

# TESTE BIOQUÍMICO PARA DETERMINAR A RESISTÊNCIA DE DUAS CEPAS DO CARRAPATO *Boophilus microplus* (CANESTRINI,1887)

## Biochemical test to determine the resistance of two strains of the tick *Boophilus microplus* (Canestrini,1887)

MENDES<sup>1</sup> M. C., SILVA<sup>1</sup> M. X. & BRACCO<sup>2</sup> J. E.

(1) Centro de Sanidade Animal, Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves,1252, São Paulo, Brasil. CEP 04014-002.

(2) Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Vetores, Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo (Sucen), Rua Paula Souza 166, 01027-000 São Paulo, Brasil.

**SUMMARY:** The resistance detection of the tick *Boophilus microplus* has been done through larval packet test. However to make a resistance management program it is necessary the precocious detection of the resistance. In this work we describe the acetylcholinesterase (AChE) and esterase activities in two strains of the cattle tick *B. microplus*, the susceptible strain Mozo (MZ) and the field strain Mancilha (MC). The esterase assays were used an individually larvae and for the AChE activity about 50 larvae were homogenized. The results tests corroborate with the byossays data. The a-naphthyl acetate hydrolyzed in MC strain was faster than MZ strain. This result show that there was the subpopulation selection inside of the strain MC population, indicating the pyrethroids resistance, more specifically to the deltamethrin. The maximum inhibition of the activity acethylcholinesterase (AChE) was obtained at a concentration of 50 mM propoxur. In the MZ strain shown two inhibitions and MC strain just an only due to component II is modified and confers organophosphate resistance. This is the first biochemical test resistance of the *B. microplus* in Brazil.

**KEY WORDS:** *Boophilus microplus*, biochemical tests, resistance, organophosphate, pyrethroids.

## INTRODUÇÃO

No Brasil o controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) ectoparasita dos bovinos é considerado ainda insuficiente devido à falta de um monitoramento racional e eficaz no uso dos produtos químicos.

A maior parte dos produtos químicos comerciais usados atualmente tem como princípio ativo as formamidas, piretróides, organofosforados e associação entre os dois últimos. Novas moléculas, tais como inibidores de crescimento, Fluazuron, e outros, tem seu emprego ainda reduzido. A vacina contra o carrapato, que se encontra no mercado desde 1996, não tem capacidade de controlar os carrapatos do rebanho, sendo necessários eventuais tratamentos com carrapaticidas (FURLONG, 1998).

O desenvolvimento da resistência do *Boophilus microplus*, pela seleção de populações como consequência do uso constante de acaricidas, já foi relatada principalmente nos países

como Austrália e México. No Brasil, a resistência não é monitorada de uma maneira sistemática, sendo este um fator que dificulta o controle, pois a redução de seu impacto pode ser feita na medida em que ela é detectada com rapidez e precisão (BAXTER *et alii* 1999).

Ensaio bioquímicos e moleculares estão sendo empregados no diagnóstico da resistência do *Boophilus microplus* através das atividades das acetilcolinesterase (BAXTER, *et alii* 1999), Glutathione S-transferases (HE, *et alii* 1999), monooxigenases (CRAMPTON, *et alii* 1999), octopamina (BAXTER & BARKER, 1999) e esterases (HERNANDEZ, *et alii* 2000).

No Brasil estudos dos mecanismos bioquímicos ainda não estão sendo realizados com o carrapato *Boophilus microplus*, no entanto trabalhos com outros artrópodos, tais como mosquitos e ácaros já foram publicados (BRACCO *et alii* 1999; SATO, 1999).

O presente trabalho teve como objetivo as atividades da acetilcolinesterase e esterase em duas cepas do carrapato

*Boophilus microplus*: a cepa sensível Mozo (MZ) e a de campo Mancilha (MC), fornecendo subsídio para um programa de monitoramento da resistência.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Carrapatos.** Duas cepas de carrapatos foram usadas no experimento, cepa MZ e MC. Estas cepas são mantidas no laboratório do Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico. A cepa MZ, usada como cepa sensível, foi obtida do Centro de Investigaciones Veterinárias Miguel Rubino, Uruguai. Desde 1975 esta cepa vem sendo mantida isolada sem ter contato com os demais carrapaticidas que surgiram posteriormente aos clorados e organofosforados. A cepa MC é oriunda da Fazenda Nossa Senhora da Piedade, localizada no município de Jambeiro - SP.

