

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

**ESTERASES E RESISTÊNCIA A ACARICIDAS NO CARRAPATO BOVINO
Boophilus microplus (ACARI, IXODIDAE).**

Milla Alves Baffi

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

**UBERLÂNDIA - MG
2006**

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

**ESTERASES E RESISTÊNCIA A ACARICIDAS NO CARRAPATO BOVINO
Boophilus microplus (ACARI, IXODIDAE).**

Milla Alves Baffi

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

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

UBERLÂNDIA-MG

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

B143e Baffi, Milla Alves, 1977-
Esterases e resistência a acaricidas no carrapato bovino
Boophilus microplus (Acari, Ixodidae) / Milla Alves Baffi. - Uberlândia,
2006.
118f. : il.
Orientador: Ana Maria Bonetti.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Carrapato bovino - Teses. 2. *Boophilus microplus* -
Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica. III. Título.

CDU: 595.42

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

ESTERASES E RESISTÊNCIA A ACARICIDAS NO CARRAPATO BOVINO
Boophilus microplus (ACARI, IXODIDAE).

Milla Alves Baffi

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Ana Maria Bonetti (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi

Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron

Data da Defesa: 20/01/2006

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

(Orientador)

Uberlândia, ____ / ____ / ____

À minha família pelo amor, compreensão e estímulo
em todos os momentos.

"Todo homem, por natureza, quer saber."

Aristóteles

"A imaginação é mais importante que o conhecimento."

Albert Einstein

"A mais bela experiência que podemos ter é a do mistério. É a emoção fundamental existente na origem da verdadeira arte e ciência. Aquele que não a conhece e não pode se maravilhar com ela está praticamente morto e seus olhos estão ofuscados".

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família: minha mãe Rosa, minha avó Inês, minhas irmãs Melissa e Marcela e minha sobrinha Giulia, por todo amor, carinho, equilíbrio emocional e apoio constantes nos momentos mais difíceis.

À Profa. Dra. Ana Maria Bonetti, por ter dado a oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação, pela confiança depositada e pela amizade.

Aos professores Dr. Carlos Roberto Ceron e Dr. Luiz Ricardo Goulart por todo o apoio, co-orientação e sugestões dadas durante o desenvolvimento do trabalho e também pela amizade.

À Comissão Examinadora: Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi, Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart e Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron pela avaliação criteriosa do trabalho e por todas as sugestões.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Coordenador do Instituto de Genética e Bioquímica, Prof. Dr. Milton Vieira Coelho, por toda infra-estrutura utilizada e aos funcionários, Gerson Fraissat e Marlene pelos serviços prestados.

Ao Conselho de Aprendizagem e Ensino Superior (CAPES) pelo suporte ao ensino e pesquisa de Pós Graduação.

Aos coordenadores e colegas dos laboratórios de Químicas de Proteínas e Produtos Naturais, Bioquímica e Genética Molecular pelo auxílio prestado.

Ao Prof. Dr. Rogério Costa Pinto pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Vallée S/A pelo fornecimento dos acaricidas e amostras de carrapatos.

Meu especial agradecimento aos parceiros Carlos Ueira, Guilherme Souza e Cristina Soares pela participação no trabalho, companheirismo e amizade.

A todos os colegas do laboratório de Genética pela colaboração indireta no trabalho e amizade, em especial a Cícero Donizete Pereira, Soraya Vasconcelos, Rosana Oliveira, Luciana Londe, Ana Carolina Siquieroli e Isabel Marques.

A todos os colegas do laboratório de Genética Molecular pela troca de informações e sugestões, em especial a Karina, Adriana, Elis e Carlos Prudêncio.

À minha irmã Melissa, pelo auxílio na tradução dos artigos para o inglês.

Aos amigos: Andressa, Dirlene, Clara, Letícia, Leonardo, Eduardo, Diego, Luisa, Fábio Lucas e Renata por todo o carinho e amizade sincera.

A Deus e à Natureza.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO GERAL	xv
GENERAL ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO GERAL	1
O carrapato bovino	1
Ciclo de vida	2
Controle	3
Mecanismos de Resistência	5
Esterases	7
Métodos de Detecção de Resistência	10
Referências Bibliográficas	12
OBJETIVOS	21
CAPÍTULO 1	
Perfil de atividade esterásica no desenvolvimento pós-embrionário do carrapato bovino <i>Boophilus microplus</i> (Acari: Ixodidae).	22
Resumo	23
Abstract	24
Introdução	25
Material e Métodos	27
Material Biológico	27
Preparação das Amostras e Determinação de Proteína Total	27
Elektroforese e Atividade esterásica	27
Caracterização Bioquímica com Inibidores	28
Resultados	29
Identificação das regiões com atividade esterásica	29
Padrões de Inibição	29
Padrão de esterases durante o desenvolvimento	30
Discussão	32
Referências	35

CAPÍTULO 2

Padrão de esterases em linhagens sensíveis, tolerantes e resistentes a piretróides e organofosforados em uma população brasileira de <i>Boophilus microplus</i> (Acari, Ixodidae).	38
Resumo	39
Abstract	40
Introdução	41
Material e Métodos	43
Material Biológico	43
Teste de Resistência	43
Determinação de Proteína Total	44
Perfil de Esterases	44
Ensaio com Inibidores	45
Quantificação da atividade esterásica	45
Resultados	46
Teste de Resistência	46
Atividade Esterásica	46
Caracterização Bioquímica	48
Quantificação da atividade esterásica	49
Discussão	50
Referências	53

CAPÍTULO 3

Rastreamento de mutações em um fragmento de uma carboxilesterase e associação à resistência a acaricidas em <i>Boophilus microplus</i> (Acari: Ixodidae).	58
Resumo	59
Abstract	60
Introdução	61
Material E Métodos	63
Material Biológico	63
Extração de DNA	64
Amplificação do DNA e Eletroforese	65
LIS-SSCP	65

PCR-RFLP	66
Clonagem e Sequenciamento	66
Análises Estatísticas	67
Resultados	68
Teste de Resistência	68
Extração de DNA	68
PCR	69
LIS-SSCP	70
RFLP	71
Sequenciamento dos Genótipos obtidos por PCR-RFLP	74
Análises Estatísticas	80
Discussão	83
Referências	88
CONCLUSÕES GERAIS	92
ANEXOS	93

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico
LIS	Low ionic strength
g	grama
μl	Microlitros
μg	Micrograma
mM	milimolar
M	Molar
mg	miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
nm	Nanômetros
ng	nanogramas
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pmoles	picomoles
pb	pares de base
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rpm	Rotações por minuto
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tampão Tris/Borato/EDTA
U	unidades de enzima

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1. Ciclo de Vida de <i>B. microplus</i>	03
---	----

Capítulo 1

Figura 1. Padrão de esterases durante o ciclo de vida de <i>B. microplus</i> visualizado em gel de poliacrilamida não-desnaturante.....	29
--	----

Capítulo 2

Figura 1: Padrão de esterase em uma população brasileira de <i>B. microplus</i> , após teste resistência com deltametrina. PAGE não desnaturante a 12%.....	48
--	----

Figura 2: Padrão de esterase em uma população brasileira de <i>B. microplus</i> , após teste resistência com malation. PAGE não desnaturante a 12%.....	48
--	----

Capítulo 3

Figura 1. Padrão de DNA utilizado para amplificação.....	69
---	----

Figura 2. Amplificação de um fragmento de uma provável carboxilesterase de <i>B. microplus</i> de aproximadamente 372pb.....	69
---	----

Figura 3. Esquema representativo dos quatro haplótipos observados por LIS-SSCP.....	70
--	----

Figura 4. Produtos da PCR após digestão com <i>Eco</i> RI em teleóginas de <i>B. microplus</i>	72
---	----

Figura 5. Blast n da seqüência da linhagem resistente RM. Alinhamento com uma seqüência de uma CaE de *B. microplus* (HERNANDEZ et al, 2002).....75

Figura 6. Blast n da seqüência da linhagem resistente RD. Alinhamento com uma seqüência de uma AChE de *B. microplus* (Gonzalez e Leonart, dados não publicados).....75

Figura 7. Alinhamento das três seqüências através do programa Clustal W.....76

Figura 8. Alinhamento das seqüências, indicando as mutações que conferem o polimorfismo para Eco RI.....76

Figura 9: Tradução das seqüências de nucleotídeos através do programa Expasy Proteomics Server em seqüências de aminoácidos. Substituição resultante da formação de um sítio de restrição para Eco RI (cttaga → cttaag/ LR →LK) indicada em vermelho.....78

Figura 10: Tradução das seqüências, utilizando o programa ExPASy (<http://tw.expasy.org/>) mostrando códons de parada nas seqüências das linhagens sensível e tolerante, antes do sítio de restrição *Eco* RI, indicado em vermelho: substituição LR (linhagem SM) para LK (linhagens TM e RM).....79

Figura 11: Domínios protéicos presentes em cada linhagem.....79

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 - Efeito de inibidores sobre as esterases detectadas durante o desenvolvimento de <i>B. microplus</i>	30
---	----

Capítulo 2

Tabela 1. Níveis de resistência em uma população brasileira de <i>B. microplus</i> após o teste de resistência <i>in vitro</i> AIT (Adult Immersion Test).	46
--	----

Tabela 2: Efeitos de inibidores sobre as esterases em uma população brasileira de <i>B. microplus</i> . (-) ausência de inibição; (+, ++, +++) níveis crescentes de inibição.....	49
--	----

Tabela 3. Quantificação de atividade esterásica nas diferentes linhagens, utilizando o programa Image Master VDS.....	49
--	----

Capítulo 3

Tabela 1- Seqüência de oligonucleotídeos para amplificação de parte do gene de uma provável carboxilesterase de <i>B. microplus</i>	65
--	----

Tabela 2. Linhagens selecionadas após teste de resistência <i>in vitro</i> (AIT) com teleóginas (Adult Immersion Test) em uma população brasileira de <i>B. microplus</i>	68
--	----

Tabela 3. Número e porcentagem de haplótipos nas linhagens selecionadas no teste de resistência em uma população brasileira de <i>B. microplus</i>	71
---	----

Tabela 4. Frequências Genotípicas nas linhagens selecionadas no teste de resistência em uma população brasileira de <i>B. microplus</i> , após digestão com enzima de restrição <i>Eco RI</i>	72
Tabela 5. Frequência Alélica nas linhagens selecionadas no teste de resistência em uma população de <i>B. microplus</i> , após restrição com <i>Eco RI</i>	73
Tabela 6. Frequências Genotípicas e Alélicas Reais em cada linhagem de uma população brasileira de <i>B. microplus</i>	74
Tabela 7. Domínios protéicos das enzimas presentes em cada linhagem e suas respectivas seqüências de aminoácidos e posições.....	80
Tabela 8. Diferenças de Proporções (Teste –) entre as frequências genotípicas observadas por PCR-RFLP e as linhagens selecionadas pelo teste de resistência.....	81
Tabela 9. Diferenças de Proporções (Teste –) entre as frequências haplotípicas observadas por LIS-SSCP e as linhagens selecionadas pelo teste de resistência.....	83

RESUMO GERAL

O carrapato bovino *Boophilus microplus* é um dos ectoparasitos mais importantes para a agropecuária brasileira, sendo responsável, segundo o Ministério da Agricultura, por prejuízos diretos e indiretos à bovinocultura de, aproximadamente, dois bilhões de dólares ao ano. O método tradicional de controle baseia-se no uso de acaricidas piretróides e organofosforados, cujo uso sistemático tem promovido a seleção de genótipos resistentes em populações de carrapatos. Mutações de ponto em genes codificadores de esterases e o aumento na produção dessas enzimas representam importantes estratégias de resistência, conferindo insensibilidade ao efeito neurotóxico desses compostos orgânicos nessa espécie. Neste trabalho, realizou-se a análise do padrão de esterases nas diferentes fases do ciclo de vida do carrapato, por eletroforese em gel de poliacrilamida nativo e coloração específica para esterases. Os resultados mostraram nove regiões com atividade esterásica, consideradas como produtos de nove alelos distribuídos em sete *loci* genéticos. Esterases detectadas em todas as fases do desenvolvimento foram consideradas como produtos de genes *housekeeping*. Esterases estágio-específicas e sexo-específicas foram, também, detectadas. Linhagens com diferentes níveis de resistência foram selecionadas após o teste de resistência com o organofosforado malation e o piretróide deltametrina em teleóginas provenientes de uma fazenda da região de Uberlândia, MG, com histórico de resistência. A análise do padrão de esterases por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante das linhagens sensível (SM), tolerante (TM) e resistente (RM) ao malation e das linhagens sensível (SD), tolerante (TD) e resistente (RD) a deltametrina revelou a presença de quatro regiões com atividade esterásica (EST-1 a EST-4). As enzimas EST-3 e EST-4, classificadas como carboxilesterases (CaEs), foram observadas em todas as linhagens. A EST-2, classificada como acetilcolinesterase (AChE), foi detectada em todas as linhagens, porém, apresentou intensidade crescente de atividade esterásica, indicando aumento na produção da enzima de acordo com o nível de resistência, provavelmente resultante de amplificação gênica ou alterações pós-traducionais. A EST-1, classificada como AChE, foi detectada exclusivamente nas linhagens tolerantes e resistentes a ambos acaricidas, com maior atividade nas linhagens

resistentes (RD e RM). Os resultados indicam que as AChEs detectadas representam importante estratégia de detoxificação aos acaricidas. Essas linhagens foram, também, analisadas pelas técnicas *Low Ionic Strength Single Stranded Conformation Polymorphism* (LIS-SSCP) e *Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) para investigação de mutações em uma provável CaE. A digestão do fragmento amplificado de 372pb com enzima de restrição *Eco RI* por PCR-RFLP mostrou três padrões de bandas associados a três genótipos distintos, W, H e M, observados em diferentes frequências nas linhagens analisadas. O genótipo homozigoto selvagem (W) foi detectado exclusivamente nas linhagens sensíveis (SD e SM) e em alta frequência. O genótipo heterozigoto (H) foi detectado em todas as linhagens, porém, em maior frequência nas linhagens tolerantes (TD e TM) e, o genótipo homozigoto mutante (M) foi observado nas linhagens tolerantes e resistentes, em maior frequência nas linhagens resistentes (RD e RM), sugerindo que a resistência esteja associada à presença do alelo mutante *m* (polimorfismo *EcoRI*). A genotipagem por LIS-SSCP mostrou quatro haplótipos: 1 2, 3 e 4. O haplótipo 1 foi observado apenas nas linhagens sensíveis (SD e SM) e em alta frequência. O haplótipo 4 foi observado nas linhagens tolerantes e resistentes, com a maior frequência nas linhagens tolerantes (TD e TM). O haplótipo 3, foi observado nas linhagens tolerantes e resistentes, sendo detectado em maior frequência nas linhagens resistentes (RD e RM). O haplótipo 2 foi detectado nas linhagens tolerantes e resistentes, porém, em frequência muito baixa. A comparação entre as seqüências revelou a presença de mutações de ponto, além do polimorfismo *EcoRI* nas linhagens tolerante e resistente ao malation. Foi observada, também, a presença de códon de parada, gerando proteínas truncadas, nas linhagens sensível e tolerante. A análise de domínios mostrou a presença de domínios adicionais na linhagem resistente. Os dados obtidos sugerem a existência de mecanismos mediados por mutações de ponto, amplificação gênica e modificações pós-traducionais, que podem estar alterando a atividade das proteínas traduzidas e atuando em conjunto na expressão da resistência na população analisada.

PALAVRAS-CHAVE: *Boophilus microplus*, resistência, acaricidas, esterases.

GENERAL ABSTRACT

The cattle tick *Boophilus microplus* is one of the most important ectoparasites for the Brazilian farming, and it is responsible, according to Agriculture Ministry, for direct and indirect damages to livestock of, approximately, two billions dollars a year. The traditional method of control is based on the intensive use of pyrethroids and organophosphate pesticides, whose systematic use has been promoting the selection of resistant genotypes in tick populations. Point mutations in esterase genes and the increase of production of these enzymes represent important strategies of resistance, conferring insensitivity to neurotoxic effects of these organic compounds in this specie. In this work, esterase patterns were compared among the stages of the life cycle of *B. microplus*, in non-denaturing polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE), using specific staining for esterases. Electrophoretical results indicate the presence of nine regions displaying esterase activity. These esterases were considered as products from nine alleles distributed in seven gene *loci*. Esterases that were detected in all the stages of development were considered as products of *housekeeping* genes. Some stage-specific and sex-specific esterases were also detected. Strains with different levels of resistance were selected after the resistance test with the malation organophosphate and with the deltametrin pyrethroid in engorged females from a farm of Uberlândia region (MG), with description of resistance. Electrophoretical profiles of esterase pattern using non-denaturing polyacrilamide gel electrophoresis among malathion and deltametrin-susceptible, tolerant and resistant tick strains revealed four bands displaying esterase activity, named EST-1 to EST-4. The esterases EST-3 and EST-4, classified as carboxylesterases, were observed in all strains. The esterase EST-2, classified as an acetylcholinesterase in inhibitor tests, was detected in all strains, but it has presented an increasing degree of staining, from susceptible to resistant strains, indicating an increase in the enzyme production according to resistance level, probably as a result of gene amplification or post-traditional alterations. The enzyme EST-1, classified as an acetylcholinesterase, was detected exclusively in tolerant and resistant strains to both acaricides, however, with higher activity in resistant strains. These data indicate that the detected acetylcholinesterases could

be representing important detoxification strategy developed to overcome the effects of the acaricides. These strains were also analyzed by the techniques *Low Ionic Strength Single Stranded Conformation Polymorphism* (LIS-SSCP) and *Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) to investigate mutations in a putative carboxylesterase fragment. The digestion of the amplified fragment of 372bp with the restriction enzyme *Eco* RI showed three band patterns, associated to three distinct genotypes: W, H and M, which were observed in different frequencies in the analyzed strains. The homozygous wild genotype (W) was detected only in the susceptible strains, in high frequency. The heterozygous genotype (H) was observed in all strains, however, in higher frequency in tolerant strains, and the homozygous mutant genotype (M) was observed only in the resistant and tolerant strains, with higher frequency in the resistant strains, suggesting that the resistance can be associated to the presence of the *m* mutant allele (*Eco*RI polymorphism). The genotyping by LIS-SSCP showed four haplotypes, named 1, 2, 3 and 4. The haplotype 1 was observed only in the susceptible strains and in high frequency. The haplotype 4 was observed in the resistant and tolerant strains with higher frequency in tolerant strains. The haplotype 3 was observed in resistant and tolerant strains, and was detected in higher frequency in the resistant strains. The haplotype 2, was also detected in resistant and tolerant strains, however, in very low frequency in population. The comparison among the sequences demonstrated the presence of mutations, beyond the *Eco*RI polymorphism in resistant and tolerant strains. The presence of *stop codons* was also observed, creating truncated proteins in the susceptible and tolerant strains. The domains analysis showed additional motifs in resistant strain. The obtained data suggest mechanisms mediated by point mutations, gene amplification and post-traditional modifications, which can be altering the activity of the translated proteins and acting together in the expression of resistance in the analyzed population.

KEY-WORDS: *Boophilus microplus*, resistance, acaricides, esterases

INTRODUÇÃO GERAL

O carrapato bovino

O carrapato bovino *Boophilus microplus* (recentemente reclassificado dentro do gênero *Rhipicephalus*; MURRELL e BARKER, 2003) é um ectoparasita que se alimenta obrigatoriamente de sangue do hospedeiro e é encontrado em quase todas as regiões do mundo (Figura 1A). O *B. microplus* é um artrópode, pertencente à classe Arachnida, sub-classe Acarina, ordem Acari, subordem Metastigmata, superfamília Ixodidae, subfamília Canestrini, de origem, provável do sul da Ásia, quando mamíferos e pássaros substituíram os répteis como vertebrados dominantes, já no período terciário (EVANS, 1979).

Este parasita adaptou-se perfeitamente ao clima dos países tropicais, onde o calor e a umidade propiciaram condições favoráveis à sobrevivência e manutenção da espécie (POWEL e REID, 1982). De acordo com NUNES *et al.* (1982), o carrapato bovino chegou na América do Sul, por meio dos colonizadores ibéricos entre os séculos XVI e XVIII e foi introduzido no Brasil devido à importação do gado zebu da Ásia (WALKER, 1987).

O principal hospedeiro deste parasita hematófago é o gado bovino sendo que as maiores infestações ocorrem em *Bos taurus* e as menores em *Bos indicus*, porém, outros animais como burros, ovinos, búfalos, caprinos, cães, gatos, entre outros podem ser hospedeiros secundários (RIEK, 1959).

Esse parasita é responsável, segundo o Ministério da Agricultura, por perdas de, aproximadamente, dois bilhões de dólares ao ano (GRISI *et al.*, 2002) com prejuízos diretos e indiretos à bovinocultura, devido a quedas na produção de leite, natalidade, peso, aumento na mortalidade e consumo de carrapaticidas, além de danos à indústria do couro. O carrapato atua, ainda, como vetor de vários organismos patogênicos como fungos, riquetsias, bactérias e protozoários. O carrapato *B. microplus* é o vetor de uma das principais doenças dos nossos rebanhos, a Tristeza Parasitária Bovina, cujos agentes causadores, *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *Rickettsia sp* e *Anaplasma marginalis*, são transmitidos pela picada do carrapato e podem levar o animal à morte por anemia (DE CASTRO, 1997).

Ciclo de vida

O ciclo biológico de *B. microplus* (Figura 1B) se completa pela passagem em apenas um hospedeiro e divide-se em duas fases: vida livre e fase parasitária. A fase de vida livre começa quando a fêmea inicia a postura dos ovos no solo e termina quando as larvas eclodidas se fixam no hospedeiro. A fase parasitária (Figura 1D) inicia-se com a fixação das larvas no hospedeiro e culmina com a queda das fêmeas adultas ingurgitadas e fecundadas (FURLONG, 1993).

Pré-postura: período entre a queda da fêmea ingurgitada (teleógina) e a expulsão do primeiro ovo. Esse período, em condições ideais de temperatura e umidade (27°C e 80% de umidade), tem tempo médio de dois a quatro dias.

Postura: Após desprender-se do bovino, a teleógina procura um local protegido da luz solar direta para realizar a postura (Figura 1C), que pode durar de uma semana a vários meses, dependendo das condições ambientais, com duração média de 15 a 17 dias, sendo que a quantidade de ovos liberados depende do peso da fêmea e da quantidade de sangue ingerido, chegando ao número máximo de 8000 ovos por fêmea.

Incubação: Após a postura completa, a fêmea morre. O período de desenvolvimento embrionário ocorre entre o 1º dia de postura até eclosão da larva. O período de incubação mínima é de 15 dias no verão e 55 dias no inverno.

Eclosão das larvas: Quando eclode, a larva é extremamente ativa e migra por geotropismo negativo para as extremidades das folhas, 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, perivulvar e a face interna das orelhas.

