

## **ISOLAMENTO DE LARVAS DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS A PIRETRÓIDES PARA A DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMOS RELACIONADOS**

**Modalidade:** ( ) Ensino (X) Pesquisa ( ) Extensão

**Nível:** ( ) Médio (X) Superior ( ) Pós-graduação

**Área:** ( ) Química ( ) Informática ( ) Ciências Agrárias ( ) Educação (X) Multidisciplinar

Thayse Juliana RODRIGUEZ<sup>1\*</sup>; Ohana Vilhena Castro NUNES<sup>1</sup>; Ana Paula A. VEIGA<sup>1</sup>; Marlise Pompeu CLAUS<sup>1</sup>; Viviane MILCZEWSKI<sup>1</sup>; Antônio Pereira SOUZA<sup>1,2</sup>; André Luis Fachini SOUZA<sup>1\*\*</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Federal Catarinense – *Campus* Araquari; <sup>2</sup>Universidade do Estado de Santa Catarina – CAV/Lages; \*Bolsista PIBITI - Edital 503/2014; \*\*Orientador.

### **Introdução**

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é responsável por grandes perdas econômicas na pecuária bovina. Os prejuízos ocorrem por efeitos diretos como anemia, emagrecimento, diminuição do rendimento produtivo e lesões na pele que se refletirão na baixa qualidade do couro. Estes ectoparasitas são responsáveis por prejuízos econômicos expressivos, estimados, somente no Brasil, em 2 bilhões de dólares por ano (GRISI, 2002).

O uso de carrapaticidas é o principal meio de combate a esse ectoparasita, entretanto, devido a constante aplicação de produtos químicos, bem como as características do ciclo de vida do carrapato e a sua distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, houve um acentuado desenvolvimento de resistência aos carrapaticidas. Atualmente, das sete classes de carrapaticidas registradas no Brasil, cinco estão comprometidas parcial ou totalmente pela resistência, dependendo da fazenda ou região (MENDES et al., 2007).

Portanto, o controle do *R. (B.) microplus* representa um desafio para a viabilidade da pecuária mundial, tanto pelos custos com os tratamentos, quanto pela incerteza da eficácia do controle pelo uso das drogas comumente utilizadas. (GUERREIRO et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi isolar larvas de *R. (B.) microplus* resistentes e susceptíveis a piretróide (cipermetrina) para análise de polimorfismos genômicos associados à resistência de carrapatos, coletados a partir de bovinos do rebanho da Unidade de Ensino e Aprendizagem (UEA) – Gado Leiteiro do IFC – Araquari, com histórico de resistência a piretróides.

### **Material e Métodos**

Teleóginas de *R. (B.) microplus* foram coletadas aleatoriamente dos bovinos do rebanho da Unidade de Ensino e Aprendizagem (UEA) – Gado Leiteiro do IFC – *Campus Araquari*, em diferentes dias.

As fêmeas ingurgitadas foram devidamente pesadas e incubadas em estufa bacteriológica para realização da postura em temperatura (27 – 29 °C) e umidade (70 – 90%) controladas. Após a postura, um *pool* de ovos proveniente de 2 a 3 teleóginas foi transferido para seringas de plástico e novamente incubados nas mesmas condições para eclosão. Na sequência, foram submersos em soluções de cipermetrina (piretróide), em quatro diferentes diluições (1:2, 1:4 e 1:6), durante cinco segundos. Os grupos controle foram submersos em água destilada por igual período de tempo. Na sequência os conjuntos foram colocados na capela de exaustão por 1 hora para secagem e mantidos em temperatura ambiente por 24 horas.

A separação e contagem de larvas vivas e mortas foi realizada com auxílio de uma fonte luminosa em uma superfície branca. Logo após, as larvas mortas na diluição 1:6 e as larvas vivas da diluição 1:2 foram transferidas para microtubos e congeladas para posterior extração de DNA.

Para análise das diferenças entre as médias das taxas de mortalidade de larvas em diferentes concentrações de cipermetrina, foi utilizado o teste t com nível de significância de 1%.

Para a extração de DNA genômico foi testado um protocolo baseado em Sheppard e Hinkley (1992) com modificações. A separação e estimativa do tamanho dos fragmentos foi realizada por eletroforese em gel de ágar 1% (p/v) e os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados sob radiação ultravioleta em sistema de foto documentação PIX EX (Loccus Biotecnologia). (SAMBROOK et. al. 1989).

### **Resultados e discussão**

O controle do carrapato *R. (B.) microplus* tem se tornado uma prática difícil para as propriedades rurais em função da seleção de populações resistentes à acaricidas. Nesse trabalho, fêmeas ingurgitadas, coletadas a partir do rebanho bovino do IFC Araquari, foram incubadas em condições controladas de temperatura e umidade para realização de postura e após a eclosão dos ovos, as larvas foram utilizadas em testes de imersão em cipermetrina.

A mortalidade das larvas frente às diferentes diluições de cipermetrina foi de uma média de 99% (diluição 1:2), 79% (diluição 1:4) e 93% (diluição 1:6) (Figura 1). Apesar das variações na taxa de mortalidade, não foi observada diferença significativa ( $p > 0,01$ ) na taxa de mortalidade das larvas nas diferentes diluições testadas. No grupo controle observou-se um percentual médio de mortalidade de 20%.

Em um estudo anterior, foi observada uma taxa de resistência à cipermetrina de 56% (taxa de mortalidade de 44%) em testes de imersão de carrapatos adultos provenientes da mesma população de bovinos deste trabalho (VILLENNA et al., 2015).

