

Identificação de alvos moleculares para o diagnóstico quantitativo da resistência a pesticidas organofosforados em populações do carrapato-dos-bovinos

ISSN 1677-8618
Junho, 2015

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Rondônia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 74

Identificação de alvos moleculares para o diagnóstico quantitativo da resistência a pesticidas organofosforados em populações do carrapato-dos-bovinos

Luciana Gatto Brito
Fábio da Silva Barbieri
Maribel E. Funes-Huacca
Louí de Oliveira Néry
Renata Reis da Silva
Ana Paula Leite dos Santos
Ariadne Elaine Gonçalves
Márcio D. Rabelo
Márcia Cristina de Sena Oliveira

Embrapa Rondônia
Brasília, DF
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Rondônia

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 127, CEP 76815-800, Porto Velho, RO

Telefones: (69) 3901-2510, 3225-9387, Fax: (69) 3222-0409

www.embrapa.br/rondonia

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê de Publicações

Presidente: *Alexsandro Lara Teixeira*

Secretária: *Marly de Souza Medeiros*

Membros:

Marília Locatelli

Rodrigo Barros Rocha

José Nilton Medeiros Costa

Ana Karina Dias Salman

Luiz Francisco Machado Pfeifer

Fábio da Silva Barbieri

Wilma Inês de França Araújo

Daniela Maciel Pinto

Normalização: *Daniela Maciel*

Editoração eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*

Revisão gramatical: *Wilma Inês de França Araújo*

1ª edição

1ª impressão (2015): 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Rondônia.

Identificação de alvos moleculares para o diagnóstico quantitativo da resistência a pesticidas organofosforados em populações do carrapato-dos-bovinos / Luciana Gatto Brito ... [et al]. -- Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2015.

18 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Rondônia, ISSN 1677-8618 ; 75).

1. Parasitologia veterinária. 2. Carrapato-dos-bovinos. 3. *Rhipicephalus microplus*. 4. Diagnóstico molecular quantitativo. I. Brito, Luciana Gatto. II. Barbieri, Fábio da Silva. III. Funes-Huacca, Maribel E. IV. Néry, Louí de Oliveira. V. Silva, Renata Reis da. VI. Santos, Ana Paula Leite dos. VII. Gonçalves, Ariadne Elaine. VIII. Rabelo, Márcio D. XIX. Oliveira, Márcia Cristina de Sena. X. Título. XI. Série.

CDD 636.089

© Embrapa – 2015

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução	9
Bases moleculares da resistência a pesticidas em artrópode	9
Mecanismo de resistência à pesticidas organofosforados em cepas do carrapato-dos-bovinos	10
Identificação de alvos moleculares envolvidos resistência aos pesticidas organofosforados em cepas do carrapato-dos-bovinos	10
Material e métodos	11
Caracterização da amostra e avaliação fenotípica	11
Isolamento de RNA total e obtenção de Cdna	11
Desenho dos iniciadores específicos primers	11
Resultados e discussão	14
Diagnóstico molecular para a quantificação relativa (qPCR) da resistência aos pesticidas organofosforados	14
Especificidade da reação quantitativa de PCR (qPCR)	14
Diagnóstico quantitativo molecular da resistência a pesticidas organofosforados ...	15
Conclusões	17
Referências	17

Identificação de alvos moleculares para o diagnóstico quantitativo da resistência a pesticidas organofosforados em populações do carrapato-dos-bovinos

Luciana Gatto Brito¹
Fábio da Silva Barbieri²
Maribel E. Funes-Huacca³
Louí de Oliveira Néry⁴
Renata Reis da Silva⁵
Ana Paula Leite dos Santos⁶
Ariadne Elaine Gonçalves⁷
Márcio D. Rabelo⁸
Márcia Cristina de Sena Oliveira⁹

Resumo

Os programas de controle direcionados aos parasitas ainda exigem a utilização de produtos químicos para maior estabilidade operacional das ações de controle e o uso de carrapaticidas químicos é a principal ferramenta de controle para as infestações do carrapato-dos-bovinos. A utilização de técnicas fenotípicas de avaliação in vitro da suscetibilidade de carrapatos às bases pesticidas são ainda o método mais prático e mais utilizados para o diagnóstico e mensuração do fator de resistência às bases carrapaticidas. Na atualidade, o desenvolvimento e o aprimoramento de provas diagnósticas moleculares de resistência aos diferentes grupos pesticidas devem ser consideradas como ações prioritárias de pesquisa e desenvolvimento dada a necessidade de disponibilização ao setor produtivo de ferramentas acuradas e de rápida execução que a médio prazo venham a substituir os bioensaios, os quais necessitam de aproximadamente 45 dias para obtenção dos resultados. A partir de uma população de *Rhipicephalus microplus* reconhecidamente resistente a pesticidas foram realizados os estudos que demonstram a atividade enzimática das esteres no processo de detoxicação de organofosforados. Observou-se que na cepa de *R. microplus* resistente a organofosforados ocorreu o aumento na transcrição dos genes que codificam enzimas metabolizantes, possibilitando identificar os alvos moleculares aptos para serem utilizadas no desenvolvimento do ensaio diagnóstico molecular quantitativo para a resistência aos pesticidas organofosforados em populações do carrapato-dos-bovinos.

