

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Aline Pasqualini Faza

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES DO
CARRAPATO DOS BOVINOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS ÀS PRINCIPAIS BASES
QUÍMICAS CARRAPATICIDAS**

Juiz de Fora

2013

Aline Pasqualini Faza

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES DO
CARRAPATO DOS BOVINOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS ÀS PRINCIPAIS BASES
QUÍMICAS CARRAPATICIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Erik Daemon

Co-orientadora: Dra. Márcia Prata

Juiz de Fora

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Faza, Aline Pasqualini.
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES DO CARRAPATO DOS BOVINOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS ÀS PRINCIPAIS BASES QUÍMICAS CARRAPATICIDAS / Aline Pasqualini Faza. -- 2013.
24 p. : il.

Orientador: Erik Daemon
Coorientador: Márcia Prata
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2013.

1. DNA. 2. Rhipicephalus microplus. 3. sensibilidade. I. Daemon, Erik, orient. II. Prata, Márcia, coorient. III. Título.

Aline Pasqualini Faza

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES DO
CARRAPATO DOS BOVINOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS ÀS PRINCIPAIS BASES
QUÍMICAS CARRAPATICIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre

Aprovado em 05 de fevereiro de 2013

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Erik Daemon (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Elizângela Guedes
Embrapa Gado de Leite

Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata
Embrapa Gado de Leite

A minha família e ao Rodrigo, pela
compreensão e apoio de sempre.

Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. Erik Daemon pela oportunidade, pelos ensinamentos e principalmente pela compreensão.

A Dra. Márcia Prata pelos ensinamentos, apoio, incentivo, confiança, amizade e principalmente pelo projeto concedido. Muito obrigada por tudo.

Ao Dr. John Furlong pelos ensinamentos e incentivo.

A Dra. Marta Fonseca Martins pelas contribuições durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Isabela Fonseca e Gustavo Rezende por me ensinarem a trabalhar com as técnicas moleculares utilizadas neste trabalho.

A amiga Isabella Barreto que teve participação fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada pela amizade e ajuda de sempre.

Ao amigo Caio Monteiro que sempre me ajudou, incentivou e apoiou, sem ele não teria chegado até aqui.

Aos amigos de laboratório, Tatiane, Ralph, Fernanda e Vivi pela amizade durante o mestrado, pela troca de conhecimentos e pelos momentos vividos.

Ao programa de pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de fora, MG e aos professores do programa, pelos ensinamentos.

Ao meu esposo Rodrigo, que sempre esteve ao meu lado me apoiando, incentivando, e me dando força para seguir e em especial aos meus filhos Matheus e a Mariana por serem bonzinhos e dormirem cedo, amo vocês!

A minha mãe, ao Rômulo e a Isabela, vocês são à base de tudo!

À Deus pela vida, saúde e força.

À Capes pela bolsa concedida.

À Fapemig pelo financiamento do projeto.

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve
que renunciar para conseguir”.

Dalai lama

Sumário

Lista de tabelas.....	viii
Lista de abreviaturas e siglas.....	ix
Lista de ilustrações.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1 Introdução.....	13
2 Material e Métodos.....	15
3 Resultados e Discussão.....	18
4 Referências Bibliográficas.....	22

Lista de tabelas

Tabela 1: Número de populações de carrapatos dos bovinos genotipadas e percentual de resistência/suscetibilidade por ano e por base química.....20.

Lista de abreviaturas e siglas

AChE - Acetilcolinesterase

CaE - Carboxilesterase

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

GSTs - Glutationa S- transferases

NaCl - Cloreto de sódio

pb - Pares de bases

PCR - Reação em cadeia da polimerase

SDS - Dodecil sulfato de sódio

Tris-HCl - Trisaminometano hidrocloreto

Lista de Ilustrações

Fotografia 1: Produtos da PCR pós digestão com enzima de restrição *EcoRI*, em larvas do carrapato dos bovinos aplicados em gel de agarose corado em brometo de etídio mostrando os três fragmentos de 372, 300 e 72pb, que conferem resistência/suscetibilidade ao grupo químico dos organofosforados.....18.

