



## Frequência alélica e genotípica do gene *CzEst9* associado à resistência a piretróides em populações *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)<sup>1</sup>

Gustavo Resende Antunes<sup>2</sup>, Aline Pasqualini Faza<sup>3</sup>, Isabela Fonseca<sup>3</sup>, Daisyléa de Souza Paiva<sup>2</sup>, Marta Fonseca Martins Guimarães<sup>4</sup>, Márcia Cristina de Azevedo Prata<sup>4</sup>, John Furlong<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Financiado pela FAPEMIG

<sup>2</sup>Alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica - UFJF. E-mail: guto1982@gmail.com, daisyufff@gmail.com

<sup>3</sup>Bolsistas de Apoio Técnico à Pesquisa - BAT II - FAPEMIG. E-mail: alinefaza@yahoo.com.br, isabela\_fonseca@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora (MG). E-mail: mmartins@cnpgl.embrapa.br, mprata@cnpgl.embrapa.br, john@cnpgl.embrapa.br

**Resumo:** O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) é uma das principais pragas dos rebanhos bovinos no Brasil, causando grandes prejuízos econômicos para os produtores. O uso incorreto e indiscriminado de carrapaticidas tem selecionado e disseminado genótipos resistentes. A presença de uma mutação no gene *CzEst9*, que codifica para uma carboxilesterase, tem sido associada à resistência a piretróides devido a uma atividade enzimática aumentada. Neste trabalho, 87 larvas de *R. (B.) microplus*, de 70 municípios distintos de Minas Gerais, foram genotipadas para o gene *CzEst9* por meio da técnica de PCR-RFLP. A digestão com a enzima *EcoR* I, permitiu diferenciar o alelo mutante do selvagem. O alelo mutante (M), responsável pelo fenótipo de resistência, estava presente em 48% e o alelo selvagem (W) em 52% das cepas. Das cepas analisadas, 24% apresentaram genótipo homocigoto selvagem (W), consideradas sensíveis, 48% eram heterocigotos (H), com resistência moderada, e 28% de homocigotos mutantes (M). De acordo com estes dados, levando em consideração apenas o gene *CzEst9*, espera-se que encontremos no Estado de Minas Gerais um perfil de resistência moderada a piretróides. Entretanto, é necessário ressaltar que os mecanismos de resistência aos carrapaticidas ainda não estão completamente elucidados, envolvendo diversas rotas metabólicas e enzimáticas, que também podem atuar na expressão da resistência global, sendo necessárias outras análises.

**Palavras-chave:** carrapato dos bovinos, equilíbrio de Hardy-Weinberg, esterases, reação em cadeia da polimerase

### Genotypic and allelic frequency of an esterase-encoding gene associated with pyrethroid resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)

**Abstract:** The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) is one of the principal pests in cattle in Brazil which cause major economic losses for producers. The intensive and indiscriminate use of pesticides has led to the selection and dissemination of resistant genotypes. A mutation in an esterase-encoding gene, denominated *CzEst9*, which hydrolyzes pyrethroids, has been associated to pyrethroid-resistant strains. In the present study, 87 *R. microplus* larvae, from 70 different regions of Minas Gerais, were genotyped, for the gene *CzEst9*, by PCR-RFLP. *EcoR* I digestion of the amplified products allows to identify the presence of the mutated allele. The PCR assays showed that the mutant allele (M) was present in 48% and the wild allele (W) in 52% of the strains, at similar frequencies. The homozygous wild genotype (W) was in 24% of the strains analyzed, considered susceptible to pyrethroids, 48% were heterozygous (H), with moderate resistance, and 28% of mutant homozygotes (M), resistant. According to these data, taking into account only the *CzEst9* gene, is expected to find in the State of Minas Gerais a profile of moderate resistance to pyrethroids. However, it is necessary to emphasize that the mechanisms of pesticides resistance are still unknown, involving several enzymes and metabolic routes that may also act in the global expression of resistance, requiring further analysis.

**Keywords:** cattle tick, esterases, Hardy-Weinberg equilibrium, polymerase chain reaction

### Introdução

O carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae), é um importante vetor de agentes patogênicos que afetam o rebanho bovino e é responsável por grandes prejuízos econômicos para os criadores de gado, devido à perda de peso dos animais,

redução da produção de carne e leite, danos ao couro e gastos com produtos químicos para combate à praga, aumentando os custos de produção. De acordo com dados do Ministério da Agricultura, os prejuízos econômicos no Brasil podem chegar a dois bilhões anuais (Grisi et al, 2007).

