population Genetics Studies: Finding the Right “Solution”. *Journal of Arachnology*, v. 30, n. 2, p. 255–261, 2002.
- GUY, E.C.; STANEK, G. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology*, v. 44, n. 7, p. 610-611, 1991.

- HALOS, L. et al. Short note Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Veterinary Research*, v. 35, n. 6, p. 709–713, 2004.
- HEBERT, P.D. et al., Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*. v. 2, n. 10, p. 312, 2004.
- HERNANDEZ, R. et al. Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 30, n. 10, p. 969–977, 2000.
- HILL, C.; GUTIERREZ, J. A method for extraction and analysis of high quality genomic DNA from ixodid ticks. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 17, n. 2, p. 224–227, 2003.
- HUMAIR, P.F., et al., Molecular identification of bloodmeal source in *Ixodes ricinus* ticks using 12S rDNA as a genetic marker. *Journal of Medical Entomology*, v. 44, n. 5, p. 869-880, 2007.
- HOPWOOD, D. Cell and tissue fixation, 1972-1982. *Histochemical Journal*, v. 17, n. 4, p. 389–442, 1985.
- HOWAT, William J.; WILSON, Beverly A. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*, v. 70, n. 1, p. 12-19, 2014.
- HUBBARD, M.J.; CANN, K.J.; WRIGHT, D.J.M. Validation and rapid extraction of nucleic acids from alcohol-preserved ticks. *Experimental and Applied Acarology*, v. 19, n. 8, p. 473–478, 1995.
- IATA180. International Aviation. Disponível em <http://www.spnhc.org/media/assets/SPNHC_Newsletter_2011_V25_N1.pdf>, acesso em 02 de Julho de 2015.
- INCA. Instituto nacional de Câncer. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=795>, Acesso em 01 de Julho de 2015.
- KIERNAN, John A., 2000. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do . *Microscopy Today*, v. 1, n. 5, p. 8–12, 2000.
- KING, J.R.; PORTER, S.D. Recommendations on the use of alcohols for preservation of ant specimens (Hymenoptera , Formicidae). *Insectes Sociaux*, v. 51, n. 2, p. 197–202, 2004.
- LABRUNA, M.B. et al. Notes on parasitism by *Amblyomma humerale* (Acari: Ixodidae) in the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Journal of medical entomology*, v. 39, n. 6, p. 814–817, 2002.
- LABRUNA, M.B. et al. New Records and Laboratory-Rearing Data for *Ixodes schulzei* (Acari :Ixodidae) in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 40, n.1, p. 116–118, 2003.

- LABRUNA, M.B. et al. Infection by *Rickettsia bellii* and “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” in *Amblyomma neumanni* ticks from Argentina. *Microbial Ecology*, v. 54, n. 1, p. 126–133, 2007.
- LOMMANO, E., et al. Tick-borne pathogens in ticks collected from breeding and migratory birds in Switzerland. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, v. 5, n. 6, p. 871–882, 2014.
- LONDOÑO, A. et al. Infection of *Amblyomma ovale* by *Rickettsia* sp strain Atlantic rainforest , Colombia. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 5, n. 6, p. 672–675, 2014.
- LUGARINI, C. et al. Ticks and Tick-borne Diseases Rickettsial agents in avian ixodid ticks in northeast Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 6, n.3, p. 364–375, 2015. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.02.011>.
- LV, J. et al. Assessment of four DNA fragments (COI , 16S rDNA , ITS2 , 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). *Parasites & Vectors*, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2014.
- LYKIDIS, D. et al. Novel zinc-based fixative for high quality DNA, RNA and protein analysis. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. 12, e85, 2007.
- MARTINS, T.F. et al. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: Descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 1, n. 2, p. 75–99, 2010.
- 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 Metastrata (Acari: Ixodidae). *Parasitology research*, v. 84, n. 6, pp.478-484, 1998.
- MATHISON, Blaine A.; PRITT, Bobbi S. Laboratory identification of arthropod ectoparasites. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 27, n. 1, p. 48–67, 2014.
- MELO, A.L.T. et al. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 2, n. 4, p. 213–218, 2011.
- MELO, A.L.T. et al. *Rickettsia parkeri* infecting free-living *Amblyomma triste* ticks in the Brazilian Pantanal. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 6, n. 3, p. 237–241, 2015.
- MIETHING, F. et al. Effect of fixation to the degradation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 54, n. 3, p. 371–374, 2006.
- MOELANS, C.B. et al. Formaldehyde substitute fixatives: effects on nucleic acid preservation. *Journal of Clinical Pathology*, v. 64,n. 11, p. 960–967, 2011.
- MOREAU, C.S. et al. DNA preservation: A test of commonly used preservatives for insects. *Invertebrate Systematics*, v. 27, n. 1, p. 81–86, 2013.

