



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

ANÁLISE MOLECULAR E BIOQUÍMICA DA RESISTÊNCIA
DO *Boophilus microplus* (ACARI:IXODIDAE) À
CIPERMETRINA

Cícero Donizete Pereira

SISBI/UFU



1000210964

Uberlândia - MG

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

M.O.V.
595.4.2
P436a
TES/IN EM

**ANÁLISE MOLECULAR E BIOQUÍMICA DA RESISTÊNCIA
DO *Boophilus microplus* À CIPERMETRINA**

Aluno: Cícero Donizete Pereira

Orientador: Luiz Ricardo Gouglart Filho
Co-Orientador: Warwick Estevam Kerr

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte
dos requisitos para obtenção do
Título de Doutor em Genética e
Bioquímica**

**Uberlândia - MG
2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**ANÁLISE MOLECULAR E BIOQUÍMICA DA RESISTÊNCIA DO
Boophilus microplus (ACARI:IXODIDAE) À CIPERMETRINA**

Cícero Donizete Pereira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (Orientador)

Examinadores:

Dr. Warwick Estevam Kerr

Dr. Maurício Machaim Franco

Dra. Vania Alves Nascimento

Dr. Paulo Lourenço da Silva

Data da Defesa: 14 / 04 / 2003

**As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB
para o formato da Tese foram contempladas**

(Orientador)

Uberlândia, ____ / ____ / ____

AGRADECIMENTOS

A Deus por esta chance.

Ao Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, meu orientador, por ter confiado em mim e ajudado sempre com sua criatividade e otimismo, possibilitando-me atingir os objetivos propostos neste trabalho.

À Dra. Ana Maria Bonetti, pelos incentivos constantes, correções prévias e sugestões valiosas.

Ao Dr. Warwick Estevam Kerr, meu eterno orientador, professor e conselheiro.

Ao amigo Dr. Maurício Machaim Franco pelos debates científicos e políticos, pelas sugestões, amizade e por ajudar-me incondicionalmente sempre que precisei.

A Dra. Vânia Alves Nascimento pela amizade, sugestões e indispensável colaboração.

Ao Dr. Paulo Lourenço da Silva obrigado pelas sugestões e colaboração.

Ao amigo Guilherme pela grande contribuição, possibilitando-me, inclusive, por meio dele, acesso à Vallè S/A para condução de parte dos experimentos.

À Vallè SA em nome de seus competentes funcionários: Andréia, Carlos Tolentino, Carlos, Washington, Ricardo e Guilherme pela indispensável contribuição na coleta do material biológico e testes com carrapaticidas.

Ao amigo Dr. Walter Vieira da Cunha companheiro de luta desde a graduação.

Às amigas Alcione, Flávia, Renata, Alexandra, Fernanda e aos amigos Carlos e Gerson pelas contribuições técnicas e científicas.

Ao amigo Dr. Waldesse e sua esposa Jackeline pelas contribuições científicas, psicológicas e principalmente pela amizade.

Às amigas Milla e Soraya pela participação direta na condução deste trabalho. Obrigado pelo empenho, dedicação e pela amizade que muito me orgulha.

Ao amigo Marcus Marcolino que sempre esteve à disposição dando valiosas contribuições.

A todos os amigos dos Laboratórios de Genética, Genética Molecular e Bioquímica que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

Ao Frei Beniamino de Luca e colaboradores pela concessão de bolsa de estudo secundária, sem a qual um terceiro grau, e conseqüentemente um título de Doutor, não passaria de um sonho.

À minha esposa e meus filhos pela paciência e por possibilitar-me momentos indiscritíveis que transformam a turbulência do dia a dia de um pós-graduando numa calmaria paradisíaca.

A toda minha família: Mãe, Pai e irmãos, que, apesar da minha ausência, estiveram sempre do meu lado.

Vocês sabem o quanto são importantes para mim e comigo participaram juntos da realização deste trabalho.

Cida, minha mulher; Ana Carolina, Lucas e Vinícius (meus filhos)

*A vocês
Dedico*

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE ABREVIACÕES	v
RESUMO GERAL	1
1- INTRODUÇÃO GERAL	3
2- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
3- CAPÍTULO 1: Perfil Esterásico em Teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> Sensíveis e Resistentes à Cipermetrina em Uberlândia-MG	14
3.1- RESUMO	14
3.2- INTRODUÇÃO	16
3.3- MATERIAL E MÉTODOS	20
3.4- RESULTADO E DISCUSSÃO	24
3.5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
4- CAPÍTULO 2: Análise de Mutações na Região III_{S6} do Gene do Canal de Sódio Em <i>Boophilus microplus</i>	42
4.1- RESUMO	42
4.2- INTRODUÇÃO	44
4.3- MATERIAL E MÉTODOS	46
4.4- RESULTADO E DISCUSSÃO	53
4.5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Efeito de diferentes inibidores sobre as bandas esterásicas em teleóginas de <i>B. microplus</i> resistentes à cipermetrina(- : ausência de inibição; +, ++, +++, +++++ : respectivas inibições, em ordem crescente).	28
-----------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	Padrão comparativo de bandas esterásicas em uma população de teleóginas de <i>B. microplus</i> de Uberlândia, MG. PAGE a 12% para gel de separação e empilhamento a 5%, corado com α -naftil acetato. (1-3) Controle; (4-6) Sensível e (7-9) Resistente a Cipermetrina.	25
Figura 2	Padrão comparativo de bandas esterásicas numa população de teleóginas de <i>B. microplus</i> de Uberlândia, MG. PAGE a 12% para gel de separação e empilhamento a 5%, corado com β - naftil acetato. (1-2) Controle; (3-4) Sensível e (5-6) Resistente a Cipermetrina.	26
Figura 3	Padrão de inibição das bandas esterásicas em teleóginas de <i>B. microplus</i> , obtido pelo uso de sulfato de cobre 0,1mM. (1-2) Controle; (3-4) Susceptível e (5-6) Resistente à cipermetrina.	29

Figura 4	Padrão de inibição das bandas esterásicas em teleóginas de <i>B. microplus</i> , obtido pelo uso de sulfato de eserina 0,1mM. (1-2) Controle; (3-4) Susceptível e (5-6) Resistente à cipermetrina.	30
Figura 5	Padrão de inibição das bandas esterásicas em teleóginas de <i>B. microplus</i> , obtido pelo uso de Malathion 0,4mM. (1-2) Controle; (3-4) Susceptível e (5-6) Resistente à cipermetrina.	31
Figura 6	Padrão de inibição das bandas esterásicas em teleóginas de <i>B. microplus</i> , obtido pelo uso de PMSF 1,0 mM. (1-2) Controle; (3-4) Susceptível e (5-6) Resistente à cipermetrina.	32
 CAPÍTULO 2 		
Figura 1	Estrutura secundária das subunidades do canal de sódio (Adaptada de Plummer & Meisler, 1999).	44
Figura 2	Análise da qualidade das amostras de RNA total extraídas de teleóginas de <i>B. microplus</i> , em eletroforese de gel de agarose 1,5%.	47
Figura 3	Sequência esperada do fragmento de 337pb amplificado pelos <i>primers</i> A e B.	48
Figura 4	Esquema mostrando as etapas da RT-PCR assimétrico	51
Figura 5	Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos amplicons de um fragmento do canal de sódio de 337pb, obtido por RT-PCR. M (marcador de 100 pb); R₁ e R₂ (teleóginas resistentes à cipermetrina); S₁ e S₂ (teleóginas sensíveis à cipermedtrina)	53

- Figura 6** Análise de mutações por LIS-SSCP em gel de poliacrilamida dos amplicons do gene canal de sódio obtidos por RT-PCR. 54
- Figura 7** Gel de poliacrilamida (6%) de produtos gerados por LSART. **M** (marcador de peso molecular 100 pb); L₁ (R) e L₂ (S) PCR com OPA-04; L₃ (R) e L₄ (S) PCR com OPA-13; L₅ – L₈, PCR com OPV-17 e OPA-09; L₉ – L₁₂, PCR com OPA-04 e OPA –13 com alta estringência. 57

LISTA DE ABREVIações

μM	micromolar
μL	microlitro(s)
A	adenina
ABS	absorbância
AchE	acetilcolinesterase
BLAST	basic local alignment search tool
C	citossina
cDNA	DNA complementar
cm	centímetro
dATP	5'-desoxiadenosina trifosfato
dCTP	5'-desoxicitidina trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
dGTP	5'-desoxiguanosina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfato.
dTTP	5'-desoxitimidina trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico
G	guanina
h	hora(s)
LIS SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
M	molar
mg	miligrama
MgCl_2	cloreto de magnésio
min	minuto(s)
ml	mililitro(s)
mM	milimolar
ng	nanograma(s)
nm	nanômetro(s)
pb	pares de base
PCR	polymerase chain reaction
pmol	pico-mol

PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
RNA	ácido ribonucleido
rpm	rotação por minuto
T	timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima DNA polimerase)
U	uracila
UV	ultra-violeta
V	volts

RESUMO GERAL

O carrapato bovino (*Boophilus microplus*) é um dos ectoparasitos mais importantes para a agropecuária brasileira e demais regiões tropicais e subtropicais, sendo responsável por perdas econômicas significativas. Estima-se que este parasita cause 65% de prejuízos diretos e 35% de prejuízos indiretos à bovinocultura, gerando perdas na produção de leite, natalidade, ganho de peso, aumento da mortalidade e consumo de carrapaticidas, além dos prejuízos causados à indústria do couro. Dentre os vários métodos de controle, destaca-se o uso de carrapaticidas à base de piretróides que exercem um efeito neurotóxico no canal de sódio do parasita promovendo de forma gradual sua inativação. Algumas mutações no gene do canal de sódio de teleógenas desse carrapato têm sido descritas conferindo sítios de insensibilidade ao efeito neurotóxico dos piretróides. A resistência a este grupo de carrapaticidas pode ser também mediada por esterases como a acetilcolinesterase (AChE), na qual altos níveis de resistência foram evidenciados pela combinação de várias mutações no sítio ativo desta enzima. Testes com inibidores para esterase indicaram a presença de uma esterase, nesta população de *B. microplus*, pertencente ao grupo das AChE, associada à resistência a cipermetrina (piretróide). Dados preliminares com Single strand conformation polymorphism (LIS-SSCP) mostraram uma diferença na migração de fragmentos de 337pb do domínio III_{S6} do canal de sódio de teleógenas sensíveis e resistentes. Um novo método para detecção de mutações em produtos gênicos, chamado de LSART (RT-PCR assimétrico de baixa estringência), foi realizado. Dados obtidos por LSART, também sugeriram a presença de outras mutações no canal de sódio de teleógenas de *B. microplus*

por meio detecção de bandas polimórficas, quando comparadas teleóginas resistentes e sensíveis à cipermetrina, numa população de carrapatos de Uberlândia, Minas Gerais.

Palavras-chave: *Boophilus microplus*, cipermetrina, canal de sódio, esterase, RT-PCR, LIS-SSCP, RT-PCR assimétrico.

INTRODUÇÃO GERAL

O carrapato *Boophilus microplus* é um carrapato importante para a pecuária bovina brasileira e demais regiões tropicais e subtropicais. Originário da Ásia está presente entre os paralelos 32° N e 32° S, área de grandes rebanhos bovinos comerciais nas Américas, África, Ásia e Austrália (GONZALES, 1975). De acordo com Cordoves (1997), o Brasil é um país com características climáticas que favorecem a sobrevivência e o desenvolvimento do *Boophilus microplus* na maioria dos meses do ano. Além disso, este carrapato está presente em todos os estados. Deve-se destacar que no Brasil, encontramos uma grande variação climática. No Sudeste e Centro-Oeste desenvolvem-se quatro gerações anuais do parasito, e na região Sul ocorrem de duas a três gerações. Além disso, os diferentes métodos de criação encontrados no Brasil e as diferentes raças, contribuem para impedir a utilização de um método de controle padrão.

Este carrapato provoca prejuízos diretos e indiretos aos bovinos, pela diminuição na produção de leite e carne, danos ao couro e transmissão dos protozoários *Babesia bovis*, *B. bigemina* e da rickettsia *Anaplasma marginale*, causando o quadro clínico conhecido como tristeza parasitária bovina. O agravamento desse quadro é observado com a introdução de raças bovinas européias e o aumento da resistência aos carrapaticidas comerciais, resultando na seleção de populações resistentes (JONGEJAN & UILENBERG, 1994; DE CASTRO, 1997).

Horn (1987), diz que esta espécie afeta economicamente a bovinocultura, ocasionando um custo anual bastante expressivo na pecuária sul-americana. Além das características climáticas, as forrageiras comumente

encontradas nos trópicos, possuem grande produtividade por hectare, folhas largas e uma rápida propagação, favorecendo o desenvolvimento da fase de vida livre deste carrapato. A importância econômica deste parasita é tão grande que chega à comprometer o desenvolvimento da pecuária nestas regiões (HORN, 1987; CORDOVES, 1997).

