

Resistência e Controle do Carrapato-do-boi

**Organização:
Veríssimo, C.J.**

**Nova Odessa, SP
Instituto de Zootecnia
2015**



Governador do Estado de São Paulo
Geraldo Alckmin

Secretário de Agricultura e Abastecimento
Arnaldo Jardim

Secretário Adjunto de Agricultura e Abastecimento
Rubens Rizek Junior

Coordenador da Agência Paulista de Tecnologia
dos Agronegócios
Orlando Melo de Castro

Diretor Técnico de Departamento do Instituto de
Zootecnia
Renata Helena Branco Arnandes

Centro de Comunicação e Transferência do Conhe-
cimento
Ivani Pozar Otsuk

COORDENAÇÃO

Cecília José Veríssimo
Fone: (19) 34669431/cjverissimo@iz.sp.gov.br

EDITORACÃO

Maria Isabel Rodrigues Alves
Núcleo de Editoração Técnico-Científica

NORMALIZAÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Tatiane Helena Borges de Salles

CAPA

Lisley Silvério

“Esclarecemos que todas as informações contidas neste Anais são de inteira responsabilidade de cada palestrante”.

Ficha catalográfica elaborada por: Tatiane Salles – CRB 8/8946
Núcleo de Informação e Documentação

R433 Resistência e controle do carrapato-do-boi / Organização: Cecília José Veríssimo. -
Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 2015.
135p.;il.

ISBN: 978-85-61852-13-9

Inclui referências

1. *Boophilus microplus*. 2. Carrapato - controle. 3. Carrapato – Resistência aos inseticidas. I. Veríssimo, C. J. [org.]. II. Título.

CDD - 595.429

Todos os direitos autorais reservados ao Instituto de Zootecnia. A reprodução de partes ou de todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.



O Livro Resistência e controle do carrapato-do-boi está licenciado com uma Licença Creative Commons.

Instituto de Zootecnia (IZ/APTA/SAA)
Rua Heitor Penteado, 56, Centro, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP.
Fone: (19) 3466-9400/www.iz.sp.gov.br

PREFÁCIO

Este livro aborda as palestras proferidas durante o IV Workshop Controle do Carrapato, realizado em agosto de 2014. Neste evento, foi discutido o problema atual da resistência genética dos carrapatos aos carrapaticidas, e formas de controle alternativo e estratégico de combate ao carrapato, além de ensinar a maneira correta de se aplicar o carrapaticida na forma de aspersão, e como todos esses conhecimentos podem chegar ao produtor rural. Sempre contando com a experiência de especialistas em cada área, esperamos com este livro aumentar e reciclar o conhecimento de técnicos e produtores sobre o carrapato-do-boi e seu controle, colaborando para que este parasita possa ser combatido de modo eficaz e sustentável.

Cecília José Veríssimo

PALESTRANTES



Luciana Gatto Brito

Luciana Gatto Brito concluiu o doutorado em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2003 e pós-doutorado em 2010 pelo Livestock Insect Research Laboratory (USDA/ARS). Atualmente é Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, docente e vice coordenadora estadual do Programa de Doutorado da Rede Bionorte (Roraima). Atua na área de Saúde Animal - Parasitologia Veterinária tendo como principais linhas de pesquisa a entomologia e a hemoparasitologia veterinária.



Daniel Sobreira Rodrigues

Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Minas Gerais (1999), Mestrado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Minas Gerais (2002) e Doutorado em Ciência Animal, também pela Escola de Veterinária da UFMG. Pesquisador da área de Controle de Ecto e Endoparasitoses da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG. Responsável Técnico do Sistema de Produção de Leite - Rebanho 3/4 Holandês x Zebu, da Fazenda Experimental Santa Rita - FESR/EPAMIG.



Lew Kan Sprenger

Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná - Campus Curitiba (2010). Atualmente é doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Paraná, na linha de pesquisa em Sanidade Animal e Medicina Veterinária Preventiva. Tem experiência nas áreas de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, Microbiologia, Fitoterapia, Produção Animal, Inspeção e Vigilância Sanitária, TIPOA, Agroecologia, Zoonoses e Saúde Pública.



Cecilia Jose Verissimo

Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (1982), mestrado em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (1991) e doutorado em Zootecnia - Qualidade e Produtividade Animal pela Universidade de São Paulo (2008). Atualmente é pesquisador científico nível VI do Instituto de Zootecnia. Tem experiência nas áreas de Zootecnia e Medicina Veterinária Preventiva, com ênfase em Produção Animal, atuando no tema controle alternativo de parasitas, especialmente do carrapato-do-boi.



Marcia Cristina Mendes

Possui graduação em Biologia pela Universidade de Taubaté (1984), mestrado em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) pela Universidade de São Paulo (1997) e doutorado em Parasitologia pela Universidade Estadual de Campinas (2005). É pesquisadora científica do Instituto Biológico (APTA/SAA), em São Paulo. Tem experiência na área de Parasitologia, com ênfase no diagnóstico da resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos carrapaticidas.



Carlos Pagani Netto

Médico Veterinário com MBA em Agronegócio pela Fundação Getúlio Vargas, trabalha na CATI Regional de Catanduva, SP, sendo o Coordenador do Projeto CATI Leite no Estado de São Paulo.

SUMÁRIO

Palestras

Diagnóstico de resistência às bases carrapaticidas em populações do carrapato dos bovinos (Luciana Gatto Brito, Fábio da Silva Barbieri, Márcia Cristina de Sena Oliveira, Maribel Funes Huacca).....	02
Aplicação de carrapaticida em bovinos (Daniel Sobreira Rodrigues, Rebeca Passos Wanderley Muller, Romário Cerqueira Leite).....	29
Tratamento parcial seletivo do <i>Rhipicephalus (B.) microplus</i> e variações raciais de resistência em vacas de corte no Rio Grande do Sul, Brasil: uma experiência em larga escala (Marcelo Beltrão Molento, Fernanda Silva Fortes, Andréia Buzatti, Fernando Staude Kloster, Lew Kan Sprenger, Luis Dorneles Soares).....	57
Alternativas de controle do carrapato-do-boi na pecuária leiteira (Cecília José Veríssimo, Luciana Morita Katiki).....	76
Controle estratégico do carrapato dos bovinos <i>Rhipicephalus (B.) microplus</i> , no Estado de São Paulo (Márcia Cristina Mendes).....	114
Projeto CATI Leite: como fazer chegar a tecnologia ao produtor (Carlos Pagani Netto).....	124

DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA ÀS BASES CARRAPATICIDAS EM POPULAÇÕES DO CARRAPATO DOS BOVINOS

Luciana Gatto Brito^{1*}; Fábio da Silva Barbieri¹; Márcia Cristina de Sena Oliveira²; Maribel Funes Huacca³

¹Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO

³Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP,

³Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO

*Autor correspondente: luciana.gatto@embrapa.br

RESUMO: Os programas de controle direcionados aos parasitas ainda exigem a utilização de produtos químicos para maior estabilidade operacional das ações de controle e o uso de carrapaticidas químicos é a principal ferramenta de controle para as infestações do carrapato dos bovinos. A correta escolha de princípios ativos capazes de controlar as infestações nos rebanhos é uma necessidade premente, devido ao rápido surgimento e estabelecimento de populações de carrapatos resistentes. A utilização de técnicas fenotípicas de avaliação *in vitro* da suscetibilidade de carrapatos às bases pesticidas são ainda o método mais prático e de maior aceitação para se diagnosticar e mensurar o grau da resistência às bases carrapaticidas nas populações, porém provas diagnósticas moleculares estão sendo desenvolvidas e utilizadas para a identificação de populações do carrapato dos bovinos resistentes às principais moléculas utilizadas em seu controle. A rápida e acurada identificação da resistência à pesticidas nas populações do carrapato dos bovinos deve ser considerada como uma demanda prioritária para reduzir a dependência química relacionada ao controle das infestações, mitigar a contaminação ambiental determinada pelos pesticidas e eliminar a presença de resíduos parasiticidas nos alimentos. Lembrando que, a identificação de produtos de degradação de fármacos parasiticidas em produtos de origem animal se apresenta como uma barreira não tarifária que será cada vez mais explorada pelo competitivo mercado internacional de produtos cárneos e lácteos.

Palavras-chave: Carrapato dos bovinos, pesticidas, resistência, diagnóstico.