Palavras-chave: *Rhipicephalus microplus*, organofosforados, resistência, diagnóstico molecular quantitativo.

¹ Médica-veterinária, D.Sc. em Ciências Veterinárias, pesquisadora da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO.

² Médico-veterinário, D.Sc. em Ciências Veterinárias, pesquisador da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO.

³ Química, D.Sc. em Química Analítica, docente da Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO

⁴ Acadêmico de Ciências Biológicas, Faculdade São Lucas, Porto Velho, RO.

⁵ Química, M.Sc. em Química dos Recursos Naturais, Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO.

⁶ Bióloga, bolsista de Desenvolvimento Tecnológico/CNPq, Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO.

⁷ Acadêmica de Ciências Biológicas da Faculdade São Lucas, Bolsista de Iniciação Científica, Porto Velho, RO.

⁸ Químico, M.Sc. em Agroquímica, analista Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

⁹ Médica-veterinária, D.Sc. em Medicina Veterinária, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

Identification of molecular targets for quantitative diagnosis of resistance to organophosphates pesticides in cattle tick populations

Abstract

Control programs targeted to parasites also require the use of chemicals for a greater operational stability of control measures and the use of chemical acaricide is the main control tool for the cattle tick infestations. The use of phenotypic evaluation the susceptibility to pesticides by in vitro techniques in ticks populations is still the most practical method most used for diagnosis and measurement of resistance factor to the base acaricides. Currently, the development and improvement of molecular diagnostic tests for resistance to different pesticide groups should be considered as a priority for research and development actions given the need to make available to the productive sector of accurate tools and rapid implementation in the medium term will replace bioassays, which require approximately 45 days to obtain results. From a population resistant to known pesticides *Rhipicephalus microplus* were conducted studies demonstrating the enzymatic activity of doors in the detoxification process of organophosphates. It was observed that the strain of *R. microplus* resistant organophosphate was increased in the transcription of genes that encode metabolizing enzymes, enabling to identify the molecular targets capable of being used for the development of a quantitative molecular diagnostic assay for organophosphate resistance in the cattle tick populations.

Key words: *Rhipicephalus microplus*, organophosphates, resistance, quantitative molecular diagnostic.

Introdução

A infestação pelo carrapato-dos-bovinos, *Rhipicephalus microplus*, é um dos fatores limitantes para a melhor rentabilidade da produção pecuária nacional. As condições climáticas predominantes na maior parte do Brasil contribuem para aumentar a intensidade e o período de parasitismo, tornando os prejuízos determinados pelas infestações um problema significativo e impactante para os rebanhos bovinos nacionais.

Os programas de controle das ectoparasitoses de bovinos exigem a utilização de produtos químicos para maior estabilidade operacional das ações e o uso de carrapaticidas químicos ainda é a principal ferramenta de controle para as infestações do carrapato-dos-bovinos. A correta escolha de princípios ativos capazes de controlar as infestações nos rebanhos é uma necessidade premente, em virtude do rápido surgimento e estabelecimento de populações de carrapatos resistentes.

No Brasil, o controle das populações de carrapatos que infestam os rebanhos bovinos se dá pela utilização de uma ampla gama de pesticidas, porém, por causa do baixo custo relativo, os grupos químicos piretroide, organofosforado e amidina são os de uso mais comum nos rebanhos nacionais. A disseminação da resistência às diferentes bases pesticidas demonstra as limitações existentes no controle químico das ectoparasitoses, sendo essencial que as bases parasiticidas sejam administradas como preciosos recursos no âmbito do manejo sanitário dos rebanhos.

O diagnóstico precoce da resistência em populações parasitárias pode viabilizar o uso mais adequado dos grupos químicos disponíveis para o controle das infestações por carrapato, já que novos compostos não estão sendo disponibilizados com a mesma velocidade com que a resistência se estabelece nas populações. Novas opções para o controle parasitário e para o manejo da resistência em populações do carrapato-dos-bovinos são prioritárias para reduzir a dependência química e a emergência da resistência, bem como o consequente aumento dos custos de produção e dos riscos ambientais e à saúde daqueles que trabalham e, ou consomem alimentos de origem animal.

Bases moleculares da resistência a pesticidas em artrópodes

As bases moleculares da resistência à pesticidas podem ser resumidas em três tipos: amplificação, alteração da regulação e alteração estrutural do gene, sendo que as duas primeiras resultam em alterações quantitativas, enquanto que a última envolve uma mudança estrutural em sua expressão (SCOTT, 1995). A amplificação representa um aumento no número de cópias de partes do gene que acabam por causar a expressão de padrões espaciais e temporais que predispuseram estes genes à seleção por inseticidas (RANSON et al., 2002). Já a alteração da regulação de um determinado gene é determinada por mudanças que ocorrem na expressão gênica sem, no entanto, ocorrer nenhuma alteração na sequência do código genético (JIRTLE et al., 2007), enquanto que as alterações estruturais se relacionam a deleções e duplicações no número de genes ou a mudanças na localização dos genes, sendo também denominadas como aberrações cromossômicas (BURGE et al., 2006).