Fotografia 2: Produtos da PCR após digestão com enzima de restrição *Eco RI*, em larvas do carrapato dos bovinos aplicados em gel de agarose corado em brometo de etídio mostrando os dois fragmentos de 68pb¹, que confere suscetibilidade e o fragmento 68pb² que confere resistência ao grupo químico dos piretroides.....19.

Resumo

O monitoramento da resistência de populações do carrapato dos bovinos às bases químicas em uso tem se limitado ao perfil fenotípico, havendo escassez de registros abordando perfil genotípico da resistência para carrapaticidas no Brasil. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo efetuar a caracterização molecular e traçar perfil genético da resistência de populações de *Rhipicephalus microplus* aos grupos químicos dos organofosforados e piretroides. Para tal, foram genotipadas larvas constituintes de 893 populações (587 para piretroides e 306 para organofosforados) do carrapato dos bovinos, utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase. Foi constatado que 75,49 e 97,44% das amostras processadas apresentavam resistência para organofosforados e piretroides, respectivamente. Entre as populações resistentes a piretroides, verificou-se que 91,9% são heterozigotas, evidenciando que a maior parte das populações resistentes apresenta apenas um alelo responsável pela resistência. Assim, é possível concluir que as populações genotipadas provenientes do estado de Minas Gerais, apresentam alto grau de resistência aos organofosforados e principalmente aos piretroides. Estas informações são fundamentais para melhor compreensão dos mecanismos de resistência de *R. microplus* aos carrapaticidas, o que pode contribuir para aprimorar técnicas de controle.

Palavras chave: DNA, *Rhipicephalus microplus*, sensibilidade.

Abstract

The monitoring of the resistance of cattle tick populations in Brazil to the chemical bases in use is largely limited to investigation of the phenotypic profile. There are few studies investigating the role played by the genotypic profile in acaricide resistance in the country. Therefore, the aim of the present study was to carry out molecular characterization and trace out the genetic profile of populations of *Rhipicephalus microplus* with respect to resistance to the organophosphate and pyrethroid chemical groups. For that purpose, were genotyped larvae belonging to 893 populations (587 for pyrethroids and 306 for organophosphates), using the polymerase chain reaction technique. It was found that 75.49% and 97.44% of the samples studied showed resistance to the organophosphates and pyrethroids, respectively. Among the populations resistant to pyrethroids, 91.9% were heterozygotes, showing that most of the resistant populations have only one allele responsible for resistance. Therefore, it is possible to conclude that the genotyped populations have high resistance to organophosphates, and even more so to pyrethroids. This information are fundamental to understanding the mechanisms of resistance of *R. microplus* to acaricides, which can help to improve control techniques.

Key words: DNA, *Rhipicephalus microplus*, sensibility.

1 Introdução

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) é um ectoparasito de bovinos de grande importância nos países tropicais, pois efetua espoliação sanguínea e atua na transmissão de patógenos, o que leva a perdas significativas nos sistemas de produção de carne e leite, gerando aumento nos custos de produção. De acordo com dados do Ministério da Agricultura, os prejuízos econômicos no Brasil chegam a dois bilhões de dólares anuais (Grisi et al., 2002). Mesmo não havendo registros específicos para cada estado brasileiro, pode-se inferir que a maior parte dos prejuízos esteja relacionada ao estado de Minas Gerais, devido à sua expressividade na cadeia produtiva do leite (Yamaguchi et al., 2006), uma vez que bovinos leiteiros são os mais susceptíveis ao parasitismo pelo carrapato dos bovinos.

