



Caracterização Molecular da Resistência de Populações do Carrapato dos Bovinos do Estado de Minas Gerais a Organofosforados¹

Aline Pasqualini Faza², Gustavo Resende Antunes³, Isabela Fonseca², Daisyléa de Souza Paiva³, Marta Fonseca Martins Guimarães⁵, Márcia Cristina de Azevedo Prata⁵, John Furlong⁵

¹Apoio Financeiro FAPEMIG

²Bolsistas de Apoio Técnico à Pesquisa - BAT II - FAPEMIG. E-mail: alinefaza@yahoo.com.br, isabela_fonseca@yahoo.com.br

³Alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica - UFJF. E-mail: guto1982@gmail.com, daisyufjf@gmail.com

⁴Pesquisadores 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 dos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é uma das principais pragas nas regiões tropicais e subtropicais, causando grandes prejuízos na pecuária. O controle desta espécie tem sido feito quase que exclusivamente por meio de carrapaticidas químicos, de forma incorreta e indiscriminada, levando à seleção e proliferação de populações resistentes. O monitoramento da resistência às bases químicas em uso tem se limitado ao perfil fenotípico, havendo escassez de registros abordando perfil genotípico da resistência a carrapaticidas no Brasil. Portanto o presente trabalho tem como objetivo efetuar a caracterização molecular e traçar um perfil genético da resistência de populações do carrapato dos bovinos no Estado de Minas Gerais aos organofosforados (OPs). Para isso foram genotipadas 112 larvas de carrapatos para o gene Carboxilesterase (*CaE*) utilizando a técnica de PCR-RFLP. A frequência dos genótipos WW (sensíveis), WM (tolerantes) e MM (resistentes) na população de larvas foi 0,27, 0,60 e 0,13 respectivamente. A frequência dos alelos W e M nessa mesma população foram 0,57 e 0,43 respectivamente, mostrando assim que a população se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o produto químico OPs.

Palavras-chave: carrapaticida, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sensibilidade

Abstract: Cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a major plague in tropical and subtropical regions, causing losses in livestock. To control this species, is used almost exclusively chemicals, so wrong and indiscriminate that leaves to selection and proliferation of resistant populations. The monitoring of chemical bases in use resistance has been limited to phenotypic profile, having few records about genotypic profile of acaricide resistance. Therefore, the aims of this work is make the molecular characterization and trace a genetic profile of the resistance of cattle tick populations of Minas Gerais state to organophosphate (Ops). To make this, were genotyped 112 populations of ticks larvae for the gene Carboxylesterase (*CaE*) - which is related to the resistance - using PCR-RFLP technical. Frequency of WW (sensible), WM (tolerant) and MM (resistant) genes in larvae population were 0,27, 0,60 and 0,13 respectively. Frequency of W and M alleles in the same population was 0,57 and 0,43 respectively, thus showing that the population is in Hardy-Weinberg equilibrium for the chemical product OPs.

Keywords: acaricide, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sensibility

Introdução

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) é um ectoparasita de bovino de grande importância nos países tropicais, pois causa espoliação sanguínea e transmissão de patógenos, levando a um prejuízo econômico de dois bilhões de dólares anuais no Brasil (Grisi et al., 2002).

A forma tradicional e praticamente exclusiva de controle desse parasita é por meio da utilização de carrapaticidas químicos, que, no entanto, vem sendo feita de modo incorreto, levando a resultados insatisfatórios e acarretando a seleção e proliferação de populações resistentes às poucas bases químicas carrapaticidas disponíveis. Tal fato é considerado preocupante, pois, uma vez instalada a resistência a um determinado produto, a utilização de outro pertencente ao mesmo grupo será ineficiente para aquela população (Furlong et al., 2007).

A resistência, de maneira geral, é uma resposta genético-evolutiva das populações de parasitas exposta a um estresse ambiental severo e contínuo. Isso acontece, por exemplo, quando um produto é aplicado frequentemente e um alto grau de dominância de alelos resistentes leva a uma rápida seleção para resistência. No carrapato de bovinos, a resistência aos organofosforados (OPs) normalmente é

determinada por um único gene semidominante, sendo que os indivíduos heterozigotos também apresentam resistência, embora em menor nível do que os homozigotos resistentes (Pereira et al., 2008).

