

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DO GRUPO PANARTHROPODA
AVALIADAS ATRAVÉS DE SEQUÊNCIAS DO GENE rDNA 18s**

ORIENTADO: Jonatas Francisco de Souza

ORIENTADOR: Prof^a Dr^a Cleusa Graça da Fonseca

BELO HORIZONTE

JUNHO-2011

Jonatas Francisco de Souza

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DO GRUPO PANARTHROPODA
AVALIADAS ATRAVÉS DE SEQUÊNCIAS DO GENE rDNA 18s**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cleusa Graça da Fonseca

BELO HORIZONTE

JUNHO – 2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora Prof^a Dr^a Cleusa Graça da Fonseca pelo exemplo e referência como intelectual, profissional e como pessoa.

Agradeço à instituição UFMG e especialmente a todos os Professores da Genética que contribuíram para minha formação.

Agradecimento especial ao Doutor Gustavo Augusto Lacorte que foi meu companheiro de Laboratório e que me ensinou muito sobre os procedimentos laboratoriais e sobre o Filo Onychophora.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório Pilar, Leonardo e Luciene que além de me ajudarem em diversos momentos de dificuldade, faziam do laboratório um local de trabalho saudável e agradabilíssimo.

Agradecimento especial ao meu pai, Lourival, e minha mãe, Celina, que sempre me ensinaram valores sobre o amor, trabalho e família e também aos meus irmãos Geovane, Juliana e Bruno (irmão de coração) que cresceram junto comigo e partilharam inúmeros momentos de felicidade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS E QUADROS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1.INTRODUÇÃO	10
1.1 A filogenia dos metazoários.....	10
1.1.2. O grupo Ecdyzoa.....	10
1.1.3. O grupo Euarthropoda.....	13
1.1.4. O grupo Panarthropoda.....	14
1.1.4.1. Aspectos gerais dos organismos do clado Panarthropoda	15
1.1.4.1.1. Onychophora.....	15
1.1.4.1.2. Hexapoda.....	16
1.1.4.1.3. Chelicerata.....	16
1.1.4.1.4. Crustacea.....	16
1.1.4.1.5. Myriapoda.....	17
1.1.4.1.6. Tardigrada.....	18
1.2. Evolução dos genes nucleares de RNA ribossômico (rDNA).....	18
1.2.1 Mutações gênicas.....	18
1.2.2. Homologias.....	19
1.2.3. Os genes de RNA ribossômico como marcadores moleculares.....	20
1.3. Filogenia.....	21
1.3.1 Árvores filogenéticas.....	21
1.3.2. Algoritmos para filogenética.....	22
1.3.3. Reconstruções filogenéticas.....	22
1.3.4. Máxima parcimônia.....	23
1.3.5. Método da máxima verossimilhança (ML).....	24
1.3.6. Inferência bayesiana.....	24
1.4. Banco de dados.....	25
1.5. Busca de sequências em banco de dados.....	25
1.6. Alinhamento.....	26
1.7. Justificativa.....	26
1.8. Objetivos.....	27
1.8.1 Objetivo geral.....	27
1.8.2. Objetivos específicos.....	27
1.9. Hipótese.....	27
2. METODOLOGIA	27
2.1. Sequências.....	27
2.2. Edição das sequências.....	29
2.3. Análise das sequências.....	30

3.	RESULTADOS	30
3.1	Modelo evolutivo e proporção de sítios invariáveis	30
3.2	Árvores filogenéticas.....	31
4.	DISCUSSÃO	34
5.	CONCLUSÃO	41
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A controvérsia entre dados moleculares e dados morfológicos.....	12
Figura 2: Provável filogenia do Ecdysozoa.....	13
Figura 3: Gene de rDNA.....	21
Figura 4: Resultado da filogenia do Panarthropoda com sequências do gene rDNA 18s utilizando a máxima verossimilhança (árvore compactada).....	32
Figura 5: Resultado da filogenia do Panarthropoda com sequências do gene rDNA 18S utilizando a análise bayesiana.....	33
Figura 6: Resultado da filogenia do Panarthropoda com sequências do gene rDNA 18S utilizando máxima parcimônia.....	34
Figura 7: Três possibilidades para a filogenia do Panarthropoda.....	36
Figura 8: Região da topologia analisada com análise bayesiana incluindo o Tardigrada juntamente com o Crustacea.....	37
Figura 9: Região da topologia de máxima verossimilhança mostrando o Pancrustacea. Os números representam o valor de bootstrap. A classe de Crustacea denominada Malacostraca se apresentou como grupo irmão de Hexapoda mais outra classe de Crustacea, a Branchiopoda.....	38
Figura 10: Região da topologia de máxima verossimilhança demonstrando o grupo Myriochelata. Os números nos nós representam os valores de bootstrap.....	39

LISTA DE TABELAS E QUADROS

QUADROS:

Quadro 1: Sequências dos clados dos Panarthropoda baixadas no genbank.....	28
--	----

TABELAS

Tabela 1: Resultado do teste modelo utilizando o programa Modeltest3.7folder para dados das sequências de rDNA 18S.....	31
---	----

Tabela 2: Lista de artigos utilizados na discussão organizados de acordo com o tipo de estudo e resultado.....	40
--	----

RESUMO

O grupo Ecdysozoa é composto por invertebrados que fazem troca de cutícula ou ecdise. Esse grupo foi proposto por Aguinaldo *et al*, 1997 em sua análise molecular com subunidade ribossomal 18S e contrasta com a hipótese morfológica do grupo Articulata. Dentro do Ecdysozoa, há um grupo de animais com características em comum denominado Panarthropoda. Este é composto por Onychophora, Tardigrada e o Euarthropoda. Muito se tem discutido sobre o grupo basal do Panarthropoda e também sobre as relações filogenéticas dos integrantes deste grupo. O marcador molecular 18S é um gene ortólogo e tem sido utilizado em muitos trabalhos de filogenia com boa eficiência para a resolução das relações entre os clados. O presente trabalho teve como objetivo resolver a posição filogenética do Filo Onychophora dentro do grupo Panarthropoda utilizando como marcador sequências do gene 18S. Para esta análise, foram utilizados os métodos de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e análise bayesiana. Embora se tenha encontrado suporte estatístico para a relação entre alguns grupos do Panarthropoda, não houve suporte estatístico suficiente para resolver a posição do Filo Onychophora.

ABSTRACT

The group Ecdysozoa is compounded by invertebrates that make cuticle exchange or ecdise. This group was proposed by Aguinaldo *et al.* 1997 in his molecular analysis with the 18S ribosomal subunit and it contrasts with the morphological hypothesis of the Articulata group. In the Ecdysozoa, there is a group of animals with similar characteristics called Panarthropoda. This group is compounded by Onychophora, Tardigrada and Euarthropoda. It has been discussed a lot about basal group of Panarthropoda and also about the phylogenetic relationships among members of this group. The 18S is a molecular orthologue marker gene and it has been used in many studies of phylogeny with good acceptance for the resolution of the relationships between clades. This study aimed to solve the phylogenetic position of the phylum Onychophora within the group using Panarthropoda as sequence markers of the 18S gene. For this analysis it was used the methods of maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian analysis. Although it has been found statistical support for the relationship between some groups of Panarthropoda, there was no sufficient statistical support to solve the position of the phylum Onychophora.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A filogenia dos metazoários

A análise filogenética dos metazoários é um desafio para os pesquisadores. Os metazoários constituem, do ponto de vista evolutivo, um grupo muito complexo, mas de interesse central na Biologia. Existe uma grande discussão sobre o posicionamento dos clados, que se intensificou com o surgimento da Sistemática Filogenética, em meados do século XX, com o trabalho de Hennig (Matioli, 2001). O avanço dos métodos e das técnicas de pesquisa filogenética tem proporcionado meios de enfrentar muitas dificuldades, mas frequentemente aponta novos problemas a serem resolvidos (Adoutte *et al.* 2000)

A morfologia há muito tempo é usada para o entendimento da evolução biológica e para as análises filogenéticas. Entretanto, a escassez de dados fósseis dificultava a reconstrução de filogenias com este tipo de dado. O problema com a falta de dados era devido às linhagens evoluírem rapidamente, o que deixa uma ausência de sinal filogenético, ou à perda dos dados devido à extinção de grupos ancestrais que não deixaram fósseis ou também devido à evolução convergente e à hibridização introgressiva (Jenner & Littlewood, 2007).

Atualmente a análise molecular vem sendo utilizada em muitos estudos filogenéticos. O uso de marcadores genéticos trouxe uma nova interpretação da evolução dos metazoários e altera principalmente várias posições filogenéticas dentro do grupo dos invertebrados. Uma das filogenias mais discutidas dos invertebrados é a dos protostômios, principalmente a do grupo Panarthropoda. A análise de sequências do gene de rDNA 18S trouxe uma nova idéia da filogenia destes grupos que são cruciais para o entendimento da evolução dos bilaterais.

1.1.2. O grupo Ecdysozoa

A filogenia dos bilaterais por muito tempo foi baseada em características morfológicas e embriológicas e propunha um aumento gradual da complexidade: teriam surgido primeiro os organismos mais simples, depois os acelomados seguidos pelos pseudcelomados e posteriormente os celomados (Hyman, 1940).

Uma das filogenias mais discutidas é a dos invertebrados, particularmente entre os Arthropoda e seus grupos próximos. Os Arthropoda eram relacionados filogeneticamente mais próximos dos Annelida e Onychophora (Snodgrass, 1938) que estavam incluídos no clado dos celomados (Hyman, 1940).

Entretanto, esta idéia vem sendo alterada após a análise das sequências da pequena subunidade ribossomal de um grupo de animais (Aguinaldo *et al.* 1997). Segundo esta análise, há uma nova filogenia em que são agrupados alguns pseudocelomados, mais próximos dos Nematoda do que dos celomados (Arthropoda e Tardigrada) num grupo denominado Ecdysozoa (figura 1 e 2). Outros pseudocelomados (como os Rotifera) foram agrupados com acelomados e protostômios celomados (Annelida) no grupo Lophotrochozoa. Este e Ecdysozoa são monofiléticos e formam o clado dos protostômios (Aguinaldo *et al.* 1997)

Os grupos que compõem o clado Ecdysozoa são os Euarthropoda (Hexapoda, Crustacea, Myriapoda, Chelicerata), os grupos próximos dos Arthropoda (Onychophora e Tardigrada) e mais cinco filos: Nematoda, Nematomorpha, Priapulida, Kinorhyncha e Locyfera. O Ecdysozoa é o clado com maior número de espécies e de diversidade de nichos, sendo estimados 4,5 milhões de espécies vivas. Sua cutícula resistente significa que esse grupo pode estar representado por vários fósseis o que aumentaria mais ainda o número de espécies (Chapman, 2005).

O plano corporal basal dos Ecdysozoa é bastante conservado. Os organismos relacionados aos Hexapoda possuem corpo segmentado e apêndices unidos e os grupos relacionados aos Onychophora possuem um nervo ao redor do esôfago e uma boca terminal que é encontrada em alguns indivíduos. Todos os grupos perderam a larva primária e apresentam troca de cutícula com concomitante perda da locomoção. Esta troca de cutícula ou ecdise é a principal característica que nomeia o grupo (Telford *et al.* 2008).