Em artrópodes, os principais mecanismos de resistência à pesticidas são a redução na penetração e o aumento no sequestro e na detoxicação de xenobióticos. Tais mecanismos contribuem para diminuir a efetividade dos pesticidas, considerando que uma diminuição da sensibilidade no local alvo ou a alteração do local de destino reduzem a eficácia do fármaco. Em relação ao carrapato *R. microplus* estudos evidenciam que ambos os mecanismos de resistência encontram-se presentes, sendo que alterações na cinética do canal de sódio

relacionam-se à resistência a piretroides (GUERRERO et al., 2001) e o aumento na síntese de enzimas relacionadas à detoxicação de pesticidas mostra-se um importante mecanismo envolvido na resistência à pesticidas organofosforados (GUERRERO et al., 2012).

Três famílias de proteínas são amplamente responsabilizadas pelo metabolismo dos fármacos pesticidas: citocromos P450 (oxidases de função mista ou MFO), as esterases (EST) e as glutathione S-transferases (GSTs). As proteínas destas famílias também estão envolvidas na síntese e degradação de uma grande variedade de compostos metabólicos endógenos, assim como na proteção contra o estresse oxidativo, na transmissão de sinais nervosos e no transporte de compostos por meio das células (RANSON et al., 2002).

O desenvolvimento da resistência em populações de *R. microplus* compromete não apenas o produto comercial a que as populações foram expostas, mas a todo o grupo químico do princípio ativo utilizado. O estabelecimento da resistência nas populações parasitárias impede a utilização de todas as classes de pesticidas disponíveis, fazendo com que o controle do carrapato torne-se praticamente inviável.

Mecanismo de resistência à pesticidas organofosforados em cepas do carrapato-dos-bovinos

O grupo químico dos pesticidas organofosforados (OP) tem como alvo os genes que determinam a atividade enzimática das acetilcolinesterases (AChEs) no sistema nervoso central de artrópodes. Pesticidas organofosforados inibem irreversivelmente a ação da enzima AChE, provocando constante estimulação nervosa que acarreta na morte por paralisia (MANSON et al., 1984).

Acredita-se que a resistência aos pesticidas organofosforados em populações de *R. microplus* se estabelece e se mantém através de um complexo processo multifatorial envolvendo diversas esterases (ESTs) (GUERRERO et al., 2012; TEMEYER et al., 2013). Considera-se ainda que, a base molecular da resistência à pesticidas OP em cepas do carrapato-dos-bovinos parece estar relacionada com o aumento da transcrição ou amplificação de genes que codificam enzimas metabolizantes, tais como as AChEs e as ESTs (TEMEYER et al., 2013).

Uma ou mais AChEs parecem estar envolvidas na resposta à acaricidas (BAFFI et al., 2008; TEMEYER et al., 2012; TEMEYER et al., 2013). Foram identificados por Bellgard et al. (2012) sete *contigs* (conjunto de sobreposição de segmentos de DNA que em conjunto representam uma região consenso de DNA) no transcriptoma de *R. microplus* com significativa similaridade com sequências de AChEs. Temeyer et al. (2013) expressaram três transcritos tipo acetilcolinesterases isolados em duas cepas resistentes e uma suscetível de *R. microplus* e demonstraram que há uma variante de alelos nos indivíduos de cepas que apresentam diferentes respostas a organofosforados, concluindo que o fenótipo resistente a organofosforados é uma característica de controle genético predominante.

Identificação de alvos moleculares envolvidos resistência aos pesticidas organofosforados em cepas do carrapato-dos-bovinos

A utilização de técnicas fenotípicas de avaliação da suscetibilidade de carrapatos às bases pesticidas é ainda o método mais utilizado para o diagnóstico do grau da resistência das populações de *R. microplus*. Porém, a rapidez e acurácia das técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) podem reduzir a dependência química do controle das infestações, a contaminação ambiental determinada pelos pesticidas e a redução da presença de resíduos parasiticidas nos alimentos de origem animal.

Métodos de caracterização molecular são adequados quando a resposta de resistência é influenciada pela expressão de genes de resistência ao princípio ativo dos pesticidas. O diagnóstico rápido e acurado da resistência à pesticidas é possível por meio do conhecimento das rotas fisiológicas envolvidas no processo metabólico de absorção e, ou degradação que podem ser identificadas com a reação em cadeia da polimerase (PCR). Na atualidade, as aplicações da técnica de PCR quantitativo em tempo real são numerosas e incluem os estudos da expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e quantificação do número de cópias de ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico ou complementar (GINZINGER, 2002).

Material e métodos

Caracterização da amostra e avaliação fenotípica

Uma população de carrapato-dos-bovinos de Rondônia com fator de resistência de 62,6 em relação à cepa suscetível identificada em São Paulo foi utilizada para a realização do ensaio fenotípico direcionado a ativar a síntese das enzimas envolvidas na detoxicação de organofosforados em *R. microplus*. Grupos de 10 fêmeas adultas com cerca de 4,5 mm foram submetidos ao Teste de Imersão de Adultos (TIA) desenvolvido por Drummond et al. (1973) utilizando-se soluções aquosas de Diazinon em grau técnico (Diazinon, analytical standart, Chem Service, Lote 2221-100) nas concentrações de 0,1%, 0,25% e 0,5%. Todas as concentrações foram avaliadas em triplicata além do controle, o qual também foi realizado em triplicata utilizando-se água ultra-pura. As fêmeas permaneceram em imersão com constante agitação por 30 minutos e após a realização do teste foram secas com papel toalha e alocadas em placa de Petri e mantidas em estufa climatizada a 25 °C e atmosfera de umidade relativa de 75%. A leitura do teste foi realizada após 24 horas e, fêmeas sobreviventes (resistentes) das diferentes concentrações foram dissecadas para a retirada do terço superior onde encontra-se localizado o singlânglio (estrutura que corresponde ao sistema nervoso central dos ácaros).