O monitoramento da resistência às bases químicas utilizadas tem se limitado ao perfil fenotípico, havendo escassez de registros abordando perfil genotípico, no entanto a utilização de ferramentas moleculares por meio de técnicas de biologia molecular pode oferecer informações adicionais sobre a distribuição e frequência de alelos mutantes e contribuir para o monitoramento dos efeitos das estratégias de controle. Mutações de ponto em genes codificadores de esterases representam um dos principais mecanismos de resistência nessa espécie estudados até o momento. Baffi et al. (2007) identificaram uma mutação de ponto no gene de uma Carboxilesterase (*CaE*) em uma população de carrapatos com histórico de resistência. Esta mutação cria um sítio de restrição para a enzima *EcoR* I e, juntamente com este evento molecular, ocorre uma série de outras alterações que estão relacionadas com o desenvolvimento da resistência a este grupo químico.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi genotipar populações de carrapatos dos bovinos do Estado de Minas Gerais para uma mutação no gene da *CaE* responsável pela resistência/susceptibilidade aos Organofosforados. Além disso, estimar as frequências alélicas e genotípicas e verificar se tais populações encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Material e Métodos

Foram utilizadas 112 larvas do carrapato dos bovinos provenientes do grupo controle de cada teste de imersão (Drummond et al., 1973) realizado no ano de 2007 pelo Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora (MG). Foram selecionadas somente as populações oriundas do Estado de Minas Gerais para se obter um perfil genético da resistência de populações do carrapato dos bovinos neste Estado.

As extrações de DNA foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular, também na Embrapa Gado de Leite. Para isso, as larvas mantidas a -80°C foram maceradas 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. Acrescentou-se 300 µL de Tampão de Lise (300 mM Tris-HCl, 40 mM SDS, 20 mM EDTA) e as amostras foram incubadas no gelo por 15 minutos. Decorrido este tempo, foi acrescentado 5 µL Proteinase K (20 µg/µL) e as mesmas foram incubadas a 45°C por 1 hora. Em seguida, acrescentou-se 600 µL de fenol:clorofórmio:isoamil (24:24:1), misturou-se por pipetagem e centrifugou-se por 5 min a 17.000 x g. A fase superior foi transferida para um novo microtubo e foram acrescentados 600 µL 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. Acrescentou-se então 60 µL de NaCl 5 M e 1500 µL de etanol para a precipitação do DNA. Em seguida as amostras foram estocadas a -20°C por no mínimo 14 horas e após esse tempo foram centrifugadas por 15 minutos a 17.000 x g para a precipitação do DNA. Em seguida o DNA foi eluído em água *nuclease free* e quantificado por espectrofotometria (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific).

Para a reação de PCR foram utilizados 20 ng de DNA, 0,5 µM de cada *primer* e 1X de *GoTaq® Green Master Mix* (Promega) em um volume final de 20 µL. O *primer* utilizado nesta reação foi descrito por Baffi et al. (2007). A PCR consistiu de uma desnaturação prévia de 95°C por 5 min, seguida por 10 ciclos de 95°C por 1 min, 65°C por 1 min com decréscimo de 1°C por ciclo e 72°C por 1 min, e mais 30 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min e, finalmente, um período adicional de extensão de 72°C por 7 min.