- MOREIRA, A.S. et al. Bumblebee (Hymenoptera: Apidae) sample storage for a posteriori molecular studies: Interactions between sample storage and DNA-extraction techniques. *European Journal of Entomology*, v. 110, n. 3, p. 419–425, 2013
- MTAMBO, J. et al. Comparison of preservation methods of *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) for reliable DNA amplification by PCR. *Experimental and Applied Acarology*, v. 38, n. 2-3, p. 189–199, 2006.
- MUGNAINI, E.; DAHL, A.L. Zinc-aldehyde fixation for light-microscopic immunocytochemistry of nervous tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 31, n. 12, p. 1435-1438, 1983.
- NAGY, Zoltán Tamás. A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. *Organisms Diversity and Evolution*, v. 10, n. 1, p. 91–105, 2010.
- NAVA, S.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. The natural hosts for larvae and nymphs of *Amblyomma neumanni* and *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). *Experimental & Applied Acarology*, v. 40, n. 2, p. 123–131, 2006.
- NAVA, S. et al. Distribution, hosts, 16S rDNA sequences and phylogenetic position of the Neotropical tick *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 102, n. 5, p. 409–425, 2008.
- NAVA, S. et al. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyommacajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5, pp.252–276, 2014.
- NIERI-BASTOS, F.A. et al. *Candidatus* Rickettsia andeanae, a spotted fever group agent infecting *Amblyomma parvum* ticks in two Brazilian biomes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 2, p. 259–261, 2014.
- OGRZEWALSKA, M., UEZU, A.; LABRUNA, M.B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the Atlantic Forest in northeastern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. *Parasitology Research*, v. 108, n. 3, p. 665–670, 2011.
- OGRZEWALSKA, M. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) Infesting Birds in an Atlantic Rain Forest Region of Brazil Ticks. *Journal of Medical Entomology*, v. 46, n. 5, p. 1225–1229, 2009.
- OGRZEWALSKA, M. et al. Effect of forest fragmentation on tick infestations of birds and tick infection rates by *Rickettsia* in the Atlantic Forest of Brazil. *EcoHealth*, v. 8, n. 3, p. 320–331, 2011.
- OGRZEWALSKA, M. et al. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. *Parasitology*, v. 139, n. 10, p. 1283–1300, 2012