O ciclo biológico do *B. microplus*, diferentemente de outros carrapatos, é completado pela passagem em apenas um hospedeiro. Após desprender-se do bovino, a fêmea ingurgitada procura um local protegido da luz solar direta para realizar a postura, que pode durar de uma semana a vários meses, dependendo das condições ambientais como temperatura e umidade. Uma vez completada a postura a fêmea morre. Quando eclode, a larva é extremamente ativa e migra por geotropismo negativo para as extremidades das folhas do pasto, procurando o hospedeiro. Ao entrar em contato com o bovino, a larva dirige-se para regiões corporais mais propícias ao seu desenvolvimento como a parte posterior das coxas, regiões perineal, perianal e perivulvar e a face interna das orelhas. Após fixação, a larva alimenta-se inicialmente de linfa realizando ecdise para ninfa em cerca de sete dias. O período de ninfa prolonga-se por outros sete dias e após nova ecdise ocorre a diferenciação sexual. No estágio adulto, a fêmea inicia o repasto sanguíneo, realiza a cópula e aumenta o volume sanguíneo ingurgitado até que a fêmea totalmente ingurgitada cai ao solo. O ciclo de vida parasitário dura em média 21 dias. O macho permanece no bovino, sobrevivendo um tempo até duas vezes maior do que as fêmeas (CORDOVES, 1997).

A questão da raça é muito importante, pois sabe-se que a resistência ao parasito aumenta com o maior porcentagem de genes do *Bos indicus*, no

rebanho e o oposto é observado com a introdução de raças bovinas européias. A resistência de carrapatos à carrapaticidas é um fenômeno complexo e ainda pouco compreendido. Diferentes mecanismos de defesa, incluindo a autolimpeza, características da pele, coloração da pelagem, características do pêlo e respostas imunológicas mais específicas estão envolvidos na redução do número de carrapatos que parasitam o bovino. Também a influência de fatores, tais como idade, sexo, estação do ano, tipo de pastagens, entre outros, devem ser levados em consideração (ANDRADE, 1996).

Vários pesquisadores concluíram que na implementação de mecanismo estratégico de controle ao carrapato, deve-se levar em consideração as condições climáticas, as características genéticas e o tipo de manejo de cada região (CORDOVES, 1997).

O controle deste parasita tem sido feito, principalmente, com o uso de carrapaticidas (DE LA FUENTE *et al*, 2000). Banhos são realizados após a visualização de carrapatos adultos, o que eleva o número de banhos anuais, causa o desenvolvimento de cepas de carrapatos resistentes, predispõe aos riscos de contaminação ambiental e causa aumento significativo dos custos de produção. A introdução destas drogas, que permitiram o controle do carrapato, foi um dos fatores preponderantes no desenvolvimento da pecuária em varias regiões (DE CASTRO & NEWSON, 1993). No entanto, o uso destes produtos químicos têm aumentado cada vez mais, muitas vezes de forma indiscriminada e sem acompanhamento técnico, promovendo uma seleção de carrapatos resistentes aos diferentes princípios ativos utilizados nos pesticidas. Os produtos que já foram utilizados incluem derivados arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas e piretróides sintéticos. Em média, os

diferentes princípios ativos utilizados para controlar o carrapato apresentaram uma vida útil de pouco mais de uma década, quando quase a totalidade das populações de carrapatos presentes no campo apresentava resistência à droga utilizada. O interesse no desenvolvimento de outras formas de controle do carrapato decorre do fato de que o controle químico mostra-se cada vez mais inviável economicamente. Os custos crescentes para desenvolver novas drogas e o curto período de vida útil que elas apresentam estão tornando-se incompatíveis com o preço que o criador pode pagar sem que a produção deixe de ser rentável (FRISCH, 1999; DE CASTRO & NEWSON, 1993; KAY & KEMP, 1994). Outro fator importante que impõe a procura de novos métodos de controle é a crescente exigência do mercado consumidor por alimentos com níveis cada vez menores de resíduos químicos e que não contaminem o ambiente (RODRIGUEZ *et al.*, 1995).

O desenvolvimento de formas alternativas para o controle do carrapato vem sendo muito estudado nos últimos anos. Os estudos para atingir este objetivo têm sido concentrados no controle imunológico, procurando desenvolver vacinas, e, em menor escala, no controle biológico, através do uso de organismos entomopatogênicos (MONTEIRO *et al.*, 1998). Tanto no caso do controle, pela utilização de drogas, como nos métodos alternativos, o conhecimento da dinâmica das populações de carrapato que ocorrem em cada região é fundamental para o sucesso dos programas de controle (MOUNT *et al.*, 1991).

Entre as vantagens do uso de vacinas está a segurança tanto para o aplicador como para o consumidor, e a ausência de período de carência após a aplicação, fator de importância fundamental na pecuária de leite. A utilização

de microorganismos visando o controle de carrapatos é ainda, pouco estudada. Entretanto, o sucesso, no uso de vírus (*Baculovirus*), bactérias (*Bacillus thuringiensis*) e fungos (*Metarhizium anisopliae*) no controle de pragas da agricultura indica que o controle biológico dos ácaros parasitas de animais pode ser viável (ALVES, 1986).

A resistência de *B. microplus*, assim como de muitos artrópodes, resulta de vários mecanismos bioquímicos e fisiológicos como: redução na absorção do carrapaticida, aumento da metabolização pelas esterases, oxidases ou glutathion-transferases, e ainda, modificação do alvo do pesticida (BAYUGAR *et al.*, 2002; HE *et al.*, 2002). Mutações em ponto na subunidade do receptor GABA, no sítio ativo da acetilcolinesterase (Ache), mutações geneticamente ligadas a canais de sódio, amplificação de genes para esterases, podem ocorrer simultaneamente numa população possibilitando uma resistência controlada por vários mecanismos (HEMINGWAY, 2000; VULULE *et al.*, 1999; HE *et al.*, 1999).

Estudos em *B. microplus* tem demonstrado a relação do aumento da atividade da acetilcolinesterase com resistência a organofosforados (BAXTER & BARKER, 1999). Uma mutação de ponto no gene para carboxilesterase B foi identificada em linhagens resistentes a piretróides nesta espécie (HERNANDEZ *et al.*, 2000). Posteriormente, Hernandez *et al.* (2002) indicaram que um transcrito de carboxilesterase foi mais abundante em cepas de carrapatos bovinos resistentes a piretróides.

O presente estudo teve por objetivo analisar molecular e bioquimicamente a resistência do carrapato bovino à cipermetrina, comparando teleógenas resistentes e sensíveis de uma população de *B. microplus* coletada

em Uberlândia (MG), utilizando-se o perfil esterásico (Capítulo 1), RT-PCR com primer específico para a região IIS6 do gene do canal de sódio e RT-PCR assimétrico de baixa estringência (Capítulo 2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B. 1986. **Controle Microbiano de Insetos**. Ed. Manole Ltda. 235p.
- ANDRADE, A. B. F. 1996. Aspectos Genéticos e Ambientais da Resistência a *Boophilus microplus* de Bovinos, da Raça Gir, da Estação Experimental da EPAMIG, Uberaba, MG, Brasil. Jaboticabal, SP, 79p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP.
- BAXTER, G. D. AND BARKER S. C. 1999. Comparison of acetylcholinesterase genes from cattle ticks. **Int. J. Parasit.** **29**. 1765-1774.
- BAYUGAR, R. C., ROLA, B., BURGHARDT, R.C., WAGNER, G. G., HOLMAN, P. J. 2002. Basal cellular alterations of esterase, glutathione, glutathioneS-transferase, intracellular calcium, and membrane potentials in coumaphos-resistant *Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae) cell lines. **Pest. Biochem. Physiol.** **72**, 1-9.
- CORDOVES, C. O. 1997. **Carrapato - controle e erradicação**. Guaíba: Agropecuária. 176p.
- DE CASTRO, J. J. 1997. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries, **Vet. Parasitol.** **71**, 77-81.

DE CASTRO, J.J., NEWSON, R.M. 1993. Host resistance in cattle tick control. **Parasitol.** **9**: 13-17.

DE LA FUENTE, J; GARCÍA-GARCÍA, J. C.; GONZÁLEZ, D. M.; IZQUIERDO, G. OCHAGAVIA, M. E. 2000. Molecular analysis of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) tick strains. **Vet. Parasit.** **92**. p 209-222.

FRISCH, J.E. 1999. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **Int. J. Parasitol.** **29**. 57-71.

GLENN, D. B. & BARKER, S. C. 1998. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *Boophilus microplus*: Characterisation and role in organophosphate resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology.** **28**. 581-589.
Brisbane, Austrália.

GONZALES, J. C. 1975. **O controle dos carrapatos dos bovinos.** Porto Alegre. Sulina. 104p.

HE, H. CHEN, A. C.; DAVEY, R. B.; IVIE, G. W.; WAGNER, G. G.; GEORGE, J. E. 1999. Sequence analysis of the Para-Type Sodium Channel Gene from Pyrethroid-Resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology.** **36**(5). 539-533.

HE, H.; . CHEN, A.C.; DAVEY, R.B.; IVIE, G.W. 2002_a. Molecular cloning and nucleotide sequence of a new P450 gene, CYP319A1, from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. **32**. 303–309. Edinburg, USA.

HE, H.; . CHEN, A.C.; DAVEY, R.B.; IVIE, G.W. 2002_b. Molecular cloning and nucleotide sequence of a new P450 gene, CYP319A1, from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **32**, 303–309.

HEMINGWAY. J. 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, **30**. 1009-1015.

HERNANDEZ, R; GUERRERO, F. D; GEORGE, J. E., WAGNER, G.G. 2002. Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, **32**. 1009–1016.

HERNANDEZ, R; HE, H.; CHEN, A.C., IVIE, G.W. WAGHELA, S. D., GEORGE, J. E., WAGNER, G.G. 2000. Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **30**, 969-977.

HORN, S. 1987. **Ectoparasites of animals and their impact on the economy of South America**. In: World Veterinary Congress, *Proceedings* 23 Montreal.

JONGEJAN, F., UILENBERG, G. 1994. Ticks and control methods. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.** **13**, 1201–1226.

KAY, B.H., KEMP, D.H. 1994. Vaccines against arthropods. **Am. J. Trop. Med.** **50**. 87-96.

MONTEIRO, A.C.; FIORIN, A.C.; CORREIA, A.C.B. 1998. Pathogenicity of isolates of *Metharhizium anisopliae* (mestch.) sorokin towards the cattle *Boophilus microplus* (can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Revista de Microbiologia.** **29**: 109-112.

MOUNT, G.A.; HAILE, D.G.; DAVEY, R.B. and COOKSEY, L.M. 1991. Computer simulation of *Boophilus* cattle tick (Acari:Ixodidae) population dynamics. **J. Med. Entomol.** **28**:223-240.

RODRIGUEZ, M., MASSARD, C.L., FONSECA, A.H., RAMOS, N.F., MACHADO, H., LABARTA and DE LA FUENTE, J. 1995. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestation of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine.** **13**: 1804-1808.

VULULE, J. M., BEACH, R. F., ATIEMI, F. K., McALLISTER, J. C., BROGDON, W. G., ROBERTS, J. M. 1999. Elevated oxidase and esterase levels associated

with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. **Med. Vet. Entomol.** **13**, 239-244.

CAPÍTULO 1

PERFIL ESTERÁSICO EM TELEÓGINAS DE *Boophilus microplus* SENSÍVEIS E RESISTENTES À CIPERMETRINA EM UBERLÂNDIA-MG

RESUMO

O carrapato bovino (*Boophilus microplus*) é uma das principais pragas nas regiões tropicais e subtropicais, causando grandes prejuízos na pecuária. O método tradicional de controle é baseado no uso intensivo de pesticidas como piretróides e organofosforados. No entanto, o uso indiscriminado destes compostos ao longo dos anos levou ao desenvolvimento de resistência aos efeitos letais destas substâncias. Um dos mecanismos de resistência estudado é o aumento na produção de enzimas esterásicas envolvidas na hidrólise destes compostos. Neste trabalho, realizou-se a comparação entre teleóginas (fêmeas adultas ingurgitadas) suscetíveis e resistentes à cipermetrina, por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), utilizando-se coloração específica para esterases. Os resultados mostraram a presença de quatro bandas com atividade esterásica nas amostras de teleóginas resistentes e três bandas nas amostras de teleóginas sensíveis e da cepa MOZZO, que se coraram tanto pelo α -naftil acetato como pelo β -naftil acetato, definidas como α - β -esterases. As bandas foram denominadas EST-1 a EST-4, a partir da extremidade anódica do gel, sendo a banda de migração mais rápida (EST-1) presente somente em teleóginas resistentes. Os testes com os inibidores malathion (organofosforado), sulfato de eserina (carbamato) e PMSF, indicaram que esta enzima pertence ao grupo das acetilcolinesterases, e

provavelmente esteja associada à resistência a cipermetrina em *Boophilus microplus*.

Palavras-Chave: *B. microplus*, resistência, esterases, piretróides, carrapa, bovino.

1. INTRODUÇÃO

O carrapato bovino (*Boophilus microplus*) é um dos ectoparasitos mais importantes para a agropecuária brasileira e demais regiões tropicais e subtropicais, sendo responsável, segundo o Ministério da Agricultura, por perdas de aproximadamente 1 bilhão de dólares ao ano (HORN, 1984). Este parasita causa 65% de prejuízos diretos e 35% de prejuízos indiretos à bovinocultura, gerando perdas na produção de leite, natalidade, peso, aumento da mortalidade e consumo de carrapaticidas, sem contar os danos causados à indústria do couro. Além disso, é o vetor de uma das principais doenças dos rebanhos bovinos, a tristeza parasitária, cujos agentes causadores *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginalis*, são transmitidos pela picada do carrapato e podem levar à morte por anemia (JONGEJAN; UILENBERG, 1994; DE CASTRO, 1997).