Isolamento de RNA total e obtenção de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando-se kit comercial *Total RNA Extraction kit [Mini]* (Real Biotech Corporation, Cat Number YRT50, Taiwan) de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações totais de RNA extraído, a pureza e a integridade foram avaliados com o *RNA 6000 Nano Assay kit* utilizando o sistema microfluídico Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc, Alemanha) e o espectrofotômetro de espectro completo (220-750nm) Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA). Antes de transcrição, o RNA total foi tratado com DNase I kit (Life Technologies, EUA) seguindo-se as recomendações do fabricante.

Para a síntese de cDNA utilizou-se *random primers* ancorados Oligo (dT) 23 (Sigma-Aldrich, EUA) em reação de incubação a 70 °C durante 10 minutos juntamente com o RNA total tratado, conforme descrito pelo fabricante. Em seguida, realizou-se a reação de transcrição reversa (*Reverse Transcription* – RT) utilizando-se o kit comercial *High-Capacity cDNA* (Applied Biosystems, EUA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante para um volume final de reação de 20 µL. Por fim, o cDNA sintetizado foi quantificado por espectrofotometria para avaliação da eficiência da reação de RT.

Desenho dos iniciadores específicos primers

Sequências de nucleótidos envolvidos na síntese de AChE e EST e reportadas como envolvidas na resistência a pesticidas OP em cepas do carrapato dos bovinos, *Lucilia cuprina* e *Musca domestica* depositadas no banco público de nucleotídeos GenBank (AF067771.1,

AJ278342.1, AJ278345.1, DQ533868.1, AF286096.1, U49421.1, U49423.1, U49422.1, U49420.1, U56636.1, AF133341.1) foram utilizadas para a obtenção dos *primers* iniciadores aptos a detectar a mais ampla variabilidade relacionada aos genes envolvidos na síntese enzimática que confere resistência às populações de *R. microplus* a OP.

Realizou-se o alinhamento das sequências utilizando o algoritmo Clustal-W (DNASTar Inc., Madison, WI, EUA) para identificação das regiões conservadas e a obtenção dos *primers* foi realizada com o software *Primer Blast* (YE et al., 2012), sendo a temperatura de anelamento (*Temperature of melting* – Tm) o parâmetro limitante. As Tms teóricas dos *amplicons* referentes a cada *primer* também foram estimadas utilizando-se o software. A obtenção do *primer* referente ao gene endógeno RNA ribossômico 18S de *R. microplus* foi realizada a partir da sequência JX051005.1 também disponível no banco público de nucleotídeos GenBank. Foram desenhados 25 *primers* para utilização na qPCR (Tabelas 1 e 2). Os iniciadores foram concebidos de modo que os *amplicons* tivessem uma Tm variando entre 80 °C e 87,5 °C a fim de facilitar a identificação dos diferentes *amplicons* em reações multiplex. Todos os *primers* foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies Co. Ltd. (Iowa, EUA).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores específicos (*primers*) desenhados para detecção quantitativa do número de cópias de genes envolvidos na síntese de Acetilcolinesterase em populações de *Rhipicephalus microplus*.

Nome	Sequência (5'--- 3')	Código de acesso	<i>Amplicon</i>	Tm
LGB 001 For LGB 001 Rev	5CCGTTGGTATTTGGCAGAGT TCCTTTGGCAAATCACTCC	GenBank: AF067771.1	102 pb	60 °C
LGB 002 For LGB 002 Rev	GCTTTTGGAAACGTTGTGGT GCAGCAATGTTTTCTGGAT	GenBank: AF067771.1	143 pb	60 °C
LGB 003 For LGB 003 Rev	CTGCCATACGATCAGCAGAA ATCCTTCTTGAAGCCACCT	GenBank: AF067771.1	124 pb	60 °C
LGB 004 For LGB 004 Rev	GCCGATTCAAGGTCATTCAT GTATCTTGCATCGTGGCTCA	GenBank: AF067771.1	82 pb	59,9 °C
LGB 005 For LGB 005 Rev	TGCCGGTGATATGGACTACA AGCTGTGAACTTTGGCCACT	GenBank: AJ278342.1	109 pb	59,9 °C
LGB 006 For LGB 006 Rev	TGTGCCGGTGATATGGACTA AGCTGTGAACTTTGGCCACT	GenBank: AJ278342.1	111 pb	59,9 °C
LGB 007 For LGB 007 Rev	CCGCAATACCTCTCGATGAT ACAGGAAACCGAATGACTGC	GenBank: AJ278345.1	96 pb	60,1 °C

Tabela 2. Sequência dos iniciadores específicos (*primers*) desenhados para detecção quantitativa do número de cópias de genes envolvidos na síntese de esterases em e sequência do *primer* referente ao gene endógeno RNA ribossômico 18S para populações de *Rhipicephalus microplus*.