- OLEGÁRIO, M.M.M. et al. Life cycle of the tick *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) and suitability of domestic hosts under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology*, v. 179, n. 1, p. 203–208, 2011
- ONOFRIO, V.C. et al. Diagnoses of and illustrated key to the species of *Ixodes* Latreille, 1795 (Acari: Ixodidae) from Brazil. *Systematic Parasitology*, v. 72, n. 2, p. 143–157, 2009.
- PACHECO, R.C. et al. Detection of a novel spotted fever group rickettsia in *Amblyomma parvum* ticks (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Experimental and Applied Acarology*, v. 43, n. 1, p. 63–71, 2007.
- PACHECO, R.C. et al. Rickettsial Infection in Ticks (Acari: Ixodidae) Collected on Birds in Southern Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 49, n. 3, p. 710–716, 2012.
- PACHECO, R.C. et al. *Coxiella burnetii* in Ticks, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, n. 2, p. 344–345, 2013.
- PANGRÁCOVÁ et al., *Ixodes ricinus* abundance and its infection with the tick-borne pathogens in urban and suburban areas of Eastern Slovakia. *Parasites & Vectors*, v. 6, p. 238, 2013
- PECKLE, M. et al. Molecular epidemiology of *Theileria equi* in horses and their association with possible tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology Research*, v. 112, n. 5, p. 2017–2025, 2013.
- PICHON, B. et al., Detection and identification of pathogens and host DNA in unfed host-seeking *Ixodes ricinus* L.(Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 40, n. 5, p. 723-731, 2003.
- 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.
- RAKE, Adrian V. Isopropanol preservation of biological samples for subsequent DNA extraction and reassociation studies. *Analytical biochemistry*, v. 48, n. 2, p. 365–368, 1972.
- RAMOS, V.N. et al. Diseases Ticks on humans in the Pantanal wetlands , Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 5, n. 5, p. 497–499, 2014.
- REEVES, W.K.; UTTER, C.M; DURDEN, L. Rickettsial pathogens and arthropod vectors of medical and veterinary significance on Kwajalein Atoll and Wake Island. *Micronesica*, v. 43, n. 1, p. 07–113, 2012.
- REIF, K.E. et al. Prevalence and infection load dynamics of *Rickettsia felis* in actively feeding cat fleas. *PLoS ONE*, v. 3, n. 7, e2805, 2008.
- RIJPKEMA, S. et al., Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Experimental & Applied Acarology*, v. 20, n. 1, p. 23-30, 1996.

- RODRÍGUEZ, I. et al. An Alternative and Rapid Method for the Extraction of Nucleic Acids from Ixodid Ticks by Potassium Acetate Procedure. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 57, n. 4, p. 542–547, 2014.
- SANGIONI, L.A. et al. Rickettsial Infection in Animals and Brazilian Spotted Fever Endemicity. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, n. 2, p. 265 – 270, 2005.
- SANTOLIN, I.D.A.C.; FAMADAS, K.M.; MCINTOSH, D. Detection and identification of *Rickettsia* agents in ticks collected from wild birds in Brazil by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria*, v. 35, n. 2, p. 68–73, 2013
- SANTOS, H.A. et al., 2013. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie , 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasites & vectors*, v. 6, n. 1, pp.348, 2013.
- SARAIVA, D.G. et al. *Rickettsia amblyommii* Infecting *Amblyomma auricularium* Ticks in Pernambuco, Northeastern Brazil: Isolation, Transovarial Transmissin and Transstadial Perpetuation. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 13, n. 9, p. 615-618, 2013.
- SCHANDER, C.; HALANYCH, K.M. DNA, PCR and formalinized animal tissue– a short review and protocols. *Organisms, Diversity & Evolution*, v. 3, n. 3, p. 195–205, 2003.
- SIKULU, M., et al. Evaluating RNA later® as a preservative for using near-infrared spectroscopy to predict *Anopheles gambiae* age and species. *Malaria Journal*, v. 10, n. 1, p. 1, 2011
- SOUZA, C.E.; PINTER, A.; DONALISIO, M.R. Major Article Risk factors associated with the transmission of Brazilian spotted fever in the Piracicaba river basin, State of São Paulo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48, n. 1, p. 11–17, 2015.
- SPIGELMAN, M. et al. Long-term DNA survival in ethanol-preserved archival material. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, v. 83, n. 4, p. 283–284, 2001.
- SRINIVASAN, M., SEDMAK, D.; JEWELL, S. Content and Integrity of Nucleic Acids. *American Journal of Pathology*, v. 161, n. 6, p. 1961–1971, 2002.
- STOECKLE, B.C. et al.. Influence of arthropod sampling solutions on insect genotyping reliability. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 135, n. 2, p. 217–223, 2010
- SZABÓ, M.P.J., PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 3, p.27, 2013.
- TARRAGONA, E.L. et al., 2015. *Rickettsia* infection in *Amblyomma tonelliae* , a tick species from the *Amblyomma cajennense* complex. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 6n. 2, p. 173–177, 2015.