**Bioensaio.** A verificação da susceptibilidade da cepa MC aos acaricidas piretróides (cipermetrina e deltametrina) e ao organofosforado clorpirifós foi avaliada usando a técnica de STONE & HAYDOCK (1962). Foram usadas diversas concentrações para o cipermetrina (0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4%), deltametrina (0,0125%, 0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,8%) e para o clorpirifós (0,0125%, 0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4%). O fator de resistência foi calculado dividindo a dose letal de 50% da cepa MC pela dose letal de 50% da cepa MZ.

**Determinação da atividade de a e b esterases.** O protocolo seguido é proposto por HEMINGWAY & GEORGHU (1984) com algumas modificações. Cada larva foi homogeneizada em 25 ml de água destilada contendo PTC 1 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 1 minuto à 4°C. Duas placas de microtitulação foram utilizadas simultaneamente, uma para cada substrato. Vinte microlitros do sobrenadante foram colocados em cada poço da placa. Em seguida adicionou-se 80 ml de solução trabalho composta de a e b naftil acetato 0,03 mM em tampão fosfato 20 mM PH 7,0. Deixou-se incubando por 15 min. à temperatura ambiente. Após a incubação, adicionou-se 20 ml da solução corante em cada poço (o-Dianizidina tetrazóide 0,01 M contendo 3,5% de dodecil sulfato de sódio). Um dos poços da placa recebeu apenas os reagentes e água destilada e PTC no lugar do homogeneizado, sendo considerado o branco da reação. Após dez minutos foi determinada a densidade óptica (D.O) a 620nm num leitor de ELISA, ORGANON TECNICA 230 S.

**Cinética de hidrólise de a e b naftil acetato.** Larvas foram homogeneizadas seguindo-se a metodologia para a deter-

minação da atividade total sendo a densidade óptica determinada em intervalos de 5 minutos até o máximo de 30 minutos, sempre utilizando-se de um comprimento de onda de 620 nm.

**Atividade remanescente da acetilcolinesterase.** Cinquenta larvas foram homogeneizadas em 250 ml de solução de extração (tampão fosfato de sódio 100mM PH 7,0 com adição de 1% de TritonX-100). O ensaio para a atividade da AChE foi segundo BAXTER *et alii* (1999). Primeiramente foi 100 ml de solução corante [ácido dithio-bis 2-nitrobenzóico (DTNB) 0,2 mM, iodeto de acetilcolina (ASCHI) 0,2 Mn PH 7,8] foram adicionados em seis poços adjacentes de uma placa de microtitulação; em seguida foi adicionado proprocur nas seguintes concentrações 1 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 1000 mM e 1 mM respectivamente nos 5 primeiros poços. No sexto poço, adicionou-se 10ml de etanol (solvente da solução de propoxur). Por último, 10 ml do homogeneizado larval foram colocados em todos os poços. A leitura foi feita a 405nm num leitor de ELISA ORGANON TECNICA 230 S após um período de incubação de 15 minutos, à temperatura ambiente. Considerou-se a porcentagem de atividade remanescente como a 100 vezes a fração entre atividade de uma determinada concentração de propoxur dividida pela atividade do controle positivo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Bioensaios.** As doses letais de 50% e seus respectivos intervalos de confiança para os produtos testados com a cepa MZ e MC estão representados na Tabela 1. Os valores obtidos para a cepa MZ foram semelhantes aos dados de VIEIRA-BRESSAN *et alii* (1999) onde as doses letais de 50% para esta mesma cepa testada foi de 0,03291% para a cipermetrina 0,01124% para a deltametrina e 0,03857% para o organofosforado coumafós. A cepa de campo por eles testados, proveniente da mesma região que a cepa MC (Vale do Paraíba), apresentou para o produtos cipermetrina, deltametrina e organofosforado os respectivos fatores de resistência 12,29, 11,03 e 9,34. Comparando com a sensibilidade da cepa MC podemos considerar que essas duas cepas apresentaram o mesmo perfil para os piretróides. Já para o organofosforado a diferença pode estar relacionada ao diferente princípio ativo usada para cada cepa testada.

**Esterase.** A cepa MC apresentou dois picos de frequência de atividade de alfa-esterases (Figura 1 e 2) sendo um deles semelhante ao único pico apresentado pela cepa referência MZ. No caso das beta-esterases, as distribuições de atividade foram semelhantes nas duas populações (Figura 3 e 4). Os valores de média, desvio padrão e variância da atividade de de alfa-esterase são sempre maiores em MC (Tabela 2). A

TABELA 1: Dose letal de 50% e seus respectivos Intervalos de confiança para os produtos cipermetrina, deltametrina e chlorpirifós nas cepas MZ e MC do carrapato *Boophilus microplus*