Atualmente, a origem genética da resistência tem sido muito estudada e, alguns autores demonstraram que este fenômeno pode originar-se a partir de amplificação gênica e mutações de ponto (FOURNIER *et al.*, 1992; VULULE *et al.*, 1999; HE *et al.*, 1999). A resistência em *B. microplus*, assim como em muitos artrópodes, pode ser atribuída a vários mecanismos: redução na absorção do pesticida, aumento da metabolização pelas esterases, oxidases ou glutatona-transferases, e ainda, modificação do alvo do pesticida (HE *et al.*, 2002, BAYUGAR *et al.*, 2002).

Mutero e colaboradores (1994) identificaram mutações de ponto no gene que codifica para a acetilcolinesterase (AChE) em linhagens mutantes de *D. melanogaster* resistentes a organofosforados e carbamatos, e demonstraram que altos índices de resistência são obtidos pela combinação de várias

mutações no sítio ativo desta enzima. Estes autores discutiram ainda que, a recombinação entre mutações isoladas pré-existentes, também contribuiu para a combinação de várias mutações em uma mesma proteína, favorecendo o desenvolvimento de resistência a inseticidas.

Mutações de ponto podem ocorrer também nos genes que codificam, por exemplo, a subunidade do receptor GABA, que controla os canais de cloro (para inseticidas ciclodienos), mutações ligadas geneticamente a canais de sódio (piretróides e DDT) e ainda, mutações nos genes que codificam para oxidasas e glutathion S-transferases (várias classes de inseticidas) (BERRADA & FOURNIER, 1997; HEMINGWAY, 2000). Em uma população, geralmente ocorre a combinação de vários mecanismos resultando na expressão global da resistência.

Outro mecanismo, que os artrópodes, em geral, adquirem resistência a pesticidas é a superprodução de enzimas esterásicas devido à amplificação gênica. Este fenômeno pode ser evidenciado em várias espécies de insetos e tem sido amplamente estudado no afídeo *Myzus persicae* (DEVONSHIRE *et al.*, 1986; DEVONSHIRE *et al.* 1993; FIELD *et al.*, 1999) e em mosquitos do gênero *Culex* (HAWKES & HEMINGWAY, 2002).

As esterases pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam preferencialmente ésteres de ácidos carboxílicos, podendo atuar também sobre outros substratos que contenham ligações amidas (OAKESHOTT *et al.*, 1993). Estas enzimas também podem estar relacionadas com outras atividades fisiológicas, como a regulação dos níveis de hormônio juvenil (HIDAYAT & GOODMAN, 1994), processos digestivos (ARGENTINE & JAMES, 1995) e no comportamento reprodutivo (LABATE *et al.*, 1990).

Estas enzimas são classificadas com base na sensibilidade a diferentes inibidores, divididas em quatro classes: arilesterases, carboxilesterases, colinesterases e acetilesterases. As carboxilesterases e as colinesterases são as mais caracterizadas dentro do grupo e têm sido muito estudadas na avaliação da resistência a pesticidas em muitos insetos e aracnídeos (NEWCOMB, *et al.*, 1997; CAMPBELL *et al.*, 1998; STUMPF *et al.*, 2001, VILLATE & BACHMANN, 2002). Em *haematobia irritans*, Guerrero *et al.* (1999) identificaram uma acetilcolinesterase insensível a organofosforados em moscas resistentes ao diazinon. Nos mosquitos *Culex* e *Anopheles gambiae*, foram detectadas acetilcolinesterases e carboxilesterases envolvidas tanto na metabolização como no sequestro de moléculas inseticidas (HEMINGWAY & KARUNARATNE, 1998; HEMINGWAY *et al.*, 2002). Tsagkarakou *et al.* (2002) caracterizaram uma acetilcolinesterase menos sensível ao paraxon em *Tetranychus urticae*.

A relação entre resistência e metabolização por esterases em *B. microplus* tem sido investigada por vários autores. Wright; Ahrens (1988) e Baxter; Barker (1998) demonstraram a relação do aumento da atividade da acetilcolinesterase com a resistência a organofosforados em linhagens mexicanas e australianas de *B. microplus*. Jamroz *et al.* (2000) verificaram um aumento na atividade de carboxilesterases em linhagens mexicanas resistentes a piretróides. Mutações de ponto nos genes para carboxilesterase B e acetilcolinesterase foram identificadas nestas linhagens (HERNANDEZ *et al.*, 1999, HERNANDEZ *et al.*, 2000) e posteriormente, Hernandez *et al.* (2002) identificaram um transcrito de carboxilesterase, contendo uma mutação de ponto, mais abundante em uma linhagem resistente de *B. microplus*. Baxter;

Barker (2002) isolaram e sequenciaram dois genes da acetilcolinesterase em linhagens australianas sensíveis e resistentes a organofosforados.

Com base nos estudos realizados anteriormente, neste trabalho realizou-se a comparação do padrão de esterases entre teleóginas sensíveis e resistentes a cipermetrina em *B. microplus*, por PAGE, com o objetivo de relacionar um mecanismo de resistência a carrapaticidas com a atividade esterásica em uma população de carrapatos de Uberlândia, MG.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de amostras

Foi realizado um teste de resistência de campo em uma população de carrapatos adultos na Fazenda Experimental da Vallée S/A de Uberlândia, utilizando-se cipermetrina como acaricida de acordo com as recomendações do fabricante (Flytick – VALLÉE/SA). Um bezerro de um ano, altamente infestado por carrapatos foi pulverizado com carrapaticida à base de cipermetrina. As teleóginas (fêmeas ingurgitadas) que desprenderam do bezerro até três horas, após a aplicação do produto foram coletadas e consideradas como sensíveis (S). Aquelas que permaneceram aderidas ao bezerro após 24 horas foram coletadas e consideradas resistentes (R). Estas, após a coleta, foram submetidas novamente ao produto, sendo submersas em uma solução de 1 (um) ml do produto diluído em água q.s.p. 1 litro.

Como cepa sensível de referência às drogas carrapaticidas (grupo controle), foram utilizadas também teleóginas da cepa MOZZO (M), originária da região de mesmo nome no Uruguai, onde a utilização de carrapaticidas não era prática comum, e por esta razão, esses parasitas conservaram a característica de serem sensíveis aos carrapaticidas. Essa cepa vem sendo mantida na Fazenda Experimental da Vallée S/A.

Após a coleta, utilizando-se uma lâmina de bisturi, foi feita uma incisão longitudinal na posição ventral na direção anteroposterior do abdômen de cada indivíduo e o excesso de sangue lavado com água ultra-pura. Em seguida, as amostras foram congeladas a -80°C para posterior análise genética.

Dosagem de Proteína Total

A dosagem de proteínas foi realizada segundo o Método do Micro-Biureto (ITZHAKI & GILL, 1964). Esta dosagem é importante para que sejam utilizadas amostras com quantidades equivalentes de proteínas. Neste método, dois reagentes são utilizados: NaOH e sulfato de cobre (Reagente 1) e NaOH (Reagente 2). Cada amostra foi homogeneizada em duas repetições, utilizando-se 500 μL de cada reagente, 995 μL de água destilada e 5 μL da amostra. As medidas de absorvância a 310 nm foram realizadas em espectrofotômetro GBC UV/VIS 911A da CG Analytical.

Atividade Esterásica

Os testes enzimáticos foram realizados por eletroforese em gel de poliacrilamida, segundo o método de Laemmli (1970) modificado por Ceron, (1988), utilizando-se gel de separação a 12% e empilhamento a 5%, em condições não desnaturantes, preparados em tampão Tris-HCl 0,375M, pH 8,8. As teleóginas foram maceradas individualmente em nitrogênio líquido. Cada amostra foi solubilizada em tampão de amostra (fosfato de sódio 0,01M, pH 6,5, contendo glicerol a 10%, azul de bromofenol a 0,001%, sacarose a 20%, EDTA 0,001M e Triton X-100 a 0,5%) e submetidas à centrifugação a 15.000g por 15 minutos a 4°C. Em seguida, o *pellet* contendo impurezas foi descartado e o sobrenadante contendo a solução de proteínas foi coletado e aplicado no gel (5 μL). Cada 5 μL de amostra apresentou em média, uma concentração de 100 μg de proteína total. A eletroforese foi conduzida a uma amperagem constante de 40 mA, em tampão de corrida Tris (0,087M) - Glicina (0,013M), pH 8,3, por 3 horas a 4°C.

A identificação das bandas com atividade esterásica foi baseada no método de coloração descrito por Steiner; Johnson (1973) modificado por Ceron (1988). Após a corrida, os géis foram pré-incubados em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,5 por cerca de 45 minutos a 37° C, e, em seguida, submetidos à coloração com α e/ou β naftil acetato, como substratos. As atividades das α e β esterases foram visualizadas nos géis como bandas de coloração pretas e vermelhas, indicando a hidrólise preferencial do α ou do β -naftil acetato, respectivamente. A reação de coloração foi realizada no escuro a 37° C por aproximadamente 1 hora, em uma solução de coloração contendo 30 mg de α e/ou de β naftil acetato, previamente diluídos em 1 mL de acetona e combinados com uma solução recém-preparada e filtrada de 85 mg de *Fast Blue R/R Salt* em 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,5.

Após a coloração, os géis foram tratados com 100 mL de uma solução descorante e conservante, contendo 10% de ácido acético glacial, 25% de etanol absoluto e 1,5% de glicerol, por 24 horas. Os géis foram secos em placas de vidro à temperatura ambiente, usando papel celofane. As bandas com atividade esterásica foram numeradas a partir da extremidade anódica do gel.

Testes com Inibidores

Para a caracterização bioquímica das esterases, quatro inibidores foram individualmente usados, como se segue: solução de malathion 0,4mM, solução de sulfato de eserina 0,1mM, solução de sulfato de cobre a 0,1mM e solução de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) a 0,1 mM. Malathion foi pré-diluído em 1 mL de óleo mineral. O sulfato de cobre foi dissolvido em 1 mL de NaOH 0,1

M e o PMSF em 1 mL de metanol, antes do uso. Sulfato de eserina foi adicionado diretamente às soluções de pré-incubação e de coloração.

Cada inibidor foi adicionado ao tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5, na pré-incubação e, posteriormente, na solução de coloração. Paralelamente, como controle, géis contendo as mesmas amostras, foram corados na ausência de inibidores. Com base nestes testes, as bandas correspondentes às esterases foram classificadas como carboxilesterases (inibidas pelo malathion), colinesterases (inibidas tanto pelo malathion como pelo sulfato de eserina), arilesterases (inibidas pelo sulfato de cobre) e acetilesterases (não afetadas por nenhum destes inibidores). Além disso, as bandas observadas no gel que foram inibidas pelo PMSF (um inibidor específico de serino-proteases e de serino-esterases) foram identificadas como serino-esterases.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Padrão de Bandas Esterásicas

Quatro padrões de bandas com atividade esterásica foram detectados nos indivíduos desta população de *B. microplus* de Uberlândia, MG, e numeradas por EST-1 a EST-4, a partir da extremidade anódica do gel, sendo a banda correspondente a EST-1 a de migração mais rápida (Figura 1). Esta banda foi observada exclusivamente em teleóginas resistentes (R) à cipermetrina, enquanto que as demais bandas (EST-2 a EST-4) foram detectadas em todas as amostras de teleóginas resistentes (R) e sensíveis (S) à cipermetrina, e também, em teleóginas da cepa controle MOZZO (M). Esta distribuição semelhante de bandas entre as amostras analisadas pode estar relacionada com a importância funcional destas enzimas.

As bandas identificadas nos géis, quando coradas simultaneamente na presença dos substratos α e β naftil-acetatos, coraram-se preferencialmente de preto, indicando a hidrólise preferencial pelo α -naftil-acetato nesta população de *Boophilus microplus* (dados não mostrados).