Dos fatores determinantes relatados, o único que pode ter a influência direta do homem, seja agravando, seja amenizando o problema, é o procedimento de combate. O histórico desta ação no Brasil e no mundo, no entanto, não é dos mais animadores. Com pouca preocupação no uso correto das poucas bases químicas disponíveis, o que se tem feito nas últimas décadas é a prática do uso indiscriminado e inadequado dos princípios ativos de cada grupo químico, que têm se tornado ineficazes devido à seleção e proliferação de populações de carrapatos resistentes. Assim ocorreu com os arsenicais no Brasil na década de 40 e em seguida com os organoclorados, por volta de 1950 (Nolan e Roulston, 1979). Dos grupos químicos atualmente em uso, foram registrados casos de resistência aos organofosforados na década de 70 e às amidinas e piretroides nos anos 80 (Nolan, 1990), sendo este último grupo considerado totalmente ineficaz em formulações isoladas no combate ao carrapato dos bovinos no Brasil, após dez anos de monitoramento da resistência (Furlong et al., 2007). Atualmente não é raro encontrar populações de carrapatos com um complexo de resistência a organofosforados, amidínicos e piretroides no Brasil e no mundo (Martins et al., 1995; Rodriguez Vivas et al., 2006; Furlong et al., 2007; Thullner et al., 2007).

Enquanto estratégias alternativas como a utilização de vacinas, fitoterápicos e controladores biológicos ainda estão em fase de estudo e aprimoramento, o controle desse artrópode vem sendo realizado com a utilização de compostos químicos (Silva, 2008). No entanto, nem sempre o resultado esperado tem sido alcançado, pois o uso contínuo e em muitas vezes de forma inadequada desses compostos tem levado a seleção de carrapatos resistentes (Gomes et al., 2011).

Diante deste problema, no ano de 1997 a Embrapa Gado de Leite implementou o teste de eficácia de carrapaticidas, para determinação do produto adequado para aplicação em cada propriedade a partir de amostras de carrapatos enviadas pelos produtores. Esse bioensaio é fundamentado na imersão de fêmeas ingurgitadas (Drummond et al., 1973), que fornece informações fenotípicas sobre o grau de resistência de diferentes populações do carrapato (Furlong et al., 2007), sem entretanto, elucidar as origens genotípicas de tal resistência. Outra limitação se refere ao período necessário para a realização do teste, 35 dias, o que não condiz com a urgência do produtor em obter a orientação necessária para a implementação de um controle eficiente.

Na busca de melhor compreensão sobre os mecanismos da resistência, pesquisas têm focado avaliações sobre mutações de ponto, modificação de sítios-alvo e aumento da detoxificação metabólica por esterases, oxidases e glutathione S- transferases (GSTs) (Soderlund e Lee, 2001; Hemingway et al., 2002; Hernandez et al., 2002; Baffi et al., 2007).

As esterases estão envolvidas na via metabólica responsável pela detoxificação de organofosforados. Estes compostos bloqueiam estas vias fosforilando as esterases. Baxter e Barker (1998) relacionaram a resistência de linhagens de carrapatos da Austrália com mutações presentes no gene da acetilcolinesterase 1 (AChE 1). Em outro trabalho, também, foi identificado que linhagens de carrapato mexicanas resistentes a piretroides apresentavam um alto nível de atividade da enzima carboxi-esterase (Jamroz et al. 2000).

As GSTs são uma família de enzimas envolvidas em transporte e digestão intracelular, síntese de prostaglandinas e detoxificação de compostos tóxicos gerados nas reações de estresse oxidativo (Lee et al., 2002; Rosa et al., 2002, Enayati et al., 2005).

Assim, com intuito de agregar mais informações ao conhecimento do fenômeno da resistência, o presente trabalho foi elaborado, com o objetivo de traçar um perfil genotípico da resistência de populações do carrapato dos bovinos a piretroides e organofosforados.

2 Material e Métodos

Foram utilizadas larvas de *R. microplus* provenientes de fêmeas ingurgitadas de 893 propriedades rurais do Estado de Minas Gerais (587 para piretroides e 306 para organofosforados), constituintes do grupo controle de cada teste de imersão (Drummond et al., 1973) realizados entre 2005 e 2009 no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora (MG) a partir de amostras enviadas por produtores. Após a leitura da eclosão das larvas do grupo controle, as mesmas foram acondicionadas em microtubos previamente identificados e mantidas em freezer com temperatura -80°C , até o momento de serem transferidas para o Laboratório de Genética Molecular Dr. Mário Luiz Martinez para análise da caracterização molecular da resistência a organofosforados e piretroides.