DIAGNOSTIC OF RESISTANCE TO ACARICIDES IN BOVINE TICK POPULATIONS

ABSTRACT: Programs targeted to parasites control still require the use of chemicals for greater operational stability of the actions and the use of chemical acaricide is the main control tool for the cattle tick infestations. The correct choice of active principles able to control infestations in cattle is urgently needed due to the rapid emergence and establishment of resistant tick populations. The use of phenotyping techniques for evaluating the susceptibility to pesticides used in the control of cattle ticks populations is still the most practical method and with greater acceptance to diagnose and measure the degree of resistance to acaricides bases in these populations. Molecular diagnostic tests are being developed and used for identification of tick populations of cattle resistant to molecules used to control infestations. The quick and accurate identification of resistance to pesticides in cattle tick populations should be considered a priority demand to reduce addiction related to the chemical control of infestation, to mitigate the environmental contamination by pesticides and eliminate the presence of parasiticides residues on food. Should be highlighted that the identification of pesticides degradation products in animal products is presented as a non-tariff barrier that will be increasingly exploited by competitive international market of meat and dairy products.

Keywords: cattle tick, pesticides, resistance, diagnosis.

1. Introdução

A infestação pelo carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus microplus*, é um dos fatores limitantes para a melhor rentabilidade da produção pecuária nacional. As condições climáticas predominantes na maior parte do Brasil contribuem para aumentar a intensidade e o período de parasitismo, tornando os prejuízos determinados pelas infestações um problema significativo e impactante para os rebanhos bovinos nacionais.



Foto: Luciana Gatto Brito/Embrapa

Figura 1. Bovino intensamente parasitado e pastagem com alta densidade de larvas do carrapato dos bovinos.

Ao longo do século passado a indústria farmacêutica veterinária desenvolveu medicamentos mais eficazes e como resultado, as perdas associadas a produtividade dos rebanhos foram reduzidas. O acesso fácil a produtos parasiticidas e a facilidade com que eles podem ser aplicados, combinado ao progresso no conhecimento da epidemiologia de parasitas de ruminantes, levou a um período de relativo sucesso no controle das parasitoses, particularmente em sistemas de produção intensivos. No entanto a falsa suposição de que o controle parasitário pode ser facilmente realizado somente através da utilização de produtos químicos levou ao aparecimento da resistência às bases químicas parasiticidas mais utilizadas, aumentando também a presença de resíduos nos produtos de origem animal, além da perda de confiabilidade dos produtores na eficiência dos programas sanitários de controle de parasitas.

A resistência às bases carrapaticidas é considerada um fenômeno de origem genética nas populações de carrapatos, onde uma ou mais mutações conferem ao carrapato a

capacidade de sobreviver a exposição às bases químicas. Na prática, a seleção causada pelos tratamentos químicos leva ao aumento da frequência de indivíduos resistentes na população, com conseqüente redução da eficácia dos fármacos.

Falhas no controle do carrapato dos bovinos decorrentes da resistência as bases carrapaticidas, têm sido cada vez mais comuns nas principais regiões pecuárias do país. A situação da resistência no controle das populações de carrapato tende a agravar-se em curto prazo, não apenas devido ao uso inadequado e excessivo das bases carrapaticidas, mas porque a maioria dos produtos utilizados para o controle da mosca-dos-chifres também possui ação contra o carrapato dos bovinos. Assim, o tratamento químico dirigido a uma espécie impõe uma seleção indesejável à outra, uma vez que o carrapato e a mosca infestam o mesmo hospedeiro e são expostos simultaneamente as mesmas bases químicas.

Apesar das desvantagens do uso de carrapaticidas na bovinocultura, tais como a poluição ambiental, a produção de resíduos na carne e no leite e a exposição tóxica imposta às pessoas que aplicam as formulações carrapaticidas, estes fármacos são ainda essenciais para o controle das populações de ectoparasitas. No entanto, o uso exaustivo das formulações é responsável pela perda de eficácia das bases químicas e determina o estabelecimento, o desenvolvimento e a emergência de populações resistentes do carrapato bovino, assim como, da mosca-dos-chifres.

No Brasil, o controle das populações de carrapatos que infestam os rebanhos bovinos se dá pela utilização de uma ampla gama de pesticidas, porém, devido ao baixo custo relativo, os grupos químicos piretróide, organofosforado e amidina são os de uso mais comum, lembrando que, a amidina não possui indicação de uso para o controle das infestações causadas pela mosca-dos-chifres. A disseminação da resistência às diferentes bases pesticidas demonstra as limitações existentes no controle químico parasitário, sendo essencial que as bases parasiticidas sejam administradas como preciosos recursos no âmbito do manejo sanitário dos rebanhos.

O diagnóstico precoce da resistência em populações parasitárias pode viabilizar o uso mais adequado dos grupos químicos disponíveis para o controle das infestações por carrapato, já que novos compostos não estão sendo disponibilizados com a mesma velocidade com que a resistência se estabelece nas populações. Novas opções para o controle parasitário e para o manejo da resistência em populações do carrapato dos bovinos são prioritárias para que se possa reduzir a dependência química e a emergência

da resistência, bem como o conseqüente aumento dos custos de produção e dos riscos ambientais e à saúde daqueles que trabalham e, ou consomem alimentos de origem animal.

O desenvolvimento e a emergência da resistência a pesticidas está relacionado ao aumento na frequência das mutações genóticas decorrentes da pressão de seleção exercida pelas bases químicas. Mutações que conferem resistência aos pesticidas se caracterizam por alterações pontuais e específicas, normalmente de base única, as quais determinam o aparecimento de fenótipos resistentes aos grupos químicos parasiticidas. Atualmente ferramentas de diagnóstico fenotípico e molecular para detecção da resistência às bases químicas estão disponíveis e podem ser utilizadas com eficiência em estudos epidemiológicos, fundamentais para a identificação e a quantificação dos fatores de risco relacionados ao estabelecimento da resistência em populações do carrapato dos bovinos.

2. Bases moleculares da resistência a pesticidas em artrópodes

As bases moleculares da resistência a pesticidas podem ser resumidas em três tipos: amplificação, alteração da regulação e alteração estrutural do gene, sendo que as duas primeiras resultam em alterações quantitativas, enquanto que a última envolve uma mudança estrutural em sua expressão (SCOTT, 1995).

Em artrópodes, os principais mecanismos de resistência à pesticidas são a redução na penetração e o aumento no sequestro e na detoxicação de xenobióticos. Tais mecanismos contribuem para diminuir a efetividade da dose dos pesticidas, considerando que uma diminuição da sensibilidade no local alvo ou a alteração do local de destino também podem fazer com que a dose do fármaco torne-se ineficaz.

Três famílias de proteínas são amplamente responsabilizadas pelo metabolismo dos fármacos pesticidas: citocromos P450 (oxidases de função mista ou MFO), as esterases (EST) e a glutathione S-transferases (GSTs). As proteínas destas famílias também estão envolvidas na síntese e degradação de uma grande variedade de compostos metabólicos endógenos, assim como na proteção contra o estresse oxidativo, na transmissão de sinais nervosos e no transporte de compostos através das células (RANSON *et al.*, 2002).

A grande maioria dos compostos químicos usados como acaricidas atua em sítios específicos do sistema nervoso dos parasitas, alterando processos fisiológicos vitais. O sistema nervoso dos artrópodes é formado por agregações de células nervosas, os quais

são denominadas como neurônios. Os impulsos nervosos são transmitidos ao longo das células, por meio de alterações na diferença de potencial elétrico através da membrana do neurônio, alterações estas que se propagam ao longo do mesmo. Em condições de repouso, existe uma diferença de potencial entre o interior e o exterior da célula, sendo o interior mais eletronegativo. A concentração de Na⁺ fora da célula neuronal é muito maior do que dentro, sendo que o inverso ocorre com K⁺. Tais gradientes ocorrem devido ao transporte ativo de íons através das membranas celulares (“bombas” de Na⁺ e de K⁺) e ao fato de, na condição de repouso, as membranas permanecerem impermeáveis ao transporte passivo de Na⁺. Estímulos físicos ou químicos produzem alterações estruturais nas proteínas do canal de Na⁺ que permitem a passagem deste íon e a consequente despolarização da membrana a partir deste ponto, nova polarização ocorre quando se abrem os canais de K⁺. Quando o estímulo chega à extremidade do neurônio ocorre a liberação de neurotransmissores, responsáveis pela propagação do estímulo nervoso através das sinapses (ETO, 1990).

Além da complexidade e dificuldade de sua reversão, o desenvolvimento da resistência em artrópodes compromete não apenas a base química a que as populações foram expostas, mas a todo o grupo químico a que elas pertencem. O estabelecimento da resistência nas populações parasitárias impede a utilização de todas as classes de pesticidas disponíveis, fazendo com que o controle do carrapato torne-se praticamente inviável.