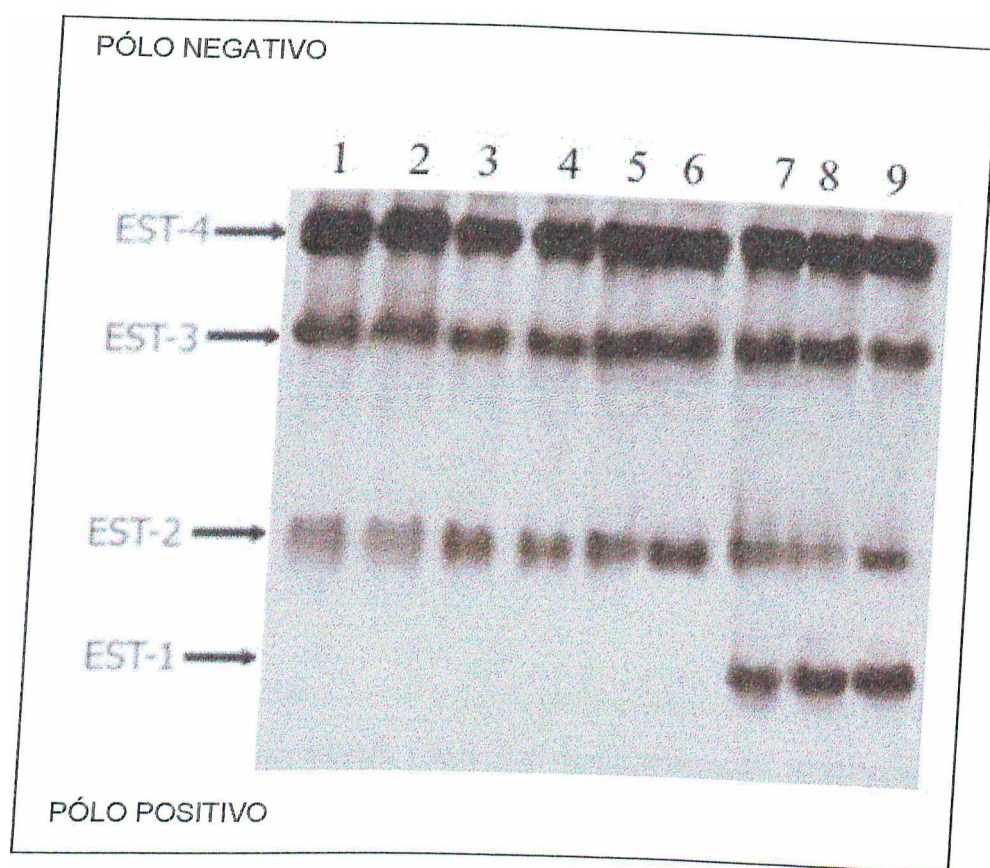


Figura 1: Padrão comparativo de bandas esterásicas em uma população de teleóginas de *B. microplus* de Uberlândia, MG. PAGE a 12% para gel de separação e empilhamento a 5%, corado com α -naftil acetato. (1-3) Controle; (4-6) Sensível e (7-9) Resistente a Cipermetrina.

Quando os géis foram corados com um ou outro substrato, o padrão de esterases foi o mesmo em ambos os géis, não ocorrendo bandas específicas com atividade pelo α ou pelo β naftil-acetato (Figuras 1 e 2), sendo assim, classificadas como α - β esterases. No entanto, a predominância de bandas pretas quando os dois substratos foram usados reflete uma maior afinidade pelo α naftil acetato ao centro ativo. Esta situação difere da encontrada na maioria dos organismos já analisados, os quais apresentam α e β esterases (CERON, 1988, KETTERMAN *et al.*, 1992).

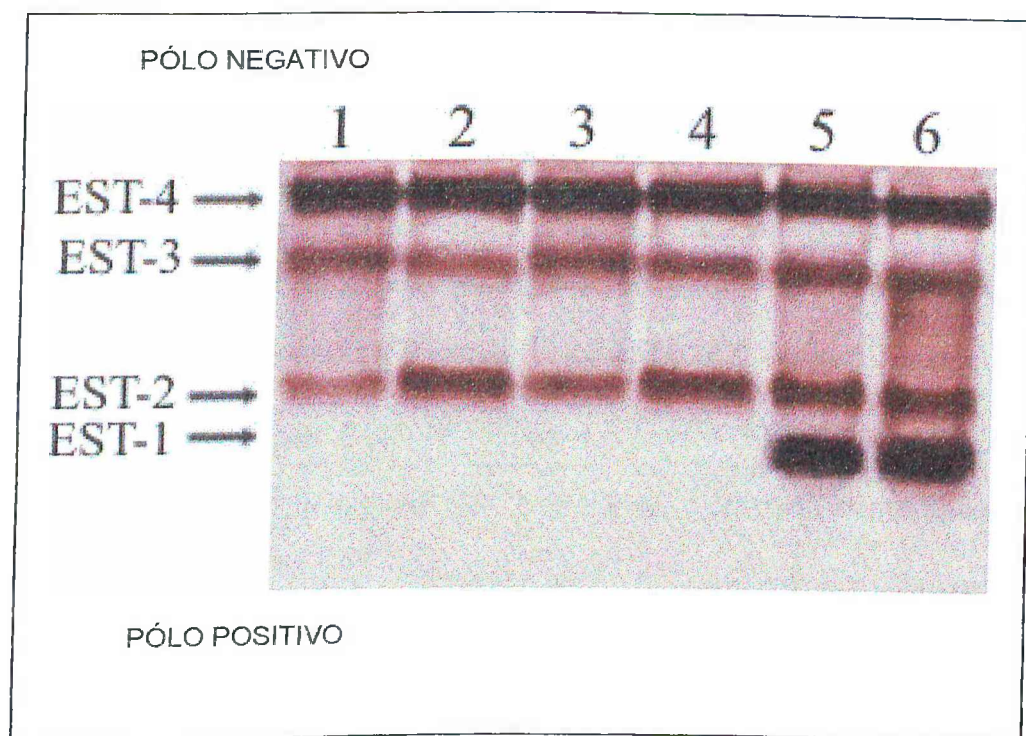


Figura 2: Padrão comparativo de bandas esterásicas numa população de teleóginas de *B. microplus* de Uberlândia, MG. PAGE a 12% para gel de separação e empilhamento a 5%, corado com β - naftil acetato. (1-2) Controle; (3-4) Sensível e (5-6) Resistente a Cipemetrina.

O número reduzido de variantes esterásicas observados nesta população de *B. microplus* pode estar relacionado ao habitat e alimentação restritos desse organismo. Em *Drosophila*, o grande número de alelos em locos esterásicos tem sido associado à adaptação ao grande número de substratos sobre os quais estas enzimas atuam, em razão de uma diversificada dieta, na natureza (FARMER & CARTER, 1989).

Estes dados diferem de um estudo feito em uma população mexicana de *B. microplus*, que detectou 22 bandas com atividade esterásica sobre o α naftil acetato em larvas (JAMROZ *et al.*, 2000). No entanto, devemos considerar que, neste trabalho, analisou-se teleóginas e no trabalho de Jamroz *et al.* (2000), foram analisadas apenas larvas. Em virtude do processo de desenvolvimento ser controlado por mudanças diretas e indiretas no padrão de expressão gênica, perfis esterásicos podem ser muito diferentes entre as fases do ciclo de

vida de um organismo. Uma análise comparativa do padrão de esterases nas fases do ciclo de vida do *B. microplus*, poderá esclarecer melhor estas questões e contribuir com informações sobre a biologia deste parasita.

As Figuras 1 e 2, mostram ainda que, não houve diferenças no padrão de bandas esterásicas entre teleóginas da cepa MOZZO e teleóginas da cepa de campo sensíveis a cipermetrina. A cepa MOZZO vem sendo mantida na Fazenda Experimental da Vallée S/A por várias gerações como uma cepa sensível de referência na ausência de pressão seletiva por carrapaticida. Supõe-se a ocorrência de um provável cruzamento entre estas cepas, apesar do rígido controle existente para evitar cruzamentos entre essas populações. De Souza (2001) analisando as mesmas populações através de marcadores AFLP, observou uma similaridade genética entre as cepas MOZZO e de campo e, também que indivíduos resistentes à piretróides apresentavam uma maior variabilidade genética em relação aos sensíveis, demonstrando que a resistência pode levar a um aumento no número de alelos responsáveis por esta característica.

A banda correspondente a EST-1 foi detectada somente em amostras de teleóginas resistentes. Este resultado sugere que esta enzima pode estar representando uma esterase associada a resistência à cipermetrina nestes indivíduos. Assim, sugere-se que a pressão seletiva exercida pelo uso constante do carrapaticida nesta cepa de campo tenha contribuído para o aparecimento de uma nova variante enzimática associada à resistência em alguns poucos indivíduos ao longo do tempo.

Efeitos de Inibidores

No presente estudo, a ação de alguns inibidores foi verificada sobre as esterases de uma população de *B. microplus* de Uberlândia, MG. As amostras de teleóginas da cepa MOZZO (M) e de teleóginas resistentes (R) e sensíveis (S) à cipermetrina da cepa de Uberlândia (MG) foram submetidas à eletroforese e em seguida, pré-incubadas e coradas para esterases na presença de inibidores. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela I e nas Figuras 3, 4, 5, e 6.

A Tabela I, mostra os resultados da ação dos inibidores sobre as bandas esterásicas detectadas em teleóginas resistentes (R) nos géis analisados. Os graus de inibição apresentados na tabela encontram-se classificados em ordem crescente de intensidade.

Inibidores	Concentração	Bandas Esterásicas			
		EST-1	EST-2	EST-3	EST-4
Malathion	0,4mM	++++	++++	++++	++
Sulfato de Eserina	1mM	+++	++	-	-
Sulfato de Cobre	1mM	-	-	-	-
PMSF	1mM	++++	++++	++++	++++

TABELA 1. Efeito de diferentes inibidores sobre as bandas esterásicas em teleóginas de *B. microplus* resistentes à cipermetrina (- : ausência de inibição; +, ++, +++, +++++ : respectivas inibições, em ordem crescente).

A Figura 3 mostra o efeito do sulfato de cobre sobre as esterases das amostras analisadas. Este composto na concentração de 1mM não apresentou

efeito inibitório sobre nenhuma das bandas detectadas. O sulfato de eserina 1mM inibiu parcialmente a EST-2 em teleóginas resistentes (R) e quase completamente em teleóginas da cepa MOZZO e teleóginas sensíveis (S). Em teleóginas resistentes (R), observou-se uma inibição acentuada da EST-1. Para as demais bandas não houve inibição após este tratamento (Figura 4). Quando os géis foram submetidos ao tratamento com o malathion 0,4mM, verificou-se que as esterases EST-1, EST-2 e EST-3 foram intensamente inibidas por este inseticida e uma ausência de inibição para a EST-4 em todas as amostras (Figura 5).

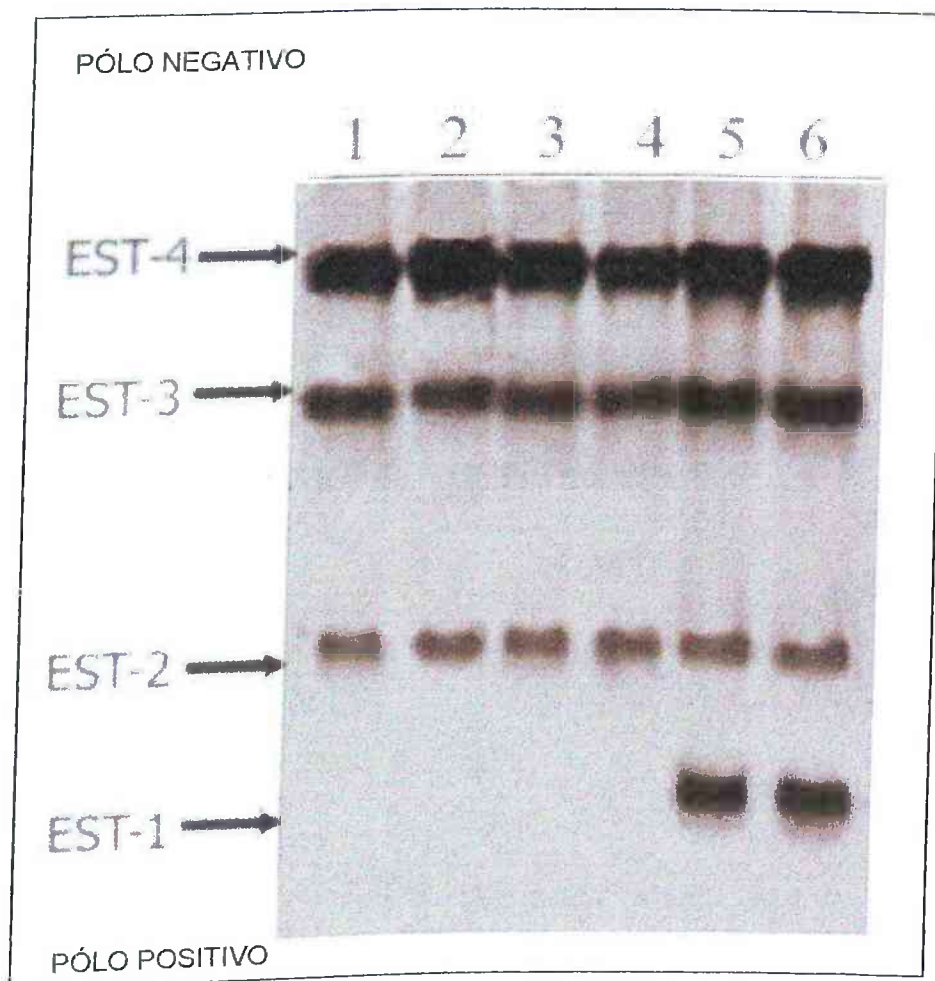


Figura 3: Padrão de inibição das bandas esterásicas em teleóginas de *B. microplus*, obtido pelo uso de sulfato de cobre 0,1mM. (1-2) Controle; (3-4) Susceptível e (5-6) Resistente à cipermetrina.