Acaricidas	MZ		MC		Fator de resistência
	DL <sub>50</sub>	IC	DL <sub>50</sub>	IC	
Cipermetrina	0.043	0.035 - 0,052	0,3736	0,232 - 0,776	8.68
Deltametrina	0,009	0,0057 - 0,012	0,100	0,017 - 0,753	11.11
Chlorpirifós	0,02311	0,168 - 0,025	0,0305	0,018 - 0,043	1.31

cinética da reação de hidrólise de beta naftil acetato foi semelhante em MZ e MC (dados não apresentados); entretanto, para alfa naftil acetato (Figura 5) ela ocorre com maior velocidade na população MC. Estes fatos mostram que houve a seleção de uma subpopulação dentro da população MC que apresenta uma maior atividade de alfa-esterase, ou seja, há uma pressão seletiva sendo exercida em favor de um aumento da atividade de alfa-esterase. Os resultados obtidos sugerem que a resistência aos piretróides, mais especificamente a deltametrina, pode ser devida ao aumento da atividade de alfa-esterases. Tal relação já foi demonstrada em mosquitos. (SANAA & OTTEA, 1995).

**Atividade de Acetilcolinesterase.** A Figura 6 mostra a atividade remanescente de AChE após inibição por diferentes concentrações de Propoxur. A inibição máxima se deu com concentração final de 50 mM (com MZ e MC apresentando, respectivamente 20% e 24,4% de atividade remanescente). Essa diferença não foi estatisticamente significativa, corroborando os dados dos testes de bioensaios. Isso pode ser explicado pelo fato de que estas cepas não estão tendo contato com acaricidas da classe dos organofosforados.

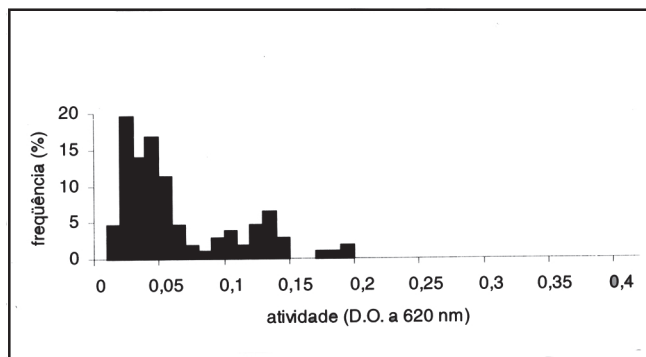


Figura 1: Distribuição da atividade de Alfa Esterase em *Boophilus microplus* - cepa MC (N=107)

Estes dados diferem dos resultados obtidos por BAXTER *et alii* (1999) para a cepa Biarra, resistente ao organofosforado. No referido trabalho, a inibição total da acetilcolinesterases

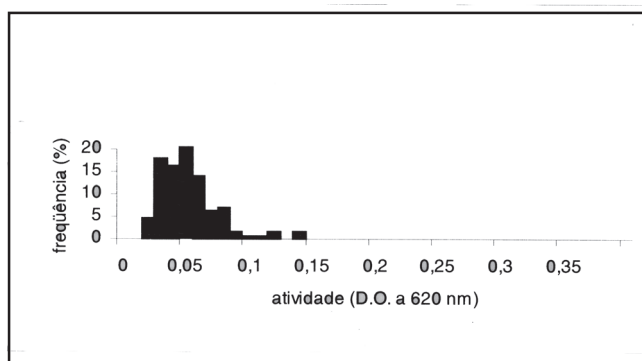


Figura 2: Distribuição da atividade de Alfa Esterase em *Boophilus microplus* - cepa MZ (N=128)

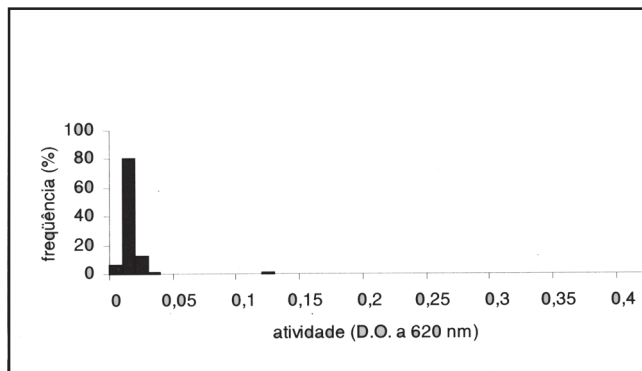


Figura 3: Distribuição da atividade de Beta Esterase em *Boophilus microplus* - cepa MC (N=117)