Levantamento realizado na Austrália indica que 80% dos carrapatos em Queensland são resistentes aos acaricidas organofosforados, 50% resistentes aos piretróides sintéticos e 12% são resistentes ao amitraz (CUTULLÉ *et al.*, 2009). O surgimento deste tipo de múltipla resistência tem tornado o manejo das populações do carrapato cada vez mais difícil, representando uma grave ameaça à bovinocultura, uma vez que o trânsito de bovinos infestados com carrapatos resistentes possibilita a difusão de populações que trazem consigo mutações que determinam o desenvolvimento da resistência as diferentes bases carrapaticidas.

2.1. Mecanismo de resistência a pesticidas piretróides

Pesticidas piretróides são derivados sintéticos de neurotoxinas naturais de plantas que se ligam seletivamente às proteínas dos canais de sódio, impedindo seu fechamento e inibindo a desativação e a estabilização dos canais. Como consequência o neurônio não consegue voltar à posição de repouso e ocorre o bloqueio na transmissão dos impulsos nervosos.

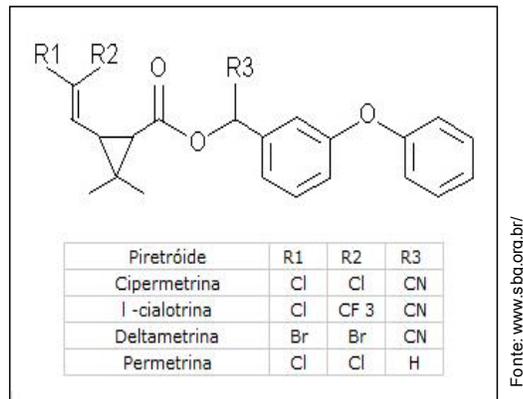


Figura 2. Estrutura química dos pesticidas piretroides sintéticos.

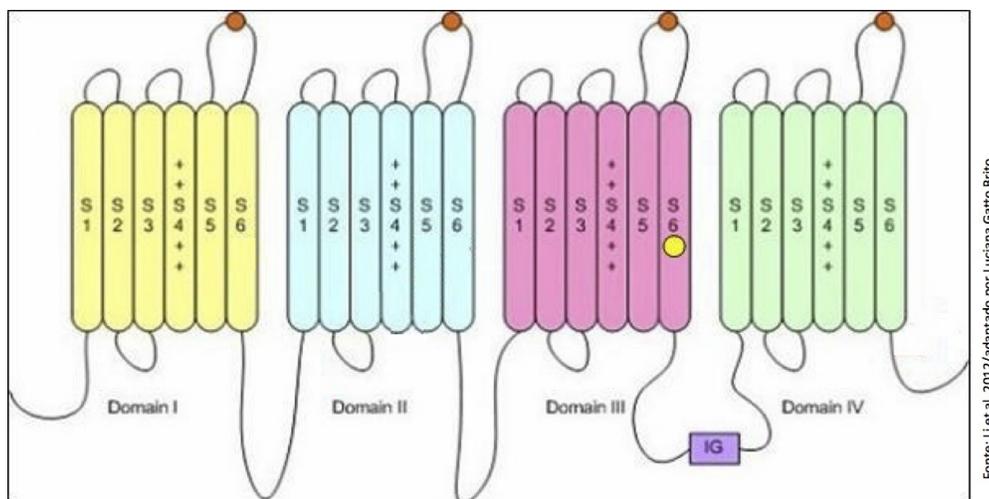
Devido a sua seletividade tóxica aos invertebrados, piretróides correspondem a 25% de todos os pesticidas utilizados mundialmente (GEORGHIOU, 1990). O uso em larga escala de piretróides possibilitou o desenvolvimento da resistência a este pesticida em muitos artrópodes como os carrapatos, a mosca doméstica, a mosca-dos-chifres, a mosca-das-frutas, baratas, entre outros (DONG; SCOTT, 1994; WILLIANSOM *et al.*, 1996; JAMROZ, 1998; HE, 1999; DOMINGUES *et al.*, 2012; LOVIS *et al.*, 2012; FAZA *et al.*, 2013). Mudanças estruturais nos canais de sódio devido a presença de mutações podem diminuir a interação entre os compostos piretróides e seu local alvo, e, assim, reduzir a sensibilidade dos artrópodes à estes pesticidas (DONG, 2007).

A resistência aos pesticidas piretróides em artrópodes parasitas é baseada na detoxicação, na insensibilidade do sítio alvo e em características comportamentais do parasita, porém não se conhece a importância relativa de cada um destes fatores em condições de campo e qual seria o principal fator determinante da resistência (GUGLIELMONE *et al.*, 2002).

As mutações genéticas têm sido associadas à capacidade de vários parasitas sobreviverem ao tratamento com pesticidas. Artrópodes em geral possuem um curto intervalo entre gerações, o que favorece a emergência de populações com diferentes perfis genotípicos de acordo com a pressão seletiva a que estão sendo submetidos. Tais mecanismos de resistência tornam os pesticidas ineficazes em um curto espaço de tempo, sendo necessário o aumento de sua concentração, a mudança do princípio ativo empregado e a utilização de formulações com associações de diferentes princípios ativos (SUTHERST *et al.*, 1983).

Porém, o mais importante mecanismo de resistência, determinado por mutação no gene que codifica a proteína do canal de sódio é caracterizado por uma redução na sensibilidade do sistema nervoso de artrópodes a piretróides e ao diclorodifeniltricloroetano (DDT), conhecido como “*knockdown resistance*” (*kdr*), que inicialmente foi observado em cepas de *Musca domestica* resistentes ao pesticida (WILLIAMSON *et al.*, 1996).

Três mutações nos canais de sódio têm sido associados à resistência aos piretróides em populações de *R. microplus* (HE *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2009; MORGAN *et al.*, 2009; JONSSON *et al.*, 2010; GUERRERO *et al.*, 2012). He *et al.* (1999) identificaram uma mutação de ponto no segmento S6 do domínio III do gene do canal de sódio, altamente conservado em cepas de carrapato dos bovinos muito resistentes aos piretróides e ao diclorodifeniltricloroetano (DDT). A mutação envolve a substituição de uma tiamina por uma adenina (T2134A), resultando na substituição de uma Fenilalanina por um resíduo de Isoleucina em indivíduos suscetíveis e resistentes, respectivamente.



Fonte: Li *et al.*, 2012/adaptado por Luciana Gatto Brito

Figura 3. Ponto da mutação KDR no segmento S6 do domínio III do gene do canal de sódio que determina a resistência a piretróides em carrapato dos bovinos.

Morgan *et al.* (2009) identificaram uma mutação localizada no *linker* do domínio II S4-5 do gene do *para*-canal de sódio a qual é determinada pela substituição de uma base nucleotídica citosina presente em indivíduos suscetíveis por uma adenina (C190A) em indivíduos resistentes aos pesticidas piretróides. Essa substituição determina a troca do aminoácido Leucina por Isoleucina, a qual é associada a resistência aos piretróides. Uma nova mutação foi identificada por Jonsson *et al.* (2010) em populações australianas

de *R. microplus*, a qual está localizada no *linker* do domínio S4-S5, onde há a substituição do aminoácido Glicina por Valina o que determina a resistência somente ao piretróide Flumetrim.

Guerrero *et al.* (2001) desenvolveram uma prova molecular diagnóstica para identificação da resistência a piretróides em populações de *R. microplus*, onde a substituição do aminoácido Fenilalanina por Isoleucina no segmento S6 da transmembrana do domínio III do canal de sódio em indivíduos resistentes aos piretróides, possibilitou a clara identificação de genótipos heterozigotos e homozigotos suscetíveis ou resistentes.

2.2. Mecanismo de resistência a pesticidas organofosforados

Os grupos químicos pesticidas organofosforados e carbamatos têm como alvo os genes que determinam a atividade enzimática das acetilcolinesterases (AChEs) no sistema nervoso central de artrópodes. Pesticidas organofosforados inibem irreversivelmente a ação da enzima AChE, provocando constante estimulação nervosa que acarreta a morte por paralisia (MASON *et al.*, 1984).

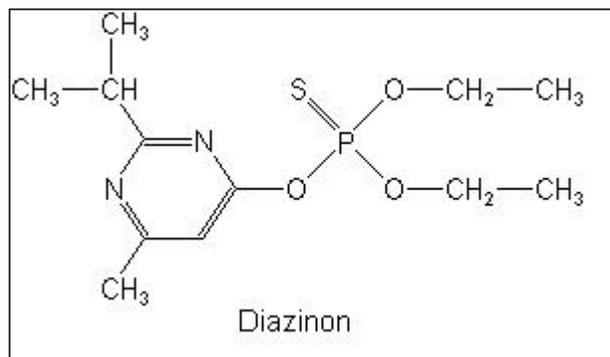


Figura 4. Estrutura química dos pesticidas organofosforados.