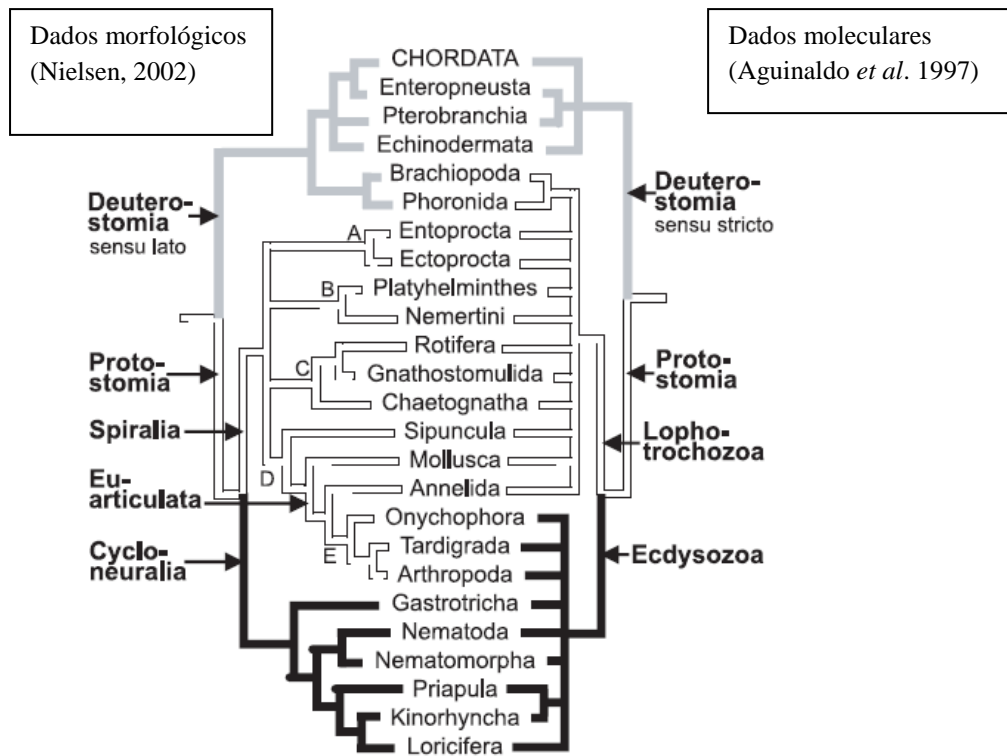


Figura 1: A controvérsia entre dados moleculares e dados morfológicos (Nielsen, 2002).

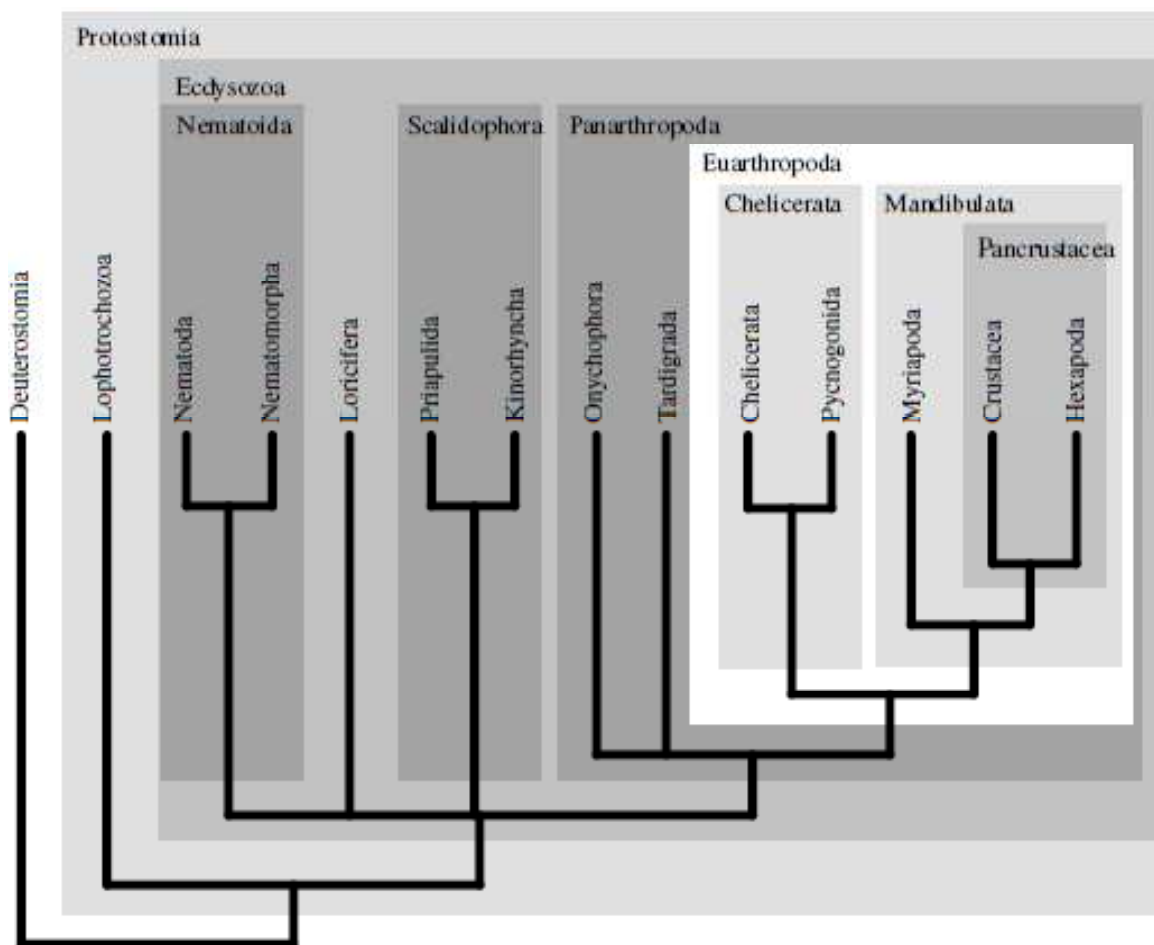


Figura 2: Provável filogenia do Ecdysozoa de acordo com dados moleculares da unidade ribossomal 18S (Aguinaldo *et al.* 1997; Telford *et al.* 2008)

1.1.3. O grupo Euarthropoda

O grupo Euarthropoda é formado pelos clados Chelicerata, Crustacea, Myriapoda e Hexapoda. As relações filogenéticas entre esses grupos têm sido debatida através da morfologia e dados moleculares. Algumas análises moleculares têm suportado a monofilia dos Euarthropoda e uma única origem de seu corpo cuticularizado com apêndices unidos (Telford *et al.* 2008).

Estudos morfológicos propuseram que Myriapoda e Hexapoda formavam um grupo denominado Atelocerata (que significa chifres mal formados e refere-se à perda do segundo segmento da antena) definido por apêndices não ramificados, túbulos de malpighi e traquéias respiratórias. Alguns autores agrupam o Aterocerata com Onychophora num clado denominado Uniramia (Telford & Thomas, 1995).

Entretanto, o mais claro resultado na filogenia dos Arthropoda mostra que os Hexapoda são mais relacionados aos Crustacea que aos Myriapoda (Boore *et al.* 1995). O grupo formado pelos Crustacea mais Hexapoda seria o Pancrustacea ou Tetraconata devido aos cones cristalinos dos omatídeos (Dohle, 1997; Harzsch, 2004).

1.1.4. O grupo Panarthropoda

Há mais de 60 anos foi proposta uma relação entre Annelida, Arthropoda e Onychophora (Snodgrass, 1938) que é muito parecida com a recente hipótese Articulata (Nielsen, 1997). Os estudos morfológicos posteriores foram contra essa proposição devido à grande variação da articulação e da musculatura das pernas dos Arthropoda e foi sugerido que este grupo não teria surgido de um ancestral comum (Anderson, 1973; Manton, 1977; Tiegs & Manton, 1958). Os Arthropoda foram então considerados um clado superior a filo e foram divididos em dois grupos: os que tinham um ancestral comum do grupo Annelida e aqueles que não se originavam de um ancestral Annelida (Tiegs & Manton, 1958).

O grupo que possuía os Annelida como ancestral comum foi denominado Uniramia e era composto por Onychophora, Myriapoda e Insecta. O outro grupo era composto por Crustacea, Trilobita e Chelicerata (Manton, 1972). A hipótese do Uniramia foi corroborada por estudos morfológicos (Anderson, 1973) e, desta maneira, a evolução dos membros articulados (artropodização) foi considerada ter surgido mais de uma vez dentro do grupo (Fryer, 1992).

Os estudos de morfologia que propunham os Arthropoda como polifiléticos não levavam em consideração a alfa quitina. Esta estrutura está presente nos Arthropoda e Onychophora e sugere que estes sejam monofiléticos. Características como apêndices com garras e mixoceloma com metanefrídeos destes grupos também são compartilhadas com alguns indivíduos dos Tardigrada. Arthropoda, Tardigrada e Onychophora formam o grupo Panarthropoda (Nielsen, 1997).

Os Tardigrada já foram relacionados filogeneticamente mais próximos com o Nematoda que com os Euarthropoda (Lartillot & Philippe, 2008). Entretanto, caso se assuma que o pequeno tamanho dos Tardigrada seja derivado e se considere a ausência de celoma, coração e nefrídeos (Schmidt-Rhaesa, 2001), características que são encontradas em Onychophora e Euarthropoda, pode-se sugerir que as similaridades de

cutículas, cordão nervoso ventral e apêncides em Tardigrada e Euarthropoda podem indicar uma relação de grupos irmãos (Telford *et al.* 2008).

1.1.4.1. Aspectos gerais dos organismos do clado Panarthropoda

1.1.4.1.1 Onychophora

Onychophora é um grupo de invertebrados terrestres que são predominantemente encontrados no solo, serrapileira ou tronco de árvores e mostram uma disjunção datada de Gondwana (Monge-Najera 1995; Reid, 1996). Este táxon é muito importante para o entendimento do grupo Panarthropoda (grupo com Euarthropoda, Tardigrada e Onychophora) (Monge-Najera, 1995; Telford *et al.* 2008) porque estes animais são relacionados com Arthropoda (Chelicerata, Myriapoda, Crustacea, e Hexapoda) (Mayer *et al.* 2004), ou alternativamente com Chelicerata (Strausfeld *et al.* 2006), ou unindo Tardigrata e Nematoda (Park *et al.* 2006) e também porque o corpo destes animais é um mosaico de caracteres anatômicos encontrados em Arthropoda e alguns vermes ancestrais (Nielsen, 1997). Até algum tempo atrás, foi assumido que estes vermes ancestrais estavam relacionados aos Annelida e, então, os animais do grupo Onychophora foram interpretados como derivados da forma do corpo dos Annelida (Anderson 1973; Scholtz, 2002; Scholtz & Edgecombe, 2005; Wägele *et al.* 1999; Wägele & Misof, 2001).

Dados moleculares não corroboram essa idéia e mostram que nem Arthropoda nem Onychophora são relacionados com Annelida. Eles são membros do grupo Ecdysozoa, que inclui um número de animais não segmentados assim como Tardigrada, Onychophora e Arthropoda, mas não Annelida. Apesar desta classificação ainda não ser muito clara, há fortes indícios moleculares (Eriksson *et al.* 2009; Telford *et al.* 2008).

As espécies de Onychophora estão divididas em duas famílias: Peripatopsidae e Peripatidae (Monge-Najera, 1995) que se distinguem pela posição de suas aberturas genitais. As espécies de Peripatidae são encontradas em áreas intertropicais (leste da África, Sul do México, América Central e do Sul, Antilhas e sudeste da Ásia) e espécies da Peripatopsidae apresentam distribuição no hemisfério sul com clima temperado (África do Sul, Oceania e Chile) (Monge-Nájera, 1995).

1.1.4.1.2 Hexapoda

Este grupo contém aproximadamente 1.200.000 espécies descritas sendo o maior táxon dos animais. A diversidade desse grupo se deve à sua adaptação ao meio terrestre, ao vôo e à coevolução com as plantas com flores. Esses animais conseguiram invadir uma grande diversidade de habitats, inclusive o aquático de água doce e água salgada. O sucesso adaptativo está diretamente ligado ao plano corpóreo dos Arthropoda, à resistência à dessecação, ao vôo e ao desenvolvimento holometábolo (indireto). Como os adultos necessitam de recursos diferentes das larvas, não há competição entre eles (Barnes *et al.* 2005).

A cutícula encouraçada dos Arthropoda oferece proteção contra predadores, patógenos, dessecação além de oferecer ancoragem para musculatura esquelética e adaptações para retenção de água. Entre as características que distinguem os Hexapoda dos demais traqueados, pode-se citar o tronco dividido em tórax e abdome, três pares de patas e pernas e asas sempre no tórax (Brusca & Brusca, 2007).

Atualmente os entomólogos dividem os Hexapoda em dois grupos irmãos: Entognatha e Insecta, este último com mais de 30 ordens (Barnes *et al.* 2005).

1.1.4.1.3 Chelicerata

Os Chelicerata são compostos pelos Arachnida terrestres (aranhas, ácaros, escorpiões e outros), os extintos Eurypterida e os Xyphosura marinhos. O corpo destes animais é formado por dois tagmas: cefalotórax e abdome. O cefalotórax é formado pela fusão no embrião da cabeça e do tórax. Os apêndices do primeiro segmento do cefalotórax foram perdidos. O primeiro apêndice do cefalotórax dos Chelicerata é um par de quelíceras preênsil (característica que nomeia o grupo). O segundo apêndice é um pedipalpo e os apêndices restantes são pernas locomotoras (quatro pares). O abdome é constituído de 12 segmentos ou menos e é dividido em pré abdome (7 segmentos) e pós abdome (5 segmentos). Apêndices abdominais quando presentes possuem função respiratória (Barnes *et al.* 2005; Brusca & Brusca, 2007).