Metamorfose: Após fixação, a larva alimenta-se, inicialmente, de plasma e linfa, iniciando a metamorfose (metalarva). A metalarva realiza ecdise para ninfa (ninfa 1) em cerca de sete dias. Nesta fase, a alimentação consiste de linfa, plasma e sangue até a transformação em metaninfa (ninfa 2), período que se prolonga por sete dias e, após nova ecdise, ocorre a diferenciação sexual. A metaninfa pode dar origem a machos (neandros) que se queratinizam e são denominados gonandros ou dar origem a fêmeas (neóginas ou ninfa 3). No estágio adulto, a fêmea inicia o repasto sangüíneo, realiza a cópula (fêmea

fecundada semi-ingurgitada ou paternógina) e aumenta o volume sanguíneo ingurgitado até que totalmente ingurgitada (teleógina) cai ao solo. O ciclo de vida parasitário tem duração média de 21 dias. O macho permanece no bovino, sobrevivendo um tempo até duas vezes maior do que as fêmeas.

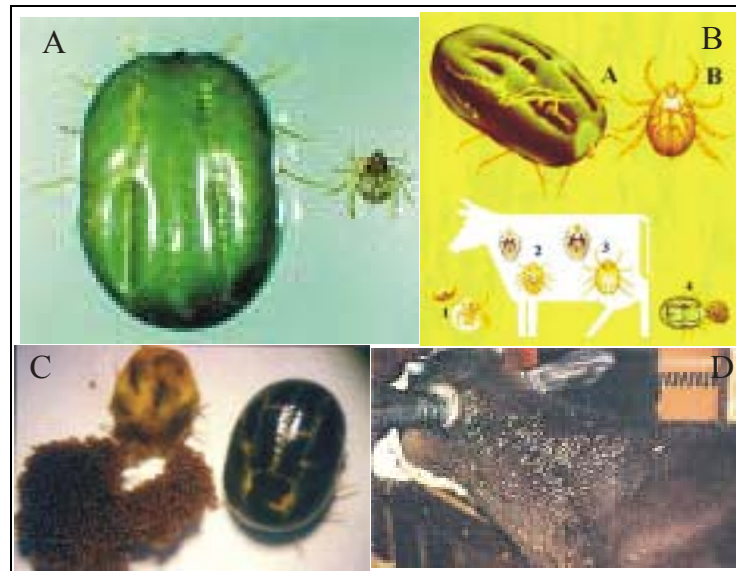


Figura 1. (A)- Fêmea e macho de *B. microplus* ; (B)- Ciclo de Vida, mostrando a fêmea (A), o macho (B) e as fases: 1- vida livre (larvas); (2-3) fase parasitária: ingurgitamento e fecundação e (4)- queda da teleógina e oviposição; (C) – postura dos ovos; (D)- fase parasitária.

Controle

O controle desse parasita tem sido feito, principalmente, por carrapaticidas (DE LA FUENTE *et al*, 2000). Esses produtos são utilizados de maneira indiscriminada e sem acompanhamento técnico, promovendo a seleção de carrapatos resistentes (DE CASTRO e NEWSON, 1993). Além disso, a má utilização de carrapaticidas predispõe a riscos de contaminação ambiental e causa aumento significativo dos custos de produção (KAY e KEMP, 1994).

Os acaricidas utilizados incluem derivados arsenicais, organoclorados, carbamatos, amidinas, organofosforados, e piretróides, sendo esses últimos, amplamente utilizados no Brasil (FURLONG *et al.*, 2004).

Os pesticidas piretróides (PIs) são neurotóxicos para artrópodes, atuando principalmente na transmissão axônica. A maioria dos PIs sintéticos são ésteres desenvolvidos a partir do produto natural piretrina, sendo a deltametrina e a cipermetrina os mais comuns. PIs exercem efeito sobre canais de sódio, ligando-se às suas subunidades, modificando-os e mantendo-os abertos por um período mais longo, com aumento do fluxo de sódio para o interior da membrana axônica, causando hiperatividade, ataxia, convulsões, paralisia e morte (SPINOSA *et al.*, 1999). Estes compostos podem atuar em sítios secundários como o sistema GABA, receptores de acetilcolina ativados por cálcio e sobre esterases, principalmente carboxilesterases.

Os pesticidas organofosforados (OPs) apresentam ação neurotóxica para artrópodes, atuando na transmissão sináptica, sendo malation, paration e coumafós os mais utilizados. OPs são inibidores da acetilcolinesterase, enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina, após transmissão do impulso nervoso, atuando como competidores pelos sítios de ligação da enzima. Quando a enzima encontra-se fosforilada, ocorre acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, ocasionando a transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos, com hiperatividade das fibras musculares, fadiga, paralisia muscular e morte (SPINOSA *et al.*, 1999). Os OPs atuam, também, sobre carboxilesterases.

O interesse no desenvolvimento de outras formas de controle decorre do fato de que o controle químico mostra-se cada vez mais inviável economicamente (TEIXEIRA LEITE *et al.*, 1991). 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). Outro fator que impõe a procura de novos métodos é a crescente exigência do mercado consumidor por alimentos com níveis cada vez menores de resíduos químicos (RODRIGUEZ *et al.*, 1995).

Formas alternativas tem se concentrado no cultivo e rotação de pastagens (BARROS e EVANS, 1989), seleção de bovinos resistentes (ANGUS, 1996), manejo de predadores naturais (GONZALES, 1995), controle imunológico, através do desenvolvimento de vacinas poli-imunogênicas (TELLAM, 2002) e, em menor escala, no controle biológico, através do uso de organismos entomopatogênicos (MONTEIRO *et al.*, 1998).

A questão da raça bovina também é muito importante, pois a resistência ao parasito aumenta com a maior porcentagem de genes do *Bos indicus* (zebu). O oposto é observado com a introdução de raças européias. Mecanismos de defesa incluindo autolimpeza, coloração da pelagem e respostas imunológicas do bovino também estão envolvidos na redução de carrapatos (ANDRADE, 1996).

De maneira geral, qualquer estratégia de controle deve ser baseada em conhecimentos sobre a biologia, ecologia, genética, bioquímica, fisiologia e imunologia tanto do parasita quanto do hospedeiro e suas interações. Durante a implementação de um mecanismo estratégico de controle, deve-se levar em consideração também as condições climáticas e o tipo de manejo de cada região (FOIL *et al.*, 2004).

Mecanismos de Resistência

A resistência a pesticidas é definida, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), como a habilidade de uma linhagem de um organismo tolerar doses de tóxicos que seriam letais pra a maioria dos indivíduos da população.

O desenvolvimento de resistência recomenda dosagens maiores de produto químico para o controle. O aumento da dosagem e a utilização de carrapaticidas mais potentes causam vários problemas, incluindo toxicidade aos animais, ocorrência de resíduos nos alimentos e contaminação ambiental (BIANCHI *et al.*, 2002).

Mecanismos de resistência podem ser comportamentais, fisiológicos ou bioquímicos. Mecanismos comportamentais são determinados por ações (irritabilidade, xenofobia ou exofilia) que influenciam na resposta à pressões seletivas exercidas pelo pesticida, aumentando a habilidade de uma população em evitar os efeitos letais dos compostos. Mecanismos fisiológicos estão relacionados com a redução da penetração cuticular (redução na absorção do pesticida) e os mecanismos bioquímicos devem-se, principalmente a ação de enzimas detoxificativas ou insensibilidade do sítio de ação (HE *et al.*, 2002). As principais enzimas envolvidas em detoxificação são as monooxigenases dependentes do citocromo P450, glutathione-S-transferases (GSTs) e esterases,

representadas por membros de famílias multigênicas (GUERRERO *et al.*, 1999; COSSIO-BAYUGAR *et al.*, 2002).

A origem genética da resistência tem sido muito estudada e, alguns autores demonstraram que esse fenômeno pode originar-se a partir de amplificação gênica, mutações de ponto e aumento na transcrição de genes estruturais, resultando na superexpressão de enzimas detoxificativas e aumento do metabolismo do pesticida (VULULE *et al.*, 1999). Em uma população, geralmente ocorre a combinação de vários mecanismos resultando na expressão global da resistência.

Mutações de ponto podem ocorrer nos genes que codificam, por exemplo, para as subunidades dos canais de sódio, subunidade do receptor GABA, que controla os canais de cloro, mutações em genes codificadores de esterases e, ainda, mutações nos genes que codificam para oxidases e glutathione S-transferases (HEMINGWAY, 2002). MUTERO *et al.* (1994) identificaram mutações de ponto no gene que codifica para a acetilcolinesterase (AChE) em linhagens mutantes de *D. melanogaster* resistentes a organofosforados e demonstraram que altos níveis de resistência são obtidos pela recombinação entre mutações isoladas pré-existent, contribuindo para a combinação de várias mutações em uma mesma proteína e favorecendo a aquisição de resistência. Mutações no gene de canal de sódio também foram descritas conferindo sítios de insensibilidade a piretróides (SODERLUND e LEE, 2001). HE *et al.* (1999) trabalhando com cepas de *B. microplus* identificaram, em cepas altamente resistentes a piretróides, uma mutação de ponto na região IIS6 havendo uma substituição de T por A, a qual resultou na alteração do aminoácido fenilalanina para isoleucina.

A amplificação de genes para esterases pode, também, ocorrer simultaneamente numa população possibilitando uma resistência controlada por vários mecanismos (HEMINGWAY, 2000). A resistência a pesticidas através da superprodução de esterases, devido à amplificação gênica foi evidenciada em várias espécies de insetos, incluindo o afídeo *Myzus persicae* (DEVONSHIRE *et al.*, 1993) e mosquitos do gênero *Culex* (KETTERMAN *et al.*, 1992).

Esterases

Esterases são hidrolases que atuam sobre ésteres endógenos e exógenos. 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 estão relacionadas com atividades fisiológicas em artrópodes: regulação dos níveis de hormônio juvenil (HIDAYAT e GOODMAN, 1994), processos digestivos (ARGENTINE e JAMES, 1995), comportamento reprodutivo (LABATE *et al.*, 1990), funcionamento do sistema nervoso (VILLATE e BACHMANN, 2002), resistência a pesticidas (NABESHIMA *et al.*, 2004) e metabolismo de agroquímicos (WHEELLOCK *et al.*, 2005).

A atividade das esterases é demonstrada utilizando-se métodos histoquímicos de coloração com substratos sintéticos, como por exemplo, ésteres de naftol, sendo o α - e o β - naftil acetatos os mais utilizados (BREWER, 1970).

A taxonomia proposta por ALDRIGDE (1953) é baseada nas interações dessas enzimas com inseticidas organofosforados. Esterases que hidrolisam estes compostos, incluindo aquelas contendo uma cisteína acilada em seu sítio ativo, são chamadas A-esterases. Esterases que são inibidas por OPs e possuem um resíduo de serina no sítio ativo, são classificadas como B-esterases e aquelas que não são inibidas por OPs, mas não degradam estes compostos são chamadas de C-esterases. DEVONSHIRE (1975) classificou essas enzimas com base na sua mobilidade em géis de eletroforese e VAUGHAN e HEMINGWAY (1995) usaram como critério, a preferência pelos substratos α e β -naftil acetatos.

Outra classificação baseia-se na sensibilidade a diferentes inibidores, dividindo as esterases em quatro classes (HOLMES e MASTERS, 1967; OAKESHOTT *et al.*, 1993): 1. Arilesterases: inibidas somente por agentes sulfidrílicos e cátions metálicos bivalentes como Hg^{+2} e o Cu^{+2} , com preferência por substratos aromáticos; 2. Carboxilesterases: inibidas somente por organofosforados e com preferência por ésteres alifáticos de cadeia longa; 3. Colinesterases: inibidas por organofosforados e sulfato de eserina e preferência por substratos carregados (como ésteres de colina). 4. Acetilesterases: não são afetadas por nenhum dos inibidores e, geralmente, preferem substratos alifáticos,

derivados do ácido acético. Os testes de inibição, para caracterização bioquímica de esterases, têm sido importantes para o entendimento dos diferentes processos fisiológicos nos quais essas enzimas atuam.

Carboxilesterases (CaEs) e acetilcolinesterases (AChEs) são as mais caracterizadas dentro do grupo. Essas enzimas podem ser utilizadas como biomarcadores da exposição a pesticidas, para detecção da presença e toxicidade de resíduos de inseticidas usados na agricultura e como componentes de programas de monitoramento ambiental. Estudos envolvendo a atividade de CaEs na detoxificação de PIs e OPs vem sendo realizados em várias espécies de peixes e moluscos (WOGRAM *et al.*, 2001; BONACCI *et al.*, 2004) e em algumas espécies de plantas (DE CARVALHO *et al.*, 2003), como bioindicadores de poluição. A atividade de esterases também tem sido relacionada ao metabolismo de drogas farmacêuticas, inclusive de agentes antitumores (ALIMONT *et al.*, 2004). Outras aplicações dessas enzimas seriam: proteção à exposição a vapores químicos (MAXWELL e BRECHT, 2001) através da detoxificação de agentes tóxicos (pesquisa relacionada ao terrorismo) e no tratamento de pacientes com overdose de cocaína (BENCHARIT *et al.*, 2003).

Alguns trabalhos indicam uma origem comum devido à alta similaridade entre seqüências de CaEs e AChEs (MIKHAILOV e TORRADO, 2000), que são conservadas evolutivamente (SATO e HOSOKAWA, 1998) e organizadas em uma única família multigênica (OAKESHOTT *et al.*, 1999).

Acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, finalizando a transmissão do impulso nervoso e permitindo a repolarização da membrana pós-sináptica. Inseticidas, principalmente carbamatos e organofosforados atuam como inibidores da AChE. Alterações da AChE para uma forma insensível têm sido demonstradas como mecanismo de resistência em vários artrópodes –praga (Li *et al.*, 2004). Alguns trabalhos sugerem que essa enzima seja codificada por apenas um gene, como na mosca de frutas *Drosophila melanogaster* (WEILL *et al.*, 2002). A presença de várias isoformas sugere que nos artrópodes, pelo menos dois genes estão envolvidos. No afídeo *Myzus persicae*, foram identificados dois genes codificadores para AChE (NABESHIMA *et al.*, 2003) e no nematóide *Caenorhabditis elegans*, estas enzimas são codificadas por quatro genes

(GRAUSO *et al.*, 1998), os quais produzem enzimas com diferentes atividades catalíticas. No carrapato bovino *B. microplus*, dois genes codificando duas formas diferentes de AChE foram identificados e seqüenciados (BAXTER e BARKER, 2002). Recentemente, um terceiro cDNA, provavelmente codificando uma AChE, foi identificado nessa espécie (TEMEYER *et al.*, 2004).

Carboxilesterases (CaEs) são enzimas que hidrolisam compostos contendo ligações éster de ácidos carboxílicos a seus produtos correspondentes (álcool e ácido). E são importantes no metabolismo e detoxificação de muitos compostos endógenos e xenobióticos, incluindo piretróides e organofosforados, reduzindo-os a compostos menos tóxicos (WHEELLOCK *et al.*, 2004). OPs não são, geralmente, substratos para esterases, mas atuam se ligando estereoquimicamente a CaEs e AChEs (CASIDA e QUISTAD, 2004).

Um grande número de pesquisas tem demonstrado que muitas CaEs têm uma afinidade maior por OPs do que as AChEs, indicando que CaEs podem ser inibidas preferencialmente, atuando como uma rota detoxificativa alternativa. Dessa maneira, CaEs atuam como um mecanismo protetor da inibição de AChEs (O'NEILL *et al.*, 2004). Além disso, CaEs atuam tanto sobre OPs como sobre PIs e a exposição simultânea a ambos causa uma toxicidade sinérgica.

A resistência a pesticidas envolvendo carboxilesterases e acetilcolinesterases foi descrita para mais de 30 espécies de insetos de importância médica, veterinária e agrícola (HEMINGWAY e KARUNARATNE, 1998). Na mosca *Lucilia cuprina* (CAMPBELL *et al.*, 1998) e no mosquito *Aedes aegypti* (FLORES *et al.*, 2005), altos níveis de resistência ao malation foram relacionados com CaEs. Estudos com vários insetos têm demonstrado a relação entre atividade alterada da AChE com resistência a OPs e CAs (WALSH *et al.*, 2001; WEILL *et al.*, 2003; NABESHIMA *et al.*, 2004). No afídeo *Aphis gossypii*, duas mutações, uma no gene da AChE-1 (*ace 1*) e outra no gene da AChE-2 (*ace 2*) foram atribuídas à sensibilidade reduzida da enzima e associadas à resistência a inseticidas (LI e HAN, 2004).

No carrapato bovino *B. microplus*, a resistência a acaricidas envolvendo carboxilesterases e acetilcolinesterases foi investigada por vários autores (VILLARINO *et al.*, 2001, VILLARINO *et al.*, 2003). WRIGHT e AHRENS (1988) demonstraram a relação do aumento da atividade da AChE com a resistência a

OPs em linhagens mexicanas de *B. microplus*. BAXTER e BARKER (1998) isolaram um cDNA da AChE (AChE 1) e concluíram que a resistência a OPs, em linhagens australianas de carrapatos, não está relacionada a mutações nos alelos desse gene e sugeriram que modificações pós-traducionais, codificando uma enzima insensível ou, ainda, a presença de um segundo gene para AChE poderiam estar relacionados à resistência. JAMROZ *et al.* (2000) indicaram uma detoxificação metabólica de PIs por CaEs como mecanismo de resistência em linhagens mexicanas de *B. microplus* e sugeriram que a atividade aumentada dessa enzima pode ser resultado de duplicação gênica, levando à superexpressão e conseqüente aumento na hidrólise do acaricida. Uma mutação de ponto em um gene de uma CaE foi identificada nestas linhagens e associada à resistência a PIs (HERNANDEZ *et al.*, 2000). Posteriormente os mesmos autores em 2002 detectaram um transcrito de CaE com uma mutação de ponto, que foi mais abundante na linhagem de *Boophilus microplus* resistente. BAXTER e BARKER (2002) identificaram e sequenciaram dois genes codificadores de AChE em linhagens australianas de carrapatos resistentes e LI *et al.* (2005) identificaram uma AChE insensível a OPs em uma linhagem resistente.

Métodos de Detecção de Resistência

Atualmente, a FAO (Food and Agriculture organization) preconiza dois métodos de detecção, *in vitro*, de resistência (KEMP *et al.*, 1998) em carrapatos: Larval Packet Test, em larvas e Adult Imersion Test, em fêmeas adultas.

O Adult Imersion Test (AIT) ou Biocarrapaticitograma (DRUMOND *et al.*, 1973) consiste em coletar fêmeas completamente ingurgitadas (teleóginas), pesá-las e separá-las em placas de Petri, por peso. As teleóginas são imersas no acaricida, na dosagem recomendada pelo fabricante, por 3 minutos. Em seguida, são retiradas e secas em papel de filtro. Posteriormente, são fixadas com o ventre para cima em placas de Petri e mantidas em condições ideais de temperatura (27° C) e umidade (80%) para postura dos ovos. Após a postura completa, é realizada uma avaliação visual da quantidade de teleóginas vivas e de ovos viáveis.

O Larval Packet test (LPT) consiste em colocar uma quantidade de larvas (100 a 300) em contato com papéis impregnados com várias diluições do princípio

ativo do produto, em condições ideais de temperatura e umidade. Depois de determinado tempo, os papéis são abertos e é feita uma contagem do número de larvas vivas e mortas. Teleóginas ou larvas tratadas com água são usadas em ambos os testes, como controle.

Técnicas fundamentadas na bioquímica e na biologia molecular estão sendo, atualmente, utilizadas como ferramentas auxiliares na detecção da resistência (PRUETT, 2002). A identificação de genes que se expressam diferencialmente em indivíduos sensíveis e resistentes constitui-se em uma ferramenta valiosa na avaliação dos níveis da resistência em uma população, auxiliando nos programas de manejo e controle. Pesquisas de caráter aplicado buscam, via produtos desses genes, metodologias mais eficazes de controle, tanto do estágio adulto como das fases imaturas do carrapato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRIDGE, W.N., 1953. Serum esterases. 1. Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. **Biochem. J.** **53**,110–117.
- ALIMONTI, A., GELIBTER, A., PAVESE, I., SATTA, F, COGNETTI, F, FERRETTI, G., RASIO, D., VECCHIONE, A., DI PALMA., M. 2004. New approaches to prevent intestinal toxicity of irinotecan-based regimens. **Câncer Treat Rev.** **30**, 555–562.
- 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.
- ANGUS, B.M., 1996. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. **Int. J. Parasitol.** **26**, 1341–1355.
- 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.
- BARROS, A. T. M., EVANS, D. E. 1989. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infestantes do carrapato dos bovinos, *Boophilus microplus*. **Pesq. Vet. Bras.** **9 (1/2)**: 17-21.
- 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 acetylcholinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and resistant cattle ticks. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **32**, 815-820.
- BENCHARIT S, MORTON CL, XUE Y, POTTER PM, REDINBO MR., 2003. Structural basis of heroin and cocaine metabolism by a promiscuous human drug-processing enzyme. **Nat. Struct. Biol.** **10**: 349-356.

- 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.
- BONACCI, S., BROWNE, M.A., DISSANAYAKE, A., HAGGER, J.A., CORSI, I., FOCARDI, S., GALLOWAY, T.S., 2004. Esterase activities in the bivalve mollusc *Adamussium colbecki* as a biomarker for pollution monitoring in the Antarctic marine environment. **Mar. Pollut. Bull.** **49**, 445–455.
- BREWER, G.J. 1970. **An introduction to isozyme Techniques**. Academic Press, New York and London, 186 pp.
- 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.
- CASIDA, J.E., QUISTAD, G.B., 2004. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. **Chem. Res. Toxicol.** **8**, 983–998.
- COOSIO-BAYUGAR, R., 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.
- DE CARVALHO, V. M., MARQUES, R.M., LAPENTA, A. S., MACHADO, M. F.P.S. 2003. Functional classification of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). **Gen. Mol. Biol.**, **26 (2)**, 195-198.
- 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 anlysis of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) tick strains. **Vet. Parasit.** **92**: 209-222.

- DEVONSHIRE, A. L. 1975. Studies of the acetylcholinesterase from houseflies (*Musca domestica* L.) resistant and susceptible to organophosphorous insecticides. **Biochem. J.** **149**: 463-469.
- 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.
- DRUMMOND, R.O., CRUST, S.E., TREVINO, J.L., GLADNEY, W.J., GRAHAN, O.H., 1973. *Boophilus annulatus* and: laboratory tests of insecticides. **J. Econ. Entomol.** **66**, 130-133.
- EVANS, D.E., 1979. **Ecologia e o carrapato *Boophilus microplus***. In: Seminário Nacional sobre Parasitoses dos Bovinos. Campo Grande, MS, EMBRAPA/CNPQC, 217-229.
- FLORES, A. E., ALBELDANO-VAZQUEZ, W., SALASA, I.F., BADII, M. H., BECERRA, H. L., GARCIA, G. P., FUENTES, S. L., BROGDON, W. G., BLACKIV, W. C., BEATY, B. 2005. Elevated a-esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, México. **Pestic. Biochem. Physiol.** **82**, 66–78.
- FOIL, L.D., COLEMAN, P., EISLER, M., FRAGOSO-ASNCHEZ, H., GARCIA-VAZQUEZ, Z., GUERRERO, F.D., JONSSON, N.N., LANGSTAFF, I.G., LI, A.Y., MACHILA, N., MILLER, R.J., MORTON, J., PUETT, J.H., TORR, S., 2004. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Vet. Parasitol.** **125 (1-2)**, 163-181.
- FRISCH, J.E. 1999. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **Int. J. Parasitol.** **29**. 57-71.
- FURLONG, J. 1993. Controle do Carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Cad. Tec. Esc. Vet. UFMG**, **8**: 49-61.
- FURLONG, J., MARTINS, J. R., PRATA, M. C. A. 2004. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, **23(137)**: 53-56.
- GONZALES J.C. 1995. **O controle do carrapato do boi**. 2a ed. Porto Alegre: Edição do Autor. Sulina. 104p.
- GRAUSO, M., CULETTO, E., COMBES, D., FEDON, Y., TOUTANT, J., ARPAGAUS, M. 1998. Existence of four acetylcholinesterase genes in the

- nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *FEBS Letters*, 424(3), 279-284.
- GRISI, L., MASSARD, C. L., MOYA BORJA, G. E., PEREIRA, J. B. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, 21(125): 8-10.
- 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.
- 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). **J. Medical Entomol.** 36(5), 539-533.
- HEMINGWAY, J. 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochem. Molec. 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., WAGHELA, S.D., GEORGE, J.E., WAGNER, G.G., 2000. Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the 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.

