

## IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE DO CANAL DE SÓDIO ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA EM *BOOPHILUS MICROPLUS* POR RT-PCR ASSIMÉTRICO DE BAIXA ESTRINGÊNCIA

### IDENTIFICATION OF MUTATIONS IN CATTLE TICK SODIUM CHANNEL GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE BY LOW STRINGENCY ASSYMETRIC RT-PCR

Cícero Donizete PEREIRA<sup>1</sup>; Guilherme Rocha Lino SOUZA<sup>2</sup>; Maurício Machaim FRANCO<sup>3</sup>; Warwick Estevam KERR<sup>4</sup>; Luiz Ricardo GOULART FILHO<sup>5</sup>

**RESUMO:** O carrapato bovino (*Boophilus microplus*), constitui um dos maiores problemas da agropecuária de regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil. Altas infestações resultam num significativo aumento nos custos de produção devido a reduções de peso, produção de carne e leite. Este carrapato age também como vetor de agentes causadores de babesiose e anaplasmoses, que causam a febre bovina, considerada uma das mais importantes doenças destas regiões. O método mais comum de controle envolve o uso de acaricidas, o que é desvantajoso, pois leva à seleção de populações de carrapatos resistentes e ocasiona efeitos danosos aos animais e ao ambiente. Mutações no gene do canal de sódio tem sido observadas, conferindo sítios responsáveis pela insensibilidade ao efeito neurotóxico de piretróides. Para a detecção de prováveis polimorfismos neste gene, em teleóginas resistentes e sensíveis à cipermetrina, utilizou-se a técnica da RT-PCR Assimétrico de baixa estringência (LSART). A detecção de bandas polimórficas sugere a ocorrência de mutações no canal de sódio a partir da posição 2296 do domínio IIIIS6 em direção à extremidade 3' do gene, que podem estar relacionadas com a resistência deste ectoparasito à cipermetrina.

**UNITERMOS:** *Boophilus*, Canal de sódio, Piretróides, Cipermetrina, Polimorfismo, Resistência, Mutações.

## INTRODUÇÃO

O carrapato bovino (*Boophilus microplus*) é um ectoparasita importante para a agropecuária brasileira e demais regiões tropicais e subtropicais. Este carrapato causa prejuízos diretos e indiretos à agropecuária por meio da redução na produção de leite e carne, danos ao couro e transmissão dos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e da riquetsia *Anaplasma marginale*. Estes organismos quando juntos, causam o quadro conhecido como Tristeza Parasitária Bovina. Um agravamento deste quadro é observado com a introdução de raças bovinas européias e o evidente aumento da resistência aos acaricidas comerciais, resultando na seleção de populações de carrapatos resistentes e dificultando ainda

mais o manejo (JONGEJAN; UILENBERG, 1994; ANDRADE, 1996; DE CASTRO, 1997).

O controle deste parasita tem sido feito, principalmente, com o uso de carrapaticidas, destacando-se entre eles os piretróides. Banhos são realizados após a visualização de carrapatos adultos, podendo este controle causar o desenvolvimento de cepas de carrapatos resistentes, riscos de contaminação ambiental e significativo aumento dos custos de produção (DE LA FUENTE et al, 2000).

Piretróides são derivados sintéticos de neurotoxinas naturais de plantas que se ligam seletivamente ao canal de sódio (JAMROZ, 1998). Devido sua seletividade tóxica aos invertebrados, os piretróides correspondem a 25% de todos os inseticidas utilizados

<sup>1</sup> Professor Adjunto, Universidade Presidente Antônio Carlos, Campus Araguari, MG.

<sup>2</sup> Doutorando do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

<sup>3</sup> Pesquisador do Cenargen/Embrapa.

<sup>4</sup> Professor voluntário, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

<sup>5</sup> Professor Titular, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

Received 22/09/03 Accept 28/01/04

mundialmente (GEORGHIOU, 1990). Este uso em larga escala possibilitou o desenvolvimento de resistência a este pesticida em muitos artrópodes como, baratas, moscas domésticas, moscas das frutas, moscas do chifre, carrapatos, entre outros (JAMROZ et al, 1998; HE, 1999; DONG; SCOTT, 1994; WILLIAMSON et al, 1996).