Embora grandes esforços de pesquisa sejam realizados para a identificação dos mecanismos de resistência aos organofosforados em populações do carrapato dos bovinos, muito pouco se conhece em relação as bases moleculares envolvidas. Acredita-se que a resistência aos pesticidas organofosforados se estabelece e é mantida através de um complexo processo multifatorial envolvendo diversas AChEs (GUERRERO *et al.*, 2012; TEMEYER *et al.*, 2013). Uma série de estudos vêm sendo realizados para a busca de evidências relacionadas aos mecanismos de resistência a pesticidas organofosforados em populações de *R. microplus*. Porém, mecanismos específicos relacionados a resistência à

este pesticida não foram identificados. A incerteza relacionada a identidade de transcritos que codificam AChEs funcionalmente relevantes para os mecanismos de resistência de *R. microplus* a organofosforados é uma realidade.

Uma ou mais AChEs parecem estar envolvidas na resposta à acaricidas (BAFFI *et al.*, 2008; TEMEYER *et al.*, 2010; TEMEYER *et al.*, 2013). Recentemente, Bellgard *et al.* (2012) identificaram sete *contigs* (conjunto de sobreposição de segmentos de DNA que em conjunto representam uma região consenso de DNA) no transcriptoma de *R. microplus* com significativa similaridade com sequências de AChEs. Temeyer *et al.* (2013) expressaram três transcritos tipo acetilcolinesterases isolados em duas cepas resistentes e uma suscetível de *R. microplus* e demonstraram que há uma variante de alelos nos indivíduos de cepas que apresentam diferentes respostas a organofosforados, concluindo que o fenótipo resistente a organofosforados deve ser um caráter complexo e multigênico.

Infelizmente, mutações específicas relacionadas às AChEs não têm sido correlacionadas a resistência aos pesticidas organofosforados em populações de campo do carrapato dos bovinos (GUERRERO *et al.*, 2012). Ensaio genotípicos alelo específicos ou sequenciamento de cDNA com cepas de *R. microplus* resistentes e suscetíveis, sugerem que mutações adicionais estão potencialmente associadas à insensibilidade de *R. microplus* a pesticidas organofosforados (TEMEYER *et al.*, 2011).

2.3. Mecanismo de resistência aos demais grupos pesticidas

2.3.1. Amitraz

Amitraz é um acaricida da classe formamidina que tem sido utilizado de forma eficaz no controle de importantes pragas agropecuárias, incluindo o carrapato dos bovinos (HAIGH; GICHANG, 1980; DAVEY *et al.*, 1984; GARRIS; GEORGE, 1985; KAGARUKI, 1996). O mecanismo de ação da formamidina, pelo qual exerce seu efeito tóxico, se dá através da interação da molécula com os receptores de octopamina (β ,4-dihidroxifenetilamina) e α_2 -adrenoreceptores no sistema nervoso central de artrópodes (EVANS; GEE, 1980; DUDAI *et al.*, 1987; JONSSON; HOPE, 2007), e, possivelmente, também por inibição da enzima monoaminaoxidase (ATKINSON *et al.*, 1974; SCHUNTNER; THOMPSON, 1976).

Embora os mecanismos de ação para o amitraz ainda não estejam completamente compreendidos, tanto esse pesticida quanto outras formamidinas pertencem a uma classe de pesticidas que apresenta mecanismo de ação distinto.

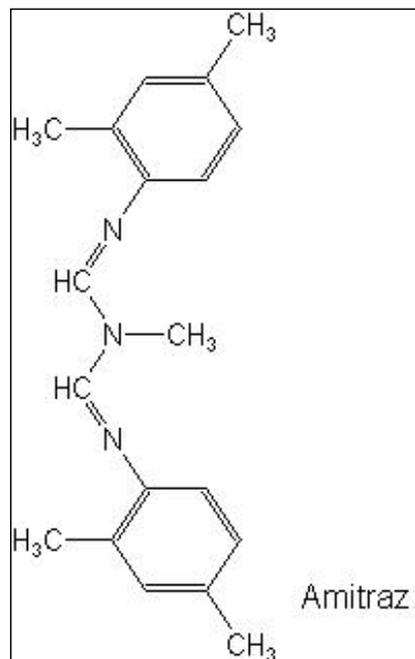


Figura 5. Estrutura química do pesticida amidina.

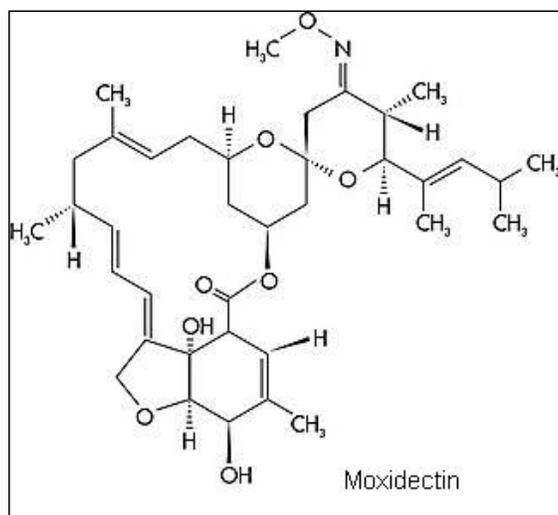
A base molecular da resistência ao amitraz relacionada ao sítio-alvo da molécula foi verificada comparando-se sequências de cDNA de receptores de uma octapamina putativa em populações australianas do carrapato dos bovinos resistentes e suscetíveis ao amitraz, porém a sequência deste gene a partir da análise de uma variedade de populações demonstraram que tanto cepas suscetíveis quanto resistentes apresentam sequências idênticas relacionadas aos receptores de octapamina (BAXTER; BARKER, 1999).

Estudo realizado por Li *et al.* (2005) buscando identificar os mecanismos metabólicos envolvidos no aparecimento e na fixação da resistência ao amitraz em uma cepa brasileira de *R. microplus* identificou que a resistência à essa base pesticida é herdada como traço recessivo incompleto envolvendo mais de um gene, e com um forte efeito materno na expressão da resistência ao amitraz na progênie larval. Evidências encontradas por esses autores, sugerem que também há o envolvimento de mecanismos de detoxificação metabólica relacionados com a resistência ao amitraz. Dada a possibilidade da resistência ao amitraz envolver tanto mecanismos sítio-alvos como mecanismos de detoxificação, é esperado que a resistência ao amitraz em populações de *R. microplus* seja de natureza poligênica.

O envolvimento de vários genes e o efeito materno sobre o nível de resistência ao diflubenzuron foi demonstrado em uma linhagem selecionada em laboratório de *Lucilia cuprina* (KOTZE; SALES, 2001). Embora a herança ligada ao sexo na resistência a pesticidas venha sendo demonstrada em várias espécies de insetos (DALY; FISK, 1998; DE LAME *et al.*, 2001; SHEARER; USMANI, 2001), não há a possibilidade de se testar a resposta a resistência relacionada com o sexo em *R. microplus*, uma vez que o bioensaio recomendado pela avaliação da resistência a pesticidas preconizado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) é o teste do pacote de larvas – TPL (*Larval Packet Test - LPT*) modificado, onde é avaliada a susceptibilidade e a resistência as bases pesticidas nas larvas do carrapato, o que impossibilita a identificação sexual dos espécimes (LI *et al.*, 2005).

2.3.2. Lactonas macrocíclicas

Duas classes de lactonas macrocíclicas (LMs) apresentam atividade acaricida: as avermectinas e as milbemicinas. Avermectinas são lactonas macrocíclicas derivadas do actinomiceto *Streptomyces avermitilis* enquanto que as milbemicinas são derivados dos produtos de fermentação de *S. hygroscopicus aureolacrimosus* (LASOTA; DYBAS, 1991). Ivermectina, eprinomectina e doramectin pertencem a classe das avermectinas, sendo que a moxidectina é a única das milbemicinas comercializada para o controle de carrapatos. Cada uma dessas lactonas macrocíclicas é ativa sistemicamente em doses muito baixas para o controle de carrapatos.