2.1 Teste de Imersão

No Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, os carrapatos serão registrados, lavados em água corrente e secos em papel absorvente. As amostras foram submetidas ao teste de sensibilidade dos carrapatos aos carrapaticidas ou teste de imersão de fêmeas ingurgitadas, segundo metodologia preconizada por Drummond et al. (1973). A última etapa do teste de imersão consiste na avaliação do percentual de eclosão larval, um dos parâmetros empregados para cálculo da eficácia dos produtos avaliados. Após esta avaliação, normalmente as larvas são sacrificadas em estufa a 150°C e descartadas. Para o presente estudo, no entanto, as larvas constituintes do grupo controle de cada amostra analisada serão armazenadas em freezer a -80°C para a realização das análises biomoleculares.

2.2 Extração do DNA das larvas

O DNA foi extraído das larvas individualmente conforme Sheppard et al. (1992) modificado. Para tal, uma larva de cada população foi colocada em um microtubo e macerada em 300 μl de Tampão de *Grinding* (10 mM Tris-HCl, 60 mM NaCl, 30 mM sacarose, 10 mM EDTA). Acrescentou-se 300 μL de Tampão de Lise (300 mM Tris-HCl, 40 mM SDS, 20 mM EDTA) e as amostras foram incubadas no gelo por 15 minutos. Decorrido este tempo, foram acrescentados 5 μL de Proteinase K (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e as amostras foram incubadas a 56°C por 1 hora. Em seguida, acrescentou-se 300 μL de

fenol e 300 µL de clorofórmio: isoamil (24:1) misturou-se por pipetagem e centrifugou-se por 5 min a 17.000 x g.

A fase superior foi transferida para um novo microtubo e foram acrescentados 600 µL de clorofórmio: isoamil (24:1) e novamente misturados por pipetagem. Na sequência as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 17.000 x g e a fase superior foram transferidas para um novo microtubo. Acrescentaram-se então 60 µL de NaCl 5 M e 1000 µL de etanol para a precipitação do DNA e as amostras foram estocadas a -20°C *overnight*. O passo seguinte foi lavar o *pelete* com 100 µL de etanol 70% e centrifugar os microtubos a 17000 x g por 5 min. Descartado o sobrenadante, os tubos foram abertos e colocados deitados em superfície estéril por 30 min a temperatura ambiente. O último passo consistiu em ressuspender o *pelete* em 20 µL de água ultrapura.

Após a extração foram realizadas a quantificação e a avaliação da qualidade das amostras por meio de espectrofotometria (Nanodrop®1000 Technologies, Wilmington, DE, USA). Os parâmetros para avaliação da qualidade da amostra utilizados foram a concentração (ng/µL) e pureza da amostra, denominada $A_{260/280}$, cujo valor ideal é 1,8. A comprovação desta avaliação foi realizada por meio da técnica de PCR (polymerase chain reaction).

2.2.1 Reação de PCR e eletroforese para caracterização molecular

Para reação de PCR foi realizado um teste para verificação da condição ótima de amplificação de cada marcador, sendo verificadas temperatura de anelamento e concentração de magnésio. As amostras foram amplificadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), de acordo com as condições específicas dos pares de primers utilizados para avaliação da resistência a piretroides e organofosforados.

2.2.2 PCR para piretroides:

Para obtenção do genótipo da resistência e suscetibilidade das larvas do carrapato dos bovinos ao grupo químico dos piretroides foram utilizados dois primers forward: FG222: 5'-TTATCTTCGGCTCCTTCA-3' e FG221: 5' - TTATCTTCGGCTCCTTCT-3' e um primer reverse comum para os dois FG227: 5'-TTGTTTCATTGAAATTGTCGA-3', descritos por Guerrero et al. (2001). Para a reação

de PCR foram utilizados 20 ng de DNA, 1,0 μ m de cada *primer* e 1X de *GoTaq[®]Green Master Mix* (Promega) em um volume final de 25 μ l. A reação de PCR consistiu de desnaturação prévia a 95°C por 5 min, seguida de 10 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 65°C por 1 min (com decréscimo de 1°C por ciclo) e extensão a 72°C por 1 min, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7min.

Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio. O gel foi revelado em fotodocumentador Eagle Eye II (Stratagene) para identificação das bandas.

2.2.3 PCR para organofosforados:

Para determinação da resistência e suscetibilidade ao grupo químico dos organofosforados em larvas do carrapato dos bovinos foi utilizado o par de primers GS138B 5'- GCATCGACCTCTCGTCCAAC - 3' e GS139R 5' - GTCGGCATACTTGTCTTCGATG - 3', descrito por Hernandez et al (2002).

Para a reação de PCR foram utilizados 20 ng de DNA, 0,5 μ m de cada *primer* e 1X de *GoTaq[®]Green Master Mix* (Promega) em um volume final de 25 μ L. A PCR consistiu de uma desnaturação prévia de 95°C por 5 min, seguida por 10 ciclos de 95°C por 1 min, 65°C por 1 min com decréscimo de 1°C por ciclo e 72°C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min com um período de extensão final de 72°C por 7 min.

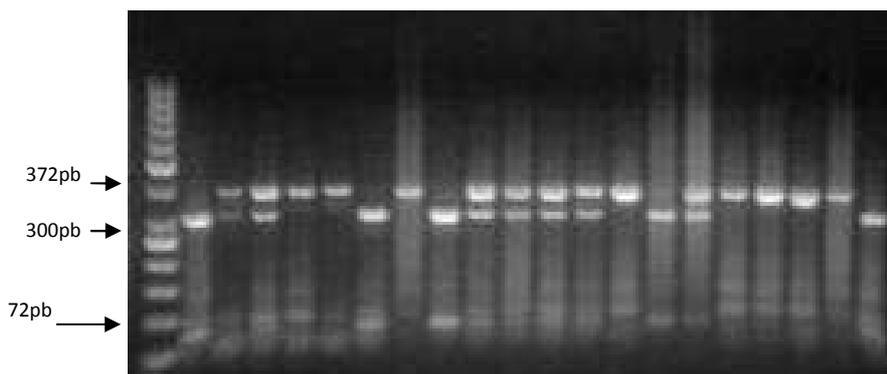
O produto da PCR foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* a 37°C por 3 horas e submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,8%, corado em solução de brometo de etídio. O gel foi revelado em fotodocumentador Eagle Eye II (Stratagene) para identificação das bandas.

2.3 Análise Estatística:

Os valores obtidos em porcentagem foram transformados em arco seno de x. As médias referentes ao percentual de resistência e suscetibilidade para organofosforados e piretroides foram comparadas por teste de Anova e Tukey a níveis de significância de 5%.

3 Resultados e Discussão

No gel apresentado no fotografial1 podem ser identificadas três bandas que se referem aos alelos relacionados à resistência a organofosforados. O fragmento de 372pb que caracteriza o alelo A (sensível), os fragmentos de 300pb e 72pb que determinam o alelo B (resistente) e a presença dos três fragmentos de 372, 300 e 72pb que caracterizam o genótipo AB (resistência moderada).

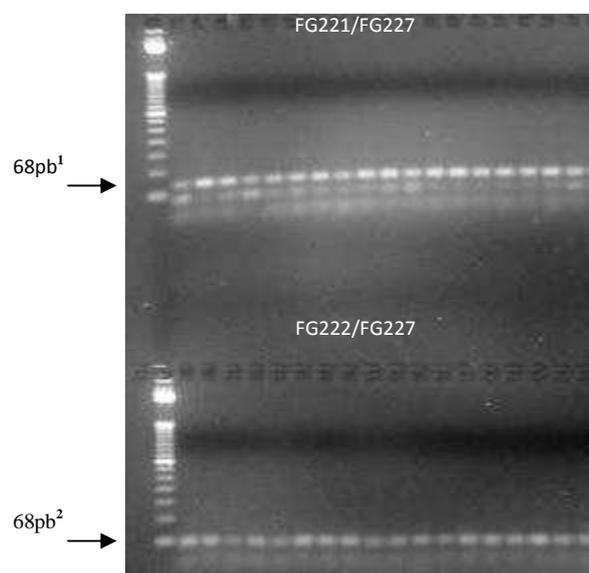


Fotografia1: Produtos da PCR após digestão com *EcoRI*, em larvas de *R. (B.) microplus* aplicados em gel de agarose corado em brometo de etídio mostrando os três fragmentos de 372, 300 e 72pb, que conferem resistência/suscetibilidade ao grupo químico dos OPs.