- HOLMES, R.S., MASTERS, C.J. 1967. The developmental multiplicity and isoenzyme status of cavian esterases. **Biochem. Biophys. Acta.** **132**: 379-399.
- 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.
- KAY, B.H., KEMP, D.H. 1994. Vaccines against arthropods. **Am. J. Trop. Med.** **50**. 87-96.
- KEMP, D. H., THULLER, R., GALE, K. R., SABATINI, G. A. 1998. Acaricide resistance in cattle tick *Boophilus microplus* and *B. decoloratus*: review of resistance data, standartisation of resistance tests and recommendations for integrated parasite control to delay resistance. **Report to the Animal Health Services**, AGAH, FAO.
- KETTERMAN, A. J., JAYAWARDENA, K. G. I., HEMINGWAY, J. 1992. 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., OAKESHOTT, J.G., 1990 The number and distribution of esterase 6 alleles in populations of *Drosophila melanogaster*. **Heredity.** **63**, 203-208.
- LI, A.Y., DAVEY, R.B., MILLER, R.J., GEORGE, J.E. 2004. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick *Boophilus microplus* (Acari, ixodidae). **J. Med. Entomol.** **41**: 193-200.
- LI, F., HAN, Z. 2004. Mutations in acetylcholinesterase associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **34**, 397-405.
- LI, A.Y., PRUETT, J.H., DAVEY, R.B., GEORGE, J.E. 2005. Toxicological and biochemical characterization of coumaphos resistance in the San Roman strain of *Boophilus microplus* (Acari, ixodidae). **Pestic. Biochem. Physiol.** **81**, 145-153.

- MAXWELL, D. M. BRECHT, K. M. 2001. Carboxylesterase: specificity and spontaneous reactivation of an endogenous scavenger for organophosphorus compounds. **J. Appl. Toxicol.** **21**, S103–S107.
- MIKHAILOV, A.T., TORRADO, M. 2000. Carboxylesterases moonlight in the male reproductive tract: a functional shift pivotal for male fertility. **Front Bioscience.** **5**:53-62.
- 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.
- MURRELL, A., BARKER, S.C., 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Syst. Parasitol.** **56**, 169–172.
- 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.
- NABESHIMA, T., KOZAKI, T., TOMITA, T., KONO, Y., 2003. An aminoacid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **307**, 15–22.
- NABESHIMA, T., MORI, A., KOZAKI, T., IWATA, Y., HIDOH, O., HARADA, 2004. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **313**, 794–801.
- NUÑES, J.L, COBEÑAS, M.E.M., MOLTEDO, H.L. 1982. ***Boophilus microplus*, La garrapata comun del ganado vacuno.** Hemisferio Sur 1Ed. Bs. Rep. Argentina, 184p.
- OAKESHOTT, J.G., VAN PAPENRECHT, E.A., BOYCE, T.M., HEALY, M.J., RUSSEL, R.J., 1993. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetica.** **90**, 239–268.
- OAKESHOTT, J.G., CLAUDIANOS, C., RUSSELL, R.J., ROBIN, J.C. 1999. Carboxyl/Cholinesterases: a case study of the evolution of a succesful multigene family. **Bioessays** **21**, 1031-1042.

- O'NEILL, A.J., GALLOWAY, T.S., BROWNE, M.A., DISSANAYAKE, A., DEPLEDGE, M.H., 2004. Evaluation of toxicity in tributaries of the Mersey estuary using the isopod *Asellus aquaticus* (L.). **Mar. Environ. Res.** **58**, 327–331.
- POWELL, R.T. e REID, T.J. 1982. Project tick control. **Queensland Agric. J.** **108** (6), p.279-300.
- PRUETT, J.H. 2002. Comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterases extracted from organophosphate resistant and susceptible strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **J. Econ. Entomol.** **95**: 1239-1244.
- RIEK, R. F. 1959. Studies on the reaction of animals to infestation with ticks. V. Laboratory animals as host for the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). **Austral. J. Agric. Res.** **10**, 614-619p.
- 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.
- SODERLUND D.M., LEE, S.H. 2001. Point Mutations in Homology Domain II Modify the Sensitivity of Rat Na1.8 Sodium Channels to the Pyrethroid Insecticide Cismethrin. **NeuroToxicol.** **22** (6): 755-765.
- SATOH, T., HOSOKAWA, M. 1998. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** **38**:257-288.
- SPINOSA, H.S., GORNIK, S.L., BERNADI, M.M. 1999. Farmacologia aplicada a medicina veterinária. Ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro.
- TEIXEIRA-LEITE, N., ARIZA, A.T.O., GIANINI, M.C., MIRANDA, M.A. 1991. Alguns prejuízos que os carrapatos bovinos *Boophilus microplus* podem causar. **Ecossistema**, **16**: 137-141.
- TELLAM R.L., KEMPA D., RIDING A. G., BRISCOE A. S., SMITH B.D., SHARP B.P., IRVING B.D., WILLADSEN P. 2002. A Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. **Vet. Parasitol.** **103**, 141–156.

- TEMEYER, K.B., DAVEY, R.B., CHEN, A.C. 2004. Identification of a third *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cDNA presumptively encoding an acetylcholinesterase. **J. Med. Entomol.** **41**: 259-268.
- VAUGHAN, A., HEMINGWAY, J., 1995. Mosquito carboxylesterase Est alpha 2(1) (A2). Cloning and sequence of the full-length Cdna for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **J. Biol. Chem.** **270**, 17044–17049.
- VILLARINO, M.A., WAGHELA, S.D., WAGNER, G.G., 2001. Histochemical localization of esterases in the integument of the female *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) tick. **J. Med. Entomol.** **38**, 780-782.
- VILLARINO, M.A., WAGHELA, S.D., WAGNER, G.G., 2003. Biochemical detection of esterases in the adult female integument of organophosphate-resistant *Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae). **J. Med. Entomol.** **40**, 52-57.
- 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.
- WALKER, A.R. 1987. Estudios inmunologicos en relación al control de garrapatas. **Semin. Intern. Med. Bovina 4 Memórias**, 80-87.
- WALSH, S.B., DOLDEN, T.A., MOORES, G.D., KRISTENSEN, M., LEWIS, T., DEVONSHIRE, A.L. 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. **Biochem. J.** **359**, 175–181.
- WEILL, M., FORT, P., BERTHOMIEU, A., DUBOIS, M.P., PASTEUR, N., RAYMOND, M., 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. **Proc. R. Soc. Lond. B** **269**, 2007–2016.
- WEILL, M., LUTFALLA, G., MOGENSEN, K., CHANDRE, F., BERTHOMIEU, A., BERTICAT, C. 2003. Insecticide resistance in mosquito vectors. **Nature** **423**, 136–137.

- WHEELLOCK, C.E., MILLER, J.L., MILLER, M.G., SHAN, G., GEE, S.J., HAMMOCK, B.D., 2004. Development of toxicity identification evaluation (TIE) procedures for pyrethroid detection using esterase activity. **Environ. Toxicol. Chem.** **11**, 2699–2708.
- WHEELLOCK, C.E., SHAN, G., OTTEA, J., 2005. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. **J. Pestic. Sci.** **30(2)**, 75-83.
- WOGRAM, J., STURM, A., SEGNER, H., LIESS, M., 2001. Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure. **Environ. Toxicol. Chem.** **20**, 1528–1531.
- 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**, 234-239.

OBJETIVOS

1. Comparar os padrões de atividade esterásica entre os estágios do ciclo de vida de *Boophilus microplus* para subsidiar futuras pesquisas de controle durante as fases imaturas do carrapato.
2. Análise bioquímica da resistência a organofosforados e piretróides associado à atividade de esterases em linhagens brasileiras de *B. microplus*.
3. Análise molecular da resistência a acaricidas através do rastreamento de mutações em uma provável *carboxilesterase* de *B. microplus*.

CAPÍTULO 1

**PERFIL DE ATIVIDADE ESTERÁSICA NO DESENVOLVIMENTO PÓS-
EMBRIONÁRIO DO CARRAPATO BOVINO *Boophilus microplus*
(ACARI: IXODIDAE)**

RESUMO

O carrapato bovino *Boophilus microplus* é uma das principais pragas nas regiões tropicais e subtropicais, causando grandes prejuízos à pecuária. O método tradicional de controle é baseado no uso de pesticidas, cujo uso indiscriminado levou à seleção de resistência aos efeitos letais dessas substâncias. Esterases são hidrolases amplamente estudadas e associadas à resistência a acaricidas em *B. microplus*. Neste trabalho, realizou-se uma análise por eletroforese em gel de poliacrilamida nativo (PAGE) do padrão de atividade esterásica nos estágios de desenvolvimento de *B. microplus*, utilizando coloração específica para esterases. Os resultados mostraram a presença de nove regiões com atividade esterásica, coradas tanto pelo α -naftil acetato como pelo β -naftil acetato e definidas como α - β -esterases. Foram detectadas esterases estágio-específicas, sendo que os estágios de larva e de ninfa de 1º. estágio foram os que mostraram maior atividade esterásica durante todo o desenvolvimento. Uma esterase, denominada EST-4, foi detectada apenas em machos e considerada sexo-específica. Os dados contribuem com informações que podem ser úteis em futuras pesquisas e programas de controle.

PALAVRAS-CHAVE: resistência a acaricidas, *Boophilus microplus*, esterases, ciclo de vida.

ABSTRACT

The *Boophilus microplus* tick is one of the main pests of cattle raising in the tropical and subtropical regions, causing great damages to livestock. The traditional method of control is based on the intensive use of pesticides. However, the indiscriminate use of these compounds led to the selection of resistance to their lethal effects. Esterases are hydrolases which have been widely studied and associated to the acaricide resistance in *B. microplus*. In this work, esterase patterns were compared among the life cycle stages of *B. microplus*, in non-denaturing polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE), using specific staining for esterases. Electrophoretical results indicate the presence of nine regions displaying esterase activity stained by α -naphthyl acetate and also by β -naphthyl acetate, which were classified as α - β -esterases. Specific esterases from each stage were detected. The larval and ninfal of 1st stage were the stages with greater esterase activity during the development. An esterase, named EST-4, was detected only in males and considered sex-specific. These data contribute with information which can be useful in future researchs and control programs.

KEY-WORDS: acaricide resistance, *Boophilus microplus*, esterases, life cycle.

INTRODUÇÃO

O carrapato bovino *Boophilus microplus* é um dos ectoparasitos mais importantes para a agropecuária brasileira, sendo responsável, segundo o Ministério da Agricultura, por perdas de dois bilhões de dólares ao ano (GRISI *et al.*, 2002). Esse parasita é responsável por inúmeros prejuízos à bovinocultura devido a perdas na produção de leite, natalidade, peso, aumento da mortalidade, consumo de carrapaticidas e danos à indústria do couro. Além disso, *B. microplus* é o principal vetor de *Babesia* e *Anaplasma*, agentes causadores da Tristeza Parasitária Bovina (DE CASTRO, 1997).

O método tradicional de controle do carrapato é baseado principalmente no uso de acaricidas: derivados arsenicais, organofosforados, amidinas, carbamatos e piretróides. O uso indiscriminado destes compostos levou à seleção de linhagens resistentes aos efeitos letais destas substâncias, ao aparecimento de resíduos químicos nos produtos de origem animal (carne e leite) e à poluição ambiental (FOIL *et al.*, 2004).

O ciclo biológico de *B. microplus* apresenta uma fase parasitária na qual passa pelos ínstares de larva, ninfa e adulto, todos em um único hospedeiro e uma fase de vida livre que se inicia com a queda das fêmeas ao solo e culmina quando as larvas encontram um hospedeiro. A cada postura, uma fêmea produz de 2000 a 3000 ovos (FURLONG, 1993). As larvas recém eclodidas migram para as pontas da vegetação para localizar o hospedeiro. Após fixação, a larva alimenta-se inicialmente de plasma e linfa, iniciando a metamorfose (metalarva). A metalarva realiza ecdise para ninfa (ninfia 1) em cerca de sete dias. Nesta fase, a alimentação consiste de linfa, plasma e sangue até a transformação em metaninfa (ninfia 2), período que se prolonga por sete dias e após nova ecdise ocorre a diferenciação sexual. A metaninfa pode se transformar em machos (neandros) que se queratinizam dando origem aos gonandros ou dar origem a fêmeas (neóginas). No estágio adulto, a fêmea inicia o repasto sanguíneo, realiza a cópula (partenógina) e aumenta o volume sanguíneo até que a fêmea totalmente ingurgitada (teleógina) cai no solo. O ciclo de vida parasitário tem uma duração média de 21 dias. O macho permanece no bovino, sobrevivendo um tempo até duas vezes maior do que as fêmeas (CORDOVÉS, 1997).

As esterases pertencem a um grupo de enzimas hidrolíticas altamente variáveis e multifuncionais. Nos artrópodos, estas enzimas estão relacionadas com atividades fisiológicas como regulação dos níveis de Hormônio Juvenil (HIDAYAT e GOODMAN, 1994), desenvolvimento ontogenético (BITONDI e MESTRINER, 1983), processos digestivos (ARGENTINE e JAMES, 1995), comportamento reprodutivo (LABATE *et al.*, 1990), funcionamento do sistema nervoso (VILLATE & BACHMANN, 2002) e resistência a pesticidas (HEMINGWAY *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2005).

Carboxilesterases e acetilcolinesterases estão associadas à resistência a pesticidas em artrópodos (GUERRERO *et al.*, 1999). Em *B. microplus*, BAXTER e BARKER (1998) demonstraram a relação entre resistência a organofosforados (OPs) e a atividade alterada da acetilcolinesterase (AChE) em uma linhagem australiana e JAMROZ *et al.* (2000) verificaram aumento na atividade da carboxilesterase em uma linhagem mexicana de carrapatos resistentes a piretróides. Mutações de ponto foram também detectadas nos genes que codificam para essas enzimas (HERNANDEZ *et al.*, 2000; 2002). Não existem dados na literatura sobre o padrão de esterases durante o ciclo de desenvolvimento de *B. microplus*. Neste estudo, realizou-se uma análise do perfil esterásico nos estágios de desenvolvimento de *B. microplus*, a fim de contribuir com conhecimentos biológicos que possam auxiliar em futuras pesquisas de controle durante as fases imaturas do carrapato.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Para a análise do padrão esterásico durante o desenvolvimento pós-embrionário de *Boophilus microplus* (larvas, ninfas e adultos machos e fêmeas), utilizou-se uma cepa de referência sensível, cepa MOZZO, originária do Uruguai, e que foi mantida na ausência de pressão acaricida durante múltiplas gerações. Esta cepa foi cedida pelo Laboratório Experimental de Parasitologia da Vallée S/A (Uberlândia-MG), onde vem sendo mantida sob condições adequadas de temperatura (27° C) e umidade (80%).

Preparação das Amostras e Determinação de Proteína Total

Um pool de amostras de cada fase (50 mg) foi macerado em nitrogênio líquido e solubilizado em tampão 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 submetido à centrifugação a 15.000g por 15 minutos a 4°C. Fêmeas adultas (teleóginas), pesando 50mg, foram previamente lavadas em tampão PBS 0,15M e maceradas individualmente. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante, contendo proteínas solúveis, foi coletado. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de BRADFORD (1976). A absorbância foi lida a 595nm em espectrofotômetro Hitachi U-2000 e a concentração média de proteína nos extratos foi determinada a partir de curva padrão utilizando albumina sérica bovina. A quantidade de proteína total foi expressa em miligramas de proteínas por grama de amostra.

Eletroforese e Atividade esterásica

Os testes enzimáticos foram realizados por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes, de acordo com o método de LAEMMLI (1970), utilizando-se gel de separação a 12% e de empilhamento a 5%, preparados em tampão Tris-HCl 0,375M, pH 8,8. Foram aplicados 100µg de proteína total por amostra. 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 em câmara fria.

Após a separação eletroforética, a identificação das esterases foi realizada de acordo com o método de LAPENTA *et al.* (1998). 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 sintéticos. As atividades α e β esterases foram visualizadas nos géis como bandas de coloração preta e vermelha, indicando a hidrólise preferencial do α ou do β -naftil acetato, respectivamente. A reação de coloração foi realizada no escuro, a 37° C por 1 hora, em uma solução contendo 30 mg de α e/ou de β naftil acetato, previamente diluídos em 1mL 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. As bandas com atividade esterásica foram numeradas a partir da extremidade anódica do gel.

Caracterização Bioquímica com Inibidores

A caracterização bioquímica das esterases foi realizada por meio de testes com os seguintes inibidores: sulfato de cobre 1.0 mM, p-cloromercuribenzoato 1.0mM (pCMB), malation 0.4 mM, sulfato de eserina 1.0 mM e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1.0 mM (PMSF). Os inibidores foram testados separadamente na pré-incubação e nas soluções de coloração. Os géis foram pré-incubados por 30 minutos, no escuro, em tampão fosfato de sódio (0.1M, pH 6.5) contendo o inibidor e, então, corados para detecção de atividade esterásica em presença do inibidor. Um volume equivalente a 0.4 mM de uma solução comercial de malation foi adicionado diretamente na pré-incubação e na solução de coloração. O PMSF foi dissolvido em 1 mL de methanol e o pCMB em 1 mL de NaOH, 0.1M, pH 8.0, antes do uso. Sulfato de eserina e sulfato de cobre foram adicionados diretamente às soluções de pre-incubação e coloração. De acordo com a classificação de OAKESHOTT *et al.* (1993), as esterases inibidas pelo malation (organofosforado) e pelo sulfato de eserina (carbamato) foram classificadas como acetilcolinesterases. Esterases inibidas apenas pelo malation foram consideradas carboxilesterases. Sulfato de cobre e pCMB foram utilizados como inibidores de arilesterase e o PMSF foi utilizado como inibidor de serino-esterases.

RESULTADOS

Identificação das regiões com atividade esterásica

Nos diferentes estágios de *B. microplus* foram detectadas nove regiões com atividade esterásica utilizando-se α -naftil acetato como substrato, numeradas de EST-1 a EST-9, a partir da extremidade anódica do gel, sendo a banda correspondente a EST-1 a de migração mais rápida (Figura 1). As bandas identificadas quando coradas simultaneamente em presença dos substratos α e β naftil-acetatos, coraram-se de preto, indicando a hidrólise preferencial pelo α naftil-acetato. Géis corados com cada substrato separadamente mostraram o mesmo padrão, não ocorrendo bandas específicas, sendo as enzimas classificadas como α - β esterases (dados não mostrados).

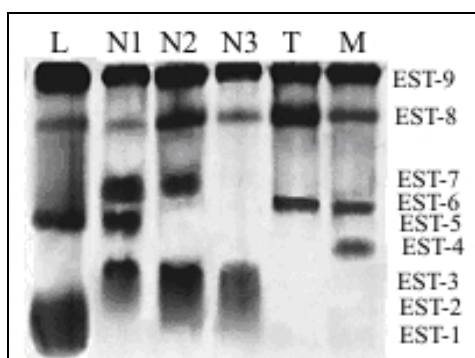


Figura 1: Padrão de esterases durante o desenvolvimento pós-embrionário de *B. microplus*. Gel de poliacrilamida não desnaturante e coloração com α naftil-acetato. L – larvas; N1- ninfas; N2- metaninfas; N3- neóginas; T- teleógina; M- machos.

Padrões de Inibição

Os resultados dos testes com inibidores para a caracterização bioquímica das esterases detectadas nos diferentes estágios do ciclo de vida do carrapato *B. microplus* estão representados na Tabela 1. Os graus de inibição apresentados estão classificados de acordo com a diminuição da intensidade das bandas. Nenhuma das esterases detectadas foi afetada pelo sulfato de cobre ou pelo pCMB. Sulfato de eserina inibiu completamente a atividade das EST-1, EST-2, EST-3 e EST-4, que foram também fortemente inibidas pelo malation e pelo

PMSF, sendo classificadas como acetilcolinesterases. As enzimas EST-5 e EST-6 apresentaram um grau de inibição menos acentuado pela eserina e foram fortemente afetadas pelo malation e PMSF, sendo também classificadas como acetilcolinesterases. As enzimas EST-7, EST-8 e EST-9 foram inibidas pelo tratamento com malation e com PMSF e classificadas como carboxilesterases.

Tabela 1 – Efeito de inibidores sobre as esterases detectadas durante o desenvolvimento de *B. microplus*.

Esterases	Cobre	pCMB	Malation	Eserina	PMSF	Classificação
EST-1	-	-	+++	+++	+++	AChE
EST-2	-	-	+++	+++	+++	AChE
EST-3	-	-	+++	+++	+++	AChE
EST-4	-	-	+++	+++	+++	AChE
EST-5	-	-	+++	++	+++	AChE
EST-6	-	-	+++	++	+++	AChE
EST-7	-	-	+++	-	++	CaE
EST-8	-	-	+++	-	++	CaE
EST-9	-	-	+++	-	++	CaE

(-) ausência de inibição; (+, ++, +++) níveis crescentes de inibição.

AChE: acetilcolinesterase.

CaE: carboxilesterase.

Padrão de esterases durante o desenvolvimento

A análise eletroforética revelou diferenças no padrão de atividade esterásica contra o α -naftil acetato nas fases imaturas durante o ciclo biológico do carrapato bovino *B. microplus* (Figura 1). Dois alelos correspondentes às esterases EST-8 e EST-9, foram expressos durante todo o desenvolvimento ontogenético. Em larvas (L), foi possível detectar cinco regiões com atividade esterásica, EST-9, EST-8, EST-5, EST-2 e EST-1, sendo que a atividade da esterase EST-5 se estende até ninfas de 1º estadio (N1). As bandas correspondentes às enzimas EST-1 e EST-2 foram detectadas somente em larvas, sendo consideradas larva-específicas.