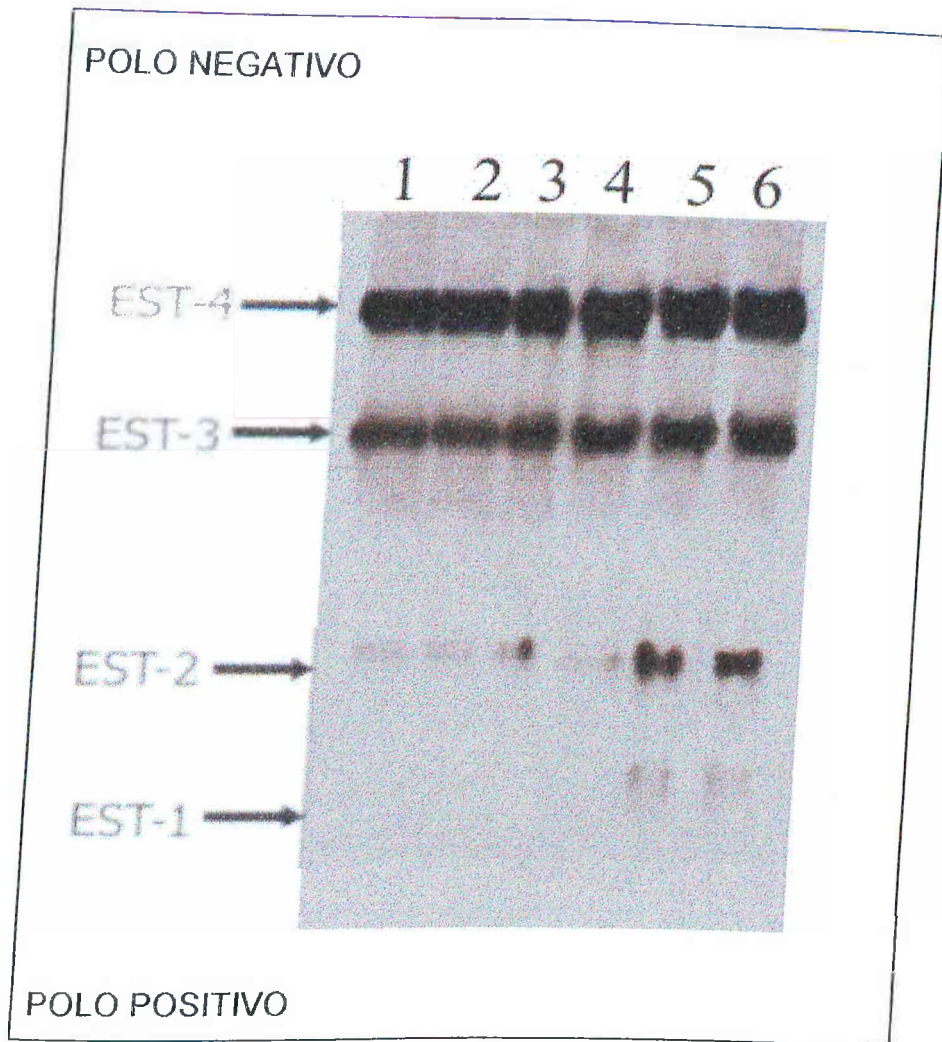


Figura 4: Padrão de inibição das bandas esterásicas em teleóginas de *B. microplus*, obtido pelo uso de sulfato de eserina 0,1mM. (1-2) Controle; (3-4) Susceptível e (5-6) Resistente à cipermetrina.

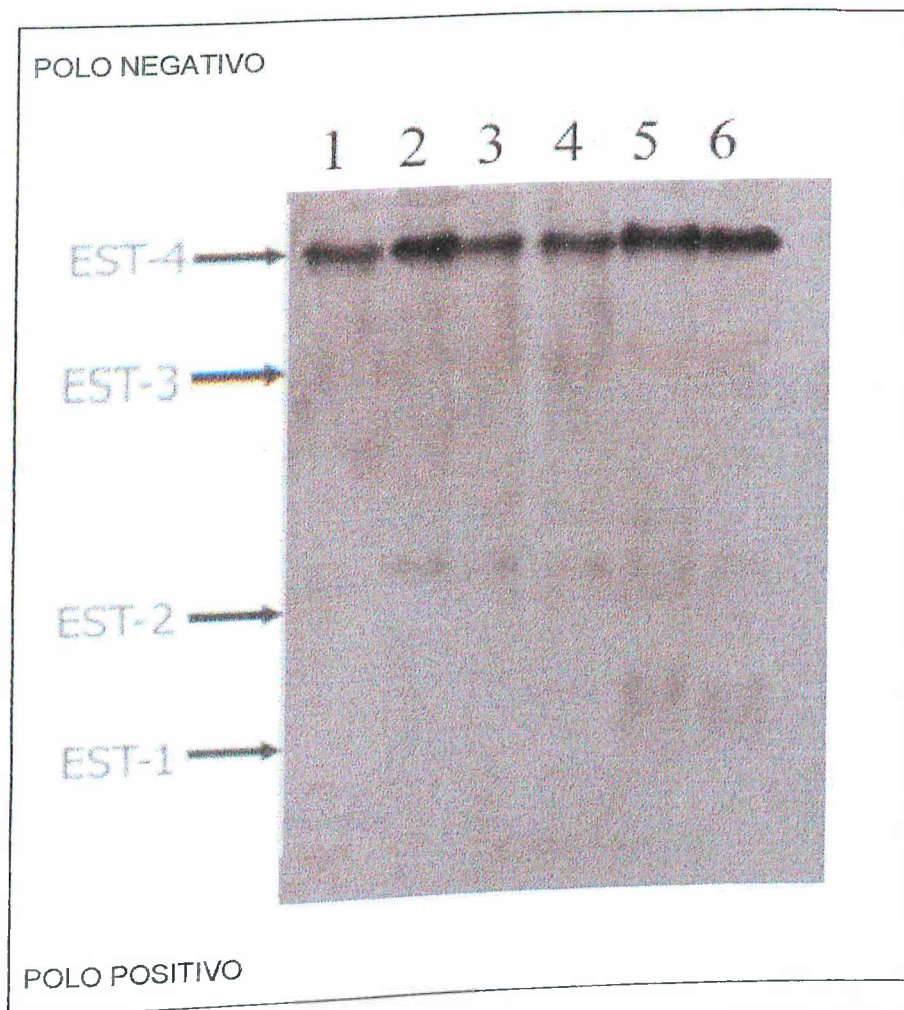


Figura 5: Padrão de inibição das bandas esterásicas em teleóginas de *B. microplus*, obtido pelo uso de Malathion 0,4mM. (1-2) Controle; (3-4) Susceptível e (5-6) Resistente à cipermetrina.

Na figura 6, pode-se observar o efeito do fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF). Este composto inibiu quase totalmente todas as bandas em todos os experimentos. Como, mencionado anteriormente, o PMSF é considerado um inibidor de serino-proteases e serino-esterases, o que sugere que estas enzimas contém resíduos de serina em seus sítios ativos.

Assim, estas observações sugerem que a EST-4 trata-se de uma acetilesterase, visto que esta enzima foi inibida pelo PMSF e mostrou-se resistente ao malathion, sulfato de eserina e sulfato de cobre. Estes dados sugerem uma função proteolítica para esta enzima, da mesma maneira que as

considerada uma carboxilesterase também, indicando ser uma enzima em processo de seleção para resistência ao malathion em indivíduos resistentes.

Quanto à EST-1, enzima detectada somente em teleóginas resistentes, pode ser classificada como uma acetilcolinesterase, com um resíduo de serina no centro catalítico, pois foi inibida tanto pelo malathion (organofosforado) como pelo sulfato de eserina (carbamato) e também pelo PMSF. Portanto, é provável que esta enzima tenha surgido nessa população de *B. microplus* em alguns poucos indivíduos resistentes, em função da pressão exercida pelo uso constante de acaricida ao longo do tempo e que, assim como em alguns insetos, possivelmente seja uma acetilcolinesterase associada à resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGENTINE, J. A., JAMES, A. A. 1995. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **25**, 621-630.
- BAXTER, G. D., BARKER, S. C. 1998. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick , *Boophilus microplus* : characterization and role in organophosphate resistance. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **28**, 581-589.
- BAXTER, G. D., BARKER, S. C. 2002. Analysis of the sequence and expression of a second putative acetilcolinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and resistant cattle ticks. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **32**, 815-820.
- BAYUGAR, R. C., ROLA, B., BURGHARDT, R.C., WAGNER, G. G., HOLMAN, P. J. 2002. Basal cellular alterations of esterase, glutathione, glutathioneS-transferase, intracellular calcium, and membrane potentials in coumaphos-resistant *Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae) cell lines. **Pest. Biochem. Physiol.** **72**, 1-9.
- BERRADA, S., FOURNIER, D. 1997. Transposition-mediated transcriptional overexpression as a mechanism of insecticide resistance. **Mol. Gen. Genet.** **256**, 348-354.

BIANCHI, M. W., BARRÉ, N., MESSAD, S. 2002. Factors related to cattle infestation level and resistance to acaricides in *Boophilus microplus* tick populations in New Caledonia. **Vet. Parasitol.** **2511**, 1-15.

CAMPBELL, P. M., NEWCOMB, R. D., RUSSEL, R. J., OAKESHOTT, J. G. 1998. Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorous insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **28**, 139-150.

CASTIGLIONI-RUIZ, L. C., CAMPOS-BICUDO, H. E.M., CERON, C. R. 1997. Esterase patterns in four Brazilian populations of *Haematobia irritans*. **Cytobios** **90**, 81-94.

CERON, C. R. **Padrão de esterases no desenvolvimento de *D. mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos.** São Paulo, 1988. 142p. Tese de Doutorado em Genética- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

DE CASTRO, J. J. 1997. Sustainable tick and tickborn disease control in livestock improvement in developing countries. **Vet. Parasitol.** **71**, 77.

DE SOUZA, G. R. L. 2001. **Variabilidade genética de marcadores AFLP em populações de carrapato *Boophilus microplus* induzida por carrapaticidas.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 65p.

- DEVONSHIRE, A. L., SEARLE, L. M., MOORES, G. D. 1986. Quantitative and qualitative variation in the mRNA for carboxylesterase in insecticide-susceptible and resistance *Myzus persicae*. **Biochem. J.** **260**, 659-665.
- DEVONSHIRE, A. L., WILLIAMSON, M. S., MOORES, G. D., FIELD, L. M. 1993. Analysis of the esterase genes conferring insecticide resistance in peach-potato aphid, *Myzus persicae*. **Biochem. J.** **294**, 569-574.
- FARMER, J. L., CARTER, M. W. 1989. Properties of partially purified allozymes of esterase-5 of *Drosophila pseudoobscura*. **Camp. Biochem. Physiol.** **93B(2)**, 451-458.
- FIELD, L. M., BLACKMAN, R. L., TYLER-SMITH, C., DEVONSHIRE, A. L. 1999. Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae*. **Biochem. J.** **339**, 737-742.
- FOURNIER, D. , MUTERO, A. , RUNGGER, D. 1992. *Drosophila* acetylcholinesterase: Expression of a functional precursor in *Xenopus* oocytes. **Eur. J. Biochem.** **203**, 513-519.
- GUERRERO, F. D., PRUETT, J. H., KUNZ, S. E., KAMMLAH, D. M. 1999. Esterase profiles of diazinon-susceptible and resistant horn flies (Diptera, Muscidae). **J. Econ. Entomol.** **92(2)**, 286-292.

HAWKES, N. J., HEMINGWAY, J. 2002. Analysis of the promoter for the b-esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Bioch. Biophys. Acta** **1574**, 51-62.

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

HE, H.; . CHEN, A.C.; DAVEY, R.B.; IVIE, G.W. 2002. Molecular cloning and nucleotide sequence of a new P450 gene, CYP319A1, from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **32**, 303-309.

HEMINGWAY, J. 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **30**, 1009-1015.

HEMINGWAY, J., FIELD, L., VONTAS, J. 2002. An overview of insecticide resistance. **Science** **298**, 96-97.

HEMINGWAY, J., KARUNARATNE, S. H. P. P. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Med. Vet. Entomol.** **12**, 1-12.

HERNANDEZ, R; HE, H.; CHEN, A.C., IVIE, G.W., GEORGE, J. E., WAGNER, G.G. 1999. Cloning and sequencing of a putative acetylcholinesterase cDNA from *Boophilus microplus*. **J. Med. Entomol.** **36(6)**, 764-770.

HERNANDEZ, R; HE, H.; CHEN, A.C., IVIE, G.W. WAGHELA, S. D., GEORGE, J. E., WAGNER, G.G. 2000. Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **30**, 969-977.

HERNANDEZ, R; GUERRERO, F. D; GEORGE, J. E., WAGNER, G.G. 2002. Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **32**, 1009-1016.

HIDAYAT, P., GOODMAN, W. G. 1994. Juvenile hormone and hemolymph juvenile hormone binding protein titers and their interaction in the hemolymph of fourth stadium *Manduca sexta*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **24 (7)**, 709-715.

HORN, S. C. 1984. **O couro e seus problemas**. Brasília, Secretaria da Defesa Sanitária Animal. 40p.

ITZHAKI, R.F., GILL, D. M. 1964. A Micro-biuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.** **9**, 401-410.