Fonte: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmonov04/1je01.gif>

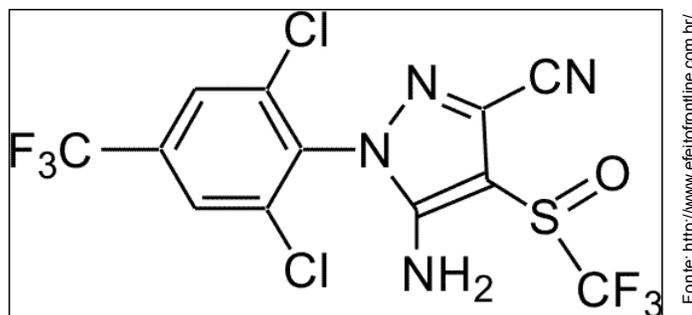
Figura 6. Estrutura química de alguns pesticidas da classe das avermectinas e das milbemicinas.

As avermectinas e a milbemicina atuam principalmente sobre o ácido γ -aminobutírico (GABA) e os canais de cloro-glutamato (FRITZ *et al.*, 1979; CLARK *et al.*, 1995). Poucos estudos destinam-se a identificar os mecanismos de desenvolvimento da resistência às lactonas macrocíclicas em ácaros. Clark *et al.* (1995) demonstraram que o aumento da excreção e a diminuição da absorção, combinados a elevação do metabolismo (ou conjugação do composto) estão envolvidos na resistência à abamectina, assim como, de forma indireta, a resistência metabólica (CAMPOS *et al.*, 1995; STUMPF; NAUEN, 2002).

A insensibilidade do GABA e o fechamento dos canais de cloro glutamato, sítios-alvos relacionados com a resistência as avermectinas e as milbemicinas em carrapatos, são sugeridos como os mecanismos que determinam a diminuição da disponibilidade de abamectina em sítios de ligação específicos, especialmente nas subunidades α do receptor de ligação, sendo esse também mais um possível mecanismo de resistência às avermectinas (CLARK *et al.*, 1995; BLACKHALL *et al.*, 1998).

2.3.3. Fipronil

Fipronil é um pesticida da classe das fenilpirazolonas que tem como mecanismo de ação o bloqueio de íons cloreto controlados por GABA (GABA-Cl) presentes no sistema nervoso central de artrópodes. O sistema receptor de GABA é responsável pela inibição da atividade neuronal e o bloqueio de tais funções é responsável pela hiperexcitação do sistema nervoso e conseqüente morte. O bloqueio dos canais de íons cloreto ativados por glutamato determinado pelo fipronil é a característica, que em parte, é responsável pela maior toxicidade seletiva dessa molécula para artrópodes, uma vez que mamíferos não possuem canais de íons cloreto (NARAHASHI *et al.*, 2007).



Fonte: <http://www.efefrontline.com.br/>

Figura 7. Estrutura química do pesticida fipronil.

O neurotransmissor glutamato é um aminoácido simples que desempenha papel excitatório do sistema nervoso central. Dois tipos de canais de cloro ligados ao glutamato apresentam características eletrofisiológicas e farmacológicas distintas. Em insetos, o gene da subunidade do receptor de GABA foi clonado primeiramente em *Drosophila melanogaster* (Meigen) e designado como *Rdl* (relacionado a resistência ao Dieldrin, composto organoclorado sintético), o qual associa-se com outra subunidade do receptor GABA para formar o sítio de atuação de pesticidas ciclodienos e fenilpirazolonas. A mutação que confere resistência ao dieldrin está associada a substituição de um aminoácido Alanina na posição 302 por um aminoácido Serina, mutação essa que confere a resistência também ao fipronil.

3. Teste diagnósticos para identificação da resistência a pesticidas em populações do carrapato dos bovinos

O diagnóstico precoce da resistência mostra-se como uma importante ferramenta para viabilizar o uso mais adequado dos grupos químicos disponíveis para o controle das infestações por carrapatos. Estudos epidemiológicos direcionados ao conhecimento da situação da resistência às bases pesticidas realizados em diferentes populações do carrapato dos bovinos demonstram a estreita associação entre os fatores fenotípicos, tais como limites de concentração letal (CL) e fator de resistência (FR) das populações de carrapato com a frequência de alelos mutantes nas populações.

A associação de provas diagnósticas fenotípicas e genotípicas para a identificação da presença de resistência às bases pesticidas mostra-se como uma ferramenta viável para o monitoramento da resistência nas populações de carrapatos, sendo também útil na elaboração de novas estratégias de manejo de bases carrapaticidas para o controle das populações de *R. microplus*.

3.1. Testes fenotípicos para o diagnóstico da resistência a pesticidas

De acordo com a FAO (2004), a escolha de um teste laboratorial adequado para avaliar a resistência a pesticidas em populações do carrapato dos bovinos deve apresentar alguns requisitos, tais como:

- ser sensível o suficiente para identificar a resistência no início de seu surgimento;

- abranger toda a gama de grupos químicos que estão em uso, incluindo os princípios ativos mais recentemente desenvolvidos;
- ser simples e de baixo custo e,
- fornecer um resultado rápido e confiável, sendo também adequado para padronização para utilização em laboratórios de vários países.

Os testes de avaliação *in vitro* mais utilizados para a identificação fenotípica da resistência a pesticidas são os bioensaios realizados com larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Nenhum dos bioensaios até o momento desenvolvidos atende a todos os requisitos preconizados pela FAO, sendo necessário o aperfeiçoamento dos protocolos diagnósticos da resistência à pesticida direcionados às populações do carrapato dos bovinos (FAO, 2004).

A análise das respostas relacionadas a um questionário aplicado pelo Grupo de Trabalho da FAO sobre a resistência em parasitas (*Working Group on Parasite Resistance/ WGPR*), demonstra que o método mais amplamente utilizado nos laboratórios envolvidos com o diagnóstico de resistência a pesticidas em populações de carrapatos é o Teste de Imersão de Adultos – TIA (*Adult Immersion Test - AIT*) (FAO, 2004).

Diversos são os protocolos disponíveis para a identificação de cepas resistentes de carrapatos. No entanto, para facilitar o monitoramento global da resistência e fornecer uma base histórica para a comparação dos resultados dos testes, devem ser adotados métodos diagnósticos padronizados. Em vista disso e seguindo o conselho de especialistas, desde 1975, a FAO tem recomendado a realização do Teste do Pacote de Larvas – TPL (*Larval Packet Test - LPT*) para investigação da resistência em cepas de campo do carrapato dos bovinos, especialmente para acaricidas organofosforados e piretróides sintéticos (KEMP *et al.*, 1999).

3.1.1. Teste do Pacote de Larvas (TPL)

Esse é um bioensaio amplamente utilizado na América Latina e na África e baseia-se em protocolos australianos utilizados pelo *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization* (CSIRO) e pelo *Queensland Department of Primary Industries* (DPI). O bioensaio utiliza larvas para o diagnóstico da resistência em populações do carrapato dos bovinos e os resultados são obtidos em cerca de seis semanas, podendo também ser utilizado para outras espécies de carrapatos ixodídeos.

No TPL, método preferencial da FAO para o diagnóstico de resistência em

populações de carrapatos, as larvas são expostas a papéis filtros impregnados com bases pesticidas e a mortalidade das larvas é quantificada após 24 horas de exposição aos princípios ativos. Mais recentemente, os protocolos foram adaptados para avaliação da resistência à lactonas macrocíclicas (LMs).

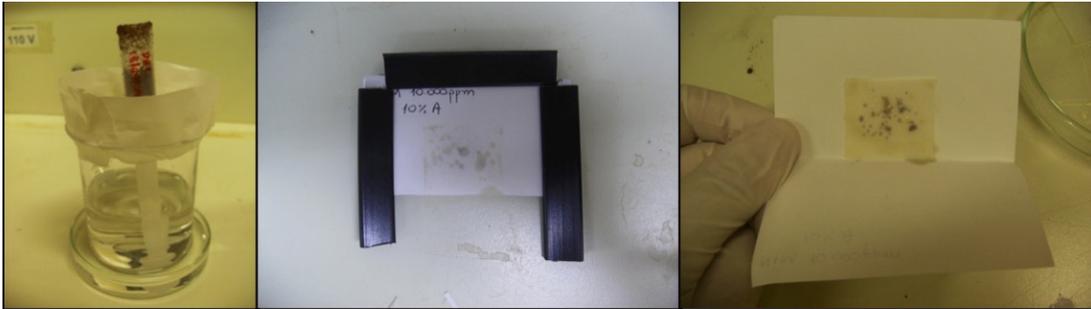


Foto: Márcia C. de Sena Oliveira/Embrapa.

Figura 8. Teste do pacote de larvas (TPL) utilizado para o diagnóstico da resistência a pesticidas em populações do carrapato dos bovinos.