O produto da PCR (372 pb) foi digerido com a enzima *EcoR* I a 37°C por 3 horas e submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado em solução de brometo de etídio. Esta enzima diferencia os alelos W e M para uma mutação de ponto no gene *CaE* em carrapatos. Foram calculadas as frequências gênicas e genotípicas da população e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi analisado pelo Teste χ^2 (Qui-Quadrado) ao nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

No presente trabalho foram genotipadas 112 larvas do carrapato dos bovinos do Estado de Minas Gerais para o gene *CaE*. Destas, 27% apresentaram genótipo homozigoto para W (sensível), 60% foram heterozigotos (WM) (tolerante), e 13% homozigotas para M (resistente). Comparando-se estes resultados com os encontrados por Baffi et al. (2007), espera-se que, a população de larvas avaliadas neste trabalho apresente o seguinte perfil fenotípico: aproximadamente 27% sensíveis aos OPs, 60% tolerantes e 13% totalmente resistentes à essa base química. Os OPs são inibidores da *CaE*, enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina, após transmissão do impulso nervoso, atuando como competidores pelos sítios de ligação da enzima.

No trabalho de Baffi et al. (2007) o alelo W é identificado pela presença de uma banda não digerida de 372 pb e o alelo M é identificado por uma banda de 300 pb e outra de 72 pb. Com isso torna-se possível identificar três diferentes genótipos: as larvas que contêm somente bandas de 372 pb são

homozigotas selvagens (WW) e susceptíveis aos OPs; as larvas com dois padrões de bandas (300 e 72 pb) são homozigotas mutantes (MM) e resistentes aos OPs; já as larvas heterozigotas (WM), com bandas de 372, 300 e 72 pb, apresentam tolerância.

As frequências observadas e esperadas para cada genótipo não diferiram estatisticamente pelo teste de χ^2 ao nível de significância de 5%, como pode ser observado na Tabela 1, evidenciando, portanto, que a população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências dos alelos W e M encontradas foram semelhantes, mostrando que esses alelos estão bem distribuídos na população, indicando que as populações de carrapatos do Estado de Minas Gerais ainda não se encontram totalmente resistentes a OPs. Portanto, tal base química ainda pode ser utilizada na composição de produtos utilizados no controle a estes carrapatos, com probabilidade de eficiência satisfatória, o que tem sido comprovado fenotipicamente por meio de testes de imersão de fêmeas ingurgitadas (Furlong et al, 2007)

Nos registros de Baffi et al (2007), foi encontrada situação diferente da observada no presente trabalho, ou seja, as frequências genotípicas e alélicas encontram-se em desequilíbrio, evidenciando que a população enfocada no estudo anterior está sob intensa seleção em favor da resistência aos OPs.

Dado que a resistência é uma adaptação evolutiva, existem mecanismos comportamentais e fisiológicos que permitem aos indivíduos resistentes a sobrevivência perante uma pressão de seleção (Pereira et al. 2008). É necessário que haja uma maior compreensão dos mecanismos moleculares da resistência, para que futuramente sejam desenvolvidas novas técnicas permitindo um prolongamento da vida útil dos princípios ativos em uso, e com isso possam desenvolver drogas menos sensíveis ao desenvolvimento da resistência pelos carrapatos.

Tabela 1 - Frequências genotípicas, gênicas e valor de χ^2 calculado a 5% de probabilidade das 112 populações do carrapato dos bovinos do Estado de Minas Gerais aos OPs.

Genótipo ^a	Número de Larvas		Frequência		χ^2 calculado
	Observado	Esperado	Genotípica	Alélica	
WW	30	36	0,27	(W) 0,57	5,34
WM	67	55	0,60		
MM	15	21	0,13	(M) 0,43	

^a Genótipos: WW = Sensível, WM =Tolerante, MM = Resistente

Conclusão

De acordo com os resultados, foi possível concluir que a população estudada encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para OPs. Como próxima etapa, poderá ser analisado um maior número de larvas e /ou outros genes e realização concomitante de bioensaios para que seja possível a comparação dos resultados genotípicos e fenotípicos para traçar um perfil genético da resistência de populações do carrapato dos bovinos aos OPs.

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**, n.148, p.301-309, 2007.
- FURLONG, J.; MARTINS, J.R.; PRATA, M.C.A.; O Carrapato dos Bovinos e a Resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, ano 27, n.159, p.1-7, 2007.
- 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.
- PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J. et al. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus** **Biologia, Controle e Resistência**. 1.ed. MedVet: São Paulo, 2008. p.81-105