Os resultados encontrados revelam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o percentual médio de larvas suscetíveis (27,3%) e resistentes (72,2%) aos organofosforados (tabela 1), podendo estas ser homo ou heterozigotas para o gene que codifica a *CaE*. A partir da análise destes resultados constata-se que a situação é ainda mais grave do que se conhecia até então, pois o perfil determinado pelas análises fenotípicas dessas mesmas populações evidenciaram níveis de 40,66 e 59,34% para resistência e suscetibilidade a organofosforados, respectivamente. Situação semelhante foi encontrada por Baffi et al. (2007) com populações de carrapatos oriundos de Uberlândia MG, com perfis genotípicos de 23 e 77% e correspondentes fenotípicos de 50,77 e 49,33% para, respectivamente, sensibilidade e resistência a organofosforados. A explicação para a aparente discrepância entre perfis genotípicos e fenotípicos em ambos os experimentos pode estar relacionada ao fenômeno de semidominância. Segundo Klafke (2008) a resistência a organofosforados normalmente é determinada por um único gene semidominante. Como consequência, os indivíduos heterozigotos manifestam a resistência, porém em menor grau que os homozigotos resistentes. Tais diferenças podem ser devidas, ainda, à ocorrência de mutações em locais diferentes dos

que foram avaliados nos respectivos experimentos. De qualquer forma, confirma-se, pelos resultados apresentados, a intensa pressão de seleção em favor da resistência a organofosforados, grupo químico dos mais antigos utilizados no controle de *R. microplus* no Brasil e um dos mais utilizados na composição dos carrapaticidas disponíveis na atualidade, seja em formulações simples, seja em associação com outros grupos químicos (Gomes et al., 2011).

O fragmento de 68pb amplificado com o par de primers FG221/FG227 caracteriza a suscetibilidade (alelo A) a piretroides e o fragmento amplificado de 68pb com o par de primers FG222/FG227 caracteriza a resistência (alelo B). A presença dos dois fragmentos (AB) remete a uma resistência moderada (fotografia2) das larvas ao composto químico.



Fotografia2: Produtos da PCR após digestão com *EcoRI*, em larvas de *R. (B.) microplus* aplicados em gel de agarose corado em brometo de etídio mostrando os dois fragmentos de 68pb¹, que confere suscetibilidade e o fragmento 68pb² que confere resistência ao grupo químico dos PIs.

Diferenças significativas também foram constatadas ($p < 0,05$) entre o percentual médio de larvas resistentes (99,3%) (AB ou BB) e suscetíveis (0,7%) (AA) aos piretroides (Tabela 1), sendo que 92,9% das larvas resistentes foram identificadas como heterozigotas (AB) e 6,4% como homozigotas (BB). Através destes resultados constata-se que a maioria das populações resistentes aos piretroides apresenta apenas um alelo responsável por essa resistência, informação de extrema relevância, pois pode significar a possibilidade de reversão da resistência a este grupo químico, por exemplo, por introdução de indivíduos sensíveis na população, estimulando a realização de estudos para viabilização desse processo.

Tabela 1. Número de populações de carrapatos dos bovinos genotipadas e percentual de resistência/suscetibilidade por ano e por base química.