1.1.4.1.4 Crustacea

Os Crustacea são um táxon com cerca de 42.000 espécies descritas. Dentre estas, destacam-se carangueijos, tatuzinhos de jardim, lagostas, camarões entre outros. Estes

animais possuem uma enorme heterogeneidade morfológica e ecológica. Há desde animais com menos de 1 milímetro de comprimento a animais com mais de 3 metros (Barnes *et al.* 2005).

Uma característica específica desse grupo são os quatro pares de antenas e os três ou quatro ocelos simples em forma de taça pigmentada. Poucos são os caracteres que podem ser generalizados entre os seres desse grupo (Brusca & Brusca, 2007).

Os organismos desse táxon possuem mandíbula, assim como os Hexapoda e os Myriapoda. O clado formado por estes seres foi denominado Mandibulata, devido à presença da mandíbula e outras similaridades entre estes indivíduos (Barnes *et al.* 2005).

Várias análises moleculares (Delsuc *et al.* 2003; Friedrich & Tautz, 1995; Hwang *et al.* 2001; Nardi *et al.* 2003; Regier *et al.* 2005) sugeriram que os Crustacea estariam relacionados com os Hexapoda num clado denominado Pancrustacea. Alguns aspectos morfológicos são compartilhados por estes dois grupos como neuroblastos, dois pares de neurônios serotoninérgicos por hemineurônios, um número fixo de motoneurônios excitatórios por músculo e aspectos da ultra estrutura lateral do olho (Brusca & Brusca, 2007)

1.1.4.1.5 Myriapoda

O Subfilo Myriapoda possui quatro grupos ou classes: Chilopoda, Diplopoda, Symphyla e Pauropoda. São seres traqueados que apresentam um corpo constituído por cabeça e um tronco alongado que contém muitos segmentos portadores de pernas. Na cabeça existe um par de antenas. Os ocelos medianos estão ausentes nos Myriapoda, entretanto, os olhos laterais simples, talvez derivados dos olhos compostos, estão presentes nos Chilopoda e Diplopoda. Os Pauropoda e Symphyla não possuem olhos (Barnes *et al.* 2005).

A maioria dos Myriapoda necessita de um ambiente úmido porque sua epicutícula é relativamente permeável e não apresenta as mesmas características químicas dos Chelicerata e Hexapoda. Os Myriapoda são amplamente distribuídos e vivem sob pedras e madeira, dentro do solo e no húmus das regiões temperadas e tropicais (Barnes, 2005; Brusca & Brusca, 2007).

1.1.4.1.6 Tardigrada

Tardigrada, também chamados de ursos d'água, podem ser encontrados em água ou em ambientes úmidos. A primeira espécie deste grupo foi descoberta em 1773 e desde então mais de 960 espécies têm sido escritas (Guidetti & Bertolani, 2005). O filo Tardigrada possui três classes: Heterotardigrada, Mesotardigrada e Eutardigrada (Ramazzotti & Maucci, 1983).

Enquanto Heterotardigrada é primariamente marinho, os indivíduos da classe Eutardigrada podem ser encontrados em água doce ou em ambientes terrestres e só existe uma espécie da classe Mesotardigrada que foi descrita num manancial quente no Japão por Rahm (1937) e nunca mais foi encontrada (Ryu *et al.* 2007).

A posição filogenética dos Tardigrada no grupo dos metazoários é incerta. Os estudos mais recentes de morfologia e de DNA e proteínas consideram os Tardigrada como um filo separado pertencente ao Panarthropoda, que inclui os Arthropoda e seus grupos relacionados (Brusca & Brusca, 2003; Garey *et al.* 1996; Giribet *et al.* 1996; Mallatt *et al.* 2004; Nielsen, 2001; Regier & Shultz, 2001).

1.2 Evolução dos genes nucleares de RNA ribossômico (rDNA)

1.2.1 Mutações gênicas

Mutações gênicas são modificações que ocorrem nas sequências de DNA dentro de genes específicos. Se considerarmos apenas as mudanças nas sequências, elas podem ser classificadas como transições, transversões, inserções ou deleções. Na transição uma base é trocada por outra que possui característica química mais semelhante (purina por purina ou pirimidina por pirimidina). Em contrapartida, na transversão a base é substituída por outra com característica química diferente (purina por pirimidina). As transições são mais frequentes que as transversões porque modificam menos a estrutura do DNA (Page & Holmes, 1998). A inserção é uma mutação que adiciona uma ou mais bases na fita de DNA e a deleção remove bases da fita (Griffiths *et al.* 2008; Page & Holmes, 1998).

Há uma relação entre o número de substituições e o tempo de divergência entre duas sequências. O número de diferenças entre duas sequências com o aumento do tempo se torna uma medida cada vez menos acurada em relação ao verdadeiro número

de substituições que ocorreram desde a divergência das sequências do ancestral comum. À medida que aumenta a divergência entre duas espécies, o número de transições em relação ao de transversões decresce (Schneider, 2003; Yang, 2006). A relação entre a diferença da sequência e o tempo decorrido desde a divergência não é linear e sim, hiperbólica, devido à ocorrência de múltiplas mudanças no mesmo sítio. Com o acúmulo das substituições entre as duas sequências, pode ocorrer saturação dos dados, ou seja, os sítios observados mudaram tanto que retornaram ao estado ancestral. (Page & Holmes, 1998).

Então, ao se trabalhar com um conjunto de sequências para o estudo de relações filogenéticas, deve-se fazer a análise de saturação dos dados. Dar continuação a uma análise filogenética quando se evidencia saturação de substituição nas sequências pode levar a subestimar os eventos evolutivos importantes que possam ter ocorrido durante o tempo, desde a divergência inicial. A saturação de substituições, no entanto, é difícil de ser estimada de acordo com o tempo de divergência, pois na maioria das vezes se trabalha com táxons de existência atual. Uma maneira de contornar este problema é relacionar o número de substituições com a distância matemática entre as sequências, já que a distância entre estas é proporcional ao tempo de divergência (Matioli, 2001; Page & Holmes, 1998)

1.2.2 Homologias

É possível distinguir entre estados de caráter ancestrais (primitivos) e derivados. Se uma sequência tem a mesma base em comum com o ancestral de todas as sequências estudadas, ela é considerada primitiva ou plesiomórfica. Caso contrário ele será considerado apomórfica. Um único caráter derivado é considerado autapomorfia e um caráter derivado compartilhado é considerado sinapomorfia (Futuyma, 2005).

Dado dois estados de caráter que são idênticos (o mesmo nucleotídeo) e a similaridade entre eles foi herdada diretamente de um ancestral (que também o possuía), isto é denominado homologia. Homoplasia seria a similaridade compartilhada que não foi herdada de um ancestral (Futuyma, 2005; Matioli, 2001; Page & Holmes, 1998).

Os genes homólogos podem ser considerados parálogos quando sofrem duplicação ou ortólogos quando seu ancestral mais recente não sofreu duplicação e eles passam a ter histórias evolutivas diferentes (Matioli, 2001).

Na reconstrução de filogenias a preocupação primordial deve ser a busca por homologias, isto é, a comparação de caracteres homólogos entre as sequências. Para cada tipo de trabalho deve haver a escolha certa do tipo de gene e as sequências a serem trabalhadas. Para fenômenos de duplicação, devem ser escolhidos genes parálogos; para reconstruções filogenéticas devem ser escolhidos genes ortólogos (Matioli, 2001; Page & Holmes, 1998). Apesar disto, eventos antigos de duplicação podem ser úteis para reconstruções filogenéticas quando empregados como grupos externos recíprocos. Um exemplo desta prática foi a utilização de cópias parálogas para enraizar a árvore da vida e determinar as relações filogenéticas entre os três domínios: Bacteria, Archaea e Eukarya (Woese *et al.* 1990).

Um exemplo de genes com cópias múltiplas frequentemente utilizados em filogenias são os rDNA (genes de rRNA). Há inúmeras cópias deste gene no genoma dos vertebrados, o que torna provável que houve a duplicação antes da divergência entre os vertebrados. As cópias deste gene num indivíduo são virtualmente idênticas mas diferem entre espécies (Matioli, 2001)

1.2.3 Os genes de RNA ribossômico como marcadores moleculares

As sequências que codificam o rRNA são reiteradas, ocorrendo em número variável nos diversos grupos de organismos. Nos eucariontes essas cópias estão organizadas em tandem e agrupadas em uma ou mais regiões cromossômicas. Os rRNA são classificados conforme seu coeficiente de sedimentação sob campo centrífugo, que depende tanto do tamanho quanto da unidade da molécula nas unidades Svedberg (S). Cada unidade de repetição do rDNA possui uma organização conservada, constituída de: um espaçador externo (ETS, do inglês external transcribed spacer), transcrito numa sequência que contém a extremidade 5' da molécula precursora do rRNA, esta com alto coeficiente de sedimentação (até 45S); uma região que codifica para rRNA 18S; um espaçador interno que é transcrito (ITS, do inglês internal transcribed spacer) e que possui uma região que codifica para rRNA 5,8S; e uma região que codifica para rRNA 25-28S e um espaçador externo que não é transcrito (NTS, do inglês non transcribed spacer) (Figura 3). (Griffiths *et al.* 2008; Lewin, 2004; Matioli, 2001).

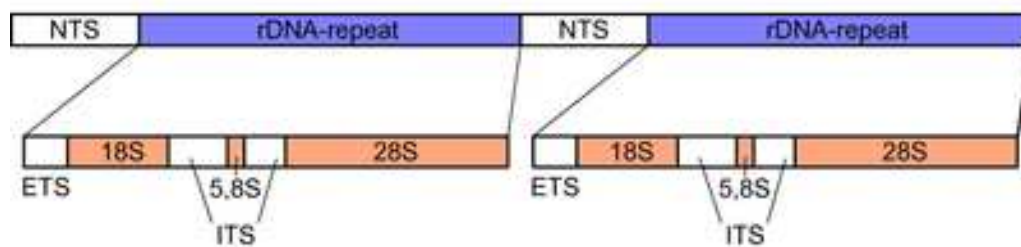


Figura 3: Gene de rDNA (Matioli, 2001)

Os ribossomos são formados por grandes complexos protéicos juntamente com ácidos nucléicos, formando subunidades. Nas células eucariontes são observadas duas subunidades, a primeira chamada de subunidade pequena (small subunit – SSU) que é formada pelos RNA's 18S e 5S e mais um total de 32 proteínas formando a subunidade 30S. A segunda subunidade denominada de subunidade grande (large subunit – LSU) é formada pelos rRNA's 26S, rRNA 5,8S e 50 proteínas formando a subunidade 50S. A função do rRNA está relacionada com a formação de proteínas (Lewin, 2004).

O gene que codifica a subunidade pequena do rRNA (SSU, do inglês small subunit) tem baixa taxa de mutação, é resistente à transferência lateral de genes, funcionalmente conservado e amplamente distribuído ente os organismos. Estas características são fundamentais para sua utilização como marcador molecular (Brocchieri, 2001).

Os genes de rRNA são essenciais para o organismo e por isso evoluem de forma mais lenta. Então, modificações pontuais em sítios específicos podem determinar a inativação da função da subunidade comprometendo a síntese protéica. O gene rDNA 18S possui uma taxa de mutação menor que o gene rDNA 28S e é mais utilizado para as reconstruções filogenéticas (Bargues & Mas-Coma, 1997).

1.3 Filogenia

1.3.1 Árvores filogenéticas

O conceito de filogenia surgiu com Darwin, junto com o próprio conceito de ancestralidade comum entre espécies e seu único diagrama publicado de filogenia representa, por meio de uma árvore, relações filogenéticas. Assim as filogenias nada mais são que a indicação das relações de ancestralidade supostas para um conjunto de espécies (Matioli, 2001).

Uma árvore é uma representação de uma hipótese utilizada como modelo da mais provável história evolutiva de um grupo de sequências ou de organismos. Uma árvore consiste de nós conectados por braços. Nós terminais representam sequências ou organismos que estão sendo estudados (também denominados unidades taxonômicas operacionais – OTU). Nós internos representam os hipotéticos ancestrais. O ancestral de todas as sequências da árvore é a raiz desta (Page & Holmes, 1998; Yang, 2006).

