



SP
4844
P. 155

Início

Frequência alélica e genotípica do gene *CzEst9* associado à resistência a piretróides em populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)

Enviado por Guto Antunes, sex, 18/12/2009 - 19:44

Autores: Gustavo Resende Antunes

Aline Pasqualini Faza

Isabela Fonseca

Daisyléa de Souza Paiva

Marta Fonseca Martins Guimarães

Márcia Cristina de Azevedo Prata

John Furlong

Resumo:

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.

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

Resumo

Submeter Resumo

Ver lista de resumos

Login do usuário

Usuário: *

Senha: *

Login

• Recuperar senha

Selecionados

Confira a 2ª Lista dos
Selecionados

Datas importantes

Inscrições:

01/06/09 a 18/09/09

Resultado da seleção:

05/10/09

Data do Curso:

18/01/10 a 29/01/10

Estágio opcional:

01/02/10 a 05/02/10

Idioma

- Português
- Español

Realização

USP



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 resistente aos piretróides. E, por fim, o terceiro padrão, o genótipo heterocigoto (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 χ^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 homocigoto selvagem, consideradas, por este método, sensíveis; 48% eram heterocigotos, com resistência moderada; e 28% de homocigotos 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 homocigotos mutantes (M), 28% de heterocigotos (H) e 8% de homocigotos 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 χ^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 Scientiarum 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*

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

Patrocinador



Apoio



SIGMA-ALDRICH