- JAMROZ, R. C., GUERRERO, F. D., PRUETT, J. H., OEHLER, D. D., MILLER, R. J. 2000. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of southern cattle tick. **J. Insect Physiol.** **46**, 685-695.
- JONGEJAN, F., UILENBERG, G. 1994. Ticks and control methods. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.** **13**, 1201-1226.
- KETTERMAN, A. J., JAYAWARDENA, K. G. I., HEMINGWAY, J. 1993. Purification and characterization of a carboxylesterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Biochem. J.** **287**, 355-360.
- LABATE, B., GAME, Y., COOKE, H., OAKSHOTT, J. G. 1990. The number and distribution of esterase 6 alleles in populations of *Drosophila melanogaster*. **Heredity** **63**, 203-208.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**, 680-685.
- MUTERO, A., PRALAVORIO, M., BRIDE, J. M., FOURNIER, D. 1994. Resistance associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. **P. N. A. S.** **91**, 5922-5926.

NEWCOMB, R. D., CAMPBELL, P. M., OLLIS, D. L., CHEAH, E., RUSSEL, R. J., OAKSHOTT, J. G. 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorous hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. **P. N. A. S.** **94**, 7464-7468.

OAKESHOTT, J. G., VAN PAPERRECHT, E. A., BOYCE, T. M., HEALY, M. J.,

RUSSEL, R. J. 1993. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetica** **90**, 239-268.

ROULSTON, W. J., WHARTON, R. H., NOLAN, J., KERR, J. D., WILSON, J. T., THOMPSON, P. G., SCHOTZ, M. 1981. A survey for resistance in cattle ticks to acaricides. **Aust. Vet. J.** **57**, 362-371.

STEINER, W. W. M., JOHNSON, W. E. 1973. Techniques for electrophoresis of hawaiian *Drosophila*. **US-IBP. Island Ecosyst. Tech. Report.** **30**, 1-21.

STUMPF, N., ZEBITZ, C. P. W., KRAUS, W., MOORES, G. D., NAUEN, R. 2001. Resistance to organophosphates and biochemical genotyping of acetylcholinesterases in *Tetranychus urticae* (Acari, Tetranychidae). **Pest. Biochem. and Physiol.** **69**, 131-142.

TAVARES, M. G., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., CERON, C. R. 1998. Tissue-specific expression of esterases in *Triatoma infestans*. **Genet. Mol. Biol.** **21(4)**, 325-331.

- TSAGKARAKOU, A., PASTEUR, N., CUANY, A., CHEVILLON, C., NAVAJAS, M. 2002. Mechanisms of resistance to organophosphates in *Tetranychus urticae* (Acari, Tetranychidae). **Insect Biochem. Mol. Biol.** **32**, 417-424.
- VILLATTE, F., BACHMANN, T. T. 2002. How many genes encode cholinesterase in arthropods? **Pest. Biochem. and Physiol.** **73**, 122-129.
- VULULE, J. M., BEACH, R. F., ATIEMI, F. K., McALLISTER, J. C., BROGDON, W. G., ROBERTS, J. M. 1999. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. **Med. Vet. Entomol.** **13**, 239-244.
- WRIGHT, F. C., AHRENS, E. H. 1988. Cholinesterase insensitivity: a mechanism of resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* against coumaphos. **J. Med. Entomol.** **25(4)**, 234-239.

CAPÍTULO 2

Análise de Mutações na Região IIS₆ do Gene do Canal de Sódio Em *Boophilus microplus*

RESUMO

O carrapato bovino (*B. microplus*), constitui um dos maiores problemas da pecuária de regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil. Este carrapato causa prejuízos diretos e indiretos à pecuária por meio da redução na produção de leite e carne, danos ao couro e transmissão dos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e da rickettsia *Anaplasma marginale*. Estes organismos, quando juntos, causam o quadro conhecido como Tristeza Parasitária Bovina. O agravamento desse quadro é observado com a introdução de raças bovinas européias e o aumento da resistência aos carrapaticidas comerciais, resultando na seleção de populações de carrapatos resistentes dificultando ainda mais o manejo. Dentre os vários métodos de controle, destaca-se o uso de acaricidas piretróides que exercem um efeito neurotóxico no canal de sódio promovendo de forma gradual sua inativação. Um número de mutações no gene de canal de sódio tem sido mostradas conferindo sítios de insensibilidade ao efeito neurotóxico dos piretróides, ratificando a importância desse gene na resistência de *B. microplus* a este grupo de carrapaticida. Para a detecção de prováveis polimorfismos neste gene, entre teleóginas resistentes e sensíveis à cipermetrina, utilizou-se a técnica da RT-PCR associada a LIS-SSCP e RT-PCR Assimétrico com baixa estringência, utilizando *primers* específicos para o gene do Canal de Sódio. Dados obtidos com LIS SSCP mostraram uma diferença na migração de fragmentos de 337pb, do gene do canal de sódio, de

teleógenas sensíveis e resistentes sugerindo a presença de uma mutação na região III_{S6} de uma população de carrapatos de Uberlândia (MG). A detecção de bandas polimórficas, por RT-PCR Assimétrico de baixa estringência, sugere a ocorrência de mutações no canal de sódio a partir da posição 2296 do domínio III_{S6} em direção a extremidade 3' do gene, as quais poderão estar relacionadas com a resistência de *B. microplus* à cipermetrina.

Palavras-chave: *Boophilus microplus*, RT-PCR, RT-PCR assimétrico, LIS – SSCP.

INTRODUÇÃO

Análises do canal de sódio em diversas espécies indicam que sua subunidade primária é uma única proteína transmembrana de aproximadamente 260 kDa, subunidade α , constituída por quatro domínios homólogos e associada com duas subunidades β auxiliares; β_1 e β_2 (GOLDIN, 1994, *apud* JAMROZ *et al*, 1998; PLUMMER & MEISLER, 1999).

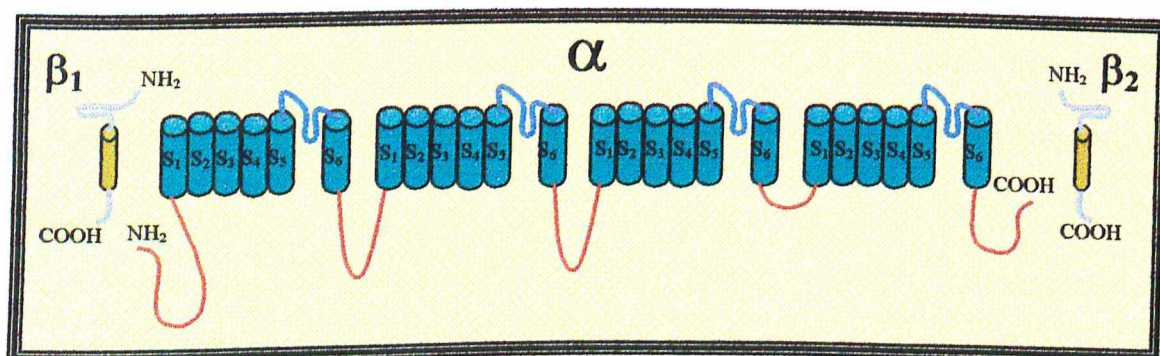


Figura 1- Estrutura secundária das subunidades do canal de sódio (Adaptada de Plummer & Meisler, 1999).

A subunidade α é constituída por quatro domínios: SI, SII, SIII e SIV. Estes domínios são conectados por dois grandes interdomínios citoplasmáticos em forma de *loops* (ID I/II, ID II/III) e por um menor, altamente conservado, ID III/IV. Estes domínios contribuem para as três funções essenciais do canal de sódio: abertura, seleção de íons e inativação rápida (MARBAN *et al*, 1998).

Piretróides exercem um efeito neurotóxico no canal de sódio promovendo de forma gradual sua inativação. Mutações no gene de canal de sódio tem sido descritas conferindo sítios de insensibilidade ao efeito neurotóxico dos piretróides (JAMROZ *et al*, 2000; JAMROZ *et al*, 1998; HE *et al*, 1999). Mutações na região II S6 do canal de sódio de cepas *kdr* (knockdown resistance) e mutações localizadas próximas ao início do sítio ligante entre os domínios III e IV tem sido associadas com resistência a piretróides (HE *et al*,

1999; SODERLUND & LEE, 2001). Roosignol (1988) verificou que moscas domésticas *kdr* apresentavam-se 4 a 21 vezes mais resistentes que moscas selvagens.

He *et al* (1999a) trabalhando com cepas de *B. microplus* identificaram, em cepas altamente resistentes a DDT e piretróides, uma mutação de ponto na região IIIIS6 havendo uma mudança de uma T por A, a qual resultou numa mudança de aminoácido de Fenilalanina para Isoleucina. No entanto, esta mutação não foi encontrada em cepas mexicanas de *B. microplus* resistentes a piretróide, podendo haver, de acordo com os autores, outros mecanismos de resistência envolvidos em tal processo.

Este trabalho verificou a existência de mutações no gene para o canal de sódio numa população de carrapato bovino *B. microplus* de Uberlândia, Minas Gerais.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e preparação do material biológico

A partir de uma população de carrapatos *B. microplus* de Uberlândia (MG) foram selecionadas teleóginas resistentes e sensíveis à cipermetrina. Um bezerro (1 ano de idade) altamente infestado foi submetido ao carrapaticida a base de cipermetrina (Flytick® – VALLÉE/SA), de acordo com as recomendações do fabricante. As teleóginas que desprenderam do bezerro até três horas, após a aplicação do produto, foram coletadas como sensíveis e aquelas que permaneceram aderidas ao bezerro após 24 horas, foram consideradas resistentes. Após a coleta, utilizando-se uma lâmina de bisturi, foi feita uma incisão longitudinal na posição ventral na direção anteroposterior do abdômem de cada indivíduo e o excesso de sangue lavado com água ultra-pura. Em seguida, as amostras foram congeladas a -80°C para posterior análise genética.

Extração de RNA

Para a extração do RNA foi utilizado o método do TRIZOL (Invitrogen Life Technologoy) seguindo as orientações do fabricante e procedimentos de otimização padronizados pelo Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (LABGEM). Após a extração, o RNA total foi tratado com DNase e procedeu-se então a quantificação por espectrofotometria. A qualidade do RNA foi verificada em gel de Agarose 1,5% (Fig 2). Imediatamente após, o RNA foi estocado em alíquotas (20 μl) em ultrafreezer a 80°C .

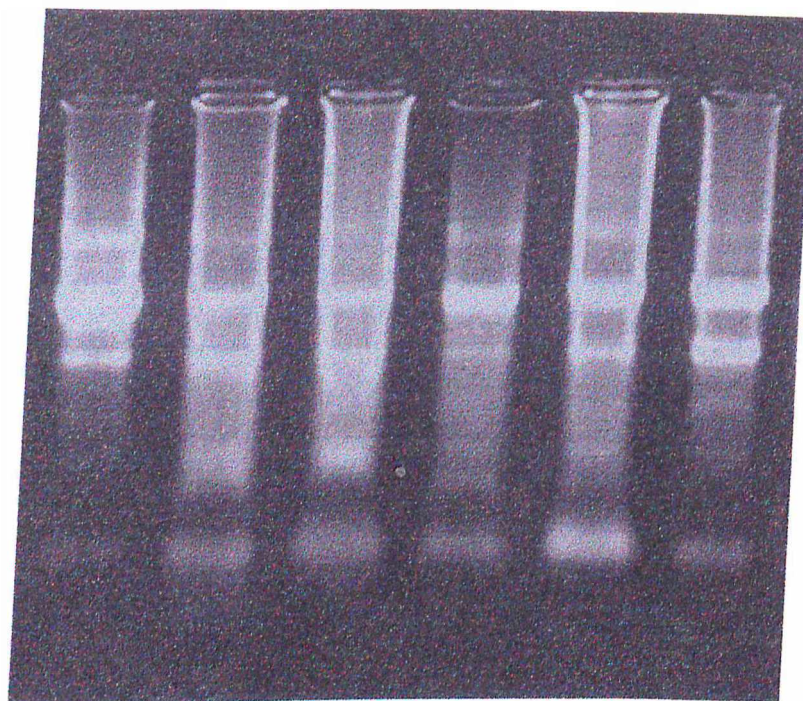


Figura 2 - Análise da qualidade das amostras de RNA total extraídas de teleóginas de *B. microplus*, em eletroforese de gel de agarose 1,5%.

Reação de RT-PCR

Para verificar a existência da mutação na região III S6 do gene do canal de sódio em cepas de carrapatos resistentes a piretróide, foi confeccionado um par de "primers" (50% GC) utilizando o programa *Primer designer – version 2.0* copyright 1990, 91 Scientific & Educational Software, baseados na seqüência de um cDNA parcial deste gene descrito por He *et al* (1999a). O primer A (5' - GACAACGTCCTCAACGCATA - 3') anelando na posição 1960 e primer B – complementar- (5'- GTCTTGGAATTGCCTTGCT – 3') na posição 2296 de um cDNA parcial do canal de sódio, flaqueando a mutação descrita pelos autores, gerando um fragmento de 337bp representado no esquema abaixo (Figura 3). As duas bases envolvidas pelo retângulo indicam a mutação descrita por He *et*

al (1999a), onde nas teleógenas resistentes houve uma troca de uma adenina por timina.

```

GACAACGTCCTCAACGCATATTTGGCCCTTTTCCAAGTGG
CAACATTCAAAGGCTGGACGGACATTATGGACAATGCGAT
CGACTCCAGGGGCGGAAAAGAGGACCAACCGGAATACGA
GGCTAACATCTACATGTACCTATACTTCGTGTTCTTCATTA
TCTTCGGCTCCTTCATTACCTTAATCTATTCATCGGTGTT
ATTATCGACAATTTCAATGAACAAAAGAAGAAGGCTGGAG
GATCATTAGAAATGTTTCATGACAGAAGACCAAAAAGAAATAC
TATAACGCCATGAAGAAAATGGGATCCAAAAAGCCAGCCA
AGGCAATTCCAAGAC

```

Figura 3 - Sequência esperada do fragmento de 337pb amplificado pelos primers A e B.