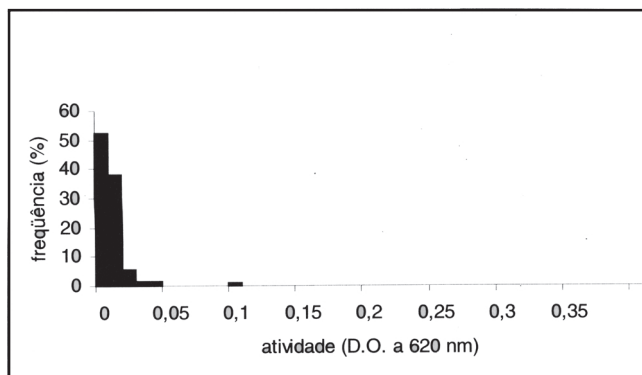


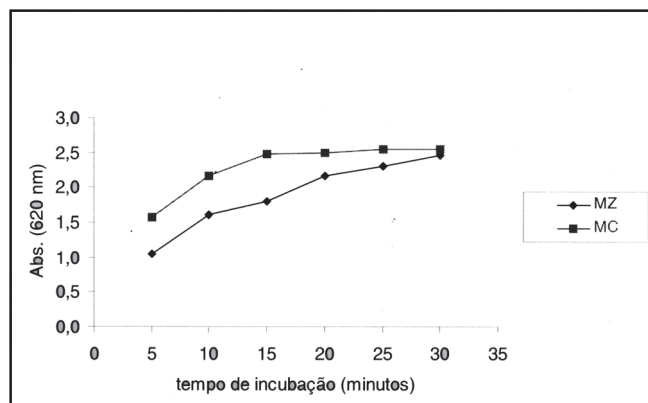
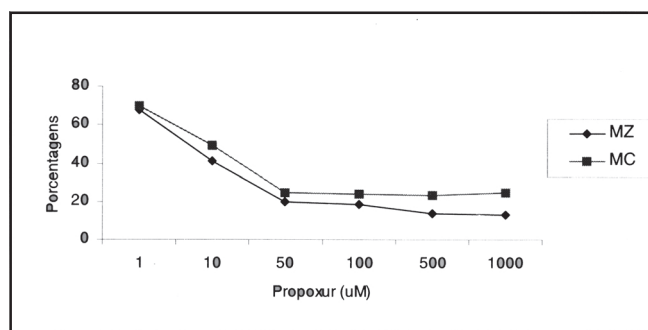
Figura 4: Distribuição da atividade de Beta Esterase em *Boophilus microplus* - cepa MZ (N=128)

TABELA 2: Médias, desvio padrão (s), variância de atividade de esterases nas cepas MZ e MC.

Cepas	$\alpha$ esterase			$\beta$ esterase		
	Média	desvio padrão	variância	Média	desvio padrão	variância
MZ	0.0476	0.0224	0.0005	0.0025	0.0111	0.0001
MC	0.0540	0.0451	0.0020	0.0068	0.0112	0.0001

se deu com uma concentração final de propoxur de 100 mM e outra cepa sensível, onde a variação da atividade de acetilcolinesterase em função da concentração de propoxur foi de 100 mM, tanto para o teste com larvas como para o gânglio cerebral de fêmeas adultas. A atividade de acetilcolinesterase na concentração de 50 mM foi menor que 10% para a cepa sensível e 80% para a cepa resistente. Portanto, apenas com o uso de larvas pode-se avaliar a atividade de acetilcolinesterase.

Observamos também pelo gráfico (Figura 6) que na cepa MZ há duas inibições, uma em 50 mM e outra em 100 mM. Já em MC ocorreu uma única inibição. Estes dados mostram que os dois componentes, I e II, de acetilcolinesterase

Figura 5. Cinética de Alfa Esterase em duas cepas de *Boophilus microplus* - MZ e MCFigura 6: Inibição da Ache em duas cepas de *Boophilus microplus* - MZ e MC

(NOLAN *et alii*, 1972; BAXTER *et alii*, 1999) foram inibidas em MZ enquanto que em MC a segunda forma (componente II) não está, provavelmente é essa forma (II) que confere resistência aos organofosforados.

Recentemente, vários trabalhos foram feitos descrevendo resistência em carrapatos (BAXTER *et alii*, 1999; He *et alii*, 1999; CRAMPTON *et alii*, 1999; BAXTER & BARKER 1999; HERNANDEZ *et alii*, 2000). Esses trabalhos, feitos com “pools” de larvas, se prestam a explicar uma resistência a acaricidas já instalada em determinada população. Porém, para o efetivo manejo da resistência, a detecção precoce do processo, ou seja, nos estágios iniciais de desenvolvimento é fundamental. Estudos populacionais como o presente trabalho são de grande valia na compreensão e monitoramento da resistência em populações naturais, pois o fato de usarmos apenas uma larva permite detectar a resistência nos estágios iniciais de seu desenvolvimento, o que pode fornecer informações sobre a genética e a evolução do processo nas diversas populações (BRACCO, 1998). Tais informações devem ser utilizadas para que medidas de manejo de acaricidas possam ser tomadas.