Diversas formas de controle não químico têm sido pesquisadas como alternativa ao controle químico, incluindo o rodízio e cultivo de pastagens que dificultem a sobrevivência das fases de vida livre do carrapato, seleção de raças bovinas menos sensíveis aos carrapatos, uso de predadores naturais, fungos entomopatogênicos e nematóides. Mas o controle químico utilizando carrapaticidas ainda é a principal medida utilizada no combate aos carrapatos. Essa forma de controle tem sido responsável pela seleção e proliferação de genótipos resistentes em populações deste carrapato devido ao uso incorreto e indiscriminado das poucas bases químicas disponíveis (Freitas et al, 2005). Vários mecanismos, como a modificação de sítios-alvo e aumento da detoxificação metabólica por esterases, oxidases e glutatona S-transferases, são atribuídos à resistência de carrapatos aos carrapaticidas (Baffi et al., 2007; Hernandez et al, 2002).

A origem genética desta resistência é estudada por diversos pesquisadores que a relacionam a uma série de mutações em genes codificadores de diferentes grupos de enzimas, mutações em canais de sódio etc. Hernandez et al. (2002) relataram a substituição de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 1120 de um gene codificador de uma carboxilesterase em *R. microplus*, conhecida como CzEst9. Esta mutação gera um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *EcoR* I. Este grupo observou que a substituição deste nucleotídeo ocorria em uma frequência muito mais alta nas populações de *R. microplus* que, em geral, apresentavam resistência aumentada a piretróides em comparação com as cepas que eram sensíveis. Acredita-se que a mutação neste gene seja responsável por uma atividade hidrolítica aumentada e isto leve à resistência a piretróides.

O objetivo desse trabalho foi genotipar, para o gene *CzEst9*, 87 populações de larvas de *R. microplus*, provenientes de 70 municípios do Estado de Minas Gerais, e analisar as frequências alélicas para traçar o perfil genotípico de resistência a piretróides dos carrapatos de bovinos no Estado. Desta forma, será possível auxiliar os produtores rurais por meio de programas de controle estratégicos de *R. microplus*, promovendo a redução da pressão de seleção para resistência aos carrapaticidas.

### Material e Métodos

Para genotipar cada larva quanto à presença da substituição da guanina pela adenina no gene *CzEst9*, o método descrito por Hernandez et al. (2002) foi utilizado. Para isso, o DNA genômico de 87 larvas de *R. microplus*, que estavam mantidas no Banco de Larvas do Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite a -80 °C, foi extraído de larvas individuais após maceração em 300 µL de Tampão de *Grinding* (10 mM Tris-HCl, 60 mM NaCl, 30 mM sacarose, 10 mM EDTA) em um microtubo de 1,5 mL, no qual acrescentou-se 300 µL de Tampão de Lise (300 mM Tris-HCl, 40 mM SDS, 20 mM EDTA) e incubou-se no gelo por 15 minutos. Decorrido este tempo, foram acrescentados 5 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e as amostras foram incubadas a 45°C por uma hora. Em sequência, acrescentou-se um volume igual de fenol:clorofórmio:isoamil (24:24:1), misturou-se por pipetagem e centrifugou-se por 5 minutos a 17.000 x g. A fase superior foi transferida para um novo microtubo e foi acrescentado um volume igual de clorofórmio:isoamil (24:1) e, novamente, misturados por pipetagem. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 17.000 x g e a fase superior foi transferida para outro microtubo de 2 mL, acrescentou-se então 60 µL de NaCl 5 M e 1500 µL de etanol para a precipitação do DNA. As amostras foram incubadas a -20°C por no mínimo 14 h e após esse tempo foram centrifugadas por 30 minutos a 17.000 x g. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. O pelete foi lavado com 100 µL de etanol 70%, centrifugado por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante em seguida. Após secagem do pelete, ressuspendeu-se em 20 µL de água e o DNA foi quantificado por meio de espectrofotometria (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific).

Para a amplificação do DNA genômico foi usado um par de *primers*, descrito Hernandez et al. (2002), para o gene *CzEst9*. Na reação de PCR foram utilizados 20 ng de DNA, 0,5 µM de cada *primer* e 1X de *GoTaq®Green Master Mix* (Promega), em volume final de 20 µL. A PCR consistiu de uma desnaturação prévia de 95°C por 5 min, seguida por 40 ciclos, sendo 10 ciclos de 95°C por 1 min, 70°C por 1 min com decréscimo de 1°C por ciclo e 72°C por 1 min, em seguida 30 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min e, finalmente, extensão final de 72°C por 7 min.