O estágio de ninfa foi subdividido em três sub-estágios, de acordo com o grau de ingurgitamento e tamanho, sendo denominados de N1 (ninfas de 1º estágio), N2 (ninfas de 2º estágio ou metaninfa) e N3 (ninfas de 3º estágio ou neóginas). Em ninfas N1, verificou-se cinco regiões de atividade esterásica, EST-9, EST-8, EST-7, EST-5 e EST-3. A EST-7 se mantém presente também em metaninfa (N2) e a EST-5 é compartilhada com larvas. A EST-3 mostrou atividade apenas nos três sub-estágios de ninfa e foi considerada ninfa-específica. Em metaninfas (N2), ocorrem quatro esterases, EST-9, EST-8, EST-7 e EST-3, e em ninfas de 3º estágio ou neóginas (N3) foram detectadas as regiões correspondentes à atividade das enzimas EST-9, EST-8 e EST-3. Em fêmeas adultas completamente ingurgitadas (teleóginas), o número de regiões com atividade esterásica continua menor, sendo detectadas três esterases, EST-9, EST-8 e EST-6. Em machos adultos (gonandros) foi possível verificar quatro regiões, sendo as regiões das esterases EST-9, EST-8 e EST-6 compartilhadas com teleóginas e a EST-4 presente somente nos machos (sexo-específica). A EST-6 ocorreu somente em teleóginas e machos, sendo considerada adulto-específica.

DISCUSSÃO

No Brasil, o carrapato bovino *B. microplus* representa um grande problema para a bovinocultura por ser um agente debilitante e vetor de hemoparasitas altamente virulentos. O controle deste carrapato tem se tornado difícil em função da seleção de resistência a acaricidas. Programas de manejo têm aumentado o interesse no desenvolvimento de pesquisas sobre a biologia deste parasita para subsidiar programas de controle. Nesse estudo, o padrão de expressão gênica de esterases durante o desenvolvimento de *B. microplus* foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Foram detectadas nove regiões com atividade esterásica (EST-1 a EST-9) durante a ontogênese de *B. microplus* (Figura 1). Em virtude de terem sido utilizados *pools* de cada fase, é possível que esteja ocorrendo sobreposição de alelos, não sendo possível identificar variações individuais.

Nesse trabalho, as bandas referentes as esterases EST-9 (*locus est 7*) e EST-8 (*locus est 6*) estão presentes em todos os estágios de desenvolvimento de *B. microplus* e exibem elevada intensidade de coloração. Esta distribuição homogênea em todas as amostras reflete a importância funcional destas enzimas, demonstrando uma atividade gênica constante e elevada durante todo o ciclo de vida, sendo consideradas como produtos de genes *housekeeping*. Enzimas *housekeeping* são enzimas que se expressam constitutivamente, na maioria da população, durante todo o desenvolvimento, envolvidas em atividades fisiológicas essenciais e são codificadas por genes designados como *housekeeping*. TOWNSON (1972) e LIMA-CATELANI *et al.* (2004) descreveram estas características para bandas esterásicas de *A. aegypti* detectadas em todas as fases do desenvolvimento por eletroforese em gel de amido e poliacrilamida. Nos testes com inibidores, estas enzimas foram classificadas como carboxilesterases (Tabela 1). Carboxilesterases estão associadas com processos fisiológicos de síntese da parede cuticular (SUDDERUDIN AND TAN, 1973) e regulação dos níveis de Hormônio Juvenil (SPARKS *et al.*, 1979), processos importantes durante os estágios imaturos do carrapato, relacionados à regulação do desenvolvimento. Essas enzimas podem atuar, também, como sítios de fosforilação alternativos

durante o processo de intoxicação por acaricidas organofosforados (WATSON e CHAMBERS, 1996).

Diferenças nos padrões de esterases entre os estágios refletem expressão gênica diferencial da produção de proteínas importantes não só para a manutenção do estágio em si como para a síntese de proteínas que desencadeiam processos de metamorfose. A análise eletroforética revelou diferenças nas atividades dessas enzimas entre as fases durante o ciclo biológico do carrapato *B. microplus* (Figura 1).

As regiões de atividade das enzimas EST-1 e EST-2, codificadas pelo locus *est 1*, foram consideradas larva-específicas e classificadas como acetilcolinesterases. Nesse estágio de desenvolvimento, a larva está migrando na planta em busca do hospedeiro e, portanto, torna-se alvo fácil de acaricidas. Acetilcolinesterases associadas a organofosforados já foram detectadas em larvas de *B. microplus* e relacionadas à resistência a acaricidas (WRIGH e AHRENS, 1988; BAXTER e BARKER, 2002).

A enzima EST-5, classificada com base nos testes com inibidores como uma acetilcolinesterase, pode estar relacionada com requerimentos funcionais do início do desenvolvimento, visto que foi identificada somente em larvas e ninfas de 1º estágio. A esterase EST-7, classificada como uma carboxilesterase, esteve presente somente nos estágios iniciais de ninfa (N1 e N2), podendo estar relacionada com requerimentos necessários durante o processo de amadurecimento das ninfas. A EST-3, observada nos estágios de ninfa, metaninfa e neóginas, foi classificada como acetilcolinesterase e, em função da sua intensidade deve estar relacionada não somente aos requerimentos para metamorfose, como também, para o desenvolvimento de estruturas de adulto.

Os estágios de larva e ninfa de 1º. estágio (N1) foram os que apresentaram maior atividade esterásica, não só pelo número de variantes, mas, também, pela intensidade de expressão do produto gênico. Requerimentos esterásicos podem ser maiores nessas fases iniciais do desenvolvimento do que nos outros estágios devido ao alto nível de ingestão de alimento, metabolismo do hormônio juvenil e intensa atividade mitótica. A EST-5, que começa a se expressar em larva, mantém atividade somente até ninfa 1 (N1), indicando que algumas

características juvenis estão relacionadas com essa enzima. Detecta-se aí um provável alvo para acaricidas.

Em fêmeas adultas (teleóginas) e machos adultos (gonandros), foram compartilhadas três regiões com atividade esterásica, EST-9, EST-8 e EST-6. Essas enzimas esterásicas estão provavelmente envolvidas com digestão, fisiologia do sistema nervoso, reprodução, amadurecimento do aparato reprodutor externo e desenvolvimento de gônadas. A EST-6, considerada adulto-específica, pode estar envolvida com a transmissão do impulso nervoso. Seria importante analisar como essa enzima se comporta frente aos acaricidas. Em função disso, seria possível propor como método alternativo de controle, a inibição dessa esterase por droga que utiliza metodologia molecular de inibição do produto protéico. Em machos adultos (gonandros), foi possível verificar além das esterases EST-9, EST-8 e EST-6 (em comum com teleóginas), a esterase EST-4 (locus *est 6*) presente somente em machos e considerada sexo-específica. Esterases sexo-específicas já foram detectadas em algumas espécies de *Drosophila*. KAMBYSELLIS *et al.* (1968), descreveu a esterase F como produto de um gene autossômico, com expressão limitada ao sexo em *D. aldrich* e em *D. melanogaster*, a EST-6 foi relacionada com o comportamento de acasalamento, influenciando no macho a velocidade de formação de um feromônio antiafrodisíaco na fêmea, a partir do fluido seminal do macho (RICHMOND *et al.*, 1986). O mesmo papel pode ser atribuído à EST-4 de *B. microplus*, classificada como uma acetilcolinesterase. Essa hipótese baseia-se no fato de que a fêmea acasala-se com um único macho e após a cópula desprende-se do hospedeiro para oviposição e em seguida, morre, enquanto que o macho se acasala com várias fêmeas. Um mecanismo de controle do parasita via macho estéril, poderia ser pesquisado a partir da manipulação da expressão dessa esterase.

Nesse trabalho, diferenças estágio-específicas e sexo-específicas no padrão de esterases foram detectadas durante o desenvolvimento pós-embrionário do carrapato bovino *B. microplus*. Os dados contribuem com conhecimentos sobre a biologia desse parasita que podem ser úteis em futuras pesquisas e programas de controle.

REFERÊNCIAS

- 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 acetylcholinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and resistant cattle ticks. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **32**, 815-820.
- BITONDI, M.M.G., MESTRINER, M.A. 1983. Esterase isozymes of *Apis mellifera*: Substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny, and electrophoretic variability. **Biochem. Genet.** **21**, 985-1002.
- BRADFORD, M., 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** **72**, 248-254.
- CORDOVÉS, C.O. 1997. **Carrapato: Controle ou Erradicação**. Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, RS, 176pp.
- DE CASTRO, J. J. 1997. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries, **Vet. Parasitol.** **71**, 77-81.
- FOIL, L.D., COLEMAN, P., EISLER, M., FRAGOSO-ASNCHEZ, H., GARCIA-VAZQUEZ, Z., GUERRERO, F.D., JONSSON, N.N., LANGSTAFF, I.G., LI, A.Y., MACHILA, N., MILLER, R.J., MORTON, J., PUETT, J.H., TORR, S., 2004 Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Vet. Parasitol.** **125 (1-2)**, 163-181.
- FURLONG, J. 1993. **Controle do Carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil**. Cad. Tec. Esc. Vet. UFMG, 8: 49-61.
- GRISI, L., MASSARD, C. L., MOYA BORJA, G. E., PEREIRA, J. B. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, **21(125)**: 8-10.

- 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.
- HEMINGWAY, J., FIELD, L., VONTAS, J., 2002 An overview of insecticide resistance. **Science.** **298**, 96-97.
- 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 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.
- 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.
- KAMBYSELLIS, M.P., HOHNSON, F.M., RICHARDSON, R.H. 1968 Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. IV: Distribution of the esterases in the body tissues of *D. Aldrich* and *D. mulleri*. **Biochem. Genet.** **1**, 249-265.
- LABATE, B., GAME, Y., COOKE, H., OAKESHOTT, 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 protein during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** **227**, 680-685.
- LAPENTA, A.S., BICUDO, H.E.M.D., CERON, C.R. 1998 Esterase patterns and phylogenetic relationships of species and strains included in the *Drosophila buzzatii* cluster. **Cytobios** **96** (382), 95-107.

- LI, A.Y., PRUETT, J.H., DAVEY, R.B., GEORGE, J.E. 2005 Toxicological and biochemical characterization of coumaphos resistance in the San Roman strain of *Boophilus microplus* (Acari, ixodidae). **Pestic. Biochem. Physiol.** **81**, 145-153.
- LIMA-CATELANI, A.R.A., CERON, C.R., BICUDO, H.E.C.B. 2004 Variation of genetic expression during development, revealed by esterase patterns in *Aedes aegypti* (Dipter, Culicidae). **Biochem. Genet.** **42 (3/4)**, 69-84.
- OAKESHOTT, J.G., VAN PAPENRECHT, E.A., BOYCE, T.M., HEALY, M.J., RUSSEL, R.J., 1993 Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetica.** **90**, 239–268.
- RICHMOND, R.C., MANE, S.D., TOMPIKINS, L. 1986. The behavioral effects of a carboxylesterase in *Drosophila*. In: HOY, M.A. **Insect molecular genetics: an introduction to principles and application**. San Diego, Califórnia: Academic Press, Inc. cap 12: 301-336.
- SPARKS, T.C., WILLIS, W.S., SHOREY, S., HAMMOCK, B.D. 1979 Haemolymph juvenile hormone esterase activity in synchronous last instar larvae of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **J. Insect. Physiol.** **25**, 125-132.
- SUDDERUDIN, K.L., TAN, H.H. 1973 Some hydrolase and their involvement in insecticide resistance. **Pest. Art. News** **19**, 24-25.
- TOWNSON, H. 1972 Esterase polymorphism in *Aedes aegypti*: The genetics and Km values of electrophoretically heterogeneous forms. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **66**, 255-266.
- VILLATTE, F., BACHMANN, T. T. 2002. How many genes encode cholinesterase in arthropods? **Pest. Biochem. and Physiol.** **73**, 122-129.
- WATSON, A.M., CHAMBERS, J.E., 1996 The effect of high and low dosages of paraoxon in beta-naphtolflavone-treated rats. **J. Biochem. Toxicol.** **11**, 263-268.
- 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**, 234-239.

CAPÍTULO 2

**PADRÃO DE ESTERASES EM LINHAGENS SENSÍVEIS, TOLERANTES E
RESISTENTES A PIRETRÓIDES E ORGANOFOSFORADOS EM UMA
POPULAÇÃO BRASILEIRA DE *Boophilus microplus*.**

RESUMO

O carrapato bovino *Boophilus microplus* é uma das principais pragas nas regiões tropicais e subtropicais, causando grandes prejuízos à pecuária. O método tradicional de controle é baseado no uso de pesticidas, cujo uso indiscriminado levou à seleção de resistência. Esterases representam um grupo de enzimas amplamente estudadas e associadas à resistência a pesticidas. Neste trabalho, realizou-se uma análise comparativa por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante do padrão de esterases em fêmeas adultas de *B. microplus* de linhagens sensíveis, tolerantes e resistentes ao organofosforado malation e de linhagens sensíveis, tolerantes e resistentes ao piretróide deltametrina, provenientes de uma população de uma fazenda da região de Uberlândia, MG, com histórico de resistência. Os resultados revelaram a presença de quatro regiões com atividade esterásica contra o substrato α -naftil acetato, designadas de EST-1 a EST-4. As esterases EST-3 e EST-4 foram observadas em todas as linhagens e classificadas como carboxilesterases (CaEs) por meio de testes de inibição. A esterase EST-2, classificada como acetilcolinesterase (AChE) nos testes com inibidores, foi detectada em todas as linhagens, porém apresentou grau crescente de intensidade de coloração, nas linhagens sensíveis, tolerantes e resistentes, respectivamente, indicando produção alterada de acordo com o nível de resistência. A enzima EST-1, também classificada como AChE, foi detectada exclusivamente nas linhagens tolerantes e resistentes a ambos acaricidas, porém, apresentou maior atividade na linhagem resistente ao malation. A quantificação da atividade das enzimas EST-1 e EST-2 por densitometria óptica confirmou o aumento da atividade dessas esterases de acordo com o nível de resistência. A análise mostrou, ainda, que a atividade dessas AChEs é maior nas linhagens submetidas ao teste com malation quando comparadas com as linhagens selecionadas pelo teste com deltametrina, indicando maior resistência a organofosforados nessa população. Os dados sugerem que as AChEs detectadas representam importante estratégia de detoxificação a acaricidas.

PALAVRAS-CHAVE: *B. microplus*, resistência, acaricidas, esterases.

ABSTRACT

The cattle tick *Boophilus microplus* is one of the main pests of tropical and subtropical regions, causing great damages to cattle raising. The traditional method of control is based on the intensive use of pesticides. However, its control has become difficult because the intensive use of acaricides led to evolution of resistance. Esterases are enzymes widely studied which have been reported to be associated with acaricide resistance. In this work, esterase patterns were compared among malathion and deltamethrin-susceptible, tolerant and resistant tick strains using non-denaturing polyacrilamide gel electrophoresis analysis. Electrophoretical profiles revealed four bands displaying esterase activity against α -naphthyl acetate, named EST-1 to EST-4. The esterases EST-3 and EST-4 were detected in all strains and were classified as carboxylesterases in inhibitor studies. The esterase EST-2, classified as an acetylcholinesterase in inhibitor tests, was detected in all strains, but it has presented an increasing degree of staining, from susceptible to resistant strains, indicating an altered production according to resistance level. The enzyme EST-1, which was classified as an acetylcholinesterase, was detected exclusively in tolerant and resistant strains to both acaricides, however, it has been detected more intensively stained in malathion-resistant strain. The quantitative analysis of the EST-1 and EST-2 activities by optical densitometry demonstrated the increase of the activity of these enzymes according to the resistance level. These data suggest that the observed acetylcholinesterase could represent an important detoxification strategy developed to overcome the effects of acaricides.

KEY-WORDS: *Boophilus microplus*, resistance, acaricides, esterases.

INTRODUÇÃO

O carrapato bovino *Boophilus microplus* é o parasita mais importante para a bovinocultura e está presente nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. No Brasil, de acordo com o Ministério da Agricultura, esse carrapato é responsável por perdas de dois bilhões de dólares ao ano (GRISI *et al.*, 2002), não somente pelo seu efeito direto na produção de leite e progênie, mas também, pela sua habilidade como vetor dos hemoparasitas causadores de Babesiose e Anaplasmose (de CASTRO e NEWSON, 1993; CORDOVÉS, 1997).

O método tradicional de controle é baseado no uso intensivo de acaricidas piretróides, organofosforados, carbamatos e formamidinas. Entretanto, populações de *B. microplus* têm evoluído alguns mecanismos que permitem a sobrevivência de alguns indivíduos à exposição ao tratamento com acaricidas (FOIL *et al.*, 2004). A seleção de resistência limita a eficácia dos programas de controle baseados em acaricidas. Assim, a detecção precoce da resistência é um passo fundamental para o sucesso de programas de controle.

A origem genética da resistência tem sido investigada e, alguns autores demonstraram que este fenômeno pode originar-se por amplificação gênica e mutações de ponto (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 glutathione-transferases e modificação do alvo do pesticida (ZHU *et al.*, 2004, COSSIO-BAYUGAR *et al.*, 2002).

Os mecanismos mediadores da resistência a piretróides (PI) e organofosforados (OPs) vêm sendo amplamente estudados em insetos. Em *Drosophila melanogaster*, MUTERO *et al.* (1994) identificaram mutações de ponto no gene da acetilcolinesterase (AChE) em linhagens resistentes a inseticidas organofosforados e carbamatos. Mutações de ponto podem ocorrer também no gene da subunidade do receptor GABA (ácido gama-aminobutírico), genes do canal de sódio, oxidases e glutathione-S-transferases (GSTs) (HEMINGWAY *et al.*, 2002). Outros mecanismos metabólicos de resistência incluem detoxificação aumentada pela superexpressão de enzimas, tais como citocromo P450 (*cytP450s*) e carboxilesterases (CaEs) (HE *et al.*, 2002; WHEELLOCK *et al.*, 2005).

Esterases representam um grupo de enzimas hidrolíticas altamente variáveis e multifuncionais. Nos artrópodos, estas enzimas estão relacionadas com várias atividades fisiológicas, como regulação dos níveis de Hormônio Juvenil (HIDAYAT e GOODMAN, 1994), processos digestivos (ARGENTINE e JAMES, 1995), comportamento reprodutivo (LABATE *et al.*, 1990), funcionamento do sistema nervoso (VILLATE & BACHMANN, 2002) e resistência a pesticidas (FRENCH-CONSTANT *et al.*, 2004).

Estudos com carrapatos *B. microplus* resistentes a acaricidas demonstraram que esterases, particularmente, CaEs e AChEs, estão associadas à resistência, envolvendo tanto o aumento da detoxificação metabólica, bem como a insensibilidade do sítio alvo (VILLARINO *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2005). BAXTER e BARKER (1998) demonstraram a relação entre a resistência a OPs e a atividade aumentada da AChE em carrapatos australianos. Mutações de ponto nos genes de CaEs e AChEs foram detectados nessa espécie e associadas à resistência (HERNANDEZ *et al.*, 1999, 2000). Em carrapatos *B. microplus* do Texas (USA), VILLARINO *et al.* (2003) detectaram três esterases, que foram purificadas do tegumento de carrapatos adultos resistentes e caracterizadas como carboxilesterases com base nos testes com inibidores. Esses autores verificaram uma maior quantidade de atividade dessas enzimas na linhagem resistente. Neste trabalho, perfis esterásicos de linhagens de fêmeas adultas sensíveis, tolerantes e resistentes ao malation e à deltametrina, provenientes de uma população brasileira de *B. microplus* foram comparados com o objetivo de identificar diferenças de expressão que pudessem refletir mecanismos de resistência a acaricidas associados à atividade hidrolítica por esterases.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Fêmeas adultas (teleóginas) de *B. microplus* de uma população de campo com alto nível de resistência a acaricidas, obtidas em uma fazenda da região de Uberlândia, MG, Brasil, foram coletadas (cerca de 500 indivíduos) e transportadas ao Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia, onde foram submetidos ao teste de detecção de resistência *in vitro*, preconizado pela FAO (KEMP *et al.*, 1998): Biocarrapaticitograma ou Adult Immersion Test (AIT) (DRUMMOND *et al.*, 1973), sob condições ideais de temperatura e umidade, com algumas modificações.

Teste de Resistência

Os pesticidas utilizados foram: deltametrina a 5% (piretróide) e malation (organofosforado) a 2,5%. Estes produtos foram cedidos pela Vallée S/A e utilizados de acordo com as recomendações do fabricante nas dosagens comerciais também usadas pelo produtor rural no campo. Em cada teste, 150 fêmeas adultas, com peso médio equivalente, foram imersas por três minutos na solução contendo o acaricida diluído em água (V/V). Após a imersão, as fêmeas foram secas em papel absorvente e transferidas para placas de Petri, e aderidas à placa com auxílio de fita adesiva. Os indivíduos foram mantidos em placas de Petri a 27°C e 80% de umidade para monitoramento da sobrevivência e oviposição. O grupo Controle constou de 150 fêmeas imersas em água e monitorado da mesma maneira que o grupo tratado.

Após o teste, os carrapatos que morreram foram considerados “sensíveis”. Fêmeas que sobreviveram, mas não realizaram a oviposição, foram consideradas “tolerantes” com sensibilidade moderada e aquelas que sobreviveram e realizaram oviposição completa, com grande número de ovos viáveis, foram consideradas “resistentes” ao tratamento.

Uma linhagem sensível de referência foi utilizada como controle externo (cepa Mozzo), originária do Uruguai, onde nunca houve exposição a pesticidas e que vem sendo mantida na Fazenda Experimental da Valeé S/A (Uberlândia, MG, Brasil). Todas as amostras (incluindo as da cepa Mozzo) foram submetidas a um

corde longitudinal no abdômen e o excesso de sangue bovino foi lavado com água ultra-pura. As amostras foram congeladas a -80°C .

Determinação de Proteína Total

Os carrapatos foram macerados individualmente em nitrogênio líquido e homogeneizados em tampão fosfato de sódio 0,01M (pH 6.5), contendo sacarose 20%, EDTA 0,001M e Triton X-100 0,5%. Os homogenados foram submetidos à centrifugação a 15.000g, 4°C , por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado, dividido em alíquotas e congelado a -80°C . A concentração de proteína total de cada amostra foi determinada de acordo com o método de BRADFORD (1976). A absorbância foi lida a 595nm em espectrofotômetro Hitachi 2000 e a concentração média dos extratos de proteínas foi determinada a partir de uma curva padrão, utilizando-se albumina sérica bovina (BSA). A concentração total de proteína foi expressa em miligramas de proteína por grama de carrapato.

Perfil de Esterases

Amostras individuais foram analisadas quanto ao perfil de atividade esterásica. As análises eletroforéticas foram realizadas utilizando-se 100 μg de proteína total por amostra em gel de poliacrilamida não desnaturante, de acordo com LAEMMLI (1970), com algumas modificações. O sistema de gel foi preparado com gel de empilhamento a 4% e gel de separação a 12%. A eletroforese vertical foi conduzida durante 4 horas, a 4°C , com corrente constante a 40 mA e tampão de corrida Tris (0,087M)-Glicina (0,013M), pH 8.3. A identificação das esterases foi feita pelo método descrito por LAPENTA *et al.* (1998), com modificações, por pré-incubação do gel em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 6.5) por 30 minutos a 37°C , seguido de incubação em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 6.5), contendo α -naftil acetato 3,2mM e Fast Blue R/R Salt 2,4mM por 60 minutos, no escuro, a 37°C . A solução de α -naftil acetato foi pré-diluída em 1mL de acetona.

Amostras de sangue bovino extraído das teleóginas e também de sangue extraído direto dos bovinos foram também analisadas quanto ao perfil esterásico, nas mesmas condições, para avaliar a possibilidade de contaminação das amostras com sangue do hospedeiro.

