



Avaliação das Frequências Genotípica e Alélica para o Gene de Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a Piretroides¹

Isabella Silvestre Barreto Pinto², Aline Pasqualini Faza³, Isabela Fonseca⁴, Márcia Cristina de Azevedo Prata⁵, John Furlong⁵, Marta Fonseca Martins⁵

¹Projeto financiado pela Fapemig

²Bolsista BAT II/FAPEMIG – Juiz de Fora/MG. isabellajf@gmail.com

³Mestranda em Comportamento Animal - UFJF/Juiz de Fora. MG. Bolsista da Capes. apfaza@yahoo.com.br

⁴Doutoranda do Programa de Genética e Melhoramento - UFV/Viçosa, MG. isabella_fonseca@yahoo.com.br

⁵Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora/MG. mprata@cnpgl.embrapa.br, john@cnpgl.embrapa.br, mmartins@cnpgl.embrapa.br

Resumo: O carrapato dos bovinos tem causado prejuízos financeiros para a agropecuária brasileira, e o uso descontrolado de carrapaticidas é um dos fatores que mais contribui para esta realidade. Mutações de ponto em genes que estão relacionados a cadeia de detoxificação têm sido responsáveis pela resistência dos carrapatos a compostos químicos a base de piretroides. Dois alelos do gene para a proteína do canal de sódio foram relacionados à resistência a piretroides em carrapatos: o alelo A, da suscetibilidade e o alelo B, que confere resistência. O objetivo deste trabalho foi verificar as frequências genotípicas e alélicas para o gene de resistência a piretroides em 440 populações de carrapato dos bovinos e associar os valores encontrados para equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para isso, o DNA das larvas das diferentes populações foi extraído com fenol-clorofórmio e ressuspenso em água. Em seguida foi feita a reação de PCR e as amostras foram aplicadas em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio para a identificação dos alelos. As frequências dos alelos A e B foram de 0,4886 e 0,5114. Das larvas genotipadas, 3,41% foram diagnosticadas como homozigotas suscetíveis (AA) e 96,59% como resistentes a piretroides, sendo 90,91% heterozigotas (AB) e 5,68% homozigotas resistentes (BB). Além de evidenciar desequilíbrio, estes valores indicam que a maioria das populações resistentes a piretroides apresentam apenas um alelo responsável pela resistência.

Palavras-chave: carrapatos, DNA, equilíbrio de Hardy-Weinberg, genotipagem

Abstract: The cattle tick has caused economic losses to Brazilian agriculture, and uncontrolled use of acaricides is one factor that contributes most to this reality. Point mutations in genes that are related to the chain of detoxification have been responsible for the resistance of ticks to chemicals based on synthetic pyrethroids. Two alleles of the gene for sodium channel protein have been related with resistance to pyrethroids in ticks: the A allele, of susceptibility and B allele, which confers resistance. The aim of this study was to assess the genotypic and allelic frequencies for the gene for resistance to pyrethroids in 440 populations of the cattle tick and associate the values for Hardy-Weinberg equilibrium. For this, the DNA of larvae of different populations was extracted with phenol-chloroform and resuspended in water. Next was the PCR reaction and the samples were applied in 3% agarose gel stained with ethidium bromide for identification of alleles. The frequencies of alleles A and B were 0.4886 and 0.5114. Larvae genotyped, 3.41% were diagnosed as homozygous susceptible (AA) and 96.59% as resistant to pyrethroids (90.91% heterozygous, AB, and 5.68% resistant homozygotes, BB). In addition to demonstrating imbalance, these figures indicate that most populations resistant to pyrethroids have only one allele responsible for resistance.

Keywords: DNA, genotyping, Hardy-Weinberg equilibrium, ticks

Introdução

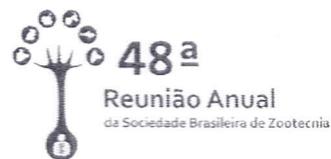
O carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, tem sido responsável por prejuízos da ordem de 2 bilhões de dólares anuais nos rebanhos brasileiros. O uso indiscriminado de carrapaticidas contribui para essa situação, levando à seleção de populações de carrapatos resistentes aos



48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

O Desenvolvimento da Produção Animal e a Responsabilidade Frente a Novos Desafios

Belém - PA, 18 a 21 de Julho de 2011



compostos utilizados (Furlong et al, 2007), o que acarreta a necessidade de intensificação de estudos sobre o processo de resistência.

A resistência dos carrapatos ao composto piretroide pode ser decorrente de mutações de ponto em genes que estão relacionados à cadeia de detoxificação aos compostos químicos a base de piretroides. Dois alelos do gene para a proteína do canal de sódio foram relacionados à resistência a piretroides em carrapatos, o alelo A, da suscetibilidade e o alelo B, que confere resistência. Para a determinação destes alelos são utilizados dois primers *forward*: um para o alelo da suscetibilidade (A) e outro para o alelo da resistência (B); e um primer *reverse* comum para os dois (Guerrero et al, 2001).

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar as frequências genotípicas e alélicas para o gene da resistência a piretroides de 440 populações de carrapato dos bovinos e associar os valores encontrados para EHW.