Foi realizada a digestão do produto da PCR com a enzima *EcoR* I a 37°C por 3 h e submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado em solução de brometo de etídio. Sendo possível a obtenção de três padrões de bandas. O primeiro é representado por uma banda não digerida de 372 pb, representando o genótipo homocigoto selvagem (W) para o gene *CzEst9*, considerado susceptível aos piretróides. O segundo padrão é composto de duas bandas, uma de 300 e outra 72pb, representando o genótipo homocigoto mutante (M), considerado resistentes aos piretróides. E, por fim, o terceiro padrão,

o genótipo heterozigoto (H) contendo três bandas: 372, 300 e 72 pb, que apresenta uma resistência moderada a essa base química.

As frequências gênicas e genotípicas da população foram calculadas e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado pelo Teste  $\chi^2$  (Qui-Quadrado) considerando um nível de significância de 5%.

### Resultados e Discussão

Das 87 larvas genotipadas para o gene *CzEst9*, o alelo mutante estava presente em 48% e o alelo selvagem em 52%. Das cepas analisadas, 24% apresentaram genótipo homozigoto selvagem, consideradas, por este método, sensíveis; 48% eram heterozigotos, com resistência moderada; e 28% de homozigotos mutantes, resistentes. Este perfil difere do resultado encontrado por Guerreiro & Hernandez (2002), nas cepas denominadas Coatzacoalcos (Cz), coletadas em um rancho próximo a Veracruz, no México, que apresentaram 62% de homozigotos mutantes (M), 28% de heterozigotos (H) e 8% de homozigotos selvagem (W) para os locos *CzEst9*. As cepas Cz apresentaram alta atividade hidrolítica de esterase *CzEst9* e uma elevada resistência a piretróides em um bioensaio realizado por Guerreiro & Hernandez (2002). Em cepas denominadas San Felipe (SF), que apresentaram baixa resistência para piretróides no bioensaio, foi verificado o perfil de 5, 25 e 69% de W, H e M, respectivamente, oposto ao perfil das cepas Cz. De acordo com estes dados, espera-se que na população de larvas analisadas neste trabalho, cerca de 24% sejam altamente resistentes à piretróides, 48% apresentem resistência moderada e 28% sejam sensíveis a esta base química. Entretanto é necessário ressaltar que os mecanismos de resistência aos carrapaticidas ainda é pouco conhecido, envolvendo diversas rotas metabólicas e enzimáticas. Com isto, a relação de resistência ou susceptibilidade a uma determinada base química depende de outros genes e sua expressão relativa. Levando em consideração apenas o gene *CzEst9*, frente as cepas mexicanas, Cz e SF, espera-se que o perfil de resistência a piretróides dos carrapatos no Estado de Minas Gerais seja intermediário às duas situações, com um perfil de resistência moderada prevalecendo. Entretanto, posto que a resistência é um processo complexo e envolve diversas enzimas e rotas metabólicas, é provável que diversos outros genes desempenhem importantes papéis no perfil global de resistência às bases carrapaticidas disponíveis. Por isso, é importante desenvolver metodologias moleculares para a detecção desta e de outras mutações relacionadas à resistência a carrapaticidas para que se possa combater eficientemente as populações resistentes às bases químicas disponíveis e prolongar a vida útil dos princípios ativos em uso.

A análise estatística das frequências observadas e esperadas para cada genótipo não diferiram pelo teste de  $\chi^2$  ao nível de significância de 5%. As frequências dos alelos mutante e selvagem encontradas foram semelhantes, mostrando que esses alelos estão bem distribuídos na população.

### Conclusões

Com as frequências alélicas e genotípicas encontradas, é possível concluir que a população estudada encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o gene *CzEst9* no Estado de Minas Gerais.

### Literatura citada

- BAFFI, M.A.; SOUZA, G.R.L.; VIEIRA, C.U. et al. Identification of point mutations in a putative carboxylesterase and their association with acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.148, p.301-309, 2007.
- FREITAS, D.R.J., POHL P.C.; VAZ-JR, I.S. Characterization of acaricide resistance in *Boophilus microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.2, p.109-117, 2005.
- GRISI, L; MASSARD, C.L; MOYA BORJA,G.E. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos do Brasil. **A Hora Veterinária**, ano 21, n.125, p.8-10, 2002.
- GUERRERO, F.D., LI, A.Y, HERNANDEZ, R. Molecular diagnosis of pyrethroid resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.39, p.770–776, 2002.
- HERNANDEZ, R.; GUERRERO, F.D.; GEORGE, J.E. et al. Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p.1009–1016, 2002.