Ensaio com Inibidores

Testes com inibidores foram realizados, envolvendo sulfato de cobre a 1,0 mM, para-cloromercuribenzoato (pCMB) a 1,0 mM, malation 0,4 mM, sulfato de eserina a 1,0 mM e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) a 1,0 mM, para a caracterização bioquímica das esterases. Esses compostos foram utilizados separadamente nas soluções de pré-incubação e coloração. Os géis foram pré-incubados no escuro com tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 6.5) por 30 minutos e corados para detecção de atividade esterásica em presença do inibidor. O PMSF foi dissolvido em 1 mL de metanol e o pCMB em 1 mL de NaOH, 0,1M, pH 8.0, antes do uso. Sulfato de eserina e sulfato de cobre foram adicionados diretamente às soluções de pré-incubação e coloração. Sulfato de eserina foi empregado para determinar atividade atribuída a acetilcolinesterases. Sulfato de cobre e pCMB foram utilizados como inibidores de arilesterases, enquanto que o malation foi utilizado como inibidor de carboxilesterases e colinesterases e o PMSF como inibidor de serino-esterases (OAKESHOTT *et al.*, 1993).

Quantificação da atividade esterásica

A atividade das acetilcolinesterases detectadas por PAGE foi quantificada pela densidade óptica de cada banda no gel através do programa ImageMaster VDS versão 2.0 (Amersham Biosciences). A intensidade de coloração de cada banda foi medida em IOD (Intensidade de Densidade Óptica Absoluta).

RESULTADOS

Teste de Resistência

Após o teste de resistência, as fêmeas do grupo tratado foram separadas em três grupos (linhagens): indivíduos que morreram até 24 horas após o tratamento foram considerados “sensíveis” (SD: sensível a deltametrina; SM: sensível ao malation). Os carrapatos que sobreviveram, mas não realizaram a oviposição ou a oviposição foi incompleta foram considerados “tolerantes” (TD: tolerante a deltametrina; TM: tolerante ao malation) e aqueles que sobreviveram e realizaram a oviposição completa, com grande número de ovos viáveis, foram considerados “resistentes” (RD: resistente a deltametrina; RM: resistente ao malation) ao tratamento com o pesticida (Tabela 1). O elevado número de indivíduos resistentes revelou o alto nível de resistência na população estudada, com 54% de indivíduos resistentes a deltametrina (piretróide) e 49,33% de indivíduos resistentes ao malathion (organofosforado).

Tabela 1. Níveis de resistência em uma população brasileira de *B. microplus* após o teste de resistência *in vitro* AIT (Adult Immersion Test).

Bioensaio	Grupos selecionados	Características após tratamento	Número e % de indivíduos
Deltametrina 5% (piretróide)	Sensível (SD)	Morte	30/150 = 20%
	Tolerante (TD)	Oviposição incompleta	39/150 = 26%
	Resistente (RD)	Oviposição normal	81/150 = 54%
Malation 2,5% (organofosforado)	Sensível (SM)	Morte	34/150 = 22.67%
	Tolerante (TM)	Oviposição incompleta	45/150 = 30%
	Resistente (RM)	Oviposição normal	74/150 = 49,33%

Atividade Esterásica

As esterases foram detectadas em gel de poliacrilamida seguido por coloração específica usando o α -naftil acetato como substrato. Não foram observadas variações individuais dentro de cada linhagem. O padrão de atividade esterásica foi bastante semelhante entre as linhagens selecionadas pelo teste com deltametrina ou pelo teste com malation (Figuras 1 e 2).

As bandas identificadas nos géis, quando coradas simultaneamente na presença dos substratos α e β naftil-acetatos, coraram-se preferencialmente de preto (dados não mostrados). A predominância de bandas pretas, quando os dois substratos foram usados em conjunto, reflete maior afinidade do centro ativo das enzimas pelo α naftil acetato, indicando hidrólise preferencial desse substrato. Quando os géis foram corados com cada substrato separadamente, o padrão de esterases foi o mesmo em ambos os géis, não ocorrendo bandas específicas com preferência pelo α ou pelo β naftil-acetato, classificadas como α - β esterases.

Quatro regiões de atividade esterásica foram observadas nas linhagens tolerantes (TD e TM) e resistentes (RD e RM) a ambos acaricidas e três regiões nas linhagens sensíveis (SD e SM) e na linhagem sensível de referência (MZ). Estas esterases foram numeradas de EST-1 a EST-4, a partir da extremidade anódica do gel (Figuras 1 e 2). As esterases EST-2, EST-3 e EST-4 correspondem às enzimas EST-6, EST-8 e EST-9 detectadas na análise do perfil esterásico durante o desenvolvimento, utilizando a cepa Mozzo (MZ), sendo as esterases EST-9 e EST-8 presentes em todas os estágios, desde larvas até adultos, e a EST-6, detectada apenas em adultos (Figura 1, Capítulo 1).

As linhagens sensíveis (SD, SM e MZ) apresentaram um padrão de esterases semelhante, consistindo de três regiões distintas de atividade nos géis, EST-2, EST-3 e EST-4. Porém, essas enzimas foram detectadas com uma intensidade de coloração mais intensa nas linhagens sensível a deltametrina (SD) e na linhagem sensível de referência Mozzo (MZ), quando comparadas com a linhagem sensível ao malation (SM). Na linhagem sensível de referência (MZ), essas enzimas foram observadas com maior intensidade, talvez pelo fato dessa linhagem não ter sido submetida ao teste de resistência antes da eletroforese. Na linhagem sensível ao malation (SM), esse resultado indica uma maior sensibilidade dessas enzimas ao organofosforado malation e sugere que essas esterases foram utilizadas na tentativa de hidrólise desse acaricida.

As linhagens TD, TM, RD e RM apresentaram quatro esterases, EST-1, EST-2, EST-3 e EST-4. A esterase EST-2, apesar de ocorrer em todas as linhagens, apresentou um grau crescente de intensidade de coloração nas linhagens SD, SM, TD, TM, RD e RM, respectivamente, de acordo com o nível de resistência. A enzima EST-1 foi detectada exclusivamente nas linhagens

tolerantes (TD e TM) e nas linhagens resistentes (RD e RM), com maior intensidade de coloração nas linhagens resistentes RD e RM.

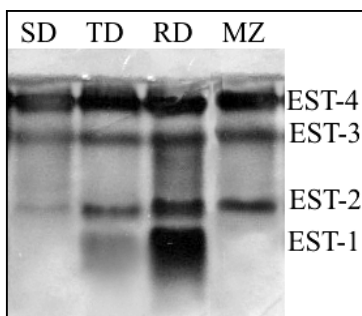


Figura 1: Padrão de esterases em *B. microplus*, após teste resistência com deltametrina. PAGE a 12% e coloração com α naftil acetato. SD: sensível; TD: tolerante; RD: resistente e MZ: cepa sensível de referência Mozzo.

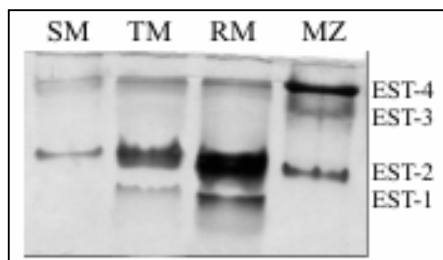


Figura 2: Padrão de esterases em *B. microplus*, após teste resistência com malation. PAGE a 12% e coloração com α naftil acetato. SM: sensível; TM: tolerante; RM: resistente e MZ: cepa sensível de referência Mozzo.

Caracterização Bioquímica

O efeito de inibidores foi verificado sobre as esterases dessas sublinhagens da população brasileira de *B. microplus* e da cepa Mozzo. As amostras foram submetidas à eletroforese e em seguida, pré-incubadas e coradas para esterases na presença de inibidores (Tabela 2). Os graus de inibição apresentados na tabela encontram-se classificados de acordo com a diminuição da intensidade das bandas (OAKESHOTT *et al.*, 1993).

As esterases EST-1 e EST-2 foram inibidas pelo sulfato de eserina e pelo malation, sugerindo que essas enzimas são AChEs. EST-3 e EST-4 foram afetadas pelo malation e classificadas como CaEs. Todas essas enzimas foram

inibidas pelo PMSF, indicando que apresentam um resíduo de serina essencial no sítio ativo. O sulfato de cobre e o pCMB não tiveram efeito inibitório sobre as esterases detectadas na população analisada.

Tabela 2: Efeitos de inibidores sobre as esterases em uma população brasileira de *B. microplus*. (-) ausência de inibição; (+, ++, +++) níveis crescentes de inibição.

Esterases	Cobre	pCMB	Malation	Eserina	PMSF	Classificação*
EST-1	-	-	+++	+++	+++	AChE
EST-2	-	-	+++	+++	+++	AChE
EST-3	-	-	+++	-	+++	CaE
EST-4	-	-	+++	-	+++	CaE

* AChE: acetilcolinesterase. / CaE: carboxilesterase.

Quantificação da atividade esterásica

A quantificação da atividade esterásica por densitometria óptica através do programa Image Master VDS software versão 2.0 (Amershan Biosciences) mostrou que a atividade da AChE 1 (EST-1) nas linhagens resistentes é maior do que a atividade da mesma nas linhagens tolerantes (Tabela 3). A quantificação mostrou também a atividade crescente da AChE-2 (EST-2) nas linhagens sensível (SD e SM), tolerante (TD e TM) e resistente (RD e RM), de acordo com o grau de resistência, sendo a atividade dessa enzima maior nas linhagens submetidas a teste com malation.

Tabela 3. Quantificação de atividade esterásica nas diferentes linhagens, utilizando o programa Image Master VDS.

Linhagens	SD	SM	TD	TM	RD	RM
Esterases	IOD*	IOD*	IOD*	IOD*	IOD*	IOD*
EST-2	112,41	118,06	356,11	655,18	918,21	951,33
EST-1	-	-	33,406	80,326	248,35	284,53
Total	112,41	118,06	389,51	735,51	1166,6	1235,86

* IOD: Densidade Óptica Integrada absoluta para cada banda.

- ausência de atividade.

DISCUSSÃO

Esterases são hidrolases amplamente estudadas e associadas à resistência a pesticidas em artrópodes (HE *et al.*, 2004). Neste trabalho, o perfil de atividade esterásica foi comparado entre linhagens de teleóginas sensíveis, tolerantes e resistentes ao malation e também entre linhagens de teleóginas sensíveis, tolerantes e resistentes à deltametrina, provenientes de uma população de campo de carrapatos *B. microplus* do Brasil com histórico de resistência a acaricidas piretróides e organofosforados. Os padrões de esterases foram comparados com uma linhagem sensível de referência, cepa Mozzo, proveniente do Uruguai.

Os resultados mostraram quatro regiões de atividade esterásica, coradas pelo α -naftil acetato (Figura 1) nas linhagens tolerantes e resistentes e três nas linhagens sensíveis e cepa Mozzo. Esses dados são similares aos resultados anteriormente observados em outra população brasileira de carrapatos *B. microplus* submetida a piretróides (BAFFI *et al.*, 2005).

As linhagens sensíveis a deltametrina (SD) e ao malation (SM) e a linhagem sensível de referência (MZ) apresentaram o mesmo padrão de esterases (EST-2, EST-3 e EST-4). Porém, na cepa Mozzo, essas enzimas foram observadas com maior intensidade, talvez pelo fato dessa linhagem não ter sido submetida ao teste de resistência com os acaricidas antes da eletroforese.

Com relação às enzimas EST-3 e EST-4, quando as linhagens de cada ensaio foram comparadas entre si, observamos que nas linhagens selecionadas pelo teste com deltametrina, as esterases EST-3 e EST-4 foram detectadas com uma intensidade maior de coloração do que sob o efeito do malation, indicando que essas enzimas respondem diferentemente a piretróides e organofosforados, com expressão diferencial dos genes que codificam para essas esterases.

Uma explicação para tal fenômeno seria que, em virtude do malation ser um pesticida mais potente, pertencente à classe dos organofosforados, essas enzimas foram quase totalmente utilizadas em resposta à pressão exercida pela exposição ao acaricida. As esterases EST-3 e EST-4 foram classificadas como carboxilesterases nos testes com inibidores. Carboxilesterases são enzimas com papel protetor para as acetilcolinesterases-alvo durante a intoxicação por

organofosforados, por atuarem como sítios de fosforilação alternativos (WATSON e CHAMBERS, 1996). É provável que essas enzimas tenham atuado como sítios de fosforilação alternativa e foram utilizadas na tentativa de neutralização dos mesmos, sendo detectadas nos géis com baixa atividade.

As linhagens tolerantes (TD e TM) e resistentes RD e RM) apresentaram as mesmas regiões de atividade, esterases EST-1, EST-2, EST-3 e EST-4. A esterase EST-1, classificada como acetilcolinesterase (AChE), foi observada exclusivamente nas linhagens tolerantes e resistentes, porém com maior intensidade de coloração nas linhagens resistentes e foi associada à resistência tanto a organofosforados quanto a piretróides. Da mesma maneira, EST-2, também classificada como uma AChE, apresentou um aumento progressivo de atividade, observado por um grau crescente de coloração, desde as linhagens sensíveis até as linhagens resistentes, indicando uma produção de esterases em função do nível de resistência. A quantificação por densitometria óptica confirmou o crescente aumento na atividade dessas enzimas, de acordo com o nível de resistência.

Estes resultados sugerem que as esterases EST-1 e EST-2 apresentam atividades aumentadas em resposta à pressão acaricida. O aumento na atividade dessas enzimas indica produção associada à resistência. A superprodução de esterases pode resultar na detoxificação metabólica de ésteres pesticidas por sequestro e hidrólise (FLORES *et al.*, 2005). Em muitos artrópodes-pestes, a resistência a pesticidas tem sido atribuída a um aumento na produção e atividade de enzimas detoxificativas, incluindo CaEs e AChEs (NEWCOMB *et al.*, 1997, HEMINGWAY, 1998). AChEs são enzimas alvo para o ataque por pesticidas (SHI *et al.*, 2004) e AChEs alteradas com detoxificação metabólica aumentada já foram identificadas como o mecanismo primário em populações mexicanas e australianas de *B. microplus* para o desenvolvimento de resistência a OPs (WRIGHT e AHRENS, 1988; BAXTER e BARKER, 1999).

O aumento na produção e na atividade dessas esterases pode ser devido a processos de amplificação gênica, como também a eventos de modificações pós-traducionais. BAXTER e BARKER (1998) demonstraram que a resistência a OPs está associada à modificações pós-traducionais, produzindo uma AChE insensível em linhagens australianas de *B. microplus* e HERNANDEZ *et al.* (2000)

associaram o aumento no número de cópias de uma esterase, resultante de amplificação gênica, com a resistência a piretróides em uma população de carrapatos do México.

A presença de duas esterases com atividade de AChEs (EST-1 e EST-2) nas linhagens tolerantes e nas linhagens resistentes sugere que estas enzimas sejam produtos de dois genes distintos, que podem ter se originado a partir de um processo de duplicação gênica. Eventos de duplicação gênica já foram propostos para explicar a resistência a piretróides em carrapatos do Texas e México, envolvendo CaEs (JAMROZ *et al.*, 2000). Em uma linhagem resistente australiana de *B. microplus*, dois genes para AChE (*AChE1* e *AChE2*) foram identificados na singânglia e sequenciados (BAXTER e BARKER, 2002). Recentemente, um terceiro provável gene codificador de uma AChE (*AchE3*) foi identificado em uma linhagem de *B. microplus* dos Estados Unidos (TEMEYER *et al.*, 2004).

A resistência a pesticidas é um processo dinâmico resultante da associação de múltiplos mecanismos, entre eles, mutações de ponto, eventos de amplificação e de duplicação gênica, além de modificações pós-traducionais, que contribuem para a superexpressão e aumento na atividade de enzimas detoxificativas, incluindo carboxilesterases e acetilcolinesterases (HEMINGWAY *et al.*, 2004). Os resultados do presente trabalho sugerem que detoxificação metabólica aumentada por duas acetilcolinesterases está contribuindo para a resistência a organofosforados e piretróides nessa população de carrapatos do Brasil, sendo a acetilcolinesterase EST-1 presente apenas em indivíduos tolerantes e resistentes. Esses dados fornecem informações que poderão ser utilizadas em futuros programas de manejo da resistência e no uso mais efetivo de acaricidas.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BAFFI, M.A., PEREIRA, C.D., BONETTI, A.M., CERON, C.R. AND GOULART, L.R. 2005. Esterase profile in a pyrethroid-resistant Brazilian strain of *Boophilus microplus* cattle ticks (Acari, Ixodidae). **Gen. Mol. Biol.** **28**(4): 749-753.
- 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., 1999. Comparison of acetylcholinesterase genes from cattle ticks. **Int. J. Parasitol.** **29**, 1765-1774.
- BAXTER G.D., BARKER, S.C. 2002. Analysis of the sequence and expression of a second putative acetylcholinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and resistant cattle ticks. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **32**, 815-820.
- BRADFORD, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** **72**, 248-254.
- CORDOVÉS, C.O. 1997. **Carrapato: Controle ou Erradicação**. Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, RS, 176pp.
- COOSIO-BAYUGAR, R., 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.
- DE CASTRO, J.J. , NEWSON, R.M., 1993 Host resistance in cattle tick control. **Parasitol. Today** **9**, 13-17.
- DRUMMOND, R.O., CRUST, S.E., TREVINO, J.L., GLADNEY, W.J., GRAHAN, O.H., 1973 *Boophilus annulatus* and: laboratory tests of insecticides. **J. Econ. Entomol.** **66**, 130-133.

- FLORES, A. E., ALBELDANO-VAZQUEZ, W., FERNANDEZ SALAS, I., BADIL, M.H., BECERRA, H.L., GARCIA, G.P., FUENTES, S. L., BROGDON, W. G., BLACK IV, W. C., BEATY, B. 2005. Elevated a-esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. **Pestic. Biochem. Physiol.** **82**, 66–78.
- FOIL, L.D., COLEMAN, P., EISLER, M., FRAGOSO-ASNCHEZ, H., GARCIA-VAZQUEZ, Z., GUERRERO, F.D., JONSSON, N.N., LANGSTAFF, I.G., LI, A.Y., MACHILA, N., MILLER, R.J., MORTON, J., PUETT, J.H., TORR, S., 2004. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Vet. Parasitol.** **125 (1-2)**, 163-181.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H., DABORN, P. J., LE GOFF, G. 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. **Trends in Genetics**, **20 (3)**, 163-170.
- GRISI, L., MASSARD, C. L., MOYA BORJA, G. E., PEREIRA, J. B. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, **21(125)**: 8-10.
- 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 Molecular cloning and nucleotide sequence of a new P450 gene, CYP319A1, from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **32**, 303-309.
- HE, Y. P., MA, E. B., ZHUB, K. Y. 2004. Characterizations of general esterases in relation to malathion susceptibility in two field populations of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). **Pesticide Biochem. Physiol.** **78**, 103–113.
- HEMINGWAY, J., KARUNARATNE, S.H., 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Med. Vet. Entomol.** **12**, 1-12.
- HEMINGWAY, J., FIELD, L., VONTAS, J., 2002. An overview of insecticide resistance. **Science**. **298**, 96-97.

- HEMINGWAY , J., HAWKES, N. J., MCCARROLL, L., RANSON, H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **34**, 653–665.
- 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**, 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 cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **30**, 969-977.
- HYDAYAT, 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.
- 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.
- KEMP, D. H., THULLER, R., GALE, K. R., SABATINI, G. A. 1998. Acaricide resistance in cattle tick *Boophilus microplus* and *B. decoloratus*: review of resistance data, standartisation of resistance tests and recommendations for integrated parasite control to delay resistance. **Report to the Animal Health Services**, AGAH, FAO.
- LABATE, B., GAME, Y., COOKE, H., OAKESHOTT, 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 protein during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** **227**, 680-685.
- LAPENTA, A.S., BICUDO, H.E.M.D., CERON, C.R. 1998. Esterase patterns and phylogenetic relationships of species and strains included in the *Drosophila buzzatii* cluster. **Cytobios** **96 (382)**, 95-107.
- LI, A.Y., PRUETT, J.H., DAVEY, R.B., GEORGE, J.E. 2005. Toxicological and biochemical characterization of coumaphos resistance in the San Roman

- strain of *Boophilus microplus* (Acari, ixodidae). **Pestic. Biochem. Physiol.** **81**, 145-153.
- MUTERO, A., PRALAVORIO, M., BRIDE, J.M., FOURNIER, D., 1994. Resistance associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **91**, 5922-5926.
- NEWCOMB, R.D., CAMPBELL, P.M., OLLIS, D.L., CHEAH, E., RUSSELL, R.J., OAKESHOTT, J.G., 1997. A single aminoacid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **94**, 7464-7468.
- OAKESHOTT, J.G., VAN PAPENRECHT, E.A., BOYCE, T.M., HEALY, M.J., RUSSEL, R.J., 1993. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica*. **90**, 239-268.
- SHI, M. A., LOUGARRE, A., ALIES, C., FREMAUX, I., TANG, Z. H., STOJAN, J., FOURNIER, D. 2004. Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations coferring insecticide resistance. **BMC Evolut. Biol.** **4**, 1-8.
- TEMEYER, K.B., DAVEY, R.B., CHEN, A.C. 2004. Identification of a third *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cDNA presumptively encoding an acetylcholinesterase. **J. Med. Entomol.** **41**: 259-268.
- VILLARINO, M.A., WAGHELA, S.D., WAGNER, G.G., 2001. Histochemical localization of esterases in the integument of the female *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) tick. **J. Med. Entomol.** **38**, 780-782.
- VILLARINO, M.A., WAGHELA, S.D., WAGNER, G.G., 2003. Biochemical detection of esterases in the adult female integument of organophosphate-resistant *Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae). **J. Med. Entomol.** **40**, 52-57.
- 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., ATIELI, 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.
- WATSON, A.M., CHAMBERS, J.E., 1996 The effect of high and low dosages of paraoxon in beta-naphtolflavone-treated rats. **J. Biochem. Toxicol.** **11**, 263-268.

- WHEELLOCK, C.E., SHAN, G., OTTEA, J., 2005 Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. **J. Pestic. Sci.** **30(2)**, 75-83.
- 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**, 234-239.
- ZHU, Y. C., SNODGRASSA, G. L., CHENB, M. S. 2004. Enhanced esterase gene expression and activity in a malathionresistant strain of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **34**, 1175–1186.