Algumas modificações ao *TPL* são necessárias para o diagnóstico da resistência à amitraz, uma vez que cepas resistentes do carrapato dos bovinos não apresentam uma relação linear entre o *probit* da mortalidade e o *log* da concentração do acaricida, não se conhecendo as razões que determinam essa situação. Tal fato impossibilita que seja determinada a dose discriminante ($2 \times LC_{99,9}$) e, por isso, se faz necessária a utilização de três diferentes concentrações de amitraz: 0,2; 0,05 e 0,0125% peso/volume. O teste segue exatamente o protocolo *LPT* mas os pacotes são colocados em placas de Petri de plástico (com cada repetição de uma concentração depositada em uma placa separada) e o tempo de exposição é estendido para 48 horas. É importante ressaltar que o *LPT* não deve ser utilizado para acaricidas reguladores de crescimento, tais como o Fluazurom.

3.1.2. Teste de Imersão de Adultos (TIA)

O *TIA* é um ensaio biológico que utiliza fêmeas ingurgitadas de carrapatos. O *TIA* foi descrito por Drummond *et al.* (1973) e utilizado para determinar a eficácia relativa de novos acaricidas contra várias espécies de carrapatos.

Este bioensaio foi adaptado a partir de testes de resistência realizados em diferentes laboratórios, sem que houvesse sido estabelecido um protocolo-padrão. O *Agriculture Research Service/United States Department of Agriculture (ARS/USDA)*,

instituição que inicialmente desenvolveu o teste disponibilizou o protocolo que é mais amplamente utilizado e que também pode ser utilizado para avaliação da resistência às lactonas macrocíclicas e ao Fluazuron (FAO, 2004).



Foto: Luciana Gatto Brito/Embrapa.

Figura 9. Teste de imersão de adultos (TIA) realizado para o diagnóstico da resistência a pesticidas em populações do carrapato dos bovinos.

3.1.3. Teste de Imersão de larvas (TIL)

Este bioensaio larval desenvolvido por Shaw (1996) não é tão amplamente utilizado para o diagnóstico de resistência quanto o *AIT* e o *LPT*. O método também fornece seu resultado em cerca de seis semanas, o mesmo tempo que o *TPL*. Estudos comparativos indicaram que os resultados do *TIL* podem ser comparados com aos resultados do *TPL* já que há uma boa concordância entre os resultados dos ensaios. A incapacidade do *TPL* para diagnosticar a resistência à fluazuron também se aplica ao *TIL*. Pode-se considerar o *TIL* para o desenvolvimento de novos testes para a detecção de resistência à LMs em larvas do carrapato. O *TPL* também pode ser usado para LMs mas resultados preliminares da CSIRO, Austrália, têm mostrado que a *TIL* é muito mais sensível (FAO, 2004).

3.2. Diagnóstico molecular da resistência a pesticidas

Na atualidade, os métodos moleculares para identificação de alelos mutantes relacionados a resistência a pesticidas em populações dos carrapatos dos bovinos encontram-se bem estabelecidos para o diagnóstico da resistência a pesticidas piretróides.

O ensaio da reação em cadeia da polimerase para amplificação de alelos específicos (*PCR amplification of specific alleles/PASA*) tem como alvo o diagnóstico da resistência local em um segmento do canal sódio, uma vez que pesquisas utilizando cepas de *R. microplus* resistentes aos piretróides descobriram apenas um sítio de mutação (JAMROZ *et al.*, 2000; HE *et al.* 1999; GUERRERO *et al.*, 2001).

Os mecanismos de resistência para piretróides que atuam no carrapato dos bovinos estão começando a ser bem entendidos no nível molecular. Há uma compreensão básica dos mecanismos metabólicos que suportam a resistência à organofosforado em *R. microplus*, no entanto, um alvo único capaz de identificar a resistência a este pesticida parece não ser o caminho para que tenhamos uma prova molecular nos moldes da utilizada para a identificação da resistência a pesticidas piretróides.

Muito pouco se conhece nas populações de *R. microplus* a cerca dos mecanismos envolvidos na resistência ao amitraz, ao fipronil e às lactonas macrocíclicas. Estudos são necessários para que possamos identificar tais mecanismos relacionados à resistência pesticida em população do carrapato dos bovinos. Porém, é consenso que avanços no conhecimento da genômica de *R. microplus* irão estabelecer novos alvos moleculares e novas ferramentas moleculares de diagnóstico da resistência.

4. Situação da resistência a pesticidas em populações brasileiras do carrapato dos bovinos

Observa-se que o relato da identificação da resistência a pesticidas nas populações brasileiras do carrapato dos bovinos vem aumentando principalmente a partir de 2010, porém relatos anteriores já demonstram a preocupação da comunidade científica nacional em relação a emergência da resistência a pesticidas nas populações de *R. microplus*.

Os estudos fenotípicos diagnósticos da resistência a pesticidas ainda são os mais frequentemente realizados no Brasil e demonstram que a resistência as classes pesticidas mais utilizadas, como piretróides, organofosforados e amidina é uma realidade e encontra-se dispersa em importantes polos pecuários de produção de bovinos, conforme podemos observar na Tabela 1.

Ainda são poucos os estudos que utilizam métodos moleculares para avaliar a resistência a pesticidas nas populações brasileiras do carrapato dos bovinos. No estudo epidemiológico conduzido por Andreotti *et al.* (2011) direcionado a identificar a situação da resistência à acaricidas em populações do carrapato dos bovinos estabelecidas no Mato Grosso do Sul os autores realizaram a pesquisa de alelos mutantes tipo kdr em três populações de carrapatos fenotipicamente identificadas como resistentes a piretróides, porém, não evidenciaram a presença da mutação.

Tabela 1. Estudos realizados no Brasil direcionados a identificar fenotipicamente a resistência a pesticidas em população do carrapato dos bovinos

Base Pesticidas	Método Diagnóstico	Área do Estudo	Populações Resistentes	Autor/Ano
Piretróides	TIL	GO	100%*	Fernandes, 2001
Piretróides	TPL	SP	80%	Mendes, 2005
Piretróides	TIA	RO	35%	Brito <i>et al</i> , 2010
Piretróides	TIA	MS	80%	Gomes <i>et al</i> , 2011
Piretróides	TIA	RN	5%*	Coelho <i>et al</i> , 2013
Piretróides	TTL	SP, RS, MS, PR, ES	95%	Lovis <i>et al</i> , 2013
Piretróides	TIA	MS	46%	Andreotti <i>et al</i> , 2011
Piretróides	TPL	MS e RS	Cipermetrina: 100% Deltametrina: 100% Flumetrina: 75%	Mendes <i>et al.</i> , 2013
Piretróides + Organofosforados	TIA	PE	23%	Santana <i>et al.</i> , 2013
Piretróides + Organofosforados	TIA	MS	25%	Andreotti <i>et al</i> , 2011
Piretróides + Organofosforados	TIA	MS	42%	Gomes <i>et al</i> , 2011
Piretróides + Organofosforados	TIA	RO	24%	Brito <i>et al</i> , 2010
Organofosforados	TTL	SP, RS, MS, PR, ES	88%	Lovis <i>et al</i> , 2013
Organofosforados	TIA	MS	43%	Gomes <i>et al</i> , 2011
Organofosforados	TIA	MS	19%	Andreotti <i>et al</i> , 2011
Amidina	TTL	SP, RS, MS, PR, ES	82%	Lovis <i>et al</i> , 2013
Amidina	TIA	RO	23%	Brito <i>et al</i> , 2010
Amidina	TIA	MS	36%	Gomes <i>et al</i> , 2011
Amidina	TIA	RN	15%*	Coelho <i>et al</i> , 2013
Amidina	TIL	SP	69%	Mendes <i>et al</i> , 2013

Abreviações: TIL - Teste de Imersão de Larvas; TIA - Teste de Imersão de Adultos; TPL - Teste de Pacote de Larvas; TTL - Teste Tarsal de Larvas. *Avaliação realizada em uma única população de carrapato dos bovinos.

Faza *et al.* (2013) também realizaram a pesquisa de alelos tipo kdr em larvas de *R. microplus* provenientes de 587 populações do estado de Minas Gerais. Os autores identificaram que 91,9 % das populações avaliadas são heterozigotas, demonstrando que a maioria das populações apresentam o alelo que confere a resistência a pesticidas piretróides.

Estudo realizado por Mendes *et al.* (2013) não identificou em nenhuma das 10 populações avaliadas a mutação de ponto no segmento S6 do domínio III do gene do canal de sódio, a qual envolve a substituição de uma tiamina por uma adenina (T2134A) identificada por He *et al.* (1999).