A reconstrução filogenética consiste em estimar as relações de ancestralidade para um determinado número de organismos (táxons). Uma árvore filogenética representa graficamente a história evolutiva dos organismos representados nela (Matioli, 2001).

1.3.2 Algoritmos para filogenética

Para a obtenção de uma árvore filogenética, faz-se necessária a escolha de algoritmos. Há dois grupos básicos de algoritmos neste caso: no primeiro grupo, o princípio do método está embutido no algoritmo que resulta em uma árvore final; o segundo grupo, o princípio do método é o critério usado para a escolha da melhor árvore dentre um conjunto delas (Matioli, 2001).

No caso do segundo grupo, os algoritmos farão a busca de árvores de acordo com o método de otimização de caracteres escolhido. O conjunto de árvores pode conter todas as árvores possíveis (algoritmos exatos), caso em que o método necessariamente encontrará a árvore (ou as árvores) que satisfaçam o critério de otimização. Entretanto, isto pode ser inviável por causa do tempo computacional requerido. Uma solução possível para este problema é procurar uma árvore dentro de um subconjunto de árvores (algoritmos heurísticos), gastando menos tempo computacional para a estimativa da árvore. Entretanto, a árvore estimada pode não ser a ótima para o critério escolhido (Matioli, 2001).

1.3.3 Reconstruções filogenéticas

A tarefa da filogenética molecular é converter as informações contidas nas sequências numa árvore evolutiva. Um grande número de métodos tem sido descritos para fazer isto. Os métodos de distância são baseados na idéia de que se conhece a real distância evolutiva entre todos os membros de um grupo de sequências. As distâncias evolutivas, na prática, são raramente as melhores árvores métricas, e por isso uma classe

de métodos de qualidade de ajuste busca a árvore métrica que melhor representa as distâncias observadas. A segunda classe de método procura a árvore cuja soma dos comprimentos dos braços é o mínimo (Page & Holmes, 1998).

Já os métodos discretos atuam de uma maneira mais direta nas sequências ou nas funções derivadas delas do que nos pares de matrizes. Estes métodos tentam impedir a perda de informação que ocorre quando sequências são convertidas em distâncias. Os dois métodos discretos mais utilizados são a Máxima Parcimônia (MP) e a Máxima Verossimilhança (ML do inglês: Maximum Likelihood) (Matioli, 2001; Page & Holmes, 1998; Yang, 2006).

1.3.4 Máxima parcimônia (MP)

O método de máxima parcimônia é baseado na suposição de que a árvore mais provável é a que requer o menor número de mudanças para explicar toda a variação observada em uma matriz de caracteres ou de alinhamentos de sequências. O método se baseia no princípio de homologias, ou seja, se dois táxons compartilham uma característica é porque esta foi herdada do último ancestral comum a ambos (Schneider, 2003).

Nesse método, nem toda variabilidade das sequências é útil porque aquelas que apresentarem variação numa única sequência adicionarão um passo para qualquer uma das árvores consideradas, ou seja, aquela que tiver o menor número de mudanças. Em seguida, para cada uma das árvores possíveis, o número de substituições de cada sítio informativo é inferido e o total, para cada uma das árvores possíveis é calculado. A árvore com menor comprimento é selecionada como mais parcimoniosa. Pode haver mais de uma árvore parcimoniosa e todas devem ser consideradas (Matioli, 2001).

O método da parcimônia apresenta como vantagem a fácil interpretação dos dados, uma vez que escolhe o caminho mais simples. A desvantagem ocorre quando os marcadores usados apresentam grande número de homoplasias relativamente à quantidade de sítios informativos. As sequências com muitas substituições apresentarão ramos longos comparativamente aquelas com menores números de substituições. Estas então serão agrupadas erroneamente pelo método da parcimônia. Este problema é denominado atração de ramo longo. Ele pode ser contornado com o uso de marcadores com menores taxas de evolução (Page & Holmes, 1998; Yang, 2006).

1.3.5 Método da máxima verossimilhança (ML)

O princípio básico do método da verossimilhança consiste em estimar a probabilidade, com base em um determinado modelo, de um conjunto de dados estar representado num processo que realmente ocorreu. Tratando-se de sequências de DNA, o método irá calcular a probabilidade de que aquelas sequências em estudo tenham sido geradas seguindo as premissas do modelo evolutivo escolhido. Nesse caso, a topologia e o comprimento dos ramos de uma árvore são os parâmetros a serem estimados, dadas as sequências finais nas extremidades dos ramos. Difere um pouco da probabilidade porque esta pode ir de zero a um enquanto na máxima verossimilhança nunca será zero (Page & Holmes, 1998; Schneider, 2003).

A probabilidade deve ser calculada para todas as topologias possíveis, variando o tamanho dos ramos para um grupo de unidades taxonômicas operacionais e a árvore que demonstrar a maior verossimilhança é considerada a melhor estimativa da filogenia. A vantagem deste método é que ele apresenta menor variância que a parcimônia porque é menos afetado por erro de amostragem mesmo com sequências curtas. Entretanto ele pode ser mais demorado, especialmente quando se envolve um grande número de OTU's (Matioli, 2001).

1.3.6 Inferência bayesiana

Um dos fundamentos da análise bayesiana propõe que não há distinção lógica entre parâmetros do modelo e dados. Ambos são variáveis aleatórias com uma distribuição de probabilidades conjuntas que são especificadas por um modelo probabilístico. Desta maneira, os dados são variáveis observadas e os parâmetros são variáveis não observadas. A distribuição *a priori* engloba informação sobre os valores de um parâmetro antes de examinar os dados na forma de uma distribuição de probabilidade. A verossimilhança é a distribuição condicional que especifica a probabilidade de dados observados, dado um particular valor para os parâmetros. Essas duas funções juntas combinam todas as informações sobre os parâmetros. O principal objetivo da inferência bayesiana é calcular a distribuição posterior dos parâmetros que é a distribuição condicional dos parâmetros dado os dados (Beamont & Ranala, 2004).

Os fundamentos do método bayesiano consistem em descrever todos os erros que podem existir em torno de um parâmetro, usando como medida do erro a probabilidade de que o parâmetro tome determinados valores (Faria *et al.* 2007)

A análise bayesiana é um pouco semelhante à máxima verossimilhança mas difere na noção de probabilidades *a posteriori*: probabilidades que são estimadas, baseadas em algum modelo (expectativas *a priori*) após se ter algum conhecimento sobre os dados (Schneider, 2003).

1.4 Banco de dados

Com o desenvolvimento da tecnologia, os seqüenciamentos estão cada vez mais rápidos, com mais qualidade e com menores custos. Desta forma, a quantidade de seqüências de ácidos nucléicos e de proteínas produzidas cresceu e houve a necessidade da criação de um banco para servir de repositórios destas seqüências (Meidanis & Setúbal, 1994). Com este intuito foi criado o Genbank, um dos bancos de dados mais acessados na atualidade. O Genbank é parte da colaboração internacional de base de dados de seqüências nucleotídicas (International Nucleotide Sequence database collaboration) que é composto pelo banco de dados de DNA do Japão (DNA Databank of Japan - DDBJ), o Laboratório de Biologia Molecular Europeu (European Molecular Biology Laboratory - EMBL) e o Genbank no National Center for Biotechnology Information (NCBI). Estas três organizações trocam informações entre si e o Genbank que é atualizado a cada dois meses (NCBI-Genbank, 2010).

1.5 Busca de seqüências em banco de dados

Para que se busquem as seqüências em bancos de dados, é necessário utilizar uma ferramenta que reconheça as seqüências mais similares para facilitar a comparação e o alinhamento entre elas (Matioli, 2001; Schneider, 2003). O programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) procura regiões de similaridade local entre as seqüências. O programa compara seqüências de nucleotídeos ou proteínas no banco de dados e calcula a significância estatística da diferença entre elas. O BLAST pode ser utilizado para inferir relações evolutivas e funcionais e também identificar membros de famílias gênicas (NCBI-BLAST, 2010).

1.6 Alinhamento

O alinhamento de seqüências possui uma diversidade de aplicações na bioinformática, sendo considerada uma das operações mais importantes desta área. Este método de comparação procura determinar o grau de similaridade entre duas ou mais seqüências, ou a similaridade entre fragmentos destas seqüências. No caso de mais de duas seqüências o processo é denominado alinhamento múltiplo (Page & Holmes, 1998).

O alinhamento pode ser classificado em global ou local. No alinhamento do tipo global as seqüências são alinhadas de um extremo ao outro. Em contrapartida, no alinhamento local, alinha-se apenas as seqüências mais conservadas, independente da localização destas. Enquanto o alinhamento global é utilizado para determinar seqüências conservadas, o local é utilizado na busca por homologies. O algoritmo utilizado pelo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) realiza este tipo de alinhamento (Prodosimi *et al.* 2002).

1.7 Justificativa

Dentre as razões para se propor um estudo filogenético com dados moleculares do grupo Panarthropoda, pode-se destacar:

- Não se sabe quem é o grupo basal dos Panarthropoda
- A posição dos subgrupos do grupo Panarthropoda ainda é incerta;
- Ainda não há suporte molecular suficiente para o Ecdysozoa e consequentemente para os Panarthropoda;

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo geral

Investigar as relações filogenéticas do grupo Panarthropoda através de sequências do gene rDNA 18S.

1.8.2 Objetivos específicos

- Resolver as relações dos Onychophora com os grupos do Panarthropoda
- Resolver as relações filogenéticas entre os grupos do Panarthropoda.

1.9 Hipótese

- Hipótese: O grupo Panarthropoda é monofilético e o grupo Onychophora é o grupo basal.

2 METODOLOGIA

2.1 Sequências

As sequências foram obtidas no banco de dados do Genbank no site do NCBI. Foi feito o download de cinquenta e uma sequências do gene ribossômico 18S de invertebrados do grupo Panarthropoda e duas sequências de indivíduos do grupo Annelida para serem utilizadas como grupo externo (quadro 1). As sequências foram baixadas no formato Fasta e armazenadas em blocos de notas.

Quadro 1 - Sequências dos clados dos Panarthropoda baixadas no genbank

Indivíduo	Grupo	Acesso no genbank
<i>Colossendeis sp</i>	Chelicerata	FJ862859.1
<i>Achelia hispida</i>	Chelicerata	FJ862857.1
<i>Pallenopsis sp</i>	Chelicerata	FJ862856.1
<i>Pallenopsis macneilli</i>	Chelicerata	DQ389931.1
<i>Sericosura venticola</i>	Chelicerata	DQ389925.1
<i>Callipallene sp</i>	Chelicerata	DQ389899.1
<i>Achelia hoekii</i>	Chelicerata	AY210808.1
<i>Ammothella appendiculata</i>	Chelicerata	DQ389888.1
<i>Ooperipatellus viridimaculatus</i>	Onychophora	GQ911190.1
<i>Peripatopsis moseleyi</i>	Onychophora	GQ911189.1
<i>Opisthopatus cinctipes</i>	Onychophora	GQ911188.1
<i>Euperipatoides leuckarti</i>	Onychophora	GQ911187.1
<i>Peripatoides novaezealandiae</i>	Onychophora	AF342794.1
<i>Metaperipatus inae</i>	Onychophora	GQ911184.1
<i>Peripatopsis sedgwicki</i>	Onychophora	ELU49910
<i>Scolopendra mutilans</i>	Myriapoda	DQ666178.1
<i>Theatops posticus</i>	Myriapoda	AY288695.1
<i>Alipes crotalus</i>	Myriapoda	AY288691.1
<i>Tuoba sydneyensis</i>	Myriapoda	AF173260.1
<i>Schendylops pampeanus</i>	Myriapoda	AF173257.1
<i>Pectiniunguis argentinensis</i>	Myriapoda	AF173256.1
<i>Cormocephalus monteithi</i>	Myriapoda	AF173253.1
<i>Ethmostigmus rubripes</i>	Myriapoda	AF173249.1
<i>Scolopocryptops nigrinus</i>	Myriapoda	AF173250.1
<i>Anthocomus rufus</i>	Hexapoda	AY748136.1
<i>Lepicerus inaequalis</i>	Hexapoda	GU591994.1
<i>Canthidium guanacaste</i>	Hexapoda	DQ012276.1
<i>Attalus analis</i>	Hexapoda	EF209726.1
<i>Attalus varitarsis</i>	Hexapoda	EF209723.1
<i>Charopus flavipes</i>	Hexapoda	EF209718.1
<i>Ebaeus humilis</i>	Hexapoda	EF209722.1
<i>Haplomalachius hispanus</i>	Hexapoda	EF209715.1
<i>Axinotarsus ruficollis</i>	Hexapoda	EF209717.1
<i>Cyrtosus semimarginatus</i>	Hexapoda	EF209729.1
<i>Pseudosquillopsis marmorata</i>	Custacea	HM138889.1
<i>Triops australiensis</i>	Custacea	EF189637.1
<i>Lepidurus apus</i>	Custacea	EF189623.1
<i>Lepidurus packardi</i>	Custacea	AF144212.1