CAPÍTULO 3

**RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES EM UM FRAGMENTO DE UMA
CARBOXILESTERASE E ASSOCIAÇÃO À RESISTÊNCIA A ACARICIDAS EM
Boophilus microplus (ACARI: IXODIDAE)**

RESUMO

O controle químico baseado no uso de compostos piretróides e organofosforados tem selecionado genótipos resistentes em populações de *Boophilus microplus*. Mutações de ponto em genes codificadores de esterases representam um dos principais mecanismos de resistência nessa espécie. Neste trabalho, as técnicas *Low Ionic Strength Single Stranded Conformation Polymorphism* (LIS-SSCP) e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) foram utilizadas para investigar a presença de mutações em um fragmento de uma carboxilesterase em uma população de carrapatos com histórico de resistência. A digestão de um fragmento de 372pb com *Eco* RI mostrou três genótipos: W, H e M, observados em diferentes frequências. O genótipo homozigoto selvagem (W) foi detectado apenas nas linhagens sensíveis, em alta frequência. O genótipo heterozigoto (H) foi observado em todas as linhagens, porém, em maior frequência nas linhagens tolerantes e o genótipo homozigoto mutante (M) foi observado apenas nas linhagens tolerantes e resistentes, com maior frequência nas linhagens resistentes. A genotipagem por LIS-SSCP mostrou quatro haplótipos, denominados 1, 2, 3 e 4. O haplótipo 1 foi observado apenas nas linhagens sensíveis, e em alta frequência. O haplótipo 4 foi observado nas linhagens tolerantes e resistentes, com maior frequência nas linhagens tolerantes. O haplótipo 3 foi observado nas linhagens tolerantes e resistentes, sendo detectado em maior frequência nas linhagens resistentes. O haplótipo 2 foi também detectado nas linhagens tolerantes e resistentes, porém, em frequência muito baixa na população. A comparação entre as seqüências mostrou a presença de mutações, além do polimorfismo para *Eco*RI nas linhagens tolerante e resistente. Foi observada, também, a presença de códon de parada, gerando proteínas truncadas, nas linhagens sensível e tolerante. A análise de domínios mostrou a presença de domínios adicionais na linhagem resistente. Estes resultados sugerem que diferentes mutações de ponto, além da influência de mecanismos de modificações pós-traducionais, estão alterando a atividade das proteínas traduzidas e podem estar associadas à resistência.

PALAVRAS-CHAVE: *B. microplus*, resistência, esterases, LIS-SSCP, PCR-RFLP.

ABSTRACT

The chemical control based on the use of pyrethroids and organophosphate compounds has been selecting resistant genotypes in *Boophilus microplus* populations. Point mutations in esterase genes represent one of the main resistance mechanisms in this specie. In this work, the techniques *Low Ionic Strength Single Stranded Conformation Polymorphism* (LIS-SSCP) and *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) were used to investigate the presence of mutations in a carboxylesterase fragment in a tick population with description of resistance. The digestion of a fragment of 372bp with *Eco* RI showed three genotypes: W, H and M, which were observed in different frequencies. The homozygous wild genotype (W) was detected only in the susceptible strains, in high frequency. The heterozygous genotype (H) was observed in all strains, however, in higher frequency in tolerant strains, and the homozygous mutant genotype (M) was observed only in the resistant and tolerant strains, with higher frequency in the resistant strains. The genotyping by LIS-SSCP showed four haplotypes, named 1, 2, 3 and 4. The haplotype 1 was observed only in the susceptible strains and in high frequency. The haplotype 4 was observed in the resistant and tolerant strains with higher frequency in tolerant strains. The haplotype 3 was observed resistant and tolerant strains, and was detected in higher frequency in the resistant strains. The haplotype 2 was also detected in resistant and tolerant strains, however, in very low frequency in population. The comparison among the sequences demonstrated the presence of mutations, beyond *Eco*RI polymorphism in resistant and tolerant strains. The presence of *stop codons* was also observed, creating truncated proteins in the susceptible and tolerant strains. The domains analysis showed additional motifs in the resistant strain. These results suggest that different point mutations, beyond the influence of post-translational modifications, are altering the activity of the translated proteins and can be associated to resistance.

KEY-WORDS: *B. microplus*, resistance, esterases, LIS-SSCP, PCR-RFLP

INTRODUÇÃO

A busca por informações sobre a biologia e o desenvolvimento da resistência a acaricidas em populações brasileiras de *B. microplus* é importante em virtude dos altos índices de infestações por esse parasito em todo o país e, também, para o estabelecimento de um panorama da resistência.

Ensaio convencionais para diagnosticar a resistência podem fornecer informações úteis em programas de planejamento de controle racional e manejo da resistência. A utilização de ferramentas moleculares em conjunto com os ensaios convencionais, através de técnicas de biologia molecular, pode oferecer informações adicionais sobre a distribuição e frequência de alelos mutantes e contribuir para o monitoramento dos efeitos das estratégias de controle.

A origem genética da resistência tem sido muito estudada. Alguns autores demonstraram que este fenômeno pode originar-se a partir de amplificação gênica e mutações de ponto em genes codificadores de esterases (FIELD, *et al.*, 1999; HE *et al.*, 1999; OAKHESHOTT *et al.*, 2005).

A resistência a acaricidas em *B. microplus*, envolvendo carboxilesterases (CaEs) e acetilcolinesterases (AChEs) foi investigada por vários autores (VILLARINO *et al.*, 2001, VILLARINO *et al.*, 2003). BAXTER e BARKER (1998) demonstraram a relação do aumento da atividade da acetilcolinesterase com a resistência a organofosforados em linhagens australianas. Os mesmos autores identificaram e sequenciaram dois genes codificadores de AChEs (*AChE1* e *AChE2*) em linhagens resistentes (BAXTER e BARKER, 2002). JAMROZ *et al.* (2000) verificaram um aumento na atividade de CaEs em linhagens mexicanas resistentes a piretróides e LI *et al.* (2005) identificaram uma AChE insensível em outra linhagem resistente a organofosforados no México. HERNANDEZ *et al.* (2000) identificaram uma mutação de ponto em um fragmento de DNA de aproximadamente 372 pb de uma provável carboxilesterase em larvas e hemolinfa de adultos resistentes a piretróides em uma população mexicana. Essa mutação (substituição G→A no nucleotídeo 1120) gera um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *Eco* RI (CTTAAG), que foi identificado pela digestão dos produtos amplificados (polimorfismo *Eco* RI). Posteriormente, os mesmos autores (2002) verificaram a alta frequência do genótipo homozigoto

mutante em uma linhagem resistente ao piretróide “permetrina” (96% das larvas resistentes e 33% das fêmeas adultas resistentes) e observaram ainda que, o transcrito contendo a mutação de ponto foi mais abundante na linhagem resistente.

A técnica de *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) foi desenvolvida por ORITA *et al.*, (1988), como forma de detectar mutação em fita simples de DNA e se baseia no fato de que a mobilidade eletroforética de uma fita única de ácido nucléico em gel de poliacrilamida não desnaturante depende não somente do tamanho, mas, também, da sua seqüência. Cada uma das fitas possui uma seqüência de nucleotídeos e peso molecular que fazem com que elas migrem em posições diferentes no gel. MARUYA *et al.* (1996) otimizaram a técnica, propondo o uso de um tampão de desnaturação composto por uma solução de baixa força iônica (LIS) a base de sacarose. Essa técnica, por sua alta sensibilidade, permite detectar mutações de ponto nos fragmentos analisados. A técnica *Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of products of PCR* (PCR-RFLP) consiste na amplificação por PCR de seqüências de interesse no DNA e digestão dessas seqüências por enzimas de restrição sítio-específicas. Os fragmentos obtidos após a digestão enzimática, por terem sido amplificados, são facilmente visualizadas em gel de agarose sem a necessidade de hibridação com sondas marcadas radioativamente (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Ambas as técnicas têm sido utilizadas tanto no diagnóstico de doenças como também no diagnóstico da resistência a pesticidas (RIVET *et al.*, 1993; ABBA e COLIJOW, 2004; VASCONCELOS, 2004).

Neste trabalho, as técnicas LIS-SSCP e PCR-RFLP foram utilizadas para rastrear a presença de mutações de ponto em um fragmento codificador de uma provável carboxilesterase em linhagens de *B. microplus* de uma população de campo proveniente de uma fazenda na região de Uberlândia, MG, com histórico de resistência a acaricidas. Indivíduos de linhagens sensíveis, tolerantes e resistentes ao piretróide deltametrina e ao organofosforado malation foram comparados, com o objetivo de identificar a presença e a freqüência de alelos mutantes nessa população.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Foi utilizada uma cepa de campo de *B. microplus*, proveniente de uma fazenda da região de Uberlândia, MG, onde a resistência a carrapaticidas tem sido verificada com regularidade. Os parasitas foram coletados (cerca de 800 indivíduos) e transportados ao Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia, onde foram submetidos ao teste de detecção de resistência *in vitro*: Biocarrapaticitograma ou Adult Immersion Test (AIT) para teleóginas ingurgitadas (DRUMMOND *et al.*, 1973), preconizado pela FAO (KEMP *et al.*, 1998), sob condições ideais de temperatura e umidade. Os pesticidas utilizados foram: deltametrina a 5% (piretróide) e malation (organofosforado) a 2,5%. Estes produtos foram cedidos pela Vallée S/A e utilizados de acordo com as recomendações do fabricante nas dosagens comerciais também utilizadas pelo produtor rural no campo. Em cada teste, 150 fêmeas adultas, com peso médio de 50mg, foram imersas por três minutos na solução contendo o acaricida diluído em água, e em seguida, secas em papel absorvente e transferidas para placas de Petri. As fêmeas foram aderidas à placa com auxílio de fita adesiva e foram mantidas após o teste para monitoramento. 150 indivíduos foram imersos em água destilada e mantidos em placas para monitoramento (grupo controle). Após cada tratamento, os carrapatos que morreram até 24 horas depois da exposição aos acaricidas foram considerados “sensíveis” (SD – sensível a deltametrina; SM – sensível ao malation). Fêmeas que sobreviveram, mas não realizaram a oviposição, foram consideradas “tolerantes” (TD – tolerante a deltametrina e TM – tolerante ao malation) (sensibilidade moderada) e aquelas que sobreviveram e realizaram a oviposição completa, com grande número de ovos viáveis, foram consideradas “resistentes” (RD - resistente a deltametrina e RM – resistente ao malation) ao tratamento.

Foi utilizada como cepa sensível de referência, a cepa MOZZO, originária da região de mesmo nome no Uruguai, onde é mantida em ausência de pressão acaricida durante múltiplas gerações (controle externo). Esta cepa foi cedida pelo

Laboratório Experimental de Parasitologia da Vallée S/A (Uberlândia-MG), onde vem sendo mantida sob condições ideais de temperatura e umidade.

Após a coleta dos indivíduos, um corte longitudinal foi feito no abdômen das fêmeas e o excesso de sangue bovino foi lavado com água ultrapura. Em seguida, as amostras foram congeladas a -80°C . Foram analisados 30 indivíduos de cada linhagem para cada bioensaio (deltametrina e malation) na PCR-RFLP e LIS-SSCP, além de 30 indivíduos da cepa Mozzo (controle externo).

Extração de DNA

DNA de teleóginas foi extraído individualmente utilizando-se o método com fenol-clorofórmio, segundo SHEPPARD *et al.* (1992). Cada fêmea foi triturada em nitrogênio líquido e solubilizada em tampão de Grinding (Tris 10 mM, NaCl 60 mM, sacarose 30 mM, EDTA 10 mM), seguido de centrifugação por 1 min a 10.000rpm. O sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram acrescentados 400 μL de tampão de Lise (Tris 300 mM, SDS 40 mM, EDTA 20 mM, DEPEC 0,7%), permanecendo em gelo por 15 minutos. Foi adicionado 10 μL de proteinase K (10mg/ml), mantendo em banho maria por 45 min a 37°C . Foi acrescentado 500 μL de fenol e centrifugado por 1 min a 5000rpm. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro eppendorf. Esse passo foi repetido. Em seguida, foram adicionados clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) e levado a centrifuga por 1 min a 5000 rpm. O sobrenadante foi coletado e transferido pra outro eppendorf. Esse passo foi repetido. Adicionado 1/10 do volume de NaCl 2M e dobrado o volume com etanol absoluto gelado. As amostras foram estocadas a -20°C por 2h ou overnight. O DNA foi precipitado a 13000 rpm por 15 min. O pellet foi lavado com 500 μL de etanol 70%. O pellet foi seco em estufa e ressuspendido em 50 μL de água ultrapura. O DNA foi quantificado por absorbância a 260nm em espectrofotômetro Hitachi U-2000 e sua qualidade avaliada submetendo-se 5 μL do DNA à eletroforese em gel de agarose 1% (SAMBROOK *et al.*, 1989). Após a quantificação as amostras foram diluídas em água ultrapura para a concentração de 100ng/ μL e mantidas em freezer a -20°C .

Amplificação do DNA e Eletroforese

As reações foram processadas em termociclador PTC-100TM MJ Research, Inc, utilizando-se um *mix* contendo tampão de PCR (1x), MgCl₂ (1.5mM), dNTPs (200μM), *Taq*-DNA-polimerase (1U), 1 mix de *primers* (4 pmol cada), DNA (100ng) e H₂O ultra pura, com volume final para 20μL por reação. Foi utilizado um par de *primers* específico para um fragmento de DNA de uma provável carboxilesterase de *B. microplus* (Tabela 1). A reação consistiu de desnaturação prévia a 95° C por 5 min, seguido de 38 ciclos com desnaturação a 95° C por 1 min, anelamento a 60° C por 1 min e extensão a 72° C por 1 min, seguido de extensão final a 72° C por 5 min. Para verificar a eficiência das amplificações e possíveis contaminações submeteu-se 5μl de cada reação em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, por 1 hora a 100V.

Tabela 1- Seqüência de oligonucleotídeos para amplificação de parte do gene de uma provável carboxilesterase de *B. microplus*.

Primer	Seqüência	Reação
FORWARD	5'-AGC ATC GAC CTC TCG TCC AAC-3'	PCR-RFLP e
REVERSE	5'-GTC GGC ATA CTT GTC TTC GAT G-3'	LIS-SSCP

* Os primers foram desenhados para amplificação parcial de uma *CaE* de uma linhagem mexicana de *B. microplus* (HERNANDEZ *et al.*, 2002).

LIS-SSCP

Os produtos das amplificações foram desnaturados em tampão LIS (10% de sacarose, 0,01% de azul de bromofenol e 0,01% de xileno cianol) a 95°C por 10 minutos, utilizando-se 5μL do produto da PCR por amostra e 15μL de tampão de LIS. As amostras foram visualizadas em gel de poliacrilamida 12% por 8 horas a 15mA. Os géis foram preparados em placas de vidro 17,5cm por 23cm, com espaçadores de 07mm. Posteriormente, foram visualizados por coloração com nitrato de prata de acordo com BLUM *et al.* (1987), com modificações de BASAM *et al* (1991). Os géis foram colocados em solução de ácido acético por 10min e em seguida, lavados 2 vezes por 2min. Posteriormente foram imersos em solução

0,012M de nitrato de prata e 0,056% de formaldeído por 20min e, em seguida, lavados duas vezes por 30s. A revelação ocorreu com solução gelada 0,28M de carbonato de sódio anidro, 0,056% de formaldeído e 4 μ M de tiosulfato de sódio. A reação foi finalizada com ácido acético glacial gelado 10%.

PCR-RFLP

Esta análise foi realizada entre indivíduos resistentes, tolerantes e sensíveis selecionados pelo teste de resistência com deltametrina e malation e comparados com a cepa sensível de referência (cepa Mozzo), utilizando-se 10 μ L do produto da PCR por amostra. Os produtos amplificados da PCR foram genotipados através de digestão com enzima de Restrição *EcoR* I (1 unidade por reação), separados por eletroforese em gel de agarose 2,5% e visualizados por coloração com brometo de etídeo.

Clonagem e Sequenciamento

Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo e purificados do gel usando colunas de purificação GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience). Os DNAs purificados foram novamente quantificados em espectrofotometro Hitachi U-2000 e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, para verificar a integridade dos fragmentos.

A clonagem foi realizada, utilizando *Topo T.A. Cloning Kit one-step cloning of PCR products* da INVITROGEN, conforme instruções do fabricante. A eficiência da reação de ligação do fragmento reamplificado ao vetor foi verificada através de PCR, utilizando-se *primers* universais. Em seguida, foi realizada a transformação de bactéria competente com a reação de ligação. As bactérias foram recuperadas e plaqueadas em meio de cultura contendo ampicilina. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 14 horas. Após crescimento em estufa, foi feito o preparo do *template*, seguido da reação de PCR. Os produtos foram analisados em gel de agarose e submetidos à reação de sequenciamento em sequenciador automático Megabace (Amersham Pharmacia Biotech). As amostras foram purificadas antes

da aplicação no gel de sequenciamento. As seqüências foram analisadas, utilizando-se o programa BLAST n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para busca de identidade com a seqüência de outros genes depositados no GenBank. As seqüências obtidas foram alinhadas entre si através do programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). A tradução das seqüências de DNA para seqüências de aminoácidos foi realizada através do Programa Expasy Proteomics Server (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>). O alinhamento das proteínas e análise de domínios foi realizada através dos programas Clustal X (<http://www.ebi.ac.uk/clustalx>) e Expasy Prosite (<http://www.expasy.org/prosite/>).

Análises Estatísticas

Para verificar as diferenças entre as freqüências genotípicas obtidas por PCR-RFLP e as diferenças entre as freqüências haplotípicas obtidas por LIS-SSCP entre as linhagens, utilizou-se o Teste Z de Diferenças de Proporções com auxílio do software Microsoft®Excel. Para realizar as análises, utilizou-se o erro α menor que 5% ($p < 0,05$) para o nível de significância. A dependência entre os genótipos e haplótipos foi também verificada pelo teste χ^2 de Qui-Quadrado de Pearson (método de Monte Carlo). Utilizou-se também análises de correlação de Pearson para os genótipos observados entre as linhagens SD e SM ; TD e TM e RD e RM.

RESULTADOS

Teste de Resistência

Após o teste de resistência (AIT), foram selecionados grupos (linhagens) de indivíduos sensíveis, tolerantes e resistentes (Tabela 2). Indivíduos que morreram até 24 horas após o tratamento foram considerados “sensíveis” (SD, sensível a deltametrina; SM, sensível ao malation). Os indivíduos que sobreviveram após o teste, mas não realizaram a oviposição ou a oviposição foi incompleta, foram considerados “tolerantes” (TD, tolerante a deltametrina; TM, tolerante ao malation) e aqueles que sobreviveram e realizaram a oviposição completa, com grande número de ovos viáveis, foram considerados resistentes aos bioensaios (RD, resistente a deltametrina; RM, resistente ao malation). Observa-se que o nível de resistência na população estudada é alto, com 54% de indivíduos resistentes a deltametrina (piretróide) e 49,33% de indivíduos resistentes ao malathion (organofosforado). Estas linhagens foram submetidas à análise molecular por PCR-RFLP e LIS-SSCP e comparadas com uma linhagem sensível de referência (cepa Mozzo).

Tabela 2. Linhagens selecionadas após teste de resistência *in vitro* (AIT) com teleóginas (Adult Immersion Test) em uma população brasileira de *B. microplus*.

Bioensaio	Grupos selecionados	Características após tratamento	Número e % de indivíduos
Deltametrina 5% (piretróide)	Sensível (SD)	Morte	30/150 = 20%
	Tolerante (TD)	Oviposição incompleta	39/150 = 26%
	Resistente (RD)	Oviposição normal	81/150 = 54%
Malation 2,5% (organofosforado)	Sensível (SM)	Morte	34/150 = 22.67%
	Tolerante (TM)	Oviposição incompleta	45/150 = 30%
	Resistente (RM)	Oviposição normal	74/150 = 49,33%

Extração de DNA

Na Figura 1, o DNA genômico extraído de algumas amostras está representado, mostrando a qualidade do DNA obtido.

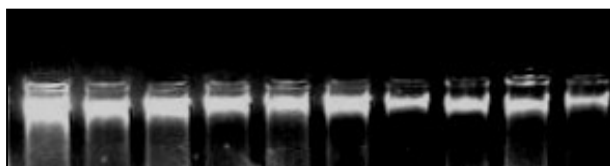


Figura 1. Padrão de DNA utilizado para amplificação.

PCR

Um fragmento de aproximadamente 372pb foi obtido na PCR em todas as linhagens da população estudada e, também, na cepa sensível de referência Mozzo (Figura 2), utilizando-se os mesmos *primers* descritos por HERNANDEZ *et al.* (2002). Esses autores observaram que o tamanho do fragmento amplificado foi o mesmo quando cDNA ou DNA genômico foi utilizado como *template* (372pb), indicando que esse fragmento não contém seqüências intrônicas nessa região do gene, ou seja, é parte de um único éxon. O produto amplificado foi analisado por desnaturação em alta temperatura em presença de sacarose (LIS-SSCP) e, também, por digestão com enzima de restrição *Eco* RI (RFLP). Posteriormente, esse fragmento foi purificado e submetido à clonagem e sequenciamento.

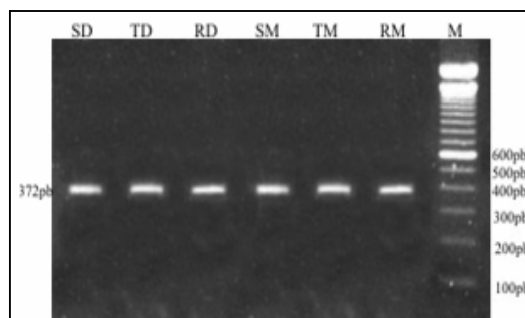


Figura 2. Amplificação de um fragmento de uma provável carboxilesterase de *B. microplus* de aproximadamente 372pb. Linhagens: SD – sensível a deltametrina; TD – tolerante a deltametrina; RD - resistente a deltametrina; SM –sensível ao malation; TM –tolerante ao malation; RM - resistente ao malation. M – marcador de peso molecular.

LIS-SSCP

Indivíduos de cada linhagem e da cepa Mozzo foram submetidos à genotipagem pela técnica de LIS-SSCP. A análise comparativa dos padrões eletroforéticos de migração das bandas mostrou quatro tipos de haplótipos na população estudada (Figura 3): haplótipo 1, haplótipo 2, haplótipo 3 e haplótipo 4.

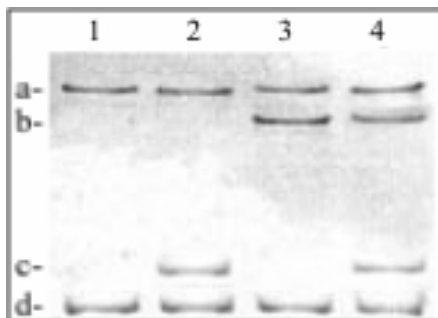


Figura 3. Esquema representativo dos quatro haplótipos observados por LIS-SSCP. 1 -, observado nas linhagens sensíveis e da cepa Mozzo. 2, 3 e 4 - haplótipos observados nas linhagens tolerantes e resistentes.

O haplótipo 1 mostra a presença de duas bandas (bandas *a* e *d*), correspondendo às duas fitas do fragmento amplificado e representa o estado homozigoto. Este padrão foi observado em 100% dos indivíduos da cepa Mozzo e em 100% dos indivíduos sensíveis tanto da linhagem sensível a deltametrina como da linhagem sensível ao malation (SD e SM). O haplótipo 2 mostra três bandas: *a*, *c* e *d*; o haplótipo 3 mostra, também, a presença de três bandas, porém em posições diferentes: *a*, *b* e *d* e o haplótipo 4, quatro bandas: *a*, *b*, *c* e *d*, que caracteriza heterozigose. Os haplótipos 2, 3 e 4 foram observados nos indivíduos das linhagens tolerantes e resistentes a ambos acaricidas nas frequências apresentadas na Tabela 3. O haplótipo 4 foi observado em 60% dos indivíduos tolerantes TD e em 60% dos indivíduos tolerantes TM. O haplótipo 3 foi observado em maior frequência nas linhagens resistentes (66,67% dos indivíduos RD e em 60% dos indivíduos RM). Já o haplótipo 2 foi o menos observado na população (13,33% em TD, RD e RM e 6,67% em TM).