Estudos epidemiológicos direcionados a identificar a situação da resistência a pesticidas piretróides em populações do carrapato dos bovinos nos estados de Rondônia e São Paulo estão em fase final de realização. Os resultados obtidos até o momento demonstram que a dispersão dos alelos mutantes kdr é bastante distinta, sendo que em Rondônia a maioria das populações do carrapato dos bovinos avaliadas são heterozigotas (Figura 10), enquanto que as populações de São Paulo apresentam uma alta frequência de genótipos SS.

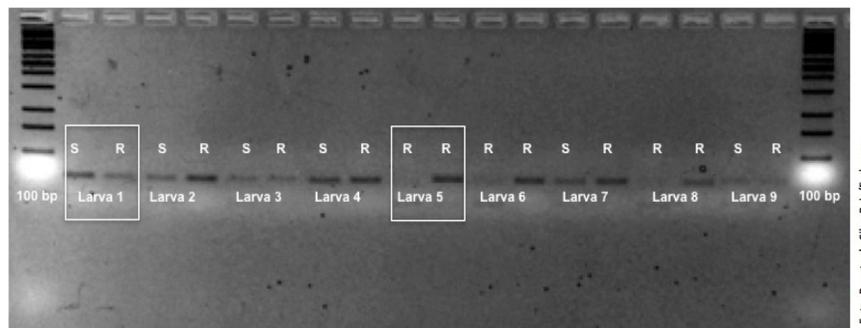


Foto: Renata da Silva Reis/Embrapa

Figura 10. Gel de agarose a 4% corado com brometo de etídeo com produtos de amplificação das amostras de DNA de larvas de carrapato *Rhipicephalus microplus* provenientes de populações estabelecidas em Rondônia genotipadas para KDR, mutação que confere resistência aos carrapaticidas piretróides. Onde: poços 1 e 20 = padrão de pares de bases (100 pares de base); SR= amostras de larvas com genótipo heterozigoto; RR= amostra de larva com genótipo homozigoto resistente; KDR= indicação da banda com cerca de 68 pb que torna possível o diagnóstico da mutação.

5. Considerações Finais

Bioensaios padronizados para determinação do fator de resistência em populações do carrapato dos bovinos, tais como o *LPT* (STONE; HAYDOCK, 1962), são úteis uma vez que oferecem um método fenotípico de resposta das populações às diferentes bases pesticidas. No entanto, bioensaios muitas vezes requerem um grande número de larvas e várias semanas para que se disponibilizem os resultados. Ensaio diagnóstico fundamentado em alvos moleculares podem produzir resultados rápidos, em até 24 horas, a partir da análise de poucos, ou até mesmo, de um único indivíduo. O desconhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência a maioria das bases pesticidas utilizadas no controle das populações do carrapato dos bovinos ainda é um fator limitante para a ampla utilização do diagnóstico molecular.

A demanda por avanços metodológicos e recomendações práticas relacionadas ao controle das populações do carrapato dos bovinos, torna necessária a busca de tecnologias que permitam acompanhar a crescente complexidade da cadeia produtiva da bovinocultura. O desenvolvimento de ferramentas diagnósticas para detecção da resistência a pesticidas em populações de campo do carrapato dos bovinos capazes de gerar resultados rápidos são fundamentais para o desenvolvimento de novas estratégias de controle parasitário e para o manejo das bases pesticidas.

A rápida e acurada identificação da resistência à pesticidas nas populações parasitárias de ruminantes deve ser considerada como uma demanda prioritária para reduzir a dependência química, mitigar a contaminação ambiental e buscar a eliminação da presença de resíduos pesticidas nos alimentos. Na atualidade, a identificação de produtos de degradação de fármacos parasiticidas em produtos de origem animal se apresenta como uma barreira não tarifária que será cada vez mais explorada pelo competitivo mercado internacional de produtos cárneos e lácteos.

O Brasil, por possuir o maior rebanho comercial do mundo, deve buscar estratégias que resguardem os produtos advindos da bovinocultura nacional. Nesse sentido, o manejo das bases parasiticidas, incluindo os fármacos carrapaticidas, merece especial atenção. A padronização de procedimentos diagnósticos e a realização de amplos estudos epidemiológicos direcionados a estabelecer a situação da resistências as bases químicas utilizadas para o controle das populações do carrapato dos bovinos mostram-se como ações necessárias para o correto uso do arsenal farmacológico pesticida direcionado ao controle das populações do carrapato dos bovinos, o que possibilitará a oferta de produtos cárneos e lácteos livres de contaminantes químicos pesticidas.

REFERÊNCIAS

- ATKINSON, P. W.; BINNINGTON, K. C.; ROULSTON, W. J. High monoamine oxidase activity in the tick *Boophilus microplus*, and inhibition by chlordimeform and related pesticides. **J. Aust. Entomol. Soc.**, v.13, p.207-210, 1974.
- BAFFI, M.A.; SOUZA, G.R.; SOUSA, C.S.; CERON, C.R.; BONETTI, A.M. Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephallus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.160, n.1, p.70-73, 2008.
- BAXTER, G.D.; BARKER, S.C. Isolation of cDNA an octopamine-like, G-protein coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Ins. Biochem. Mol. Biol.**, v.29, p.461-467, 1999.
- BELLEGARD, M. I.; MOOLHUIJZENA, P.M.; GUERRERO, F.D.; SCHIBECIA, D.; RODRIGUEZ-VALLEB, M.; PETERSONE, D.G.; DOWD, S.E.; BARRERO, R.; HUNTER, A.; MILLER, R. J. LEW-TABOR, A.E. Cattle Tick Base: An integrated Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **J. Parasitol.**,v.42, n.2, p.161-169, 2012.
- BLACKHALL, W.J.; POULIOT, J.F.; PRICHARD, R.K.; BEECH, R.N. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate gated chloride channel gene in ivermectin and moxidectin selected strains. **Exp. Parasitol.**,v.90, p.42–48, 1998.
- CAMPOS, F.; DYBAS, R.A.; KRUPA, D.A. Susceptibility of twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) populations in California to abamectin. **J. Econ. Entomol.**, v.88, p.225-231, 1995.
- CHEN, A.C.; HE, H.; TEMEYER, K.B.; JONES, S.; GREEN, P.; BARKER, S.C. A survey of *Rhipicephalus microplus* populations for mutations associated with pyrethroid resistance. **J. Econ. Entomol.**, v.102, p.373–380, 2009.
- CLARK, J.M.; SCOTT, J.G.; CAMPOS, F.; BLOOMQUIST, J.R. Resistance to avermectins- extent, mechanisms, and management implications. **Annu. Rev. Entomol.**, v.40, p.1-30, 1995.

CUTULLÉ, C.; JONSSON, N.N., SEDDON, J. Population structure of Australian isolates of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitol. Vet.**, v.161, n.3-4, p.283-291, 2009.

DALY, J.C.; FISK, J.H. Sex-linked inheritance of endosulphan resistance in *Helicoverpa armigera*. **Heredity**, v.81, p.55–62, 1998.

DAVEY, R.B., AHRENS, E.H.; GEORGE, J.E. Efficacy of sprays of amitraz against *Boophilus* ticks on cattle. **Prev. Vet. Med.**, v.2, p.91-698, 1984.

De LAME, F.M.; HONG, J.J.; SHEARER, P.W.; BRATTSTEN, L.B. Sex-related differences in the tolerance of Oriental fruit moth (*Grapholita molesta*) to organophosphate insecticides. **Pest. Manag. Sci.**, v.57, p.827–832, 2001.

DOMINGUES, L.N, BRASIL, B.S.A.F.; BELLO, A.C.P.P.; CUNHA, A.P.; BARROS, A.T.M.; LEITE, R.C.; SILAGHI, C.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. F. Survey of pyrethroid and organophosphate resistance in Brazilian field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: detection of C190a mutation in domain II of the para-type sodium channel gene. **Veterinary Parasitology**, v.189, n.2-4, p.327-332, 2012.

DONG K. Insect sodium channels and insecticide resistance. **Invert. Neurosci.**, v.7, p.17-30, 2007.

DONG, K.; SCOTT, J. G. Linkage of the *kdr*-type resistance locus to the sodium channel gene in German cockroaches. **Insect. Biochem. Molec. Biol.**, v.24, p.647-654, 1994.

DRUMMOND, R.O.; CRUST, S.E.; TREVINO, J.L.; GLADNEY, W.J.; GRAHAN, O.H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus decoloratus* laboratory tests of insecticides. **J. Econ. Entomol.**, v.66, p.130–133, 1973.