Um importante mecanismo de resistência, determinado por mutação no gene do canal de sódio, é caracterizado por uma redução na sensibilidade do sistema nervoso de insetos a piretróide e DDT, conhecido como *knockdown resistance (kdr)*, primeiramente observada em cepas de *Musca domestica* resistentes a piretróides (JAMROZ et al., 1998). Uma segunda mutação denominada *super-kdr*, também localizada neste gene, foi encontrada em combinação com a *kdr* produzindo moscas super resistentes a piretróides (WILLIAMSON et al., 1996). Jamroz et al. (1998), constataram a resistência a piretróides por meio da mutação *kdr* e *super-kdr* em populações de *Haematobia irritans*. Várias mutações foram descritas nos domínios II do canal de sódio em vários insetos conferindo resistências a piretróides. Head et al. (1998), encontraram uma mutação de ponto no *linker* do domínio III e IV do canal de sódio, também associado com este mecanismo de resistência em *Heliothis virescens* e *Helicoverpa armigera*. He et al. (1999) identificaram uma mutação de ponto no segmento IIIS6 altamente conservado do canal de sódio de cepas de *B. microplus* altamente resistente a DDT e piretróide.

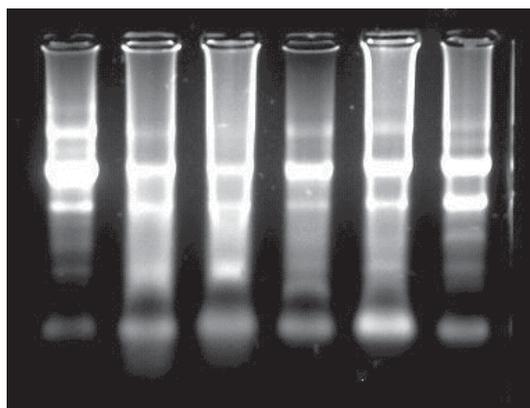
Este trabalho objetivou o estudo de mutações no canal de sódio na direção 3' a partir da posição 2296 do

domínio IIIS6 do canal de sódio de uma população de carrapatos bovino de Uberlândia (MG).

## MATERIAL E MÉTODOS

Em uma população de carrapatos *B. microplus* de Uberlândia (MG) foram selecionadas teleóginas resistentes e sensíveis a piretróide a base de cipermetrina. Um bezerro altamente infestado foi submetido a um acaricida piretróide à base de cipermetrina seguindo as recomendações técnicas do produto. As teleóginas que se desprenderam do bezerro até três horas após a aplicação do produto foram coletadas como sensíveis e aquelas que permaneceram aderidas ao bezerro após 36 horas, foram consideradas resistentes. Após a coleta das teleóginas, utilizando-se uma lâmina de bisturi, foi feita uma incisão longitudinal na posição ventral na direção anteroposterior do abdome de cada indivíduo e o excesso de sangue lavado com água ultra-pura. Imediatamente após, as teleóginas foram submersas em nitrogênio líquido e acondicionadas em ultra-freezer (-80°C).

A extração do RNA foi feita utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen Life Tecnolgy) seguindo as orientações do fabricante. Após a extração o RNA total foi tratado com DNase (Promega). Procedeu-se, então, a quantificação por espectrofotometria e a qualidade do RNA verificada em gel de agarose 1,5% (Figura 1). O RNA foi estocado em alíquotas de 20 µL, diluídas em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), em ultrafreezer (- 80 °C).



**Figura 1.** Gel de agarose 1,5% mostrando a qualidade das amostras de RNA total extraídas de teleóginas.

### Reação de RT-PCR Assimétrico de baixa estringência (LSART)

As reações de LSART foram realizadas a partir de uma reação com Transcriptase Reversa (RT). A reação da RT foi realizada em termociclador MJ

Research, Inc., modelo PTC-100 a 37 °C por uma hora acrescido de um aquecimento de 70 °C por dez minutos. O volume final de cada reação foi de 20 µL contendo tampão para RT 1X (250 mM Tris-HCl, pH 8,6; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM DTT), 200 µM de cada dNTP,

50 unidades de Transcriptase Reversa (MMLV), 1,5 µg de *primer* PDN<sub>6</sub> (hexâmeros), 20 unidades de inibidor de RNase e 1 µg de RNA total.