Quadro 1 - Sequências dos clados dos Panarthropoda baixadas no genbank (Continuação)

Indivíduo	Grupo	Acesso no genbank
<i>Triops longicaudatus</i>	Custacea	AF144219.1
<i>Triops cancriformis</i>	Custacea	EF585454.1
<i>Austinogebia narutensis</i>	Custacea	EF189638.1
<i>Echiniscus canadensis</i>	Tardigrada	FJ435714.1
<i>Testechiniscus spitzbergensis</i>	Tardigrada	EU266967.1
<i>Pseudechiniscus sp</i>	Tardigrada	EU266965.1
<i>Cornechiniscus lobatus</i>	Tardigrada	EU038079.1
<i>Bryodelphax sp.</i>	Tardigrada	EU266963.1
<i>Echiniscoides sigismundi</i>	Tardigrada	GQ849021.1
<i>Minibiotus sp</i>	Tardigrada	FJ435728.1
<i>Hebesuncus ryani</i>	Tardigrada	EU266933.1
<i>Hebesuncus sp.</i>	Tardigrada	EU266958.1
<i>Ramazzottius oberhaeuseri</i>	Tardigrada	EU266956.1
<i>Syllis westheidei</i>	Annelida	EF123877.1
<i>Syllis ferrani</i>	Annelida	EF123874.1

O programa BLAST, disponível na página do NCBI, foi utilizado para o download das sequências. A sequência inicial utilizada foi de um Onychophora da espécie *Euperipatoides leuckarti*. Para a busca de sequências de outros indivíduos foi selecionado o ícone com mais baixa similaridade. As amostras com mais de setenta e cinco por cento de similaridade, com mais de mil pares de bases (pb) e menos de dois mil pb de todos os grupos do Panarthropoda foram selecionadas.

2.2 Edição das sequências

Para fazer o alinhamento foi utilizado o programa Mega4 (Tamura *et al.* 2007). As sequências salvas em blocos de notas foram importadas para o programa Mega4 que fez o alinhamento.

As sequências foram editadas manualmente. O início e o final de algumas sequências foram desprezados para que toda a amostra ficasse do mesmo tamanho. Os espaços (gaps) foram deletados e todas as sequências ficaram do mesmo tamanho e com mil e noventa e dois nucleotídeos.

2.3 Análise das sequências

Após o alinhamento múltiplo, as sequências foram submetidas à análise de modelo evolutivo com o programa Modeltest3.7folder (Posada & Crandal, 1998). Este programa atua em conjunto com o PAUP*4.0 Beta version (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) (Swofford, 2002) selecionando o melhor modelo de substituição nucleotídica para as sequências alinhadas dentro aqueles existentes no programa (Swofford, 2002).

A análise de máxima verossimilhança foi feita pelo programa PHYML (Guindon *et al.* 2010) após descobrir o melhor modelo evolutivo e a proporção de sítios invariáveis para as sequências feito pelo Modeltest3.7folder.

A análise de máxima parcimônia foi feita pelo programa PAUP*4.0 Beta version (Swofford, 2002) e a análise Bayesiana foi feita com o programa Mrbayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

As análises de bootstrap para testar a confiança nas topologias obtidas foram realizadas para a parcimônia e para a verossimilhança com mil repetições.

Para facilitar a visualização, as árvores foram compactadas para serem exibidas nos resultados. Na discussão serão mostradas regiões das árvores com as espécies.

3. RESULTADOS

3.1 Modelo evolutivo, proporção de sítios invariáveis e parâmetro de distribuição

O programa Modeltest3.7folder apresentou como melhor modelo evolutivo para as sequências o Modelo Geral de Reversão ao Longo do Tempo (GTR, do inglês General Time Reversible). Este modelo leva em consideração a taxa de substituição de um nucleotídeo para cada um dos demais, levando-se em conta a sua frequência e taxa de substituição (Matioli, 2001; Page & Holmes, 1998). Os sítios possuem baixa variação ou são próximas de invariáveis. Entretanto, há alguns sítios que são alvos de muitas variações (hotspots, pontos quentes de mutação) (Yang, 2006). Os resultados apresentados pelo Modeltest3.7folder estão representados na tabela abaixo:

Tabela 1- Resultado do teste modelo utilizando o programa Modeltest3.7folder para dados das sequências de rDNA 18S

Modelo selecionado:	GTR+I+G
(Logaritmo da verossimilhança)-lnL	84.203.262
Frequência de bases:	
Freq. de A	0.2617
Freq. de C	0.2313
Freq. de G	0.2761
Freq. de T	0.2308
Variação entre sítios:	
Proporção de sítios invariáveis (I) sobre sítios variáveis (G)	0.3454

3.2 Árvores filogenéticas

As árvores de máxima verossimilhança e análise bayesiana apresentam os comprimentos dos ramos de tamanhos proporcionais ao número de substituições. A árvore é enraizada por um grupo externo, formado pelos Annelida, que é distante filogeneticamente dos clados analisados. Os números contidos nos nós da topologia de máxima verossimilhança são do teste de confiança (bootstrap) e representam a frequência que os grupos foram amostrados da forma apresentada nos ramos. Já os números mostrados na análise bayesiana representam a probabilidade posterior. Acima de 70, esses dados são confiáveis. A árvore de máxima parcimônia não possui seus ramos proporcionais ao número de substituições. Os números nos nós também representam o bootstrap.

Os Onychophora foram basais em todas as topologias. Quando se utilizou a máxima verossimilhança, o grupo Tardigrada se apresentou como grupo irmão dos Euarthropoda. O grupo Euarthropoda se mostrou monofilético e foi dividido em dois grupos: O grupo Myriochelata (formado pelo Chelicerata e Myriapoda) e Pancrustacea (Hexapoda e Crustacea) (figura 4).

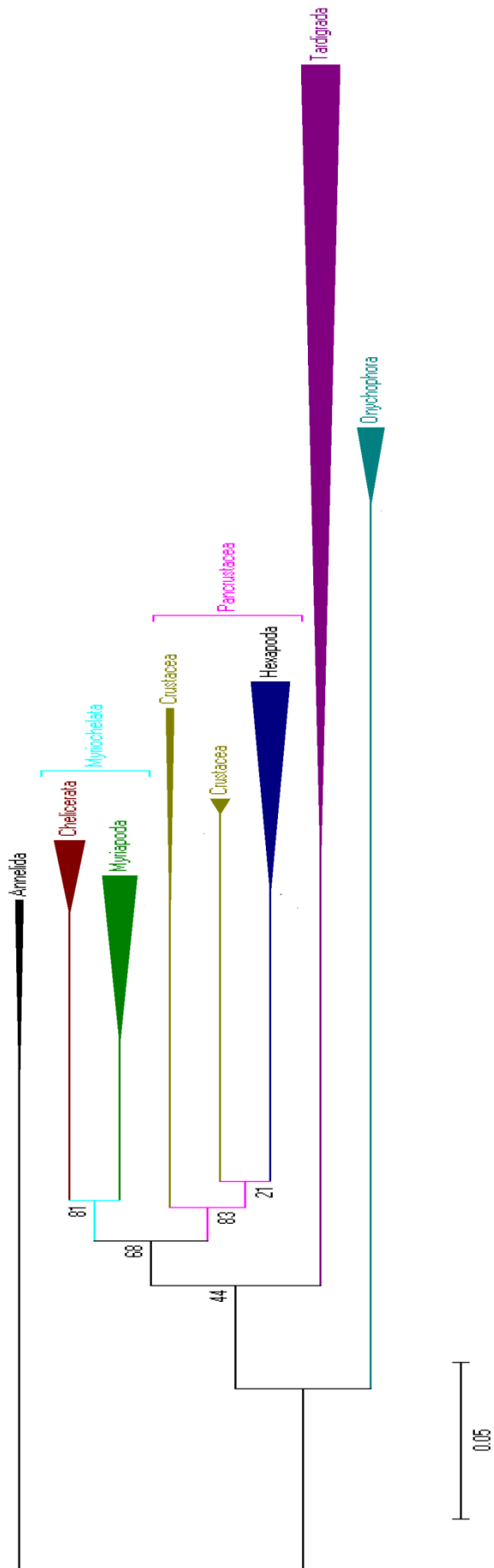


Figura 4: Resultado da filogenia do Panarthropoda com sequências do gene 18s utilizando a máxima verossimilhança (árvore compactada). Os números nos nós indicam o valor de bootstrap.

Quando foi utilizada a análise bayesiana, os Tardigrada foi posicionado juntamente com os Euarthropoda. Todo o grupo Euarthropoda foi monofilético e também foi observado o grupo Myriochelata e o grupo Pancrustacea (figura5).

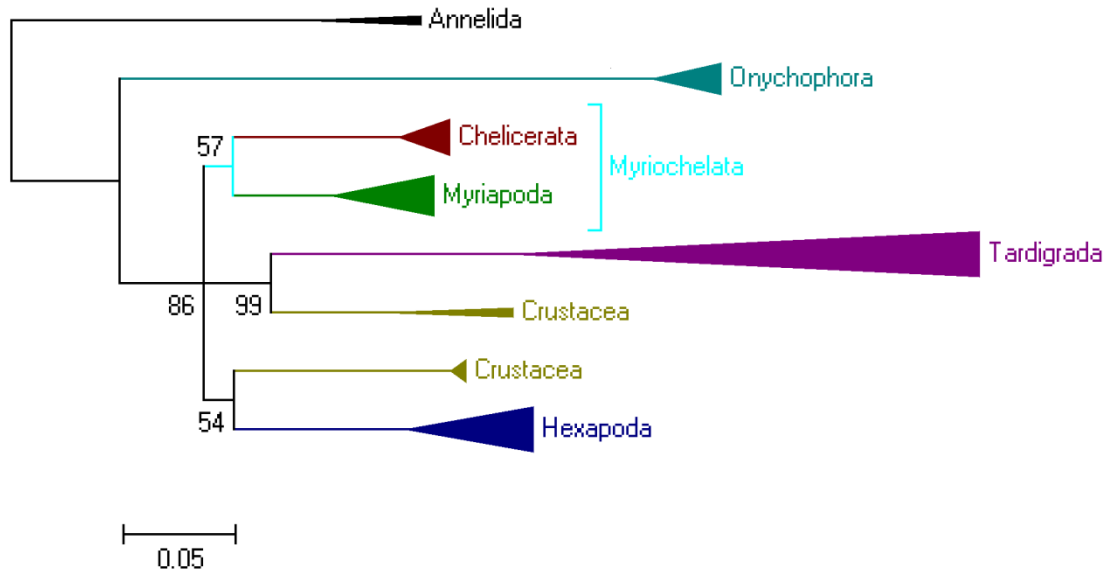


Figura 5: Resultado da filogenia do Panarthropoda com seqüências do gene 18S utilizando a análise bayesiana. Os números nos nós indicam probabilidade posterior.

Quando foi utilizada a máxima parcimônia, os Euarthropoda não foram monofiléticos. Os Tardigrada foram posicionados juntamente com o Hexapoda e alguns membros dos Crustacea foram grupos irmãos dos Euarthropoda mais Tardigrada. Dentro do Euarthropoda há o grupo Myriochelata (figura 6).

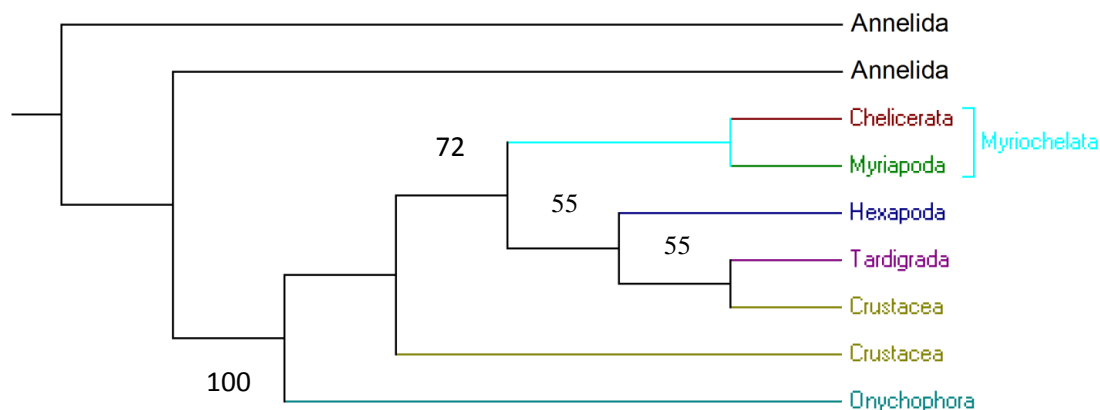


Figura 6: Resultado da filogenia dos Panarthropoda com seqüências do gene 18S utilizando máxima parcimônia. Os números nos nós indicam os valores de bootstrap.