A reação de RT foi realizada em termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-100 a 37°C por uma hora acrescido de um aquecimento de 70°C por dez minutos. O volume final de cada reação foi de 20µl contendo tampão 1X (250mM Tris-HCl, pH 8,6; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 50mM DTT), 200 µM de cada dNTP, 50 unidades de transcriptase reversa (MMLV), 10 µmol de primer reverso (primer B), 20 unidades de inibidor de RNase e 1µg de RNA total.

Na reação de PCR o volume total de cada reação também foi de 20 µl. Cada reação continha Tris-HCl 10 mM, KCl 50mM, MgCl₂ 2mM, 400 µM de dNTPs (100 µM de dGTP, 100 µM de dCTP, 100 µM de dATP e 100 µM de dTTP), 8 pmoles de primer, 1,0 U de Taq DNA Polimerase, e 2µl de cDNA da reação de RT. Água ultrapura foi utilizada para completar o volume de 20 µl. Em cada reação foi adicionada uma gota de óleo mineral para evitar a evaporação. Antes de ir para o termociclador cada reação foi submetida a um pulso de 1810g. Para cada bateria de reações foi feito um controle negativo

com todos os compostos da reação exceto o cDNA. As reações foram amplificadas em termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-100. Inicialmente a reação foi aquecida a 95 °C durante três minutos e em seqüência submetida a 35 ciclos nas seguintes condições: 95°C/30s, 62°C/40s e 72°C/45s. Após os 35 ciclos foi realizada uma extensão final a 72°C/10 min. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1,5% de 20cm x 24,5cm x 6mm em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X, de acordo com Sambrook *et al.* (1989). A visualização dos produtos amplificados foi feita em luz ultravioleta por meio do corante brometo de etídio, diluído no gel numa concentração aproximada de 0,5 µg/ml de gel.

Para a eletroforese, foram adicionados em cada amostra (15 µl) 3 µl de um tampão de carregamento (azul de bromofenol 3,61M, xileno cianol 4,64M, sacarose 1,17M e EDTA 0,1M pH8,0). A eletroforese foi conduzida a 0,23 V/ml por duas horas. Os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotografados em VDS Image System – Pharmacia, usando filtro laranja e com tempo de exposição 2,17 segundos, contraste de 0 a 6, e 0,45 de fator de correção da câmera.

Os produtos amplificados foram separados por LIS SSCP (Orita, *et al.* 1988) em gel de acrilamida (49:1 - Acrilamida:BIS) 14% previamente denaturados em tampão LIS (sacarose 10%, bromophenol blue 0,01% e xileno cianol 0,01%) e corados por Nitrato de Prata. Esta metodologia permite verificar-se a presença de polimorfismos entre os indivíduos sensíveis e resistentes, obtendo-se uma triagem prévia antes de se partir para o sequenciamento.

Os fragmentos obtidos foram clonados utilizando o Kit TOPO TA Cloning (Invitrogen) e enviados para sequenciamento pela técnica do dideoxy no sistema ABI 377.

Reação de RT-PCR Assimétrico

A reação de RT-PCR Assimétrico (LSART) foi realizada a partir de uma reação da transcriptase reversa (RT) esquematizada na Figura 4. A reação da Transcriptase reversa foi realizada em termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-100 a 37°C por uma hora acrescido de um aquecimento de 70°C por dez minutos. O volume final de cada reação foi de 20µl contendo tampão para RT 1X (250mM Tris-HCl, pH 8,6; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 50mM DTT), 200 µM de cada dNTP, 50 unidades de transcriptase reversa (MMLV), 1,5 µg de *primer* PDN₆ (hexâmeros), 20 unidades de inibidor de RNase e 1µg de RNA total.

Após a RT foram feitas reações de PCR utilizando o *primer forward* para o canal de sódio anelando na posição 2296. Cada reação continha Tris-HCl 10 mM, KCl 50mM, MgCl₂ 2mM, 400 µM de dNTPs (100 µM de dGTP, 100 µM de dCTP, 100 µM de dATP e 100 µM de dTTP), 8 pmoles de *primer*, 1,0 U de Taq DNA Polimerase, e 2µl de cDNA da reação da RT. Água ultrapura foi utilizada para completar o volume para 20 µl. Em cada reação foi adicionada uma gota de óleo mineral para evitar a evaporação. Antes de ir para o termociclador cada reação foi submetida a um pulso de 1810g. Para cada bateria de reações foi feito um controle negativo com todos os compostos da reação, exceto o cDNA. As reações foram amplificadas em termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-100. Inicialmente, a reação foi aquecida a 95 °C durante três minutos e

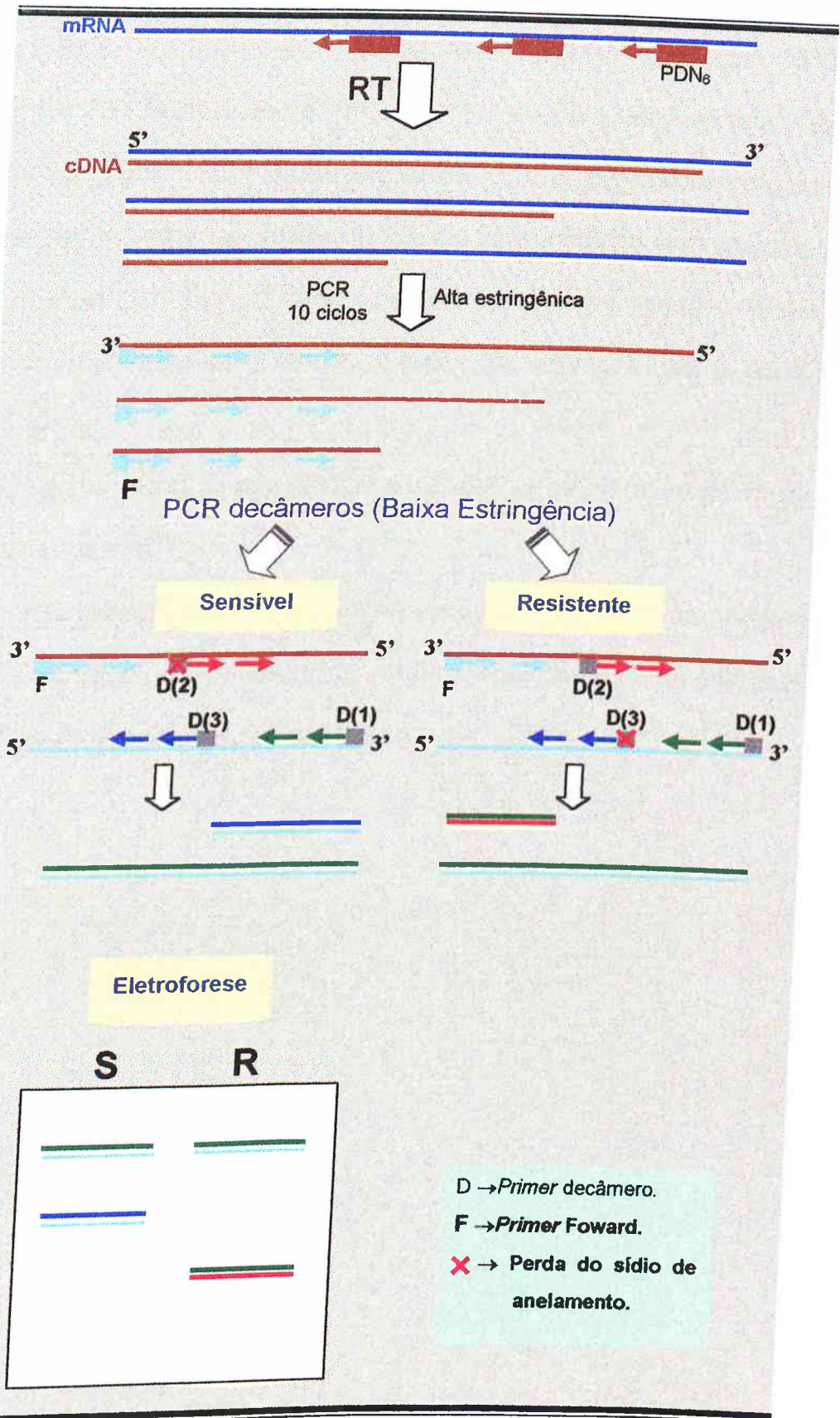


Figura 4 – Esquema mostrando as etapas da RT-PCR assimétrico

em seqüência submetida a 10 ciclos nas seguintes condições: 95°C/30s, 62°C/40s e 72°C/45s. Após os 10 ciclos, 10µl de cada reação foram utilizados como *template* para outras duas reações de PCR, uma de baixa e outra de alta estringência. A reação de baixa estringência foi idêntica àquela realizada com o *primer forward*, só que utilizando *primers* decâmeros randômicos (Operon Technology), um para cada reação, e reduzindo a temperatura de anelamento para 40 °C.

Para a reação de alta estrigência apenas a temperatura de anelamento foi alterada para 55 °C.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida 19:1, 6% corado com nitrato de prata seguindo os procedimentos do Laboratório de Genética Molecular (UFU).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da Técnica RT-PCR, mostraram um fragmento de 337 pb tanto em teleóginas resistentes quanto sensíveis a cipermetrina (piretróide) como mostrado na Figura 5.

As colunas R₁ e R₂ são de RT-PCR feitas com RNA total de teleóginas resistentes. A PCR de R₁ foi realizada utilizando-se cDNA como molde estocado há três meses a -20°C.

As colunas S₁ e S₂ apresentam o mesmo fragmento de 337pb amplificado por RT-PCR, evidenciado nas resistentes, em teleóginas sensíveis à cipermetrina. Em S₁, o cDNA utilizado para a PCR também encontrava-se estocado a -20°C por três meses.

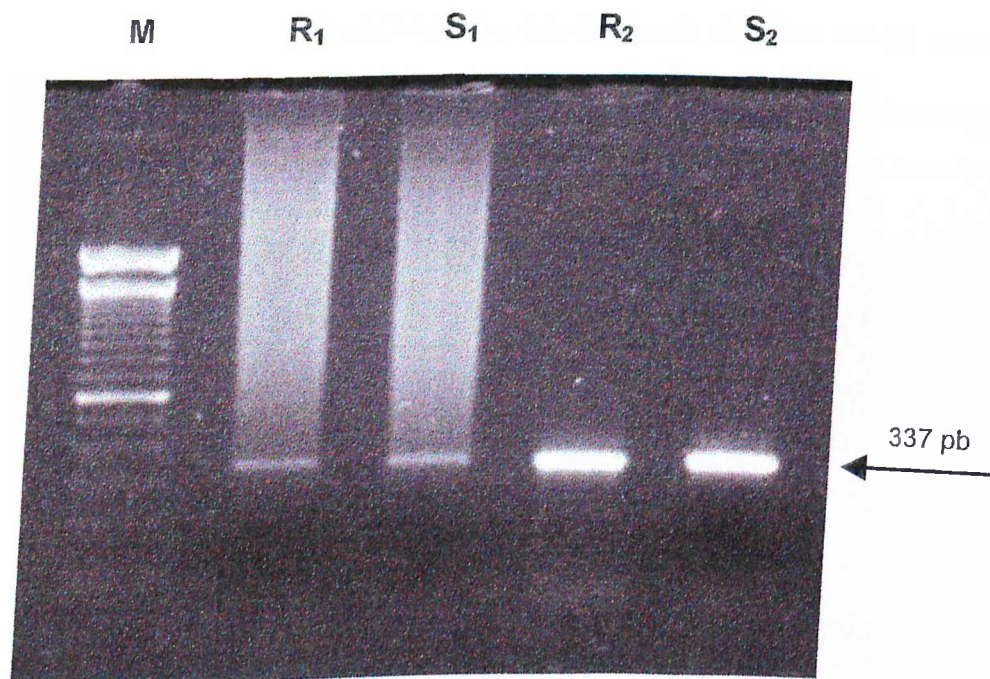


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos amplicons de um fragmento do canal de sódio de 337pb, obtido por RT-PCR. M (marcador de 100 pb); R₁ e R₂ (teleóginas resistentes à cipermetrina); S₁ e S₂ (teleóginas sensíveis à cipermetrina)

A mutação descrita por He *et al* (1999a), sugere estar presente em cepas de campo resistentes a piretróides. Os resultados obtidos com SSCP mostrou uma diferença na migração dos fragmentos de 337pb de teleóginas sensíveis e resistentes (Figura 6). Nesta figura, R e S são os perfis eletroforético dos fragmentos de 337pb das teleóginas resistentes e sensíveis, respectivamente. Este dados sugerem a presença da mutação na população de carrapatos aqui estudada. No entanto, estes resultados serão confirmados com o sequenciamento dos fragmentos descritos.