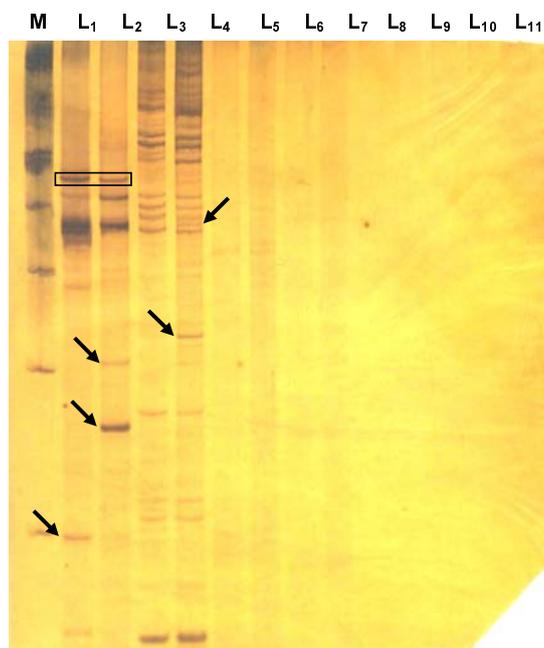
Após a RT foram feitas reações de PCR utilizando o *primer* *p*<sub>1</sub> (5'-GTCTTGGAATTGCCTTGGCT-3') para o gene do canal de sódio anelando na posição 2296 do gene. Cada reação continha Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 400 µM de dNTPs (100 µM de dGTP, 100 µM de dCTP, 100 µM de dATP e 100 µM de dTTP), 8 pmoles de *primer*, 1,0 U de Taq DNA Polimerase, e 2 µL de cDNA da reação da RT. Água ultrapura foi utilizada para completar o volume para 20 µL. Em cada reação foi adicionada uma gota de óleo mineral para evitar a evaporação.

Para cada bateria de reações foi feito um controle negativo com todos os compostos da reação, exceto o cDNA. As reações foram amplificadas em termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-100. Inicialmente, a reação foi aquecida a 95 °C durante três minutos e em seqüência submetida a 10 ciclos nas seguintes condições: 95 °C/30 s, 62 °C/40 s e 72 °C/45 s. Após os 10 ciclos, 10 µL de cada reação foram utilizados como *template* (molde) para outras reações de PCR, uma de baixa e outra de alta estrigência. A reação de baixa estrigência foi idêntica àquela realizada com o *primer* *p*<sub>1</sub>, só que utilizando *primers* decâmeros randômicos (Operon Technology), um para cada reação, e reduzindo a temperatura de anelamento para 40 °C. Para a reação de alta estrigência apenas a temperatura

de anelamento foi alterada para 55 °C. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida 19:1, 6% corado com nitrato de prata. Em seguida os géis foram secados a temperatura ambiente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 refere-se a um gel de poliacrilamida evidenciando os amplicons obtidos pela técnica da RT-PCR assimétrico. As setas indicam as bandas polimórficas entre teleóginas resistentes (L<sub>1</sub> e L<sub>3</sub>) e sensíveis a cipermetrina (L<sub>2</sub> e L<sub>4</sub>). Nas colunas L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub> utilizou-se o decâmero OPA-04 (5'-AATCGGGCTG-3') na última etapa da LSART e nas colunas L<sub>3</sub> e L<sub>4</sub> o decâmero OPA-13 (5'-CAGCACCCAC-3'). As reações destas quatro linhas (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> e L<sub>4</sub>) correspondem às de baixa estrigência, utilizando uma temperatura de anelamento de 40 °C. O aparecimento de bandas polimórficas sugere a ocorrência de mutações no canal de sódio a partir da posição 2296 do domínio IIIS6 em direção a extremidade 3' do gene, como sugerido por He et al (1999) que disseram haver diversas possíveis mutações neste gene relacionadas à resistência ainda não identificadas. Estes autores ainda sugeriram haver uma certa variabilidade em mutações já conhecidas que conferem resistência a piretróides quando populações distintas são comparadas. Portanto, esperava-se uma certa variabilidade entre os cDNAs de teleóginas resistentes e sensíveis evidenciadas na figura 2.



**Figura 2.** Gel de poliacrilamida (6%) de produtos gerados por LSART. M (marcador de peso molecular 100 pb); L<sub>1</sub> (R) e L<sub>2</sub> (S) PCR com OPA-04; L<sub>3</sub> (R) e L<sub>4</sub> (S) PCR com OPA-13; L<sub>5</sub> – L<sub>8</sub>, PCR com OPV-17 e OPA-09; L<sub>9</sub> – L<sub>12</sub>, PCR com OPA-04 e OPA –13 com alta estrigência.

A presença de bandas idênticas, destacadas no gel (Figura 2) por um retângulo, em indivíduos resistentes e sensíveis confirmam a eficiência da técnica do LSART. Isto era esperado já que na etapa da reação onde o *primer*  $p_1$  foi utilizado, o anelamento ocorreu na mesma região, independentemente do indivíduo, de um gene constitutivo.

Reações com outros decâmeros não tiveram boa amplificação.  $L_5$ ,  $L_6$ ,  $L_7$  e  $L_8$  mostram as mesmas reações apresentadas nas quatro primeiras linhas, apenas substituindo os *primers* randômicos pelos OPV 17 (5'-ACCGGCTTGT-3') e OPA09 (5'-GGGTAACGCC-3'). Nessa amplificação de má qualidade revelou-se um anelamento imperfeito destes *primers* ao gene estudado.