Verificou-se ao longo dos experimentos uma considerável taxa de variação nos resultados de mortalidade nas diferentes diluições. Esse fato, recorrente em estudos anteriores, pode ser explicado pelas diferenças nas populações de teleóginas coletadas, uma vez que os bovinos são constantemente tratados com princípios ativos diferentes, o que determina variação na seleção de genes de *R. (B.) microplus* relacionados à resistência aos diferentes carrapaticidas, dentre eles aqueles do grupo dos piretróides. Também, a grande variabilidade observada pode ser decorrente de detalhes experimentais da técnica utilizada para o banho das larvas. O líquido aderido à parede interna da seringa permaneceu visível por várias horas depois do banho, apesar da secagem em capela de exaustão, o que sugere um maior tempo de contato das larvas com o produto, além de uma importante variação de temperatura ambiente ao longo do experimento, o que pode ter influenciado na taxa de mortalidade.

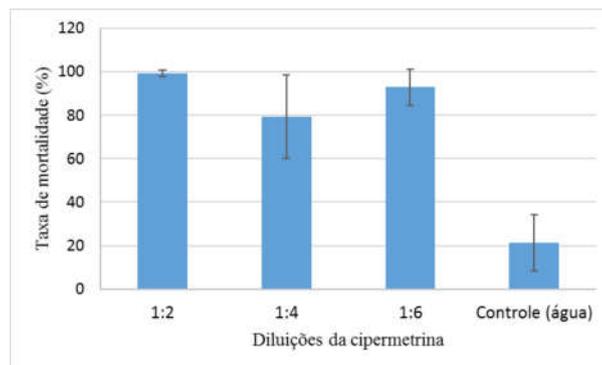


Fig. 1. Percentual de mortalidade de larvas em diferentes concentrações de cipermetrina. Diluições testadas: 1:2, 1:4 e 1:6. Os resultados representam a média de três experimentos realizados independentemente. Não foi observada diferença significativa entre os valores médios de mortalidade para todas as diluições testadas ao nível de significância de 1%.

A seleção de larvas resistentes e suscetíveis requer uma metodologia de seleção que proporcione uma taxa de mortalidade média relativamente constante para cada diluição testada, de modo que a diferenciação entre os dois grupos de larvas seja confiável para uma

adequada determinação de polimorfismos associados à resistência e uma definição do perfil de resistência da população de carrapatos do rebanho em estudo.

Um grupo de larvas resistentes na menor diluição (1:2) e um grupo de larvas mortas na maior diluição (1:6) tiveram o DNA genômico extraído (Figura 2). A análise do perfil eletroforético sugere que as modificações realizadas no método Sheppard e Hinkley (1992), as quais simplificaram a metodologia em apenas três passos resultaram em amostras aparentemente degradadas. Essa observação fica evidente por meio do desaparecimento da banda de DNA (Figura 2 – linha 2) do grupo de larvas tratado com agitação mais vigorosa no processo de extração.

Entretanto, em experimentos utilizando a metodologia de extração descrita por Sheppard e Hinkley (1992), foi observada uma concentração maior de DNA extraído (dados não mostrados), porém com sinais de degradação maiores ou iguais aos observados na metodologia utilizada nesse trabalho.

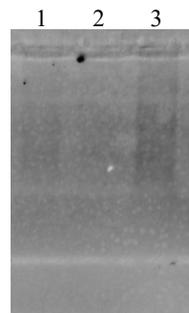


Fig. 2. Perfil eletroforético das amostras de DNA extraídas de larvas de *R. (B.) microplus*. 1 (50 larvas) e 3 (100 larvas), amostras de DNA total isoladas com protocolo incluindo homogeneização delicada; 2 (51 larvas), extração efetuada com agitação vigorosa (vórtex).

A determinação de polimorfismos associados à resistência a piretróides requer, além da separação de grupos resistentes e susceptíveis, uma amostra de DNA genômico íntegro, sem sinais de degradação, para etapas posteriores de digestão com endonucleases de restrição ou reações em cadeia da polimerase. Nesse sentido, novas metodologias ou adaptações que permitam uma completa lise do exoesqueleto de quitina do ectoparasito e a extração de DNA íntegro devem ser testadas para se partir de um material sem degradação e com bom rendimento.

### **Conclusão**

As mortalidades inconstantes das larvas quando submetidas às diferentes concentrações de piretróides, não permitiram a seleção confiável de cepas resistentes e suscetíveis de *R. (B.) microplus*. Adicionalmente, o laboratório responsável por esse trabalho tem avançado na determinação de uma metodologia de extração de DNA genômico de carrapatos, a qual permitirá os ensaios de determinação de polimorfismos associados à resistência aos piretróides. Também, a dificuldade encontrada nos ensaios de mortalidade revela o desenvolvimento de populações resistentes e geneticamente diversas nos carrapatos do rebanho bovino do IFC Araquari.

### **Referências**

- GUERREIRO, F.D.; LOVIS, L.; MARTINS, J.R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** **2(1)**, 2012.
- GRISI, L., MASSARD, C.L., MOYA BORJA, G.E., PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Vet.**, 21:8-10, 2002.
- MENDES, M.C.; PEREIRA, J.R.; PRADO, A.P. Sensitivity of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to pyrethroids and organophosphate in farms in the Vale do Paraíba region, Sao Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, 74(2):81-85, 2007.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory 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.**
- VILLENA, O.; VEIGA, A.P.A.; RODRIGUEZ, T.J.; CLAUS, M.P.; SOUZA, A.P.; MILCZEWSKI, V.; SOUZA, A.L.F. *Rhipicephalus microplus* resistance to pyrethroid in cattle from the Instituto Federal Catarinense – Araquari/SC. In: IX Congresso de Ciências Químicas, Tecnología e Innovación, 9, 2015, La Habana, Resúmenes/Abstracts, La Habana, BP-038.