Tabela 3. Número e porcentagem de haplótipos nas linhagens selecionadas no teste de resistência em uma população brasileira de *B. microplus*.

Linhagens*	1	2	3	4
SD	30/30 =100%	-	-	-
TD	-	4/30 =13,33%	8/30 =26,67%	18/30 =60%
RD	-	4/30 = 13,33%	20/30 =66,67%	6/30 =20%
SM	30/30 =100%	-	-	-
TM	-	2/30 = 6,67%	10/30 =33,33%	18/30 =60%
RM	-	4/30 = 13,33%	18/30 =60%	8/30 =26,67%

* 30 indivíduos analisados para cada linhagem em cada bioensaio (AIT).

1, 2, 3 e 4: Haplótipos encontrados na população em diferentes frequências.

RFLP

Os produtos da PCR foram submetidos à digestão com *Eco RI* e foram obtidos três diferentes padrões de bandas, representando três genótipos distintos (Figura 4). Um padrão representando o genótipo homozigoto selvagem mostrou a banda original de 372pb, que indica a não digestão (genótipo W). Um segundo padrão, representando o genótipo heterozigoto (genótipo H), mostrou três bandas: 372, 300 e 72 pb. O terceiro padrão representando o genótipo homozigoto mutante (M) mostrou duas bandas, uma de 300 pb e outra de 72pb. A frequência de cada genótipo em cada linhagem está representada na Tabela 4. Nesta tabela, podemos observar um padrão bastante heterogêneo para a distribuição de alelos nessa população. O genótipo homozigoto selvagem (W) foi observado apenas nas linhagens sensíveis, com uma alta frequência (90% dos indivíduos SD e 93,33% dos indivíduos SM). O genótipo heterozigoto (H) apresentou-se distribuído em todas as linhagens, porém em maior frequência nas linhagens tolerantes (73,33% dos indivíduos TD e 80% dos indivíduos TM). O genótipo homozigoto mutante (M) foi observado apenas nas linhagens tolerantes e resistentes a ambos bioensaios, apresentando uma maior frequência nas linhagens resistentes (60% dos indivíduos RD e 53,33% dos indivíduos RM).

Amostras de indivíduos da linhagem sensível de referência, cepa Mozzo, apresentaram dados semelhantes aos observados para as linhagens SD e SM,

onde 100% dos indivíduos analisados foram considerados homozigotos selvagens (genótipo W, 372 pb, dados não mostrados).

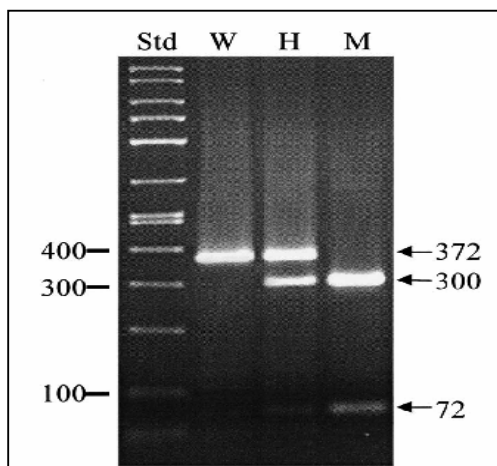


Figura 4. Produtos da PCR após digestão com *Eco* RI em teleóginas de *B. microplus*. Std- marcador de peso molecular em pb; W- genótipo homozigoto selvagem; H- genótipo heterozigoto e M- genótipo homozigoto mutante.

Tabela 4. Frequências Genotípicas nas linhagens selecionadas no teste de resistência em uma população brasileira de *B. microplus*, após digestão com enzima de restrição *Eco* RI.

Linhagens ^a	Genótipos ^b		
	W	H	M
SD	27/30= 90%	3/30= 10%	-
TD	-	22/30 = 73,33%	8/30= 26,66%
RD	-	12/30= 40%	18/30 = 60%
SM	28/30= 93,33%	2/30= 6,67%	-
TM	-	24/30 = 80%	6/30= 20%
RM	-	14/30= 46,67%	16/30 = 53,33%
Total	55/180 = 31%	77/180 = 43%	48/180 = 26%

^a 30 indivíduos analisados para cada linhagem selecionada em cada bioensaio (AIT).

^b Genótipos: W = homozigoto selvagem, H = heterozigoto, M = homozigoto mutante.

A Tabela 5 mostra a frequência de alelos observados em cada sublinhagem e na população total. Esta tabela mostra que a maior incidência do alelo *w* (selvagem) foi observada nas linhagens sensíveis (95% em SD e 97% em SM) e a maior incidência do alelo *m* (mutante) foi observada nas linhagens resistentes, com 80% em RD e 77% em RM, sugerindo a associação entre o alelo *m* e o fenótipo resistente. Estes dados mostram que a população está em equilíbrio para os alelos *w* e *m* ($0,53:0,47 \approx 1:1$).

Tabela 5. Frequência Alélica nas linhagens selecionadas no teste de resistência em uma população de *B. microplus*, após restrição com *Eco* RI.

Linhagem	Alelo <i>w</i>	Alelo <i>m</i>
SD	0,95	0,05
TD	0,37	0,64
RD	0,2	0,8
SM	0,97	0,03
TM	0,4	0,6
RM	0,23	0,77
Total na População	0,53	0,47

Baseando-se na frequência populacional (Tabela 2) e na distribuição de genótipos (Tabela 4) e alelos (Tabela 5) foi possível calcular a frequência real de cada genótipo e de cada alelo em cada linhagem (Tabela 6). Os dados apresentados na Tabela 6 mostram que as frequências genotípicas e alélicas estão em desequilíbrio, conforme pode ser verificado pela frequência observada na Tabela 4 e a frequência esperada calculada a partir das frequências da Tabela 5, sugerindo um processo de seleção direcional para os indivíduos portadores do

alelo mutante em presença dos acaricidas e um processo de expansão populacional para as linhagens tolerante e resistente a deltametrina e ao malation.

Tabela 6: Frequências Genotípicas e Alélicas Reais em cada linhagem de uma população brasileira de *B. microplus*.

Linhagens	Genótipos			Alelos	
	W	H	M	w	m
SD	18%	2%		0,19	0,01
TD		19%	7%	0,095	0,165
RD		21,6%	32,4%	0,108	0,432
Total	18%	42,6%	39,4%	0,393	0,607
SM	21,2%	1,5%		0,2195	0,0075
TM		24%	6%	0,12	0,18
RM		23%	26,3%	0,115	0,378
Total	21,2%	48,5%	32,3%	0,4545	0,5455

Sequenciamento dos Genótipos obtidos por PCR-RFLP

Após a análise por PCR-RFLP, cada um dos genótipos foi seqüenciado: um indivíduo da linhagem sensível ao malation (SM) com genótipo W (homozigoto selvagem), um indivíduo da linhagem tolerante TM com genótipo H (heterozigoto) e um indivíduo da linhagem resistente RM, diagnosticado com genótipo M (homozigoto mutante). As três seqüências obtidas foram comparadas com seqüências publicadas no GenBank, através do programa Blastn, mostrando similaridade com seqüências de esterases conhecidas. A seqüência referente à linhagem resistente ao malation (RM) obtida neste estudo revelou alto grau de identidade (96%), com 178 nucleotídeos, sendo 173 idênticos com a seqüência de uma provável carboxilesterase de *B. microplus* (GenBank-AF182283, descrita por HERNANDEZ *et al.* (2002) (Figura 5) e 91% de similaridade com uma acetilcolinesterase de *B. microplus* (de 178 nucleotídeos, 162 são idênticos, GenBank-AF286096; Gonzalez e Lleonart, no prelo) (Figura 6).

```
> gi|6003566|gb|AF182283.1|AF182283 Boophilus microplus clone 13 esterase mRNA, complete cds
Length=1950

Score = 281 bits (142), Expect = 5e-73
Identities = 173/178 (97%), Gaps = 4/178 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query 44 CCTTCCAAAGATGCCACTTGT-GCCATGAATCGTGGCTTCGTTACGTCGCGTGGATATCG 102
|||||
Sbjct 1104 CCTTCCAAAGATGCCACTTGTAGCCATGAATCGTGGCTTC-TTCGCGTTCGTCGATATCG 1162

Query 103 TGGCAGGCGTCACCTTCGACGAAAGGAGCCCTATGCGCTCGTTGTTTCCGCCGAAGCTAGA 162
|||||
Sbjct 1163 TGGCAGGCGTCACCTTCGACGAAAGGAGCCCTA-GCGCTCGT-GTTTCCGCCGAAGCTAGA 1220

Query 163 ACTTCTGCCTGATGACCTCGACGGAAGCAATCCTGAAAAACTTAAGGATTCTCTTCGC 220
|||||
Sbjct 1221 ACTTCTGCCTGATGACCTCGACGGAAGCAATCCTGAAAAACTTAAGGATTCTCTTCGC 1278
```

Figura 5. Blast n da seqüência da linhagem resistente RM. Alinhamento com uma seqüência de uma CaE de *B. microplus* (HERNANDEZ et al, 2002).

```

> gi|15383932|gb|AF286096.1|AF286096 Boophilus microplus acetylcholinesterase-like mRNA, complete
sequence
Length=1833

Score = 194 bits (98), Expect = 8e-47
Identities = 162/178 (91%), Gaps = 4/178 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query 44 CCTTCCAAAGATGCCACTTGT-GCCATGAATCGTGGCTTCGTTCCAGTCGTCGATATCG 102
|||||
Sbjct 1065 CCTTCCAAAGATGCCACTTGTAGCCATGAATCGTGGCTTC-TTCGCGTCGTCGATATCG 1123

Query 103 TGGCAGGCGTCACCTTCGACGAAGGAGCCCTATGCGCTCGTTGTTTCGCGGAAGCTAGA 162
|||||
Sbjct 1124 TGGCAGGCGTCACGTCGACGAAGGAGCCCTAAT-GCTCGT-GTTTCGCGGAAGCCAGA 1181

Query 163 ACTTCTGCGTGATGACCTCGACGGAAGCAATCCTGAAAAACTTAAGGATTCTCTTCGC 220
||| ||||| ||
Sbjct 1182 ACTCTGCGCGACTACCTCGACGGAAGCAATCCAGAGAACTCAAGGATTCTCTTCGC 1239

```

Figura 6. Blast n da sequência da linhagem resistente RM. Alinhamento com uma sequência de uma AChE de *B. microplus* (Gonzalez e Lleonart, dados não publicados).

As seqüências obtidas foram alinhadas entre si, utilizando o programa Clustal W (Figura 7). O aparecimento de *gaps* nas seqüências pode indicar deleções/inserções que podem ter alterado a janela de leitura, mudando a seqüência de aminoácidos e a conformação da proteína formada. Devido à qualidade das seqüências produzidas, foram aproveitadas somente leituras com PHRED>20, sendo possível alinhar as três seqüências com 122 nucleotídeos na região crítica, a qual inclui o sítio de restrição. Nessa região, observou-se um total de 70% de similaridade entre as três seqüências, sendo que a seqüência da linhagem tolerante apresentou um alto índice de identidade com a seqüência da linhagem resistente, com 95% de similaridade entre si. No sítio de restrição para Eco RI, podemos observar duas mutações de ponto por transição: a substituição G→A e a substituição A→G, que, juntas, criam um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *EcoR* I (Figura 8).

t	TTGTAGCCATGAATCAGTGGTTC-TTCGCGTCCGTCGATATCGTGGCAGGCGTCACTTAC	108
r	TTGT-GCCATGAATCGTGGCTTCGTTACGTCGCGTCGATATCGTGGCAGGCGTCACTT-C	118
s	-----GGGTCGACTACCGC	14
	* * *	
t	CGACGAAGGAGCCCTA-GCGCTCGT-GTTTCCGCCGAA-GCTAGAACTTCTGCCTAGATG	165
r	CGACGAAGGAGCCCTATGCGCTCGTTGTTTCCGCCGAA-GCTAGAACTTCTGCCT-GATG	176
s	ACAGAAAGCGAGCCCTA-GCGCTCGTGTATCCCGCCGAAAGCTAGAACTTCTGCCTGATTG	73
	* *	
t	ACCTCGACGGAAGCAATCCTGAAAACTTAAGGA--TTCTCTT----CGCACGGCTCTGT	219
r	ACCTCGACGGAAGCAATCCTGAAAACTTAAGGA--TTCTCTT----CGCCGGGCTCT--	228
s	ACCTCGACGGAAGCAATCCTGAAAACTTAGAGAAATTCTCTTACGGCAACGGGCTACTG	133
	* *	
t	CATCATGGGTAAAAGAGGACATACCGGACAT	250
r	-----	
s	TCATCATGGGTAAAACAAGAGGACATACCG--	162

Figura 7. Alinhamento das três seqüências através do programa Clustal W.

	
	360 370 380 390 400
SF	AAAACTTAGA GAATTTCTCT TACGGCAACG GGCTACTGTC ATCATGGGTA
RF	AAAACTTAAG GA--TTCTCT TC--GCAC-- GGCT-CTGTC ATCATGGGTA
HF	AAAACTTAAG GA--TTCTCT TC--GCCG-- GGCTCTINGTC ATCATGGG--
Clustal Co	***** ** ***** * ** **** ** *

Figura 8. Alinhamento das seqüências, indicando as mutações que conferem o polimorfismo para Eco RI. Linhagens: resistente (RF: CTTAAG), tolerante (HF: CTTAAG), e sensível (SF: CTTAGA).

A partir das seqüências de DNA de cada linhagem foi feita a tradução das seqüências de aminoácidos, utilizando o programa Expasy Proteomics Server (Figura 9). Nesta figura, observamos que as mutações de ponto que criam o sítio de restrição para Eco RI, detectadas por PCR-RFLP, geram a substituição de uma Lisina (K) para uma Arginina (R).

A análise das seqüências de aminoácidos deduzidas mostrou algumas diferenças entre elas. A figura 10 mostra a presença de códons de parada (*stop codons*) nas seqüências da linhagem sensível SM e da linhagem tolerante TM, antes do sítio de restrição EcoRI, porém em posições diferentes. Este resultado sugere a presença de uma proteína truncada nessas linhagens.

A análise das seqüências de aminoácidos, utilizando o programa Expasy Prosite (<http://www.expasy.org/prosite/>), mostrou domínios em comum entre as linhagens, além de domínios exclusivos de cada linhagem (Figura 11, Tabela 7). Sítios de fosforilação para proteína caseína kinase II (seqüência SNPE) e sítios de fosforilação para proteína kinase C (seqüência SIR) foram observados nas seqüências de todas as linhagens, porém devido a presença dos códons de parada, esses domínios foram perdidos nas linhagens sensível SM e tolerante TM. A linhagem tolerante TM apresentou um sítio de amidação (seqüência RGRR) e a linhagem resistente (RM) foi a que apresentou mais domínios em sua seqüência, além dos domínios para sítio de fosforilação para proteína caseína kinase II (seqüência SNPE) e um domínio para um sítio de fosforilação para proteína kinase C (seqüência SIR), apresentou, também, um sítio para N-glicosilação (seqüência NDSL), um sítio para amidação (seqüência RGRR) e um domínio para um sítio de fosforilação para proteína kinase dependente de cAMP e cGMP (RRRS).

Frame 5'3'**Resistente (Genótipo M)**

gaacgattccttgtcgcctcccgattctaccgacgacgcagtaccttccaaagatgccact
 N D S L S P P D S T D D A V P S K D A T
 tgtgccatgaatcggtggcttcgttcacgtccgtcgatatcggtggcaggcgctcacttccga
 C A M N R G F V H V R R Y R G R R H F R
 cgaaggagccctatgcgctcgttgtttccgccgaagctagaacttctgcctgatgacctc
 R R S P M R S L F P P K L E L L P D D L
 gacggaagcaatcctgaaaaa**cttaag**gattctcttcgccgggctct
 D G S N P E K **L K** D S L R R A

Tolerante (Genótipo H)

gtacgcacgccccgatcgaccacgatcgacaccttccaagatgccacttgtagccatgaa
 T H R P I V P R S Q T F Q D A T C S H E
 tcagtgggttcttcgcgtccgtcgatatcggtggcaggcgctcacttaccgacgaaggagccc
 S V V L R V R R Y R G R R H L P T K E P
 tagcgctcgtgtttccgccgaagctagaacttctgcctagatgacctcgacggaagcaat
 - R S C F R R S - N F C L D D L D G S N
 cctgaaaaa**cttaag**gattctcttcgcacggctctgtcatcatgggtaaaagaggacata
 P E K **L K** D S L R T A L S S W V K E D I
 ccggacat
 P D

Sensível (Genótipo W)

gggtcgactaccgcacagaagcgagccctagcgctcgtgtatcccgccgaaagctagaac
 G S T T A Q K R A L A L V Y P A E S - N
 ttctgcctgattgacctcgacggaagcaatcctgaaaaa**cttaga**gaatttctcttacgg
 F C L I D L D G S N P E K **L R** E F L L R
 caacgggctactgtcatcatgggtaacaagaggacataccg
 Q R A T V I M G K Q E D I P

Figura 9. Tradução das seqüências de nucleotídeos através do programa ExPASy Proteomics Server em seqüências de aminoácidos. Substituição resultante da formação de um sítio de restrição para Eco RI (cttaga → cttaag/ LR →LK) indicada em negrito.

5'3' FRAME**RESISTENTE** (GENÓTIPO M)

ND SL SP PD ST DD AV PS K DA TC A **Met** NR GF VH VR RY R GR RH FR RR SP
Met RS LF PP K LE LL PD DD LD GS N PEK **LK** DS LR RA

TOLERANTE (GENÓTIPO H)

TH RP IV PR SQ TF QD AT CS HES V VL RV RR Y R GR RH LP TK EP **Stop** RS CF
 RR S **Stop** NF CL DD LD GS N PEK **LK** DS LR TA LS SW VK ED IP D

SENSÍVEL (GENÓTIPO W)

GS TT AQ KR AL AL VY PA ES **Stop** NF CL ID LD GS N PEK **LR** EF LL RQ RA TV
 I **Met** GK Q ED IP

Figura 10. Tradução das sequências, utilizando o programa ExPASy (<http://tw.expasy.org/>) mostrando códons de parada nas sequências das linhagens sensível e tolerante, antes do sítio de restrição *Eco* RI, indicado em vermelho: substituição LR (linhagem SM) para LK (linhagens TM e RM).

Sensível

GS TT AQ KR AL AL VY PA ES **Stop** NF CL ID LD G **SNPE** KL RE FL
 RQ RA TV I **Met** GK Q ED IP

Tolerante

TH RP IV PR SQ TF QD AT CS HES V VL RV RR Y **RGR** RH LP TK EP
Stop RS CF RR S **Stop** NF CL DD LD G **SNPE** KL KD **SL** RT AL SS WK
 ED IP D

Resistente

ND **SL** **SP** **PD** **ST** **DD** AV PS K DA TC A **Met** NR GF VH VR RY **RGR** RH
FR **RR** **SP** **Met** RS LF PP K LE LL PD DD LD G **SNPE** KL KD **SL** LR RA

Figura 11. Domínios protéicos presentes em cada linhagem. Vermelho: *sítio de fosforilação para proteína caseína kinase II*; Azul: *sítio de fosforilação para proteína kinase C*; Amarelo: *sítio de amidação*; Verde: *sítio de N-glicosilação* e Rosa: *sítio de fosforilação para proteína kinase dependente de cAMP e cGMP*.

Tabela 7. Domínios proteicos das enzimas presentes em cada linhagem e suas respectivas seqüências de aminoácidos e posições.

Domínios		Linhagens		
Função	Seqüência	Sensível	Tolerante	Resistente
1. fosforilação para proteína caseína kinase II	SNPE	-	-	+
	SPPD	-	-	+
	STDD	-	-	+
2. fosforilação para proteína kinase C	SLR	-	-	+
3. amidação	RGRR	-	+	+
4. N-glicosilação	NDSL	-	-	+
5. fosforilação para proteína kinase dependente de cAMP e cGMP	RRRS	-	-	+

Análises Estatísticas

A análise de diferenças de proporções pelo teste Z mostrou diferenças altamente significativas entre as freqüências genotípicas observadas pelo PCR-RFLP (Tabela 8), exceto para RD: H x M ($p = 0,113$) e RM: H x M ($p = 0,605$). A análise de diferenças de proporções pelo teste Z entre as freqüências haplotípicas observadas pelo LIS-SSCP (Tabela 9) também mostrou diferenças altamente significativas, exceto para haplótipo 2 - TD x RD ($p = 1,0$); SM x TM ($p = 0,143$) e TM x RM ($p = 0,386$). A análise de dependência entre os genótipos do PCR-RFLP e haplótipos do LIS-SSCP verificada pelo teste χ^2 de Qui-Quadrado (método de Monte Carlo) foi significativa ($p < 0,05$) tanto para as linhagens selecionadas no teste com deltametrina (X-square = 106,7143, $p = 0,0004998$), como para as linhagens selecionadas no teste com malation (X-square = 100,1978, $p = 0,0004998$).

Os coeficientes de correlação de Pearson obtidos entre os genótipos do PCR-RFLP foram todos significativos (SD x SM, $r = 0,801783$; TD x TM, $r = 0,829156$ e RD x RM, $r = 0,872871$). Os coeficientes gerados para os haplótipos do LIS-SSCP também foram todos significativos (SD x SM, $r = 0,803474$; TD x TM, $r = 0,837651$ e RD x RM, $r = 0,871392$).

Tabela 8. Diferenças de Proporções (Teste Z) entre as frequências genotípicas observadas por PCR-RFLP e as linhagens selecionadas pelo teste de resistência.