Nome	Sequência (5'--- 3')	Código de acesso	Amplicon	Tm
LGB 008 For LGB 008 Rev	TTGCAGCTCCTTTTTGGACT ATTTGCCCGAACAGTAAACG	GenBank: DQ533868.1	132 pb	60 °C
LGB 009 For LGB 009 Rev	GTCTTGACGCTCCTTTTTGG ATTTGCCCGAACAGTAAACG	GenBank: DQ533868.1	135 pb	60 °C
LGB 010 For LGB 010 Rev	CTTGACGCTCCTTTTTGGAC ATTTGCCCGAACAGTAAACG	GenBank: DQ533868.1	133 pb	60 °C
LGB 011 For LGB 011 Rev	GGGTGACCTTGTTTGGAGAA TTGAAGAGACCCTCGCTCAT	GenBank: AF182283.1	82 pb	59,9 °C
LGB 012 For LGB 012 Rev	CAACATTGTAGGCTGCTCCA ATGGGAGCGAAAGGAATCTT	GenBank: AF182283.1	150 pb	60 °C
LGB 013 For LGB 013 Rev	AAGCAGAAGTGGCCAAGGTA GAAACCCTTGGTCTCGTTGA	GenBank: AF182283.1	84 pb	60 °C
LGB 014 For LGB 014 Rev	GGGTGACCTTGTTTGGAGAA TTGAAGAGACCCTCGCTCAT	GenBank: AF286096.1	82 PB	59,9 °C
LGB 015 For LGB 015 Rev	AAGCAGAAGTGGCCAAGGTA GAAACCCTTGGTCTCGTTGA	GenBank: AF286096.1	84 pb	60 °C
LGB 016 For LGB 016 Rev	GGCAAAGTGGTTCACGTTTT AGTATCCGGCCAGCTTTTCT	GenBank: AF286096.1	126 pb	60 °C
LGB 017 For LGB 017 Rev	CCTTGAAAATGGGTGCTAAA TGTACCGGAGGTGTGATTGA	GenBank: U56636.1	149 pb	59,9 °C
LGB 018 For LGB 018 Rev	TCAATCACACCTCCGGTACA CCCTTAACACCACGTCCACT	GenBank: U56636.1	106 pb	59,9 °C
LGB 019 For LGB 019 Rev	GGATGGTGTGCGTGATTGT CTCTGAGCCACACACTTTGC	GenBank: U49421.1	82 pb	60 °C
LGB 020 For LGB 020 Rev	GTGTACGTGCCAAACCCTGT TTGGTCTGGTGGGCTTTAAC	GenBank: U49423.1	111 pb	60 °C
LGB 021 For LGB 021 Rev	TATGGCGGTGGTTTTCAAAT TCAATGCTGGGATCATCAAA	GenBank: U49422.1	143 pb	60 °C
LGB 022 For LGB 022 Rev	GAGGGAACGGAGGACTGTTT TGCACCTCCATAAATCCACA	GenBank: U49420.1	96 pb	60 °C
LGB 023 For LGB 023 Rev	GACCTTGAAAATGGGTGCTA ACCGGAGGTGTGATTGAAAC	GenBank: U56636.1	148 pb	59,9 °C
LGB 024 For LGB 024 Rev	TGGGGAAACACCTACTCTGG GAAGCGCAATTGTAGGAAGC	GenBank: AF133341.1	91 pb	60 °C
LGB 025 For LGB 025 Rev	TGGCGGAGATTTATTTTCG GGCTAAGGAAACCAACACA	GenBank: AF133341.1	122 pb	60 °C
RNA 18S For RNA 18S Rev	AAAGCTGCTGCGGTTAAAAA TCTCGAGGCACACAATGAAG	GenBank: JX051005.1	131 pb	60 °C

Resultados e discussão

Diagnóstico molecular para a quantificação relativa (qPCR) da resistência aos pesticidas organofosforados

Inicialmente, os ensaios em tempo real foram otimizadas em reações de PCR *singleplex* utilizando-se o corante de ligação de DNA *Eva-Green™* (*SoFast EvaGreen kit*, BioRad). Foram testados os 25 pares de *primers* desenhados para detecção quantitativa dos genes AChE e Est, a fim de se evidenciar as melhores performances de amplificação para os alvos moleculares selecionados. Para a otimização da reação quantitativa de PCR em tempo real (qPCR), as menores concentrações de *primers* e cloreto de magnésio (MgCl₂) capazes de gerar os maiores picos de fluorescência e os menores ciclos liminares de amplificação (threshold cycle – Ct), a análise da resolução dos picos das curvas de *melting* e os valores de ciclo de quantificação (Cq). Ciclo de quantificação é o ciclo em que a fluorescência relacionada ao alvo molecular pode ser detectada pelo termociclador e é o resultado de base para a qPCR: valores inferiores de Cq significam maior número de cópias iniciais do alvo.