DUDAI, Y., BUXBAUM, J.; CORFAS, G.; OFARIM, M. Formamidines interact with *Drosophila* octopamine receptors, alter the flies' behavior and reduce their learning ability. **J. Comp. Physiol. A.**, v.161, p.739-746, 1987.

ETO, M. Biochemical mechanisms of insecticidal activities. In: BOWERS, W.S.; EBING, W.; MARTIN, D. (Eds.) **Chemistry of Plant Protection**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. v.6, p.67-68.

EVANS, P.D.; GEE, J.D. Action of formamidine pesticides on octopamine receptors. **Nature**, v.28, p.60-62, 1980.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants: module 1. Ticks: Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention.** Rome: FAO, 2004. p.25–77.

FAZA, A.P.; PINTO, I.S.B.; FONSECA, I.; ANTUNES, G.R.; MONTEIRO, C.M.O.; DAEMON, E.; MUNIZ, M.S.; MARTINS, M.F.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J.A. New approach to characterization of the resistance of populations of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to organophosphate and pyrethroid in the state of Minas Gerais, Brazil. **Experimental Parasitology**, v.134, p.519-523, 2013.

FRITZ, L.C.; WANG, C.C.; GORIO, A. Avermectin B: a irreversibly blocks postsynaptic potentials at the lobster neuromuscular junction by reducing muscle membrane resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.76, p.2062-2066, 1979.

GARRIS, G. I.; GEORGE, J. E. Field evaluation of amitraz applied to cattle as sprays for control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in the eradication program in Puerto Rico. **Prev. Vet. Medic.**, v.3, p.363-369, 1985.

GEORGHIOU, G.P. Overview of Insecticide Resistance. In: M.B. GREEN, H.M LEBARON E W.K.MOBERG (ed.). **Managing Resistance to Agrochemicals: from fundamental research to practical strategies.** Washington D.C.: Am. Chem. Soc., Symp., Ser. n.421, p.18-41, 1990.

GUERRERO, F.D.; DAVEY, R.B.; MILLER, R.J. Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v.38, p.44–50, 2001.

GUERRERO, F.D.; LOVIS, L.; MARTINS, J.R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus microplus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.21, p.1–6, 2012.

GUGLIELMONE, A.A.; CASTELLI, M.E.; VOLPOGNI, M.M.; ANZIANI, O.S.; MANGOLD, A.J. Dynamics of cypermethrin resistance in the field in the hom fly, *Haematobia irritans*. **Med. Vet. Entomol.**, v.16, p.310-315, 2002.

HAIGH, A.J.B.; GICHANG, M.M. The activity of amitraz against infestations of *Rhipicephalus appendiculatus*. **Pest. Sci.**, v.11, p.674-678, 1980.

HE, H.; CHEN, A.C.; DAVEY, R.B.; IVIE, G.W.; GEORGE, J.E. Identification of a point mutation in the para-sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.261, p.558-561, 1999.

JAMROZ, R.C.; GUERRERO F.D.; KAMMLAH, D.; KUNZ, S. E. Role of the kdr and super-kdr sodium channel; mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.28, p.1031-1037, 1998.

JAMROZ, R.C.; GUERRERO, F.D.; PRUETT, J.H.; OEHLER, D.D.; MILLER, R.J. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of southern cattle tick. **J. Insect Physiol.**, v.46, p.685-695, 2000.

JONSSON, N.; HOPE, M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vet. Parasit.**, v.146, p.193-198, 2007.

JONSSON, N.N.; CUTULLE, C.; CORLEY, S.W.; SEDDON, J.M. Identification of a mutation in the para-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* associated with resistance to flumethrin but not to cypermethrin. **Int. J. Parasitol.**, v.40, p.1659-1664, 2010.

KAGARUKI, L.K. The efficacy of amitraz against cattle ticks in Tanzania. **Ond. J. Vet. Res.**, v.63, p.91-96, 1996.

KEMP, D.H.; MCKENNA, R.V.; THULLNER, R.; WILLADSEN, P. Strategies for tick control in a world of acaricide resistance. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL; CONTROL DE LA RESISTENCIA EN GARRAPATAS Y MOSCAS DE LA IMPORTANCIA VETERINARIA Y ENFERMEDADES QUE TRANSMITEN, 4., 1999. Jalisco, México. **Proceedings...** Jalisco, México: IICA, 1999. p. 1-10.

KOTZE, A.C.; SALES, N. Elevated *in vitro* monooxygenase activity associated with insecticide resistances in field strain larvae of the Australian sheep blowfly (Diptera: Calliphoridae). **J. Econ. Entomol.**, v.88, p.782-787, 1995.

LASOTA, J.A.; DYBAS, R.A. Avermectins, a novel class of compounds: implications for use in arthropod pest control. **Ann. Rev. Entomol.**, v.36, p.91-117, 1991.

LI, A.Y.; DAVEY, R.B.; MILLER, R.J.; GEORGE, J.E. Mode of inheritance of amitraz resistance in a Brazilian strain of the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Exp. Appl. Acarol.**, v.37, p.183–198, 2005.

LOVIS, L.; GUERRERO, F.D.; MILLER, R.J.; BODINE, D.M.; BETSCHART, B.; SAGER, H. Distribution patterns of three sodium channel mutations associated with pyrethroid resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations from North and South America, South Africa and Australia. **Int. J. Parasitology: Drugs and Drug Resist.**, v.2, p.216–224, 2012.

MANSON, J.; MURPHY, M.; RICHDAL, N.; SMITH, M. Effects of oral exposure to trichloroethylene on female reproductive function. **Toxicology**, v.32, p.229-242, 1984.

MENDES, M.C.; DUARTE, F.C.; MARTINS, J.R.; KLAFKE, G.M.; FIORINI, L.C.; BARROS, A.T.M. Characterization of the pyrethroid resistance profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations from the states of Rio Grande do Sul and Mato Grosso do Sul. **Braz. J. Vet. Parasit.**, v.22, p.379-384, 2013.

MORGAN, J.A.; CORLEY, S.W.; JACKSON, L.A.; LEW-TABOR, A.E.; MOOLHUIJZEN, P.M.; JONSSON, N.N. Identification of a mutation in the para sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* associated with resistance to synthetic pyrethroid acaricides. **Int. J. Parasitol.**, v.39, p.775–779, 2009.

NARAHASHI, T.; ZHAO, X.; IKEDA, T.; NAGATA, K.; YEH, J.Z. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. **Hum. Exper. Toxicol.**, v.26, p.361–366, 2007.

RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M.V.; UNGER, M.F.; COLLINS, F.H.; FEYEREISEN, R. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. **Science**, v.298, p.179-181, 2002.

SCHUNTNER, C.A.; THOMPSON, P.G. Inhibition of a carbaryl oxidising enzyme as the

primary lesion in the lethal action of formamidines in *Boophilus microplus*. **J. Aus. Entomol. Soc.**, v.15, p.388, 1976.

SCOTT, J.A. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. **Florida Entomologist**, v.78, p.399-414, 1995.

SHAW, R.D. Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.). **Bull. Entom. Res.**, v.56, p.389–405, 1966.

SHEARER, P.W.; USMANI K.A. Sex-related response to organophosphorus and carbamate insecticides in adult Oriental fruit moth, *Grapholita molesta*. **Pest Manag. Sci.**, v.57, p.822–826, 2001.

STONE B.F.; HAYDOCK P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Bull. Entomol. Res.**, v.53, p.563–578, 1962

STUMPF, N.; NAUEN, R. Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari-Tetranychidae). **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.72, p. 111-121, 2002.

SUTHERST, R.W.; KERR, J.D.; MAYWALD, G.F.; STEGEMAN, D.A. The effect of season and nutrition on the resistance of cattle tick *Boophilus microplus*. **Aust. J. Agric. Res.**, v.34, p.329-339, 1983.

TEMEYER, K.B.; PRUETT, J.H.; OLAFSON, P.U. Baculovirus expression, biochemical characterization and organophosphate sensitivity of rBmAChE1, rBmAChE2, and rBmAChE3 of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Vet. Parasitol.**, v.172, p.114–121, 2010.

TEMEYER, K.B.; OLAFSON, P.U.; BRAKE, D.K.; TUCKOW, A.P.; LI, A.Y.; LEÓN, A.A.P. Acetylcholinesterase of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Phlebotomus papatasi*: Gene identification, expression, and biochemical properties of recombinant proteins. **Pest. Biochem. Phys.**, v.106, p.118–123, 2013.

WILLIAMSON, M.S.; MARTINEZ-TORRES, D.; HICK, C.A.; DEVONSHIRE, A.L. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. **Mol. Gen. Genet.**, v.252, p.51-60, 1996.