

**AValiação dos marcadores moleculares ITS2 e 12S rDNA para a identificação diferencial de espécies do gênero Amblyomma Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) empregando a técnica de PCR-RFLP**

IX Reunião Anual de Iniciação Científica da UFRRJ (RAIC 2021/2022) e III Reunião Anual de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (RAIDTec 2021/2022) - UFRRJ, 0ª edição, de 15/05/2023 a 19/05/2023  
ISBN dos Anais: 978-65-5465-041-0

SILVA; Ariel Souza da<sup>1</sup>, MCINTOSH; Douglas<sup>2</sup>

**RESUMO**

**RESUMO** **Introdução.** A relevância de enfermidades transmitidas por carrapatos tem se ampliado mundialmente (BOULANGER et al., 2019). A identificação de espécies é importante, tanto do ponto de vista da biodiversidade, quanto do ponto de vista médico e veterinário (DANTAS-TORRES et al., 2019). Tal identificação tem sido baseada em critérios morfológicos que, entretanto, possuem limitações relevantes (MANGOLD et al., 1998). Como a combinação da técnica de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) com a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) é reconhecida como uma ferramenta eficaz e mais confiável que a identificação morfológica (DOKIANAKIS et al., 2016), além de não demandar os altos aportes financeiros requeridos por técnicas de sequenciamento, foi elaborado, anteriormente, um protocolo promissor de PCR-RFLP do gene 16S. Alguns problemas relacionados à técnica e a ausência de informações essenciais do gene nos bancos de dados, porém, geraram a necessidade de formulação de protocolo para um gene alternativo. Assim, o presente trabalho, vinculado ao projeto PVIV 2420-2021, teve como objetivo desenvolver e validar um novo protocolo, amparando a elucidação da caracterização de carrapatos do gênero *Amblyomma*. **Objetivos.** Geral: Desenvolvimento de método molecular econômico, prático e eficaz para a identificação diferencial. Específicos: levantamento de sequências ITS2 e 12rDNA; seleção de enzimas de restrição capazes de atuar nas sequências, gerando padrões diferenciais *in silico*; análise *in vitro* do sistema PCR-RFLP e validação do protocolo por sequenciamento. **Métodos.** As sequências analisadas estavam depositadas no banco de dados “GenBank” e a digestão *in silico* foi feita utilizando o software “NEBcutterV2.0”. Enzimas apropriadas foram selecionadas manualmente. Devido às limitações impostas pela pandemia de COVID-19, a análise *in vitro* limitou-se a um relativamente restrito número de amplicons. As amostras de DNA empregadas (Cadastro Sisgen ADE 1091) pertenciam à Coleção de Ácidos Nucléicos de Artrópodes do LBioMol/DPA/UFRRJ. **Resultados e discussão.** Para o marcador 12SrDNA, o levantamento evidenciou sequências representativas para 23 de 33 espécies e a busca por enzimas não foi bem sucedida. Assim, nenhuma análise adicional foi realizada. Para o ITS2 foram encontradas sequências representativas de 29 de 33 espécies e as enzimas PstI e RsaI se mostraram adequadas. Amplicons foram gerados, para pelo menos 1 representante das espécies testadas, através da técnica de PCR. Os perfis previstos foram confirmados pela análise *in vitro*, gerando 17 padrões diferenciais, comprovando a aplicabilidade da metodologia. O sequenciamento demonstrou uma correta caracterização. **Conclusões.** O protocolo de PCR-RFLP sugerido se mostrou uma forma eficiente, mais rápida e de menor custo que as abordagens moleculares até então empregadas. Entretanto, ainda há uma necessidade evidente de trabalho continuado, a fim de aproveitar os aspectos positivos da pesquisa e encontrar soluções para as limitações presentes. Os presentes resultados fornecem subsídios para a continuidade de levantamentos ecológicos abrangentes, empregando metodologias moleculares menos onerosas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ixodologia, carrapatos, técnicas moleculares

<sup>1</sup> Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ariel397souza@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pus972@yahoo.co.uk