O gene endógeno RNA ribossômico 18S de *R. microplus* foi utilizado com gene endógeno controle e também para o cálculo da expressão gênica relativa nas amostras de teleóginas sobreviventes a diferentes concentrações de Diazinon. Cada ensaio *singleplex*-PCR em tempo real foi realizado em um volume de reação de 20 µl contendo: 2X SsoFast™ *EvaGreen® Supermix* (Bio-Rad Laboratories Inc., EUA), 100 ng de cDNA e 0,5 µM de cada um dos *primers*. A amplificação foi realizada utilizando o sistema de detecção toque CFX 96 (Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA), e a reação consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C durante 90 segundos e 39 ciclos com 95 °C durante 5 segundos, 60 °C durante 20 segundos e 72 °C durante 30 segundos, seguida de um arrefecimento final a 4 °C durante um minuto. Uma curva de fusão (*melting curve*) foi padronizada a partir de uma rampa de temperatura de anelamento variável entre 60 °C e 80 °C com aumento de 2 °C/segundo. Os dados de expressão relativa foram analisados a partir do software CFX Manager™. Todos os experimentos foram realizados utilizando-se como controle negativo uma amostra contendo água ultrapura em igual volume de cDNA e com o propósito de avaliar a reprodutibilidade cada alvo molecular foi avaliado em triplicata.

A quantificação de mRNA em cada amostra de teleógina foi determinada pelo software CFX Manager™, a qual foi normalizada por meio da quantificação dos níveis de expressão do gene endógeno. Os níveis de expressão de mRNA referentes a AChE e EST nas amostras-controle sensíveis (teleóginas mortas após exposição ao Diazinon) e resistentes foram quantificados em unidades relativas (*Relative Unites - RU*) utilizando-se o CFX Manager™ *software* (Bio-Rad Laboratories Inc., EUA).

Especificidade da reação quantitativa de PCR (qPCR)

Após o *screening* do conjunto de 25 *primers* desenhados para identificação e quantificação de genes envolvidos na síntese de AchE e EST, foram selecionados três *primers* como aptos a serem utilizados na elaboração da prova diagnóstica quantitativa para identificação de populações de *R. microplus* resistentes à pesticidas OP. A especificidade dos *primers* foi verificada em ensaios *singleplex*-PCR em tempo real. A análise da temperatura de anelamento (Tm) dos produtos de amplificação utilizando o corante EvaGreen (EG) evidenciou temperaturas específicas para cada um dos *primers* selecionados, as quais originaram picos distintos de Tm para cada *primer*, sendo esses de 80 °C para o *primer* LGB 007 o qual detecta o gene envolvido na síntese de AchE2; de 82,5 °C para o *primer* LGB 003 apto a detectar o mRNA envolvido na síntese da AChE e, de 87,5 °C para o *primer* LGB 012 responsável pela detecção do mRNA

envolvido na síntese de EST. A T_m de 83,5 °C possibilitou a identificação da amplificação do gene de controle endógeno RNA ribossômico 18S de *R. microplus*. Os picos de T_m identificados nos ensaios individuais para cada um dos genes envolvidos na síntese enzimática de AchE, AchE2 e EST também foram observados nas análises EG pós-PCR das bandas dos *amplicons* (Tabela 1; Figura 1).

Adicionalmente alvos moleculares não enzimáticos específicos, como o gene gliceraldeído 3-fosfato dihidrogenase (GAPDH) e o controle negativo água usados com *template* para a padronização da reação EG qPCR. Picos de T_m não específicos para o mRNA dos três genes alvos envolvidos na síntese enzimática podem ser observados, a exceção de um pico de baixa T_m relacionado à formação de dímeros de *primers* que podem ser distinguidos dos *amplicons* alvos, em virtude da baixa temperatura de anelamento (Figura 1). Estes dados demonstraram que ensaios *singleplex* EG qPCR mostram-se aptos para o estabelecimento de uma prova molecular quantitativa específica para o diagnóstico da resistência a pesticidas OP por meio da identificação do mRNA envolvido na síntese enzimática de AchE2, AchE e EST.