4. DISCUSSÃO

A maioria dos estudos de filogenia dos Arthropoda inclui apenas os grupos Chelicerata, Crustacea, Myriapoda e Hexapoda considerados como membros do grupo Euarthropoda. Dois grupos, os Onychophora e os Tardigrada, são comumente utilizados como grupos externos para a compreensão da filogenia dos Euarthropoda. Entretanto, esses dois grupos são cruciais para a compreensão da evolução tanto dos Euarthropoda quanto do grupo Panarthropoda (Aguinaldo *et al.* 1997) porque eles podem ser considerados como basais deste grupo (Ryu *et al.* 2007).

Estudo molecular com a família da proteína hemocianina de Onychophora revelou que este grupo possui um tipo de proteína diferente daquele encontrado nos Euarthropoda. Este resultado sugere que os Onychophora seriam posicionados como grupo irmão dos Euarthropoda (Kusche *et al.* 2002).

Ainda não se tem certeza da real posição filogenética dos Onychophora. Alguns estudos morfológicos os relacionam com os Chelicerata (Strausfeld *et al.* 2006) ou como sendo os basais do grupo Panarthropoda (Kusche *et al.* 2002) e estudos moleculares colocam os Onychophora como sendo grupo irmão do Euarthropoda (Rota-Stabelli *et al.* 2010).

Os dados analisados deste trabalho resultaram na posição filogenética dos Onychophora sendo basal dentro dos Panarthropoda na análise bayesiana, máxima

parcimônia e máxima verossimilhança (Figuras 4, 5, e 6). Estudos moleculares com gene rDNA 18S (Aguinaldo *et al.* 1997), genes de histonas (Colgan *et al.* 1998) e Hox genes (Eriksson *et al.* 2009; Grenier *et al.* 1997) ratificam esse resultado.

A posição do grupo Tardigrada tem sido bastante discutida e ainda permanece incerta. Alguns estudos moleculares consideram esse grupo um filo separado do Panarthropoda (Mallatt *et al.* 2004; Regier & Shultz, 2001), e alguns estudos morfológicos os posicionam mais relacionados com os Nematoda devido a sua faringe com estilete (Dewel & Clark, 1973; Kinchin, 1992). Entretanto, o posicionamento mais próximo dos Tardigrada aos Nematoda pode ser efeito da atração do ramo longo. Estudos com genoma mitocondrial e análises multigênicas resultaram nesse posicionamento. O resultado foi testado em outros modelos evolutivos e com genes com número de substituições moderadas. Desta maneira os Tardigrada foram posicionados juntamente com os Euarthropoda (Philippe *et al.* 2005; Rota-Stabelli, 2009).

Há três possibilidades de posicionamento dos grupos Onychophora e Tardigrada dentro do Panarthropoda: os Onychophora como grupo basal e Tardigrada mais Euarthropoda como grupos irmãos, Onychophora mais Euarthropoda como grupos irmãos e Tardigrada como grupo basal ou Onychophora mais Tardigrada como grupos irmãos (Figura 7). Morfologicamente, Euarthropoda e Tardigrada como grupos irmãos é suportado por três características: esclerotização das placas dorsal e ventral, desintegração das fibras musculares abaixo da epiderme e coloração do complexo de golgi por bismuto (Schmidit-Rhaesa, 2001).

Estudos da filogenia dos Arthropoda com DNA mitocondrial, micro RNAs e proteínas encontrou suporte para Tardigrada mais Onychophora como grupos irmãos e a monofilia dos Panarthropoda (Rota-Stabelli *et al.*, 2009). Os resultados da máxima verossimilhança do presente trabalho demonstraram os Tardigrada e Euarthropoda como grupos irmãos apenas na análise de máxima verossimilhança, entretanto, com baixo valor de bootstrap (44) (figura 4).

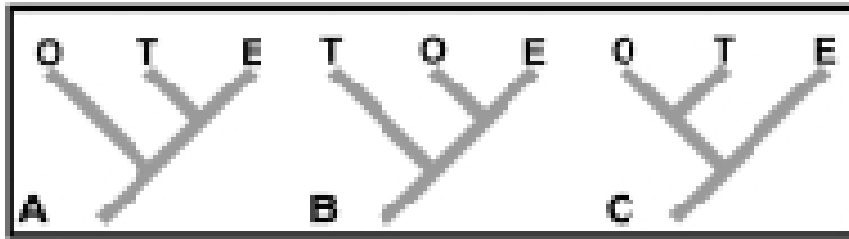


Figura 7 (Schmidit-Rhaesa, 2001): Três possibilidades para a filogenia do Panarthropoda. E= Euarthropoda; O= Onychophora e T= Tardigrada.

Nas topologias de análise bayesiana e parcimônia, encontra-se um alto valor de probabilidade posterior e de bootstrap para os Tardigrada sendo grupo irmão de Malacostraca (Crustacea) (Figura 5 e 6). Esta relação possivelmente pode ser ter sido efeito de atração do ramo longo (Matioli, 2001). Estudos filogenéticos do Panarthropoda com DNA mitocondrial também tiveram problemas com atração do ramo longo e tiveram como resultado os Tardigrada como grupo irmão dos Chelicerata, com altos valores de probabilidade posterior e bootstrap (Rota-Stabelli *et al.* 2010) (figura 8).

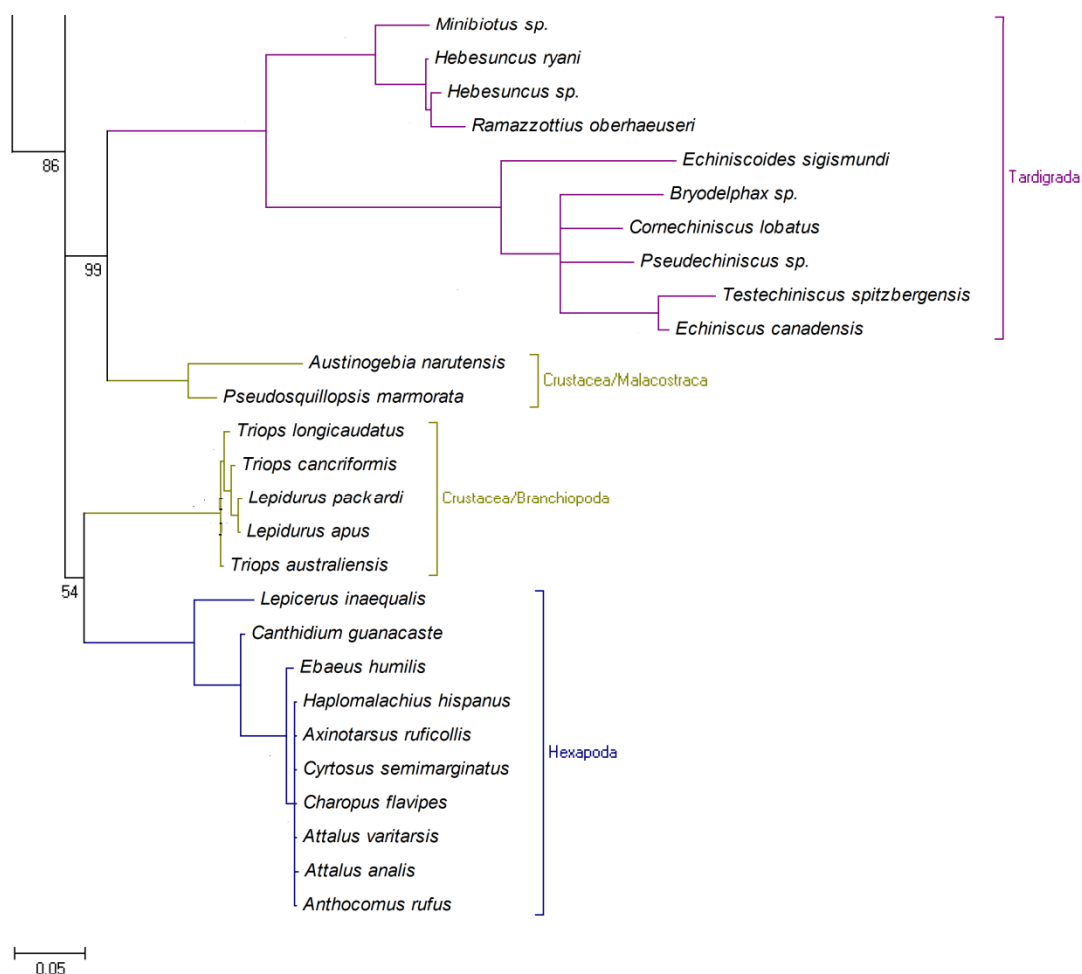


Figura 8: Região da topologia analisada com análise bayesiana incluindo o Tardigrada juntamente com o Crustacea. Possível atração do braço longo. Os números representam probabilidade posterior.

As amostras de Crustacea deste trabalho são de duas classes: Malacostraca (*Pseudosquillopsis marmorata* e *Austinogebia narutensis*) e Branchiopoda. Em estudos de filogenia do grupo Pancrustacea (Hexapoda mais Crustacea) (Aguinaldo *et al.* 1997; Giribet *et al.* 2007; Telford *et al.* 2008) estas duas classes tiveram relação mais próximas com os Hexapoda (Insecta) que com outros membros dos Crustacea, corroborando a hipótese que nem Hexapoda e nem Crustacea são grupos monofiléticos (Regier *et al.* 2005; Capelli *et al.* 2007). Cook *et al.* 2005 em seu estudo com proteínas, demonstrou que o Malacostraca e Branchiopoda são grupos irmãos de Hexapoda e que o grupo dos Crustacea não é monofilético.

Neste trabalho não houve suporte estatístico para a separação de Hexapoda e Crustacea como grupos irmãos formando o Pancrustacea. Entretanto, na análise de máxima verossimilhança, os indivíduos da classe Malacostraca foram separados com

bom suporte estatístico do grupo que contém Hexapoda e Branchiopoda (83 de bootstrap), ratificando a hipótese que os Malacostraca seriam grupo irmão de Hexapoda e este não seria monofilético (figura 9). Na análise bayesiana e na máxima parcimônia os valores de bootstrap e probabilidade posterior foram baixos (Figura 5 e 6). Dados morfológicos da anatomia do cérebro suportam esta teoria (Harzsch, 2002) (figura 7).

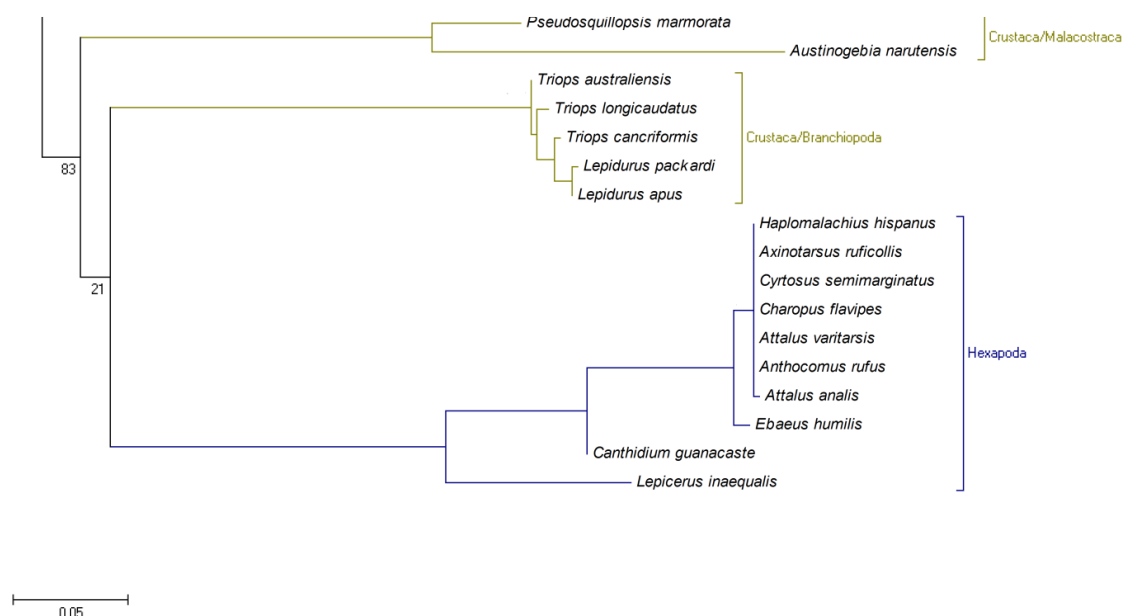


Figura 9: Região da topologia de máxima verossimilhança mostrando o Pancrustacea. Os números representam o valor de bootstrap. A classe de Crustacea denominada Malacostraca se apresentou como grupo irmão de Hexapoda mais outra classe de Crustacea, a Branchiopoda.