Variável	P1	p2	n1	n2	zcalc	zcritico	sigf (z)
SD – W x H	0,9000	0,1	30	30	10,327956	-10,327956	<u>0</u>
TD – H x M	0,7333	0,2666	30	30	4,0874927	-4,0874927	<u>4,363E-05</u>
RD – H x M	0,4000	0,6	30	30	-1,5811388	-1,5811388	0,1138463
SM – W x H	0,9333	0,0667	30	30	13,452121	-13,452121	<u>0</u>
TM – H x M	0,8000	0,2	30	30	5,809475	-5,809475	<u>6,287E-09</u>
RM – H x M	0,4667	0,5333	30	30	-0,5170293	-0,5170293	0,6051357
SD – W x M	0,9000	0	30	30	16,431677	-16,431677	<u>0</u>
TD – W x M	0,0000	0,2666	30	30	-3,3023283	-3,3023283	<u>0,000959</u>
RD – W - M	0,0000	0,6	30	30	-6,7082039	-6,7082039	<u>1,981E-11</u>
SM – W x M	0,9333	0	30	30	20,488414	-20,488414	<u>0</u>
TM – W x M	0,0000	0,2	30	30	-2,7386128	-2,7386128	<u>0,00617</u>
RM – W x M	0,0000	0,5333	30	30	-5,8550083	-5,8550083	<u>4,785E-09</u>
SD x TD (W)	0,9000	0	30	30	16,431677	-16,431677	<u>0</u>
SD x RD (W)	0,9000	0	30	30	16,431677	-16,431677	<u>0</u>
SD x TD (H)	0,1000	0,7333	30	30	-6,4910205	-6,4910205	<u>8,567E-11</u>
SD x RD (H)	0,1000	0,4	30	30	-2,8603878	-2,8603878	<u>0,0042314</u>
SD x TD (M)	0,0000	0,266	30	30	-3,2972617	-3,2972617	<u>0,0009764</u>
SD x RD (M)	0,0000	0,6	30	30	-6,7082039	-6,7082039	<u>1,981E-11</u>
TD x RD (H)	0,7330	0,4	30	30	2,7631572	-2,7631572	<u>0,0057246</u>
TD x RD (M)	0,0000	0,6	30	30	-6,7082039	-6,7082039	<u>1,981E-11</u>
SM x TM (W)	0,9333	0	30	30	20,488414	-20,488414	<u>0</u>
SM x RM (W)	0,9333	0	30	30	20,488414	-20,488414	<u>0</u>
SM x TM (H)	0,0667	0,8	30	30	-8,5196223	-8,5196223	<u>0</u>
SM x RM (H)	0,0667	0,4667	30	30	-3,9277257	-3,9277257	<u>8,579E-05</u>
TM x RM (H)	0,8000	0,4667	30	30	2,8549079	-2,8549079	<u>0,0043051</u>
SM x TM (M)	0,0000	0,2	30	30	-2,7386128	-2,7386128	<u>0,00617</u>
SM x RM (M)	0,0000	0,5333	30	30	-5,8550083	-5,8550083	<u>4,785E-09</u>
TM x RM (M)	0,2000	0,5333	30	30	-2,8549079	-2,8549079	<u>0,0043051</u>

* Sublinhado: resultados significativos ($p < 0,05$).

** W, H e M: genótipos observados.

Tabela 9. Diferenças de Proporções (Teste Z) entre as frequências haplotípicas observadas por LIS-SSCP e as linhagens selecionadas pelo teste de resistência.

Variável	p1	P2	n1	n2	zcalc	zcritico	Sigf (z)
1 – SDxTD	1,0000	0	30	30	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1 - SDXRD	1,0000	0	30	30	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4 – SDXTD	0,0000	0,6	30	30	-6,7082039	-6,7082039	<u>1,981E-11</u>
4 - SDXRD	0,0000	0,2	30	30	-2,7386128	-2,7386128	<u>0,00617</u>
4 – TDxRD	0,6000	0,2	30	30	3,4641016	-3,4641016	<u>0,0005321</u>
3 – SDXTD	0,0000	0,266	30	30	-3,2972617	-3,2972617	<u>0,0009764</u>
3 – SDXRD	0,0000	0,667	30	30	-7,7517798	-7,7517798	<u>9,104E-15</u>
3 – TDxRD	0,2667	0,667	30	30	-3,3925267	-3,3925267	<u>0,0006926</u>
2 – SDXTD	0,0000	0,1333	30	30	-2,1480348	-2,1480348	<u>0,0317109</u>
2 – SDXRD	0,0000	0,1333	30	30	-2,1480348	-2,1480348	<u>0,0317109</u>
2 – TDxRD	0,1333	0,1333	30	30	0	0	1
1- SMxTM	1,0000	0	30	30	#DIV/0!	#DIV/0!	<u>#DIV/0!</u>
1- SMxRM	1,0000	0	30	30	#DIV/0!	#DIV/0!	<u>#DIV/0!</u>
4- SMxTM	0,0000	0,6	30	30	-6,7082039	-6,7082039	<u>1,981E-11</u>
4- SMxRM	0,0000	0,2	30	30	-2,7386128	-2,7386128	<u>0,00617</u>
4- TMxRM	0,6000	0,266	30	30	2,7729414	-2,7729414	<u>0,0055553</u>
3- SMxTM	0,0000	0,333	30	30	-3,870079	-3,870079	<u>0,0001088</u>
3- SMxRM	0,0000	0,6	30	30	-6,7082039	-6,7082039	<u>1,981E-11</u>
3- TMxRM	0,333	0,6	30	30	-2,1512889	-2,1512889	<u>0,0314533</u>
2- SMxTM	0	0,0667	30	30	-1,4642422	-1,4642422	0,1431279
2- SMxRM	0	0,1333	30	30	-2,1480348	-2,1480348	<u>0,0317109</u>
2- TMxRM	0,0667	0,1333	30	30	-0,8651486	-0,8651486	0,3869572

* Sublinhado: resultados significativos ($p < 0,05$).

** 1, 2, 3 e 4: haplótipos observados.

DISCUSSÃO

O controle do carrapato bovino é baseado principalmente no uso de acaricidas e essa estratégia tem selecionado a resistência a vários produtos disponíveis comercialmente. Populações de *B. microplus* têm potencial para desenvolvimento rápido de resistência cruzada e múltipla pelas suas características biológicas e comportamentais e pela falta de programas monitorados de controle. A resistência cruzada (*cross-resistance*) se deve à resistência a duas ou mais classes de pesticidas com modo de ação igual ou semelhante e a resistência múltipla (*multi-resistance*) se deve à resistência a duas ou mais classes de pesticidas com mecanismo de ação diferenciado (RODRIGUEZ *et al.*, 2002, YOON *et al.*, 2004). No presente estudo, linhagens de indivíduos sensíveis, tolerantes e resistentes foram coletadas em uma população de *B. microplus* proveniente da região de Uberlândia, MG, após a exposição aos acaricidas deltametrina (piretróide) e malation (organofosforado), onde alto nível de resistência foi observado, com 54% de indivíduos resistentes a deltametrina e 49,33% resistentes ao malathion (Tabela 2), indicando a provável ocorrência de resistência múltipla nessa população.

A genotipagem por PCR-RFLP revelou uma associação significativa entre o genótipo W (homozigoto selvagem) e o fenótipo “sensível” (linhagens SD e SM), com 90% dos indivíduos SD e 93,33% dos SM apresentando esse genótipo. O genótipo H teve associação com o fenótipo “tolerante”, com 73,33% dos indivíduos TD e 80% dos indivíduos TM heterozigotos para o marcador *Eco* RI. O genótipo M (homozigoto mutante) foi observado em maior frequência nas linhagens resistentes, com 60% dos indivíduos RD e 53,33% dos indivíduos RM, e associado ao fenótipo “resistente”.

Verificou-se maior frequência do alelo *w* nas linhagens sensíveis (SD e SM) e maior frequência do alelo *m* nas linhagens tolerantes e resistentes (TD, TM, RD e RM), apoiando a hipótese para a associação da presença do alelo mutante (*m*) com a detoxificação metabólica destes acaricidas. A maior incidência do alelo *w* nas linhagens sensíveis (95% em SD e 97% em SM) e a maior incidência do alelo *m* (mutante) nas linhagens tolerantes e resistentes (64% em TD, 60% em TM,

80% em RD e 77% em RM) sugerem, ainda, um processo de seleção direcional para indivíduos portadores do alelo mutante em presença dos acaricidas. HERNANDEZ *et al.* (2000, 2002) também verificaram a associação do alelo mutante *m* com a resistência em uma linhagem mexicana resistente a piretróides.

Além disso, os dados apresentados na Tabela 6 mostram que as frequências genotípicas e alélicas reais em cada linhagem estão em desequilíbrio, com uma frequência total de 0,607 para o alelo mutante *m* na população após o teste com deltametrina e de 0,545 após o teste com o malation. Este resultado sugere que a população analisada está sob intensa seleção em favor da resistência a piretróides e organofosforados, indicando uma expansão populacional para as linhagens de indivíduos portadores do alelo mutante *m*.

Através da genotipagem pela técnica de LIS-SSCP, foi possível realizar a associação do haplótipo 1, homozigoto selvagem presente apenas nas linhagens sensíveis, com o fenótipo sensível e a associação do haplótipo heterozigoto (haplótipo 4) com o fenótipo tolerante, presente apenas nas linhagens tolerantes e resistentes, porém em maior frequência nas linhagens tolerantes. Além disso, um padrão de bandas inesperado, os quais diferem dos descritos na literatura, com a presença de três bandas no gel (haplótipos 2 e haplótipo 3), sendo o haplótipo 3 mais frequente nas linhagens resistentes e o haplótipo 2 com uma frequência muito baixa na população também foi observado. Esse padrão de três bandas já foi observado em outra população de carrapatos resistentes (PEREIRA, 2003) e em uma população de mosca do chifre *Haematobia irritans* (VASCONCELOS, 2004), para o qual não foi encontrada explicação dentro dos resultados esperados da técnica.

Grande parte dos agentes químicos possui algum efeito tóxico sobre o DNA, promovendo a alteração do material genético, com consequências que vão desde efeitos pouco severos até muito graves, entre eles, alteração na forma do organismo, defeitos no funcionamento enzimático, câncer e resistência a compostos químicos. Sugerimos a hipótese de que, nos homozigotos, pode ter ocorrido uma alteração em um dos filamentos da molécula de DNA, pela substituição de um nucleotídeo por um análogo de base ou base de pareamento inespecífico, por exemplo, uma 2-aminopurina ou uma 5-bromouracila, ou ainda, por mutação induzida pelo acaricida, gerando uma molécula com conformação

diferente, que justifica o padrão de migração intermediário observado nos haplótipos 2 e 3. Entretanto, para confirmação dessa hipótese, a purificação de cada banda, de cada haplótipo, e o sequenciamento devem ser realizados em trabalho futuro.

As seqüências obtidas a partir das linhagens submetidas ao teste com malation foram comparadas com seqüências publicadas no GenBank e mostraram alta similaridade com a seqüência de uma provável carboxilesterase de *B. microplus* (GenBank-AF182283, descrita por HERNANDEZ *et al.* (2002) e, também, com a seqüência de uma acetilcolinesterase de *B. microplus* (Gen-Bank-AF286096), confirmando que a enzima analisada é membro da superfamília Carboxilesterase. A análise das seqüências confirmou a presença do sítio de restrição *Eco* RI, criado pela mutação de ponto envolvendo dois nucleotídeos nas linhagens tolerante e resistente. Esses resultados confirmam os dados obtidos por PCR-RFLP e sugerem a associação dessas mutações de ponto na expressão da resistência.

A análise das seqüências de aminoácidos deduzidas mostrou a presença de códons de parada (*stop codons*) alternativos nas seqüências da linhagem sensível SM e da linhagem tolerante TM, antes do sítio de restrição para *Eco* RI, porém em posições diferentes. A presença de domínios adicionais foi detectada na seqüência da linhagem resistente RM (sítio de fosforilação para proteína caseína kinase II, sítio de fosforilação para proteína kinase C, sítio para N-glicosilação e um domínio para um sítio de fosforilação para proteína kinase dependente de cAMP e cGMP). Um sítio de amidação foi observado nas seqüências das linhagens tolerante e resistente, porém em posições diferentes. A ausência desses domínios nas linhagens sensível e tolerante pode estar associada à presença de *stop códons* nessas linhagens, produzindo proteínas truncadas e perda dos domínios protéicos.

A presença da acetilcolinesterase 1 (EST-1) apenas nas linhagens tolerante e resistente, com maior atividade na linhagem resistente ao malation (Figura 2, Capítulo 2) pode estar relacionada a presença de proteínas truncadas, devido a aos códons de parada nas seqüências das linhagens sensível e tolerante ao malation. É provável que a proteína truncada detectada na seqüência da linhagem sensível SM, apresente uma atividade esterásica muito baixa frente ao

acaricida, não sendo detectada no gel após o teste de resistência. Outra hipótese é que a sequência analisada seja correspondente à EST-2, enzima presente em todas as linhagens, porém detectada com atividade crescente nas linhagens sensível, tolerante e resistente, respectivamente, indicando que a presença de códons de parada pode estar associada com a menor atividade da enzima.

Os resultados mostram que a mutação de ponto que criou o sítio de restrição *EcoRI* é um evento molecular que ocorreu simultaneamente à uma série de alterações na sequência imediatamente anterior ao sítio e que estão associadas ao aparecimento de prováveis domínios protéicos que favorecem modificações pós-traducionais, tais como sítios de amidação, glicosilação e fosforilação, proporcionando o desenvolvimento da resistência. A ocorrência simultânea dos eventos faz com que o sítio de restrição possa ser utilizado para a detecção de resistência como forma de monitoramento populacional, apesar da mutação que criou o sítio não ser o evento molecular responsável pela resistência. A perda de domínios protéicos devido ao aparecimento de códons de parada, gerando proteína truncadas, é o principal evento molecular para a ocorrência de linhagens de carrapatos tolerantes e sensíveis.

A resistência na população estudada, portanto, pode ser gerada pela combinação de várias mutações no mesmo gene, que alteraram o quadro de leitura (mutações *frameshift*), aumentando a atividade da proteína na hidrólise dos acaricidas. Em artrópodes, a resistência tem sido associada à presença de mutações de ponto, as quais atuam alterando a hidrólise do pesticida e aumentando a eficiência catalítica da enzima (HEMINGWAY *et al.*, 2004; FLORES *et al.*, 2005). Mutações individuais conferem um baixo nível de insensibilidade e a combinação de várias mutações no mesmo gene resulta muitas vezes na expressão elevada da resistência (FFRENCH-CONSTANT *et al.*, 2004; ANSTEAD *et al.*, 2005). SHI *et al.* (2004) analisaram a atividade de AChEs entre linhagens sensíveis e resistentes a organofosforados de *Drosophila melanogaster* e observaram que níveis elevados de resistência são atingidos pela combinação de três ou mais mutações no mesmo gene, aumentando a eficiência catalítica do produto gênico.

Outros biomarcadores, não explorados nesse trabalho, tais como mutações nos genes codificadores do canal de sódio, glutational S-transferases, oxidases e

outras esterases podem, também, estar atuando na expressão global da resistência e devem ser avaliados em trabalhos futuros para a melhor caracterização da resistência e para fornecer informações úteis em programas de manejo e controle do carrapato bovino no Brasil. Um aspecto a ser explorado no controle de carrapatos é a capacidade que os fatores externos, entre eles, os acaricidas, têm em provocar alterações no DNA, que podem culminar em resistência cruzada ou múltipla. O conhecimento do potencial genotóxico dos acaricidas pode possibilitar medidas de controle mais eficientes ou a proibição do uso de determinados compostos químicos, com conseqüentes ganhos para a indústria agropecuária e para o meio ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBA, M. C., GOLIJOW, C. D. 2004. Herpes simplex virus genotyping: multiple optional PCR-based RFLP systems and a non-isotopic single-strand conformation polymorphism method. **J. Virol. Methods** **118**, 73–76.
- ANSTEAD, J. A., WILLIAMSON, M. S., DENHOLM, I. 2005. Evidence for multiple origins of identical insecticide resistance mutations in the aphid *Myzus persicae*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, **35**, 249–256.
- BASSAM, B.J., CAETENO-ANOLLES, G., GRESSHOF, P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. **Ann. Biochem.** **196**, 80-83.
- 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-susctible and resistant cattle ticks. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **32**, 815-820.
- BLUM, H., BEIER, H. GROSS, H.J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, **8**: 93-99.
- DRUMMOND, R. O., CRUST, S. E., TREVINO, J. L., GLADNEY, W. J., GRAHAN, O. H. 1973. *Boophilus annulatus* and: laboratory tests of insecticides. **J. Econ. Entomol.** **66**, 130-133.
- FERREIRA, M.E. e GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa-Cenargem, Brasília.
- FIELD, L.M., BLACKMAN, R.L., TYLER-SMITH, C., DEVONSHIRE, A.L. 1999. Relashionship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae*. **Biochem. J.** **339**: 737-742.
- FLORES, A. E., ALBELDANO-VAZQUEZ, W., SALASA, I.F., BADII, M. H., BECERRA, H. L., GARCIA, G. P., FUENTES, S. L., BROGDON, W. G., BLACKIV, W. C., BEATY, B. 2005. Elevated a-esterase levels associated with

- permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, México. **Pestic. Biochem. Physiol.** **82**, 66–78.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H., DABORN, P. J., LE GOFF, G. 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. **Trends in Genetics**, **20** (3), 163-170.
- 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.
- HEMINGWAY, J., HAWKES, N. J., MCCARROLL, L., RANSON, H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **34**, 653–665.
- 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.
- 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.
- KEMP, D. H., THULLER, R., GALE, K. R., SABATINI, G. A. 1998. Acaricide resistance in cattle tick *Boophilus microplus* and *B. decoloratus*: review of resistance data, standartisation of resistance tests and recommendations for integrated parasite control to delay resistance. Report to the Animal Health Services, AGAH, FAO.
- LI, A.Y., PRUETT, J.H., DAVEY, R.B., GEORGE, J.E. 2005. Toxicological and biochemical characterization of coumaphos resistance in the San Roman strain of *Boophilus microplus* (Acari, ixodidae). **Pestic. Biochem. Physiol.** **81**, 145-153.

- MARUYA, E., ISHIKAMA, Y., LIN, L., TOKUNAGA, K., KIMURA, A., NITA, H., YOKOHAMA, S., SAJI, H. 1996. Allele typing of HLA-A10 group by nested-PCR-low ionic strength single stranded conformation polymorphism and a novel A26 allele (A26KY, A*2605). **Hum. Immunol.** **50(2)**, 140-147.
- OAKESHOTT, J. G., DEVONSHIRE, A. L., CLAUDIANOS, C., SUTHERLAND, T. D., HORNE, I., CAMPBELL, P. M., OLLIS, D. L., RUSSELL, R. J. 2005. Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases. **Chem.-Biol. Interactions** **157-158**, 269-275.
- ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, H., HAYASHI, K., SEKIYA, T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **86**: 2766-2770.
- PEREIRA, C. D. 2003. **Marcadores moleculares e bioquímicos relacionados à resistência no carrapato bovino *Boophilus microplus***. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003, 70p.
- RIVET, Y., MARQUINE, M., RAYMOND, M. 1993. French mosquito populations invaded by A2-B2 esterases causing insecticide resistance. **Biol. J. Linn. Soc.**, **49(3)** 249-255 .
- RODRIGUEZ, M.M., BISSET, J., RUIZ, M., SOCA, A. 2002. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. **J. Med. Entomol.**, **39(6)**, 882-8.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning: a laboratorial manual**, Cold Spring-NY, v.1.
- SHEPPARD, D.C., HINKLE, N.C. (1992). A field procedure using disposable materials to evaluate horn fly insecticide resistance. **J. Agric. Entomol.** **4**: 87-89.
- SHI, M. A., LOUGARRE, A., ALIES, C., FREMAUX, I., TANG, Z. H., STOJAN, J., FOURNIER, D. 2004. Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. **BMC Evolut. Biol.** **4**, 1-8.
- VASCONCELOS, S. M. 2004. **Marcadores moleculares e bioquímicos relacionados à resistência em *Haematobia irritans***. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2004, 95p.

- VILLARINO, M.A., WAGHELA, S.D., WAGNER, G.G., 2001. Histochemical localization of esterases in the integument of the female *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) tick. **J. Med. Entomol.** **38**, 780-782.
- VILLARINO, M.A., WAGHELA, S.D., WAGNER, G.G., 2003. Biochemical detection of esterases in the adult female integument of organophosphate-resistant *Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae). **J. Med. Entomol.** **40**, 52-57.
- YOON , K. S., GAO, J. R., LEE, S. H., COLES, G. C., MEINKING, T. L., TAPLIN, D., EDMAN, J. D., TAKANO-LEE, M., CLARK, J. M. 2004. Resistance and cross-resistance to insecticides in human head lice from Florida and California. **Pest. Biochem. Physiol.** **80(3)**, 192-201.

CONCLUSÕES GERAIS

- Duas CaEs foram expressas em todas os estágios do desenvolvimento e consideradas como produtos de genes *housekeeping*.
- Esterases estágio-específicas e sexo-específicas foram detectadas durante o desenvolvimento.
- Linhagens sensíveis, tolerantes e resistentes ao organofosforado malation e ao piretróide deltametrina foram selecionadas após o teste de resistência.
- Uma AChE (EST-1), detectada apenas nas linhagens tolerantes e resistentes, porém com maior intensidade de coloração nas linhagens resistentes foi associada à resistência.
- Uma AChE (EST-2), detectada em todas as linhagens, porém com grau crescente de atividade esterásica, de acordo com o nível de resistência, também foi associada à resistência aos acaricidas.
- Mecanismos de amplificação gênica e modificações pós-traducionais foram associados ao aumento na atividade das AChEs EST-1 e EST-2.
- A genotipagem por PCR-RFLP indicou a associação entre a presença do alelo mutante para o polimorfismo *Eco* RI e o fenótipo resistente.
- A presença de códons de parada, gerando proteínas truncadas e perda de domínios proteicos foi associada à ocorrência de linhagens de carrapatos sensíveis e tolerantes aos acaricidas.
- A análise das sequências de aminoácidos mostrou domínios protéicos adicionais na linhagem resistente que favorecem modificações pós-traducionais e que foram associados às diferentes mutações de ponto, alterando a atividade das proteínas traduzidas e associadas à resistência.

ANEXOS

1-PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA

W. S. SHEPPARD, G. J. STECK and B. A. MACPHERON. (*Experimentia* 48: 1010 - 1013; 1992)

1. Lavar 3 x por 15' em tampão de lavagem.
2. Macerar em nitrogênio líquido.
3. Colocar 600uL de tampão de Grinding para lavar o cadinho e transferir a solução para tubo de eppendorf de 2mL.
4. Acrescentar 600uL de tampão de lise e deixar os tubos de eppendorf no gelo por 15 minutos.
5. Acrescentar 10uL proteinase K e levar ao banho maria (45°C) por 45 minutos.
6. Acrescentar 10uL de Rnase e manter a 37°C por 1 hora.
7. Acrescentar fenol (dobrar volume) e centrifugar 1 minuto a 5000 rpm.
8. Coletar sobrenadante e transferir para outro tubo. Descartar fase inferior.
9. Acrescentar fenol: clorofil (1:1) para dobrar o volume.
10. Centrifugar a 1 minuto por 5000rpm
11. Coletar o sobrenadante e dobrar o volume com fenol: clorofórmio: álcool isoamilico (25:24: 1).
12. Centrifugar por 1 minuto por 5000 rpm.
13. Coletar sobrenadante e transferir para outro tubo. Descartar fase inferior.
14. Acrescentar 1/10 do volume final de NaCl 2M e dobrar o volume com etanol 100% gelado.
15. Estocar a -20°C por 2 horas ou overnight para precipitar o DNA.
16. Centrifugar por 15 min. a 13.000 rpm.
17. Lavar com 500uL de etanol 70%. Cuidado para não descartar o pellet.
18. Secar e ressuspender em 70 µL de água destilada.

TAMPÃO DE GRINDING

10 mM Tris	30 μ L de Tris 1M
60mM NaCl	90 μ L de NaCl 2M
30 mM sacarose	120 μ L de sacarose 50%
10 mM EDTA	60 μ L de EDTA 0,5M
Água	2700 μ L
Volume total	3.000 μL

TAMPÃO DE LISE

300 mM Tris	600 μ L de Tris 1M
40 mM SDS	115 μ L de SDS 20%
20 mM EDTA	80 μ L de EDTA 0,5M
0,7% DEPEC	14 μ L de DEPEC
Água	1191 μ L
Volume total	2.000 μL