Base química	Piretroide				Organofosforado			
	Resistente		Susceptível		Resistente		Susceptível	
	N	%	N	%	N	%	N	%
2005	63	100,0	0	0,0	61	80,3	15	19,7
2006	–	–	–	–	12	75,0	12	25,0
2007	46	100,0	0	0,0	101	74,3	35	25,7
2008	38	100,0	0	0,0	10	55,6	8	44,4
2009	425	97,4	15	2,6	47	78,3	13	21,7
⁽¹⁾ Média (%) ±	99,3 ^a ±1,3		0,7 ^b ±1,5		72,2 ^a ±8,8		27,3 ^b ±8,8	
Desvipad								

Médias comparadas por teste de Anova e Tukey em nível de significância de 5%. Letras diferentes indicam diferença significativa entre percentual de suscetibilidade e resistência no grupo químico.

⁽¹⁾Comparação entre as médias dos percentuais de resistência e suscetibilidade nos grupos químicos piretroide e organofosforado.

– - Testes não realizados.

No caso dos piretroides, a comparação entre resultados genotípicos e fenotípicos, neste último, tendo sido evidenciado perfil de 100% de resistência, demonstra correspondência de resultados e confirma o grave quadro de resistência, o que representa, na prática, total ineficiência de formulações simples de piretroides para controle do carrapato dos bovinos, conforme já registrado por Gomes et al. (2011). O perfil fenotípico de alta resistência a esse grupo químico também foi observado por Mendes et al. (2011), que constataram 82,6% de resistência a cipermetrina e 86,36% a deltametrina. Além disso, 50% das 24 populações testadas por esses autores apresentaram resistência aos dois grupos estudados, piretroides e organofosforados, demonstrando resistência generalizada às bases químicas disponíveis. Em pesquisas efetuadas em outras regiões, embora também tenham sido verificados altos níveis de resistência a piretroides (Guerrero et al., 2002; Hernandez et al., 2002), não foi evidenciado o quadro de extrema gravidade conforme o diagnosticado em populações brasileiras do carrapato dos bovinos.

Em estudo conduzido por Guerrero et al. (2001), foram analisadas 11 populações oriundas do México e do Texas, destas, quatro foram caracterizadas como resistentes

aos piretroides, resultado diferente do encontrado no presente estudo, em que a maioria das larvas genotipadas foram diagnosticadas como resistentes. A diferença observada pode ter ocorrido devido à complexidade com que se dá a resistência, pois envolve diversas enzimas e rotas metabólicas, por isso é provável que diversos outros genes desempenhem importantes papéis no perfil global da resistência. Além disso, são populações oriundas de diferentes países e com realidades diferentes, sendo que o perfil da resistência encontrada no Brasil em especial no Estado de Minas Gerais é preocupante, sendo necessário um trabalho de controle mais severo.

Segundo Mendes et al. (2011), os maiores agravantes para o aumento da resistência estão relacionados com a escolha do produto carrapaticida. Para 85,8% dos produtores enfocados, a determinação se faz através de indicações; 10,8% não têm critério de escolha e apenas 3,4% utilizam o resultado dos testes de imersão.

A partir dos resultados obtidos no presente estudo alerta-se para a necessidade de estabelecimento de programas de orientação de produtores para uso racional dos carrapaticidas disponíveis, objetivando controle eficiente e retardamento do processo de resistência, preservando-se, desta forma, as poucas bases químicas disponíveis, garantindo assim, mais saúde dos animais e, conseqüentemente, dos consumidores dos produtos agropecuários. Tais fatores também irão contribuir para redução de custos de produção e riscos de contaminação do ambiente.

Além disso, estimula-se a realização de estudos direcionados à viabilização do processo de reversão da resistência a piretroides e ainda à melhor compreensão de processos relacionados à resistência a organofosforados, como o fenômeno de semidominância.

4 Referências Bibliográficas

BAXTER, G.D., BARKER, S.A. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *Boophilus microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, p. 581–589, 1998.

BAFFI, M.A.; SOUZA, G.R.L.; VIEIRA, C.U. et al. Identification of point mutations in a putative carboxylesterase and their association with acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.148, p.301-309, 2007.

DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O .H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v.66, n.1, p.130-133, 1973.

ENAYATI, A.A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, v. 1, p. 3-8, 2005.

FURLONG, J. ; MARTINS, J. R. ; PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 27, p. 26-32, 2007.

GOMES, A.; KOLLER, W.W.; BARROS, A. T. M. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.41, n.8, p.1447-1452, 2011.