A posição do grupo Myriapoda ainda é incerta e tem sido bastante debatida. Eles já foram considerados grupo irmão do Hexapoda que juntos formavam o grupo denominado Aterocerata. Unindo os Aterocerata com Onychophora formavam o grupo Uniramia (Telford *et al.* 2008).

O presente trabalho resultou num suporte molecular para a hipótese do Myriochelata ou Paradoxopoda (Janssen *et al.* 2011; Mayer & Whittington, 2009) pois os Myriapoda foram posicionados como grupo irmão dos Chelicerata com um valor alto de bootstrap para a análise de máxima verossimilhança (81) (figura 10). A análise de

parcimônia resultou num valor não significativo e a análise bayesiana resultou num moderado valor de probabilidade posterior (57) (Figura 5 e 6).

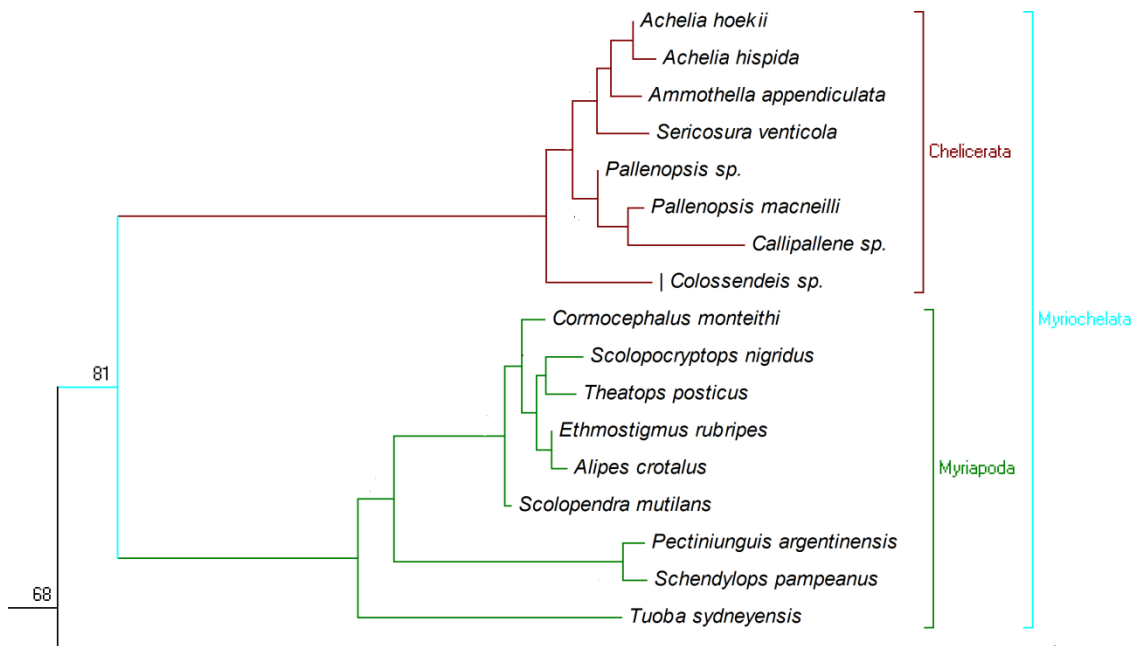


Figura 10: Região da topologia de máxima verossimilhança demonstrando o grupo Myriochelata. Os números nos nós representam os valores de bootstrap.

O grupo Myriochelata também foi encontrado com suporte estatístico em estudos com DNA mitocondrial (Podsiadlowski *et al.* 2008), no trabalho com Hox genes (Cook *et al.* 2005) e vai contra a teoria do grupo Mandibulata, onde seriam irmãos os grupos Hexapoda, Crustacea e Myriapoda (Aguinaldo *et al.* 1997; Telford *et al.* 2008; Eriksson *et al.* 2009). Isto pode ser um indício que a mandíbula estava presente no ancestral e foi perdida no grupo dos Chelicerata ou então houve evolução convergente da mandíbula nos Myriapoda e no grupo Pancrustacea (Cook *et al.* 2005).

Em seu trabalho com genoma mitocondrial, Rota-Stabelli, 2009 encontrou suporte molecular para o Myriochelata. Entretanto, quando se alterava o modelo evolutivo e se retirava as amostras com maior taxa de evolução, o suporte para o Myriochelata diminuía e aumentava o suporte para o Mandibulata, o que o levou a conclusão que a hipótese do Myriochelata poderia ser causada pela atração do ramo longo e que a posição do Myriapoda é modelo dependente.

A tabela abaixo contém os artigos presentes na discussão com os marcadores utilizados e seus respectivos resultados.

Tabela 2 – Lista artigos utilizados na discussão organizados de acordo com o tipo de estudo e resultado.

Autor	Tipo de estudo	Resultado
Aguinaldo <i>et al.</i> , 1997	Molecular - Gene de rRNA	Onychophora como basal dos Panarthropoda
Capelli <i>et al.</i> , 2007	Molecular - genes de proteínas mitocondriais	Malcostraca e Branchiopoda mais relacionados com Hexapoda
Colgan <i>et al.</i> , 1998	Molecular - Genes de Histonas	Onychophora como basal dos Panarthropoda
Cook <i>et al.</i> , 2005	Molecular - Hox genes	Myriapoda como grupo irmão de Chelicerata
Dewel & Clark, 1973	Morfológico - Anatomia da faringe	Tardigrada relacionados com Nematoda
Eriksson <i>et al.</i> , 2009	Molecular - Hox genes	Onychophora como basal dos Panarthropoda
Grenier <i>et al.</i> , 1997	Molecular - Hox genes	Onychophora como basal dos Panarthropoda
Harzsch, 2002	Morfológico - anatomia do cérebro	Malcostraca e Branchiopoda mais relacionados com Hexapoda
Janssen <i>et al.</i> , 2011	Molecular - expressão do gene <i>collier</i>	Myriapoda como grupo irmão de Chelicerata
Kinchin, 1992	Morfológico - Anatomia da faringe	Tardigrada relacionados com Nematoda
Kusche <i>et al.</i> , 2002	Molecular - Hemocianina	Onychophora como basal dos Euarthropoda
Mallat <i>et al.</i> , 2004	Molecular - Gene de rRNA	Tardigrada como um filo separado dos Panarthropoda
Mayer & Whittington, 2009	Morfológico - caracteres embrionários	Myriapoda como grupo irmão de Chelicerata
Nielsen, 2001	Morfológico - Segmentação	Visão tradicional
Philippe <i>et al.</i> , 2005	Molecular - Análise multigênica	Tardigrada relacionados com Euarthropoda
Podsiadlowski <i>et al.</i> , 2008	Molecular - DNA mitocondrial	Myriapoda como grupo irmão de Chelicerata
Regier <i>et al.</i> , 2005	Molecular - gene de proteínas nucleares	Malcostraca e Branchiopoda mais relacionados com Hexapoda
Regier & Shultz, 2001	Molecular - Gene de fator de alongação	Tardigrada como um filo separado dos Panarthropoda
Rota-Stabelli <i>et al.</i> , 2009	Molecular - Genoma mitocondrial	Tardigrada Relacionados com Euarthropoda
Rota-Stabelli <i>et al.</i> , 2010	Molecular - Genoma mitocondrial	Onychophora como grupo irmão dos Euarthropoda
Ryu <i>et al.</i> , 2007	Molecular - Genoma mitocondrial	Onychophora e Tardigrada como basais do Panarthropoda
Schmidit-Rhaesa, 2001	Morfológico -Fibras musculares	Tardigrada como grupo irmão de Euarthropoda
Strausfeld <i>et al.</i> , 2006	Morfológico - anatomia cerebral	Onychophora como grupo irmão de Chelicerata
Telford <i>et al.</i> , 2008	Molecular e morfológico	Malcostraca e Branchiopoda mais relacionados com Hexapoda

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho foram similares aos de outros trabalhos sobre o mesmo tema. Entretanto, não apresentaram suporte estatístico para a resolução da posição filogenética do Filo Onychophora.

Dentro do grupo dos Euarthropoda, o grupo Myriochelata apresentou bom suporte estatístico e foi de acordo com os trabalhos consultados.

Para um melhor entendimento da filogenia do Filo Onychophora são necessários mais estudos envolvendo concomitantemente vários genes e também caracteres morfológicos para dar maior suporte estatístico à análise. Estes estudos filogenéticos devem envolver todos os subgrupos do grupo Panarthropoda.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adoutte, A.; Balavoine, G.; Lartillot, N.; Lespinet, O.; Prud'homme, B.; Rosa, R. (2000). The new animal phylogeny: Reliability and implications. *PNAS*. 97: 4453-4456.
- Aguinaldo, A.M.A.; Tuberville, J.M.; Lindford, L.S.; Rivera, M.C.; Garey, J.R.; Raff, R.A.; Lake, J.A. (1997). Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*. 38: 489-493.
- Anderson, D.T. (1973). Embriology and phylogeny of Annelids and Arthropods. International series of monographs in pure and applied biology. *Zoology* 50. Oxford.Pergamum Press.
- Barnes, R.D.; Fox, R.S.; Ruppert, E.E. (2005). Zoologia dos invertebrados: uma abordagem evolutiva. 7ªed. São Paulo: Roca.1144p.
- Bargues, M.D. & Mas-Coma, S. (1997). Phylogenetic Analisis os Lymnaeid Snails based on 18S rDNA sequences. *Molecular Biology Evolution*. 14: 569-577.
- Beamont, M.A. & Ranala, B.(2004). The bayesian revolution in genetics. *Nature*. 5: 251-261.
- Boore, J. L.; Collins, T. M.; Stanton, D.; Daehler, L. L.; Brown, W. M. (1995). Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. *Nature*. 376:163–165.
- Brocchieri, L. (2001). Phylogenetics Inference from Molecular Sequence: Review and Critique. *Theoretical Population Biology*. 59: 27-40.
- Brusca, R. & Brusca, G.J. (2007). Invertebrados. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 878p.
- Capelli, A.; Liò, P.; Nardi, F.; What, E.V.D.; Frati, F. (2007). Phylogenetic analysis of mitochondrial protein coding genes confirms the reciprocal paraphyly of Hexapoda and Crustacea. *Evolutionary Biology*. 7: 1-13.
- Chapman, A. (2005). Numbers of living species in Australia and the World. Report, Department of the Environment and Heritage, Canberra, Australia.
- Colgan, D. J.; McLaughlan, A.; Wilson, G. D. F.; Livingston, S. P.; Edgecomb, G. D.; Macaranas, J.; Cassis, G.; Gray, M. R. (1998). Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Aust. J. Zool*. 46:419–437.
- Cook, C. E.; Yue, Q.; Akam, M. (2005). Mitochondrial genomes suggest that hexapods and crustaceans are mutually paraphyletic. *Proceedings of the Royal Society B*. 272: 1295–1304.
- Delsuc, F., Philips, M. J. & Penny, D. (2003). Comment on “hexapod origins: monophyletic or paraphyletic?”. *Science*. 301: 1482–1483.
- Dewel, R. A. & Clark, W. H. (1973). Studies on the tardigrades. II. Fine structure of the pharynx of *Milnesium tardigradum* Doyère. *Tiss. Cell*. 5:161–169.