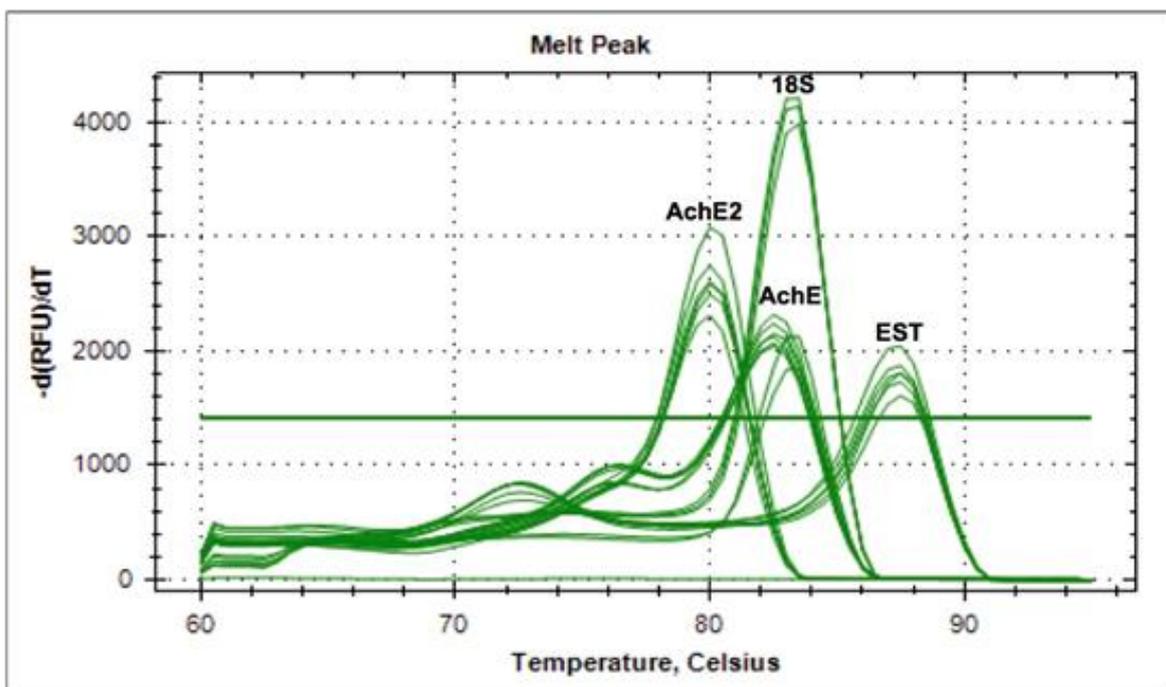


Figura 1. Avaliação da especificidade do ensaio PCR *singleplex* em tempo real para o diagnóstico da resistência à pesticidas organofosforados (OP) em populações de *Rhipicephalus microplus* pela análise da temperatura de anelamento (*Temperature melting* – T_m) do DNA complementar (cDNA) referente ao RNA mensageiro (mRNA) envolvido na síntese enzimática de acetilcolinesterases (AChE), acetilcolinesterase 2 e AChE2), esterase (EST) e do gene endógeno RNA ribossômico 18S.

Diagnóstico quantitativo molecular da resistência a pesticidas organofosforados

Para a obtenção das curvas-padrão a partir de valores de C_q dos ensaios *singleplex* em tempo real foram avaliados a correlação linear ($R^2 \geq 0,8$) entre os valores de C_q e o \log^{10} do número de cópias iniciais de cDNA (Figura 2).

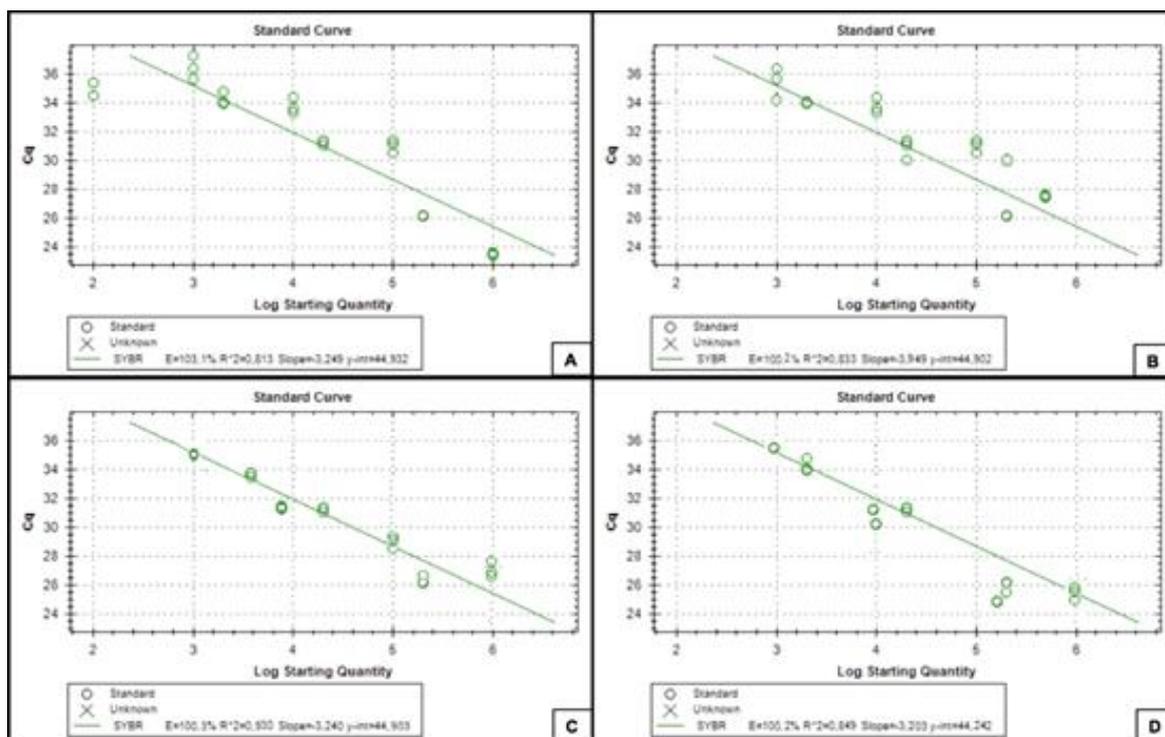


Figura 2. Curvas-padrão de eficiência de quantificação da expressão: (A) gene endógeno RNA ribossômico 18S de *Rhipicephalus microplus*; (B) gene envolvido na síntese de enzima de acetilcolinesterases (AChE); (C) gene envolvido na síntese de enzima de acetilcolinesterase 2 (AChE2) e, (D) gene envolvido na síntese de enzima de esterases (EST)