Material e Métodos

Larvas provenientes de 440 populações de carrapato dos bovinos do Estado de Minas Gerais, na razão de uma larva por população, foram colocadas em tubos previamente identificados e maceradas em tampão de Grinding (Tris-HCl 10 mM, EDTA 60 mM, NaCl 100 mM e Sacarose 30 mM), com o auxílio de pistilo. O DNA foi extraído conforme protocolo descrito por Sheppard et al. (1992) com modificações e resuspendido em água MilliQ. Em seguida foi realizada a quantificação e a avaliação da qualidade das amostras por meio de espectrofotometria (Nanodrop®1000 Technologies, Wilmington, DE, USA). Para determinação do genótipo foi empregada a técnica de AS-PCR (Allele Specific-Polimerase Chain Reaction), onde foram utilizados dois primers *forward*: um para o alelo da suscetibilidade (A) e outro para o alelo da resistência (B); e um primer *reverse* comum para os dois (Tabela 1). A reação de PCR foi conduzida no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Tabela 1- Sequência dos primers utilizados na reação de PCR para avaliação da resistência a piretroides de larvas do carrapato dos bovinos do estado de Minas Gerais.

| Primer | Sequência | Descrição |
|--------|---------------------------|--------------------------|
| FG 221 | 5'-TTATCTTCGGCTCCTTCT-3' | Alelo selvagem (A) |
| FG 222 | 5'-TTATCTTCGGCTCCTTCA-3' | Alelo da resistência (B) |
| FG 227 | 5'-TTGTCATTGAAATTGTCGA-3' | Reverse |

Para visualização dos fragmentos e verificação da eficiência da amplificação foi preparado gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio. As análises de frequências genotípicas e alélicas e o teste de EHW foram realizados no programa Popgen32 (Yeh et al., 1997). A probabilidade do EHW foi estimada pelo teste de χ^2 ($P < 0,001$).

Resultados e Discussão

As frequências dos alelos A e B foram de 0,4886 e 0,5114. A avaliação genotípica mostrou que as frequências dos genótipos AA, AB e BB foram, respectivamente, 0,0341, 0,9091 e 0,0568 (Tabela 2). Carrapatos suscetíveis devem apresentar o genótipo AA, enquanto carrapatos resistentes podem apresentar o genótipo BB ou AB, indicando, este último, uma resistência moderada a piretroides (Guerrero et al. 2001). Com base nos resultados obtidos nas populações avaliadas constata-se que o genótipo AB é o mais frequente, indicando que a maior parte das larvas analisadas possui apenas um alelo de resistência a piretroides.



Tabela 2 - Frequências genotípicas, alélicas e EHW relacionados à resistência a piretroides em 440 populações de carrapato dos bovinos do Estado de Minas Gerais.

| Genótipo | Número de populações | | Frequência | | EHW* |
|----------|----------------------|----------|------------|------------|----------|
| | Observado | Esperado | Genotípica | Alélica | |
| AA | 15 | 104 | 0,0341 | 0,4886 (A) | 249,4039 |
| AB | 400 | 220 | 0,9091 | | |
| BB | 25 | 114 | 0,0568 | 0,5114 (B) | |

* $P < (0,001)$

Guerrero et al (2001) encontraram, em seu trabalho com 306 larvas que apresentavam fenótipo de resistência, que a maioria analisada foi resistente a piretroides, com frequências de 0,14, 0,50 e 0,36 para homozigotos suscetíveis, heterozigotos e homozigotos resistentes, respectivamente. Baffi et al (2005) avaliaram uma população de carrapatos no Brasil e encontraram frequências de 0,37 e 0,64 para os alelos da suscetibilidade e resistência, respectivamente. Assim como no presente estudo, estes autores também observaram um aumento na frequência do alelo e dos genótipos responsáveis pela resistência dos carrapatos dos bovinos a piretroides.

A maior frequência de carrapatos resistentes a piretroides pode ser justificada pelo aumento da frequência do alelo que caracteriza resistência (B). Isto sugere que este alelo pode estar associado a cadeia de detoxificação da via metabólica de piretroides, tornando os carrapatos resistentes a este composto químico.

Com base no valor obtido de χ^2 para cálculo do EHW podemos afirmar que as populações analisadas não estão em equilíbrio, uma vez que há predominância significativa do alelo B, responsável pela resistência.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que a resistência de populações de carrapatos dos bovinos do Estado de Minas Gerais a piretroides é predominantemente caracterizada pela presença de apenas um alelo.

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.
- FURLONG, J.; MARTINS, J.R.; PRATA, M.C. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? *A Hora Veterinária*. Ano 27, n 159, p. 1-7. 2007
- GUERRERO, F.D.; DAVEY, R.B.; MILLER, R.J. Use of Allele-Specific Chain Reaction Assay to Genotype Pyrethroid Resistant Strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. v.38, n.1, p.44-50, 2001.
- SHEPPARD, W.S.; STECK, G.J.; McPHERON, B.A. Geographic populations of the medfly may be differentiated by mitochondrial DNA variation. *Experimentia*. v.48, p.1010-1013, 1992.
- YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T.B.J. et al. POPGENE (VERSION 1,32): Software Microsoft Windows-based freeware for population genetics analysis. Alberta: **University of Alberta**. 1997.