- Dohle, W. (1997). Are the insects more closely related to the crustaceans than to the myriapods? *Entomol. Scand. Suppl.* 51: 7–16.
- Eriksson, B.J.; Tait, N.N.; Budd, G.E.; Akam, M. (2009). The involvement of engrailed and wingless during segmentation in the onychophoran *Euperipatoides kanangrensis* (Peripatopsidae: Onychophora). *Dev Genes Evol.* 219:249–264.
- Faria, C.U.D.; Magnabosco, C.D.U.; Reyes, A.D.L.; Lôbo, R.B.; Bezerra, L.A.F. (2007). Inferência Bayesiana e sua aplicação na avaliação genética de bovinos da raça nelore: revisão bibliográfica. *Ciência Animal Brasileira.* 8: 75-86
- Futuyma, D.J. (2005). *Evolution*. Massachusetts: Sinauer Associates. 608p.
- Fryer, G. (1992). The origin of the Crustacea. *Acta Zoologica (Stockholm).* 73: 273-286.
- Friedrich, M. & Tautz, D. (1995). rDNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods. *Nature.* 376: 165–167.
- Garey, J. R.; Krotec, M.; Nelson, D. R.; Brook, J. (1996). Molecular analysis supports a tardigrade-arthropod association. *Inv. Biol.* 115: 79–88.
- Giribet, G.; Carranza, S.; Bagná, J.; Riutort, M.; Ribera, C.(1996). First molecular evidence for the existence of a Tardigrada+ Arthropoda clade. *Mol. Biol. Evol.* 13: 76–84.
- Giribet,G.; Edgecombe,G.; Wheeler,W. C. (2001). Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. *Nature.* 413:157–161.
- Giribet, G.; Dunn, C.W.; Edgecomb, G.D.; Rouse, G.W. (2007). A modern look at the Animal Tree of Life. *Zootaxa.* 1668: 61-79.
- Grenier, J. K.; Garber, T. L.;Warren, R.; Whittington, P. M.; Carroll, S. (1997). Evolution of the entire arthropod Hox gene set predated the origin and radiation of the onychophoran/arthropod clade. *Curr. Biol.* 7: 547–553.
- Guidetti, R. & Bertolani, R. (2005). Tardigrade taxonomy: na updated check list of the taxa and a list of characters for their identification. *Zootaxa.* 845:1–46.
- Guindon, S.; Dufayard, J.F.; Lefort, V.; Anisimova M.; Hordijk, W.; Gascuel, O.(2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML3.0. *Systematic Biology.* 59:307-21.

- Griffiths, A.J.F.; Wessler, S.R.; Lewontin, R.C.; Gelbart, W.M.; Suzuki, D.T.; Miller, J.H. (2008). Introdução à genética. 8ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 743p.
- Harzsch, S. (2002). The phylogenetic significance of crustacean optic neuropils and chiasmata: a re-examination. *J. Comp. Neurol.* 453: 10–21
- Harzsch, S. (2004). Phylogenetic comparison of serotoninimmunoreactive neurons in representatives of the Chilopoda, Diplopoda, and Chelicerata: implications for arthropod relationships. *Journal Morphology.* 259:198–213.
- Hennig, W. (1981): Insect Phylogeny John Wiley, New York
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F.; MRBAYES: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics application note.* 17: 754-755.
- Hwang, U. W.; Friedrich, M.; Tautz, D.; Park, C. J.; Kim, W. (2001). Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. *Nature.* 413: 154–157.
- Hyman, L. H. 1940. The Invertebrates. In: Fortey, R.A.; Thomas, R.H.. editors. Arthropod relationships. London: Chapman e Hall. p. 14.
- Janssen, R.; Damen, W.G.M.; Budd, G.E. (2011). Expression of collier in the premandibular segment of myriapods: support for the traditional Atelocerata concept or a case of convergence? *Evolutionary biology.* 1472-2148.
- Jenner, R.A. & Littlewood, D.T.J. (2007). Problematica old and new. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2008 363: 1503-1512.
- Kinchin, I. M. (1992). What is a tardigrade? *Microscopy (London).* 36: 628–634.
- Kusche, K.; Ruhberg, H.; Burmester, T. (2002). A hemocyanin from the Onychophora and the emergence of respiratory proteins. *PNAS.* 99: 10545-10548.
- Lartillot, N. & Philippe, H. (2008) Improvement of molecular phylogenetic inference and the phylogeny of Bilateria. Philosophical. *Transactions of the Royal Society B.* 363: 1463–1472.
- Lewin, B. (2004). Genes VIII. New York: Pearson prectice hall. 1006p.
- Mallatt, J. M.; Garey, J. R.; Shultz, J. W. (2004). Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin. *Mol. Phlyogenet. Evol.* 31: 178–191.
- Manton, S.M. (1972). The evolution of arthropod locomotry machanisms. Locomotry habits, morphology and evolution of the hexapod classes. *Zool.J.Linn. Soc.* 63:1-21.

- Manton, S.M. (1973). Arthropod phylogeny-A modern synthesis. *J.Zool (London)*. 171:111-130.
- Manton, S.M. (1977). The arthropoda: habits, functional morphology and evolution. London. Oxford University Press
- Matioli, S.R. (2001). Biologia molecular e evolução. Ribeirão Preto: Holos. 202p.
- Mayer, G.; Ruhberg, H.; Bartolomaeus, T. (2004). When na epithelium ceases to exist—an ultrastructural study on the fate of the embryonic coelom in *Epiperipatus biolleyi* (Onychophora: Peripatidae). *Acta Zool*. 85:163–170.
- Mayer, G. & Whittington, P.M. (2009). Neural development in Onychophora (velvet worms) suggests a step-wise evolution of segmentation in the nervous system of Panarthropoda. *Developmental Biology*. 335: 263-275.
- Meidanis, J. & Setúbal, J.C. (1994). Uma introdução à biologia computacional. Trabalho, preparado para a IX Escola de Computação, realizada em Recife. Recife: 1994. 296p.
- Monge-Najera, J. (1995). Phylogeny, biogeography and reproductive trends in the Onychophora. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 114: 21-60.
- Nardi, F.; Spinsanti, G.; Boore, J. L.; Carapelli, A.; Dallai, R.; Frati, F. (2003). Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic? *Science*. 299: 1887–1889.
- NCBI – National Center for Biotechnology Information. National library of medicine, National health institutes. BLAST. Washington, DC, 2011. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em dezembro de 2010.
- NCBI – National Center for Biotechnology Information. National library of medicine, National health institutes. Genbank. Washington, DC, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>. Acesso em dezembro de 2010.
- Nielsen, C. (1997). The phylogenetic position of the Arthropoda. In: Fortey, R.A., Thomas, R.H., editors. *Arthropod relationships*. London: Chapman e Hall. p. 11–22.
- Nielsen, C. (2001). Animal Evolution: Interrelationships of the Living Phyla. 2^a ed. Oxford: Oxford University Press
- Nielsen, C. (2002). Proposing a solution to the Articulata–Ecdysozoa controversy. *Zoologica Scripta*. 32: 475-482.
- Page, R.D.M. & Holmes, E.C. (1998). Molecular evolution: A phylogenetic approach. Oxford: Blackwell Science. 346p.
- Park, J.K.; Rho, H.S.; Kristensen, R.M.; Kim, W.; Giribet, G. (2006). First molecular data on the phylum loricifera: an investigation into the phylogeny of ecdysozoa with emphasis on the positions of loricifera and priapulida. *Zool Sci*. 23:943–954

Philippe, H.; Lartillot, N.; Brinkmann, H. (2005). Multigene Analyses of Bilaterian Animals Corroborate the Monophyly of Ecdysozoa, Lophotrochozoa, and Protostomia. *Molecular Biology and Evolution*. 22: 1246-1253.

Podsiadlowski, L.; Braband, A.; Mayer, G. (2008). The complete mitochondrial genome of the onychophoran *Epiperipatus biolleyi* reveals a unique transfer RNA set and provides further support for the ecdysozoa hypothesis. *Mol Biol Evol*. 25:42–51.

Posada, D. & Crandal, K.A. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatic Application note*. 14: 817-818.

Prodoscimi, F.; Cerqueira, G.C.; Binneck, E.; Silva, A.F.; Reis, A.N.; Junqueira, A.C.M.; Santos, A.C.F.; Júnior, A.N.; Wust, C.I.; Filho, F.C.; Kessedjan, J.L.; Petreski, J.H.; Camargo, L.P.; Ferreira, R.G.M.; Lima, R.P.; Pereira, R.M.; Jardim, S.; Sampaio, V.S.; Folgueras-Flatschart, A.V. (2002). Bioinformática: manual do usuário. *Revista de Biotecnologia*. 29: 12-25.

Ramazzotti, G. & Maucci, W. (1983). II Phylum Tardigrada. Terza deizoine rivenduta e corretta. *Me. Ist. Ital. Idrobiol. Dott. Marco Marchi*. 42: 1–1012.

Reid A.L. (1996). Review of the peripatopsidae (Onychophora) in Australia, with comments on peripatopsid relationships. *Invertebr Taxon*. 10:663–936.

Regier, J. C. & Shultz, J. W. (2001). Elongation factor-2: A useful gene for arthropod phylogenetics. *Mol. Phlyogenet.Evol*. 20: 136–148.

Regier, J. C.; Shultz, J. W.; Kambic, R. E. (2005). Pancrustacean phylogeny: hexapods are terrestrial crustaceans and maxillopods are not monophyletic. *Proceedings of the Royal Society B*. 272: 395–401.

Rota-Stabelli, O. (2009). Molecular approaches to the study of ecdysozoan evolution. Tese (Doutorado em Filosofia). University College London

Rota-Stabelli, O.; Kayal, E.; Gleeson, D.; Daub, J.; Boore, J.L.; Telford, M.J.; Pisani, D.; Blaxter, M.; Lavrov, D.V. (2010). Ecdysozoan Mitogenomics: Evidence for a Common Origin of the Legged Invertebrates, the Panarthropoda. *Genome Biology and Evolution*. 2: 425-440.

Ryu, S.H.; Lee, J.M.; Jang, K.H.; Choi, E.H.; Park, S.J.; Chang, C.Y.; Kim, W.; Hwang, U.W. (2007). Partial Mitochondrial Gene Arrangements Support a Close Relationship between Tardigrada and Arthropoda. *Molecular and cells*. 24: 351-357.

Schneider, H. (2003). Métodos de análise filogenética: um guia prático. 2ª ed. Ribeirão preto. Holos. 114p.

Schmidt-Rhaesa, A. (2001). Tardigrades—are they really miniaturized dwarfs? *Zoologischer Anzeiger*. 240: 549–555.

Scholtz, G. (2002). The Articulata hypothesis—or what is a segment? *Org Divers Evol.* 2:197–215

Scholtz, G. & Edgecombe GD (2005). Heads, Hox and the phylogenetic position of trilobites. In: Koenemann S and Jenner R (eds) *Crustacea and Arthropod relationships. Crustacean Issues.* 16:139–165

Snodgrass, R.E. (1938). Evolution of the Annelida, Onychophora and Arthropoda. In: Fortey, R.A. & Thomas, R.H. editors. *Arthropod relationships.* London: Chapman e Hall. p.13.

Strausfeld, N.J.; Strausfeld, C.M.; Loesel, R.; Rowell, D.; Stowe, S. (2006). Arthropod phylogeny: onychophoran brain organization suggests an archaic relationship with a chelicerate stem lineage. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 273:1857–1866.

Swofford, D.L. (2002). *Phylogenetic Analysis Using Parsimony – PAUP.* (and another methods). Versão 4.0 Beta. Sinauer Associates. Sunderland Massac.

Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596–1599.

Telford, M. J. & Thomas, R. H. (1995). Demise of the Atelocerata? *Nature.* 376: 123–124.

Telford, M.J.; Boullat, S.J.; Economou, A.; Papiion, D.; Rota-Stabelli, O. (2008). The evolution of Ecdysozoa. *Phylosophical Transactions of the Royal Society B.* 363: 1529–1537.

Tiegs, O.W. & Manton, S.M. (1958). The evolution of the Arthropoda. *Biol. Rev.* 33: 225–337

Wägele, J.W.; Erikson, T.; Lockhart, P.; Misof, B. (1999). The Ecdysozoa: artifact or monophylum? *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 37:211–223

Wägele, J.W. & Misof, B. (2001). On quality of evidence in phylogeny reconstruction: a reply to Zrzavý's defence of the 'Ecdysozoa' hypothesis. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 39:165–176

Woese, C.R.; Kandler, O.; Wheelis, M.L.(1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4576–4579.

Yang, Z. (2006). *Computational Molecular Evolution.* New York: Oxford University press. 357p.