A presença desta mutação de ponto na região IIIIS6 do gene do canal de sódio nesta população de *B. microplus* poderia ou não ocorrer uma vez que alguns autores não conseguiram identificar a presença de mutações conhecidas em populações resistentes (HE *et al*, 1999a). He *et al* (1999b) verificaram a não ocorrência de mutações esperadas como a *kdr* em populações resistentes a piretróides, sugerindo que poderia haver uma certa variabilidade destas mutações, quando populações distintas são comparadas.

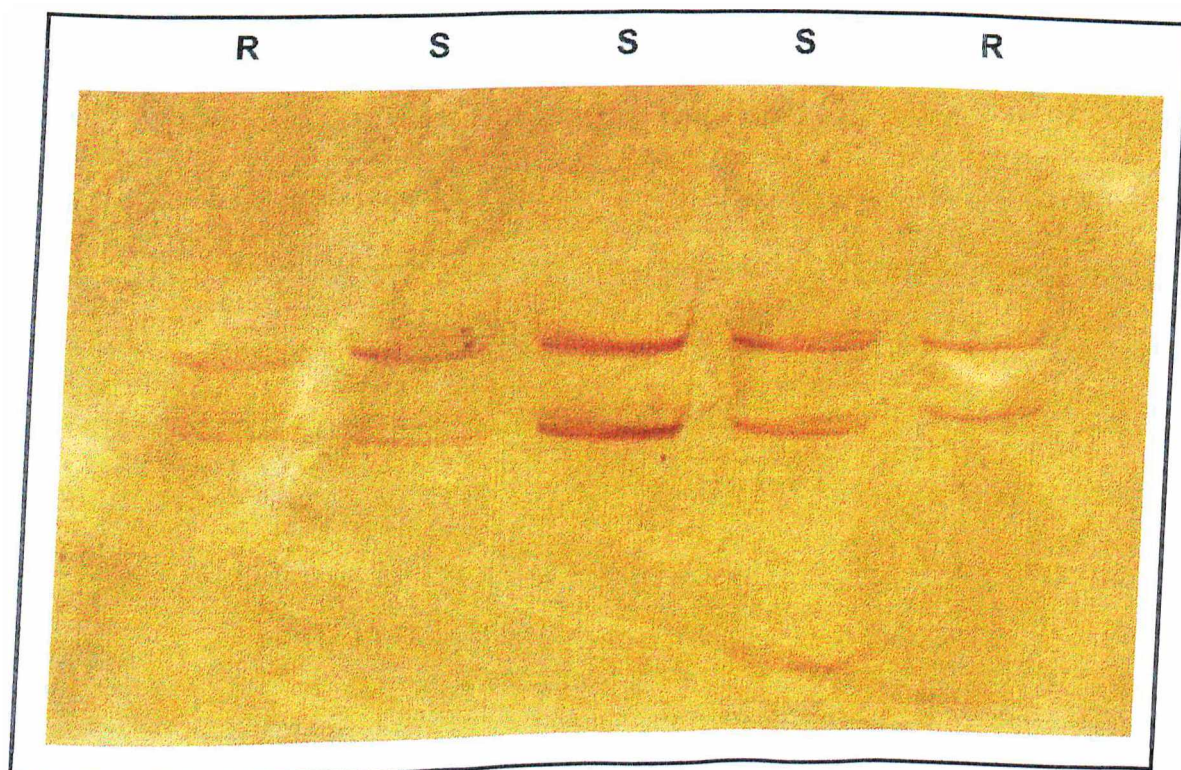


Figura 6 - Análise de mutações por LIS-SSCP em gel de policacrilamida dos amplicons do gene canal de sódio obtidos por RT-PCR.

A Figura 7 refere-se a um gel de poliacrilamida evidenciando os amplicons obtidos pela técnica da RT-PCR Assimétrico com baixa estringência. As setas indicam as bandas polimórficas entre teleógenas resistentes (L_1 e L_3) e sensíveis à cipermetrina (L_2 e L_4). Nas colunas L_1 e L_2 utilizou-se o decâmero OPA-04 (5'-AATCGGGCTG-3') na última etapa da LSART e nas colunas L_3 e L_4 o decâmero OPA-13 (5'-CAGCACCCAC-3'). As reações destas quatro linhas (L_1 , L_2 , L_3 e L_4) correspondem às de baixa estringência, utilizando uma temperatura de anelamento de 40°C. O aparecimento de bandas polimórficas sugere a ocorrência de mutações no canal de sódio a partir da posição 2296 do domínio IIIS6 em direção a extremidade 3' do gene. He *et al* (1999) sugeriram a ocorrência de várias mutações no gene de canal de sódio, ainda não identificadas, relacionadas com a resistência. Estes autores verificaram também a não ocorrência de mutações esperadas como a *kdr* em populações resistentes a piretróides, sugerindo que pode haver uma certa variabilidade destas mutações quando populações distintas são comparadas.

Várias mutações foram descritas nos domínios II do canal de sódio em vários insetos, conferindo resistências a piretróides. Head *et al* (1998), encontraram uma mutação de ponto no *linker* do domínio III e IV do canal de sódio, também associado com este mecanismo de resistência em *Heliothis virescens* e *Holicoberpa armigera*. Portanto, esperava-se uma certa variabilidade entre os cDNAs de teleóginas resistentes e sensíveis. A ocorrência de mutações idênticas ou mesmo diferentes das descritas na literatura também era esperada comprovando o resultados registrados em literatura.

A presença de bandas idênticas, destacadas no gel por um retângulo, em resistentes e sensíveis confirmam a eficiência da técnica do LSART. Isto era esperado já que na etapa da reação onde o *primer forward* foi utilizado, o anelamento ocorreu na mesma região, independentemente do indivíduo, por se tratar de um gene constitutivo.

Reações com outros decâmeros não tiveram boa amplificação. L₅, L₆, L₇, L₈ mostram as mesmas reações apresentadas nas quatro primeiras linhas, apenas substituindo os *primers* por OPV 17 (5'-ACCGGCTTGT-3') e OPA09 (5'-GGGTAACGCC-3'). Uma amplificação de má qualidade revelou um anelamento imperfeito destes *primers* ao gene estudado.

As linhas de L₉ a L₁₂ são repetições das quatro primeiras. No entanto, a temperatura de anelamento foi aumentada para 55 °C ocasionando uma completa ausência de bandas. O aumento da estringência foi suficiente para inibir o anelamento dos *primers* impedindo a obtenção dos dados anteriormente obtidos.

Outros decâmeros foram utilizados e nenhum fragmento foi amplificado ou nenhuma diferença entre sensível e resistente constatada. Quando elevou-se a temperatura de anelamento para os decâmeros a 55°C (L₉, L₁₀), aumentando a estringência, nenhuma amplificação ocorreu.

O teste de diversos *primers* randômicos é uma pré-condição importante para esta técnica que objetiva determinar mutações em genes expressos. Espera-se, no entanto, um sucesso restrito de amplificação, conforme visto na Figura 7, uma vez que a intenção é estudar apenas um único gene expresso e suas variações.

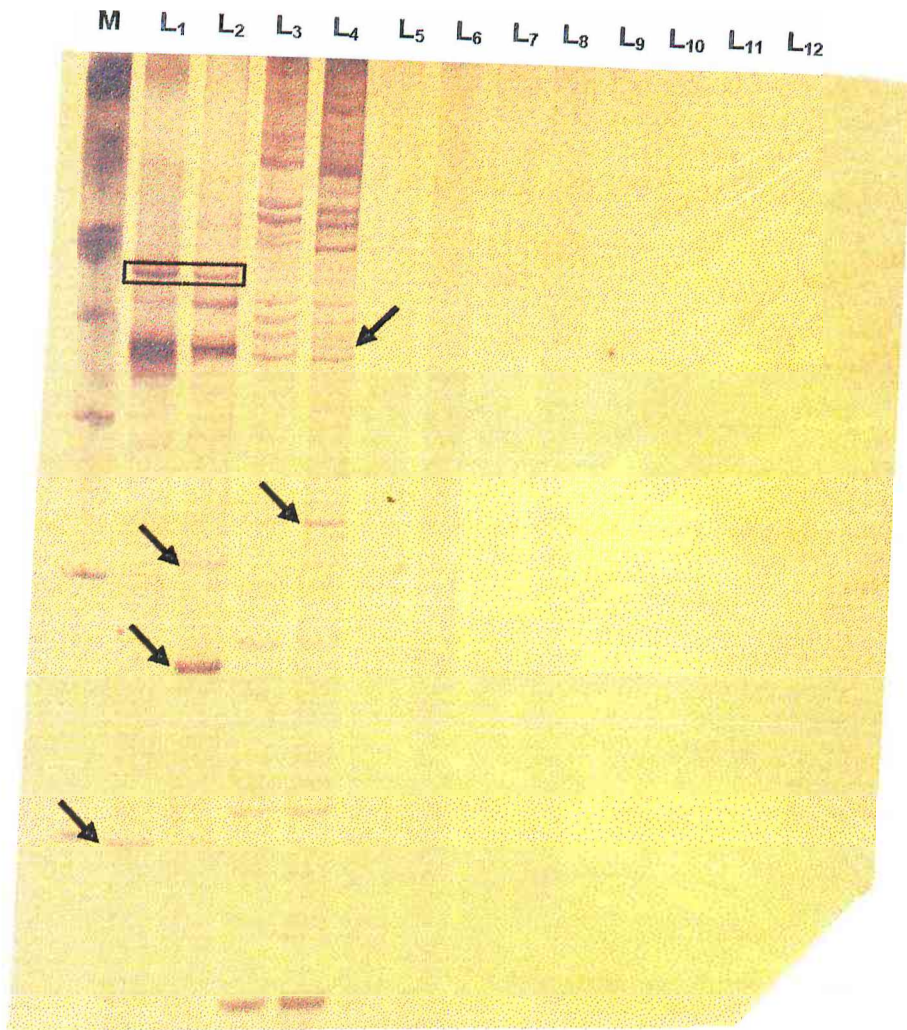


Figura 7 - Gel de poliacrilamida (6%) de produtos gerados por LSART. M (marcador de peso molecular 100 pb); L₁ (R) e L₂ (S) PCR com OPA-04; L₃ (R) e L₄ (S) PCR com OPA-13; L₅ – L₈, PCR com OPV-17 e OPA-09; L₉ – L₁₂, PCR com OPA-04 e OPA –13 com alta estringência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GOLDIN, A. L. 1994. **Molecular analysis of sodium channel inactivation.** In: Peracchia, C. (Ed.) *Handbook of Membrand Channels*, f. 19. Academic Press, San diego, pp. 121-135.
- HE, H.; CHEN, A.C.; DAVEY, R.B.; IVIE, G.W; GEORGE, J. E. 1999a. Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. **Biochemical and Biophysical Research Commucations.** 261. 558-561.
- HE, H. CHEN, A. C.; DAVEY, R. B.; IVIE, G. W.; WAGNER, G. G.; GEORGE, J. E. 1999b. Sequence analysis of the Para-Type Sodium Channel Gene from Pyrethroid-Resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology.** 36(5). 539-533.
- HEAD, D. J; MCCAFFERY, A. R. CALLAGHAN, A. 1998. Novel mutations in the para-homologous sodium channel gene associated with phenotypic expression of nerve insensitivity resistance to pyrethroids in Heliiothine lepidoptera. **Insect Molecular Biology.** 7(2). 191 – 196.
- JAMROZ, R. C.; GUERRERO, F. D.; PRUTETT, J. H. OEHLER, D. D.; MILLER, R. J. 2000. Molecular and Biochemical survey of Acaricide Resistance Mechanisms in Larvae From Mexican Strains of The Southern Cattle Tick, *Boophilus microplus*. 2000. **Journal of Insect Physiology.** 2000. 685-695.
- JAMROZ, R. C.; GUERRERO, F. D.; KAMMLAH, D. M.; KUNZ, S. E. 1998. Role of the kdr and super-kdr sodium channel mutation of allelic frequency to resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology.** 28. 1031-1037.
- MARBAN, E.; UAMAGISHI, T.; TOMASLI, G. F. 1998. Sructure and function of voltage-gaed sodium channels. **J. Physiol.** 508. 647-657.

MARTINEZ-TORES, D.; CHANDRE, F.; WILLIAMSON, M. S.; DARRIET, F.; GERGÉ, J. B.; DEVONSHIRE, A. L.; GUILLET, P.; PASTUR, N.; PAURON, D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. **Insect Molecular Biology**. 7(2). 179 - 184

ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, H., HAYASHI, K. & SEKEYA, T. 1988. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms.

PARK, Y AND TAYLOR, M. F. 1997. A Novel Mutation L1029H in Sodium Channel Gene *hscp* Associated with Pyrethroid Resistance for *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 27(1). 9-13.

PLUMMER, N. W. AND MSISLER, M. H. 1999. Evolution and Diversity of Mammalian Sodium Channel Genes. **Genomics**. 57. 323-331.

ROSSIGNOL, D. P. 1988. Reduction in Number of Nerve Membrane Sodium Channels in Pyrethroid Resistant House Flies. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 32. 146-152.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** 1. 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SODERLUND, D. M.; LEE, S. H. Point Mutations in Homology Domain II Modify the Sensitivity of Rat Na_v 1.8 Sodium Channels to the Pyrethroid Insecticide Cisethrin. 2001. **NeuroToxicology**. 22. 755-765.

ROOSIGNOL, D. P. 1988. Redução in numbrer of nerve mebbbrane sodium channels in pyrethroid resistant house flies. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 32. 146-152.