GRISI, L; MASSARD, C.L; MOYA BORJA,G.E. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos do Brasil. **A Hora Veterinária**, v.21, n.125, p.8-10, 2002.

GUERRERO,F.D.; DAVEY, R.B.; MILLER, R.J. Use of an Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Assay to Genotype Pyrethroid Resistant Strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.38, n.1, p.44-50, 2001.

GUERRERO, F.D.; LI,A.Y.; HERANDEZ,R. Molecular Diagnosis of Pirethroid resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.39, n.5, p.770-776, 2002.

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

HERNANDEZ, R.; GUERRERO,F.D.; GEORGE, J.E. et al. Allele Frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p.1009-1016, 2002.

JAMROZ, R.C., GUERRERO, F.D., PRUETT, J.H., OEHLER, D.D., MILLER, R.J. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from

Mexican strains of the southern cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Insect Physiology**, v.46, p.685–695, 2000.

LEE A.J., HUNTLEY J., VAN DEN BROEK A., COATES D. & ISAAC R.E. Expression and characterisation of a *Psoroptes ovis* glutathione S-transferase. **Veterinary Parasitology**, v.105, p. 49-63, 2002.

MARTINS, J. R. ; CORREA, B. L. ; CERESER, V. H. ; ARTECHE, C. C. P. A situation report on resistance to acaricides by the cattle tick *Boophilus microplus* in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Seminário internacional de Parasitologia Animal**, Acapulco, Mexico, p. 1-8. 1995.

MENDES, M.C.; LIMA, C.K.P.; NOGUEIRA, A.H.C. et al. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.178, p.383–388, 2011.

NOLAN, J.;ROUSTON, W.J. Acaricide resistance as a factor in the management of Acari of medical and veterinary importance. **Recent Advances in Acarology**. v.2, p.3, 1979.

NOLAN, J. Acaricide resistance in single and multi-host ticks and strategies for control. **Parassitologia**, v.32, p.145-153, 1990.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J. et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* **Biologia, Controle e Resistência**. in: KLAFKE, G.M. Resistência *R. (B.) microplus* contra os carrapaticidas. 1.ed. Med Vet: São Paulo, 2008. p.81-105.

RODRIGUEZ VIVAS, R.I.; RODRIGUEZ-AREVALO, F.; ALONSO-DIAZ, M.A.; FRAGOSO-SANCHEZ, H.; SANTAMARIA, V.M.; ROSARIO-CRUZ, R. Prevalence and potencial risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the State of Yucatan, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v.75, p. 280-286, 2006.

ROSA DE LIMA M.F., SANCHEZ FERREIRA C.A., JOAQUIM DE FREITAS D.R., VALENZUELA J.G. & MASUDA A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p. 747-754, 2002.

SHEPPARD, D.C.; HINKLE, N.C. A field procedure using disposable materials to evaluate horn fly insecticide resistance. **Journal of Agricultural Entomology**, v.4, p.87-89, 1992.

SILVA, HELOÍSA CRISTINA.; Parâmetros Farmacocinéticos e Atividade Endectocida de uma Nova Formulação Contendo Avermectinas, Via Tópica (pour-on), em Bovinos. 2008. 121 f. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

SODERLUND D.M.; LEE, S.H. Point Mutations in Homology Domain II Modify the Sensitivity of Rat Na_v1.8 Sodium Channels to the Pyrethroid Insecticide Cismethrin. **Neuro Toxicology**, v. 22, n.6, p. 755-765, 2001.

THULLNER, F.; WILLADSEN, P.; KEMP, D. Acaricide Rotation Strategy for Managing Resistance in the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acarina: Ixodidae): Laboratory Experiment with a Field Strain from Costa Rica. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 5, p. 817- 821, 2007.

YAMAGUCHI, L.C.T.; MENDES, L. C. R.; LIMA I.B.; RODRIGUES, C. DO C.; COELHO M.A.DE O. **Qualidade e eficiência na produção de leite**. 1 ed. Juiz de Fora, 2006. v. 1, p. 219-230.