As linhas de  $L_9$  a  $L_{12}$  são repetições das quatro primeiras. No entanto, a temperatura de anelamento foi aumentada para 55 °C ocasionando uma completa ausência de bandas. O aumento da estringência foi suficiente para inibir o anelamento dos *primers* impedindo a repetição dos dados anteriores obtidos em baixa estringência.

## CONCLUSÃO

A técnica de RT-PCR assimétrico de baixa estringência possibilitou a detecção de bandas polimórficas entre teleóginas resistentes e sensíveis à cipermetrina, sugerindo a ocorrência de mutações no gene do canal de sódio a partir da posição 2296 do domínio IIS6, em direção à extremidade 3', que podem estar relacionadas com a resistência do carrapato bovino a este princípio ativo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a empresa Vallée S/A pelo espaço físico, animais e carrapaticidas cedidos para a realização dos experimentos; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de Doutorado e financiamento de grande parte deste projeto.

---

**ABSTRACT:** The cattle tick, *Boophilus microplus*, constitutes a major problem for cattle raising in tropical and subtropical regions, including Brazil. Heavily infested cattle results in a significant cost to cattle producers due to the reductions in weight gain, calf production and milk production. These ticks act also as disease vectors transmitting the causative agents of babesiosis and anaplasmosis that cause cattle fever, considered one of the most important pests of these regions. The traditional method of control involves the use of acaricides, which is disadvantageous because leads to the selection of resistant tick populations and harmful effects to cattle, humans and the environment. A number of mutations in the sodium channel gene have been noticed to confer target site insensitivity to the neurotoxic effect of pyrethroids. Low stringency asymmetric reverse transcription (LSART) technique was used to detect gene polymorphisms among resistant and susceptible ticks to cipermethrin. The detection of polymorphic bands on polyacrilamide gel suggests the occurrence of mutations in the sodium channel gene, beginning in the 2296 position of the IIS6 domain, in direction 3' end of the gene, which suggests that the resistance of the ticks is genetically determined.

**UNITERMS:** *Boophilus*, Sodium channel gene, Pyrethroids.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A. B. F. **Aspectos genéticos e ambientais da resistência a *Boophilus microplus* de bovinos, da raça Gir, da Estação Experimental da EPAMG, Uberaba, MG, Brasil.** 1996. 79 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. 1996.

DE CASTRO, J. J. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries, **Veterinary Parasitology**. Amsterdam. v. 71, n. 2-3, p. 77-97. Jul. 1997.

DE LA FUENTE, J.; GARCÍA-GARCÍA, J. C.; GONZÁLEZ, D. M. IZQUIERDO, G.; OCHAGAVIA, M. E. Molecular analysis of *Boophilus* ssp. (Acari: Ixodidae) tick strains. **Veterinary Parasitology**. Amsterdam. v. 92, n. 3, p.209-222. Out. 2000.

DONG, K. F.; SCOTT, J. G. Linkage of *kdr*-resistance and the *para*-homologous sodium channel gene in german cockroaches (*Blattella germanica*). **Insect Biochemistry Molecular Biology**. Oxford. v. 24, n. 7, p. 647-654. Jul. 1994.

GEORGHIOU, G. P. Overview of insecticide resistance. In: GREEN, M. B., LEBARON, H. M.; MOBERG, W. K. (Ed.). **Managing resistance to agrochemicals**. Washington DC: American Chemical Society. 1990. p.18-41.

HE, H.; CHEN, A. C.; DAVEY, R. B.; IVIE, G. W.; GEORGE, J. E. Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. New York. v. 261, n. 2, p. 558-561. Ago. 1999.

HEAD, D. J.; MCCAFFERY, A. R.; CALLAGHAN, A. Novel mutations in the para-homologous sodium channel gene associated with phenotypic expression of nerve insensitivity resistance to pyrethroids in Heliiothine lepidoptera. **Insect Molecular Biology**. Oxford. v. 7, n. 2, p. 191 – 196. Mai. 1998.

JAMROZ, R. C.; GUERRERO, F. D.; KAMMLAH, D. M.; KUNZ, S. E. Role of the kdr and super-kdr sodium channel mutation of allelic frequency to resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Oxford. v. 28, n.12. p. 1031-1037. Dez. 1998.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. Ticks and control methods. **Revue Scientifique Et Technique**. Paris. v. 13, n. 12, p. 1201-1226. Dez. 1994.

WILLIAMSON, M. S.; MARTINEZ-TORRES, D.; HICK, C. A.; DEVONSHIRE, A. L. Identification of mutations in house-fly para-sodium channel gene associated with Knockdown resistance (*kdr*) to pyretroid insecticides. **Molecular and General Genetics**. Berlin. v. 252, n. 1-2, p 51-60. Ago. 1996.