- TOLESANO-PASCOLI, G.V. et al. Ticks on birds in a forest fragment of Brazilian cerrado (savanna) in the municipality of Uberlândia , State of Minas Gerais , Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, v. 19, n. 4, p. 244–248, 2010.
- TOMASSONE, L. et al. Molecular Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in *Amblyomma parvum* Ticks, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n. 12, p. 1953–1955, 2008.
- VINK, C.J. et al. The effects of preservatives and temperatures on arachnid DNA. *Invertebrate Systematics*, v. 19, n. 2, p. 99–104, 2005.
- YOSHIKAWA, H. et al. Mechanistic insights into protein precipitation by alcohol. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 50, n. 3, p. 865–871, 2012.
- ZAHNER, V.; LUCAROTTI, C.J.; MCINTOSH, D. Application of 16S rDNA-DGGE and plate culture to characterization of bacterial communities associated with the sawfly, *Acantholyda erythrocephala* (Hymenoptera, Pamphiliidae). *Current microbiology*, 57(6), pp.564-569, 2008.
- ZIMMERMANN, J. et al. DNA damage in preserved specimens and tissue samples: a molecular assessment. *Frontiers in zoology*, v. 5, n.18, p. 1-13, 2008.

9. ANEXOS

Anexo 1

Protocolo de experimentação animal UFRRJ/COMEP 23083.010016/2011-14



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / COMEP

Protocolo Nº 160/2011

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado "*Mantenção de colônias de carrapatos (Acari: Ixodida) usando coelhos domésticos em condições experimentais*" sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Luiz Horácio Faccini do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária, processo 23083.010016/2011-14, atende aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e do bem estar animal estando de acordo com a Resolução 714 de 20/06/2002 do CFMV.

UFRRJ, 24/01/2012.


Prof.ª. Dra. Aurea Echevarria Neves Lima
Pró-reitora de Pesquisa e Pós-graduação

Anexo 2

Protocolo de experimentação animal UFJF/CEUA 02/2016



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

COMPROVANTE DE ENTREGA DE DOCUMENTAÇÃO À
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFJF)

Recebemos a documentação abaixo especificada:

Recolimento de Projeto - Avaliação científica da associação
entre monoterpenos e fúmil propionados sobre *Rhipicephalus*
microplus (Comstock, 1888) e *Rhipicephalus sanguineus*
(Latreille, 1806)

para análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFJF, à luz de princípios éticos
adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e demais
normas vigentes.

Juiz de Fora, 7 de Jan de 2015.

[Assinatura]

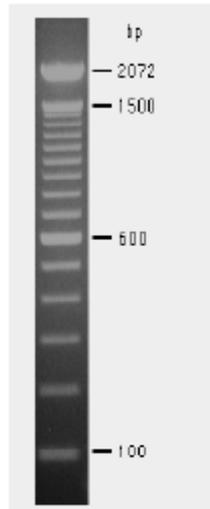
Secretário (a)

CEUA

Anexo 3

Invitrogen 100bp Ladder, Cat. No. 15628-019

Page 2 of 3



100 bp DNA Ladder
0.5 µg/lane
2% agarose gel stained with ethidium bromide.

Note:

During 2% agarose gel electrophoresis with tris-acetate (pH 7.6) as the running buffer, bromophenol blue migrates near the 100-bp fragment. The 100-bp band migrates behind the bromophenol blue marker on 6% polyacrylamide gels with tris-borate (pH 8.0) as the running buffer.

Part of the 600-bp band may migrate anomalously slowly in polyacrylamide gels (1,2,3). This band may appear as an extra band near or on top of the 700-bp band.

References:

1. Hsieh, C., et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225, 25.
2. Stellwagen, N.C. (1983) *Biochemistry* 22, 6186.
3. Jordan, H. and Hartley, J. (1997) *Focus*[®] 19, 9.

Cat. No. 15628-019