Os resultados obtidos neste trabalho nos leva a concluir que os testes de bioensaios são essenciais no diagnóstico da resistência do carrapato *B. microplus* e os ensaios enzimáticos cuja elevada sensibilidade e brevidade nos resultados permitem avaliar o perfil da população em estudo atuando assim como complementar.

## SUMÁRIO

O diagnóstico da resistência do carrapato *Boophilus microplus* tem se realizado por meio de bioensaios utilizando-se principalmente do teste de larvas. Entretanto para efetuar um monitoramento racional da resistência é necessária a detecção precoce deste fenômeno. Neste trabalho relatamos as atividades das acetilcolinesterase e esterase em duas cepas do carrapato *B. microplus*: a cepa sensível Mozo (MZ) e a cepa de campo Mancilha (MC). Os ensaios de esterases foram feitos com uma larva e para a atividade de acetilcolinesterase foram usadas 50 larvas. Os resultados dos dois testes corroboram com os dados de bioensaios. A cinética

da reação de hidrólise para alfa acetato ocorreu com maior velocidade na população MC; mostrando que houve a seleção de uma subpopulação dentro da população MC, indicando a resistência aos piretróides, mais especificamente ao deltametrina. A inibição máxima da atividade de acetilcolinesterase (AChE) se deu na concentração de 50 mM de propoxur. Na cepa MZ ocorreram duas inibições e na MC apenas uma única inibição devido ao componente II que sofre modificação conferindo resistência aos organofosforados. Este é o primeiro teste bioquímico para resistência do carrapato *B. microplus* no Brasil.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Boophilus microplus*, teste bioquímico, resistência, organofosforados, piretróides.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAXTER, G.D., GREEN, P., STUTTGEN, M. & BARKER, S.C. (1999). Detecting resistance to organophosphates and carbamates in the cattle tick *Boophilus microplus*, with a propoxur-based biochemical test. *Experimental and Applied acarology*, 23:907-914.
- BAXTER, G.D. & BARKER, S.C. (1999). Isolation of cDNA an octopamine-like, G-protein coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29:461-467.
- BRACCO, J.E. (1998). Avaliação da resistência a inseticidas em população de *Culex quinquefasciatus* (diptera:culicidae) do Rio Pinheiros (São Paulo, Brasil). *Dissertação (mestrado) Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo*.
- BRACCO, J.E., BARATA, J.M.S. & MARINOTTI, O. (1999). Evaluation of insecticide resistance and biochemical mechanisms in a population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. *Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, vol. 94(1):115-120.
- CRAMPTON, A L., GREEN, P., BAXTER, G.D. & BARKER, S.C. (1999). Monooxygenases play only a minor role in resistance to synthetic pyrethroids in the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Experimental and Applied Acarology* 23:897-905.
- FURLONG, J. (1998). Carrapato dos bovinos: conheça bem para controlar melhor. *Circular Técnica* n.46
- HAMINGWAY, J. & GEORGHIOU, G.P. (1984). Baseline esterase levels for Anophiline and Culicine mosquitos. *Mosquito News*, 44(1):33-35.
- HE, H., CHEN, A.C., DAVEY, R.B., IVIE, G.W. & GEORGE, J.E. (1999). Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29:737-743.
- HERNANDEZ, R., HE, H., CHEN, A.C., WAGHELA, S.D., IVVIE, G.W., 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 Biochemistry and Molecular Biology* 30:969-977.
- SATO, M.E. (1999). Mecanismos de resistência ao inseticida metidation em *Amblyseuis womerleyi* schicha, 1975 (Acari: Phytoseiidae) Tese (doutorado) - *Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*.
- SANAA, A.I. & OTTEA, J.A. (1995). Biochemical and toxicological studies with laboratory and field populations of heliothis virescens. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 53:116-128.
- STONE, B.F. & HAYDOCK, K.P. (1962). A method for measuring the acaricides susceptibility of cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) *Bull. of Entomol. Res.* vol.53: 563-578.
- VIEIRA-BRESSAN, M.C.R, OLIVEIRA, R.O. & DOS SANTOS, A. P. (1999). Determination of LR50 and LD99 in two susceptible strains of *Boophilus microplus* for larval resistance tests. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 8(2):119-126.