A maior eficiência de quantificação do mRNA envolvido na síntese AChE, AChE2 e EST foi observada nas teleóginas submetidas a imersão em solução de Diazinon a 0,25% com 1,00%, 1,73% e 4,26%, respectivamente (Figura 3), indicando uma associação significativa das avaliações in vitro de resistência com a amplificação de genes relacionados à resistência. A análise das curvas-padrão para os alvos moleculares testados demonstrou um coeficiente de correlação (R^2) acima de 0,98 para todas as rotas metabólicas associadas a detoxicação de pesticidas OP.

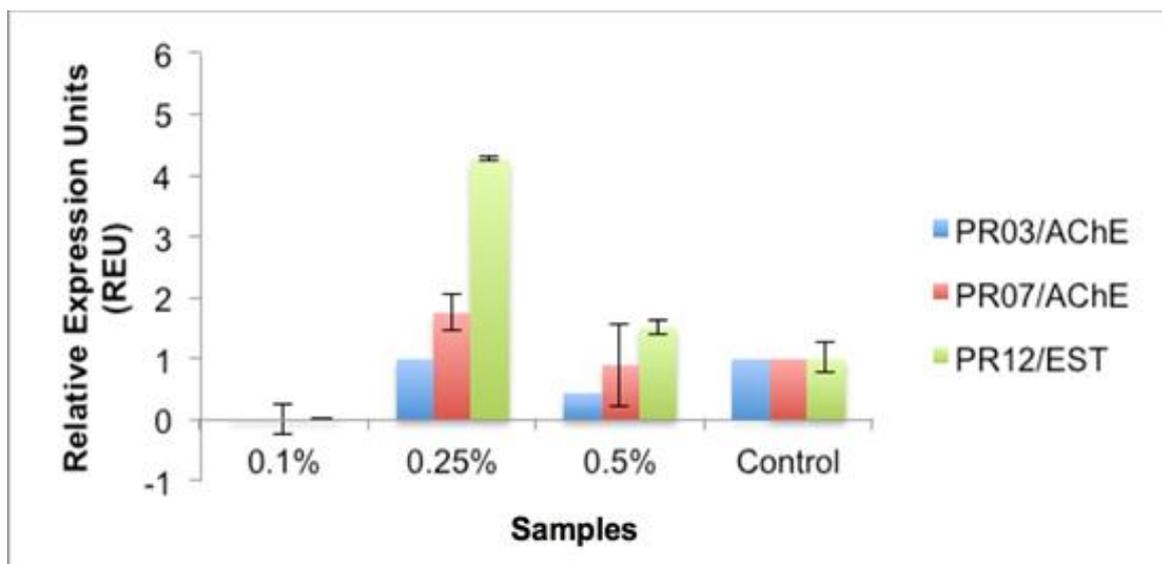


Figura 3. Comparação de níveis de expressão dos genes envolvidos na síntese de acetilcolinesterases (AChE), acetilcolinesterase 2 (AChE2) e esterase (EST) nos tratamentos com Diazinon a 0,1%, 0,25% e 0,5% nas cepas resistentes de *Rhipicephalus microplus*.

Esses resultados subsidiam a caracterização de alvos moleculares para o diagnóstico quantitativo da resistência à pesticidas OP em populações brasileiras e *R. microplus* e corroboram com Guerrero et al. (2012) e Temeyer et al. (2013) que evidenciaram que a resistência aos pesticidas organofosforados em populações do carrapato-dos-bovinos se estabelece e se mantém através de um processo multifatorial envolvendo diversas AChEs que promovem o aumento da transcrição ou a amplificação de genes que codificam enzimas metabolizantes de xenobióticos.

Conclusões

O diagnóstico quantitativo (qPCR) em tempo real da resistência à pesticidas organofosforados direcionado a identificar cepas do carrapato-dos-bovinos resistentes apresentou um bom desempenho na diferenciação dos níveis de expressão de genes envolvidos na detoxificação do pesticida. A padronização de reações *singleplex* em PCR em tempo real permitiu o desenvolvimento de um ensaio molecular de alta acurácia para o diagnóstico da resistência a pesticidas organofosforados em populações do carrapato-dos-bovinos.

A análise de anelamento dos *primers* indicou que o método é sensível, específico, rápido e de alto rendimento para o diagnóstico da resistência ao pesticida em populações do carrapato-dos-bovinos.

Referências

- BAFFI, M. A.; SOUZA, G. R. L.; SOUSA, C. S.; CERON, C. R.; BONETTI, A. M. Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephallus (Boophilus) microplus* (Acari, Ixodidae). **Molecular & Biochemical Parasitology**, Oxford, v. 160, p. 70–73, 2008.
- BELLEGARD, M. I.; MOOLHUIJZENA, P. M.; GUERRERO, F. D.; SCHIBECIA, D.; RODRIGUEZ-VALLEB, M.; PETERSONE, D. G.; DOWD, S. E.; BARRERO, R.; HUNTER, A.; MILLER, R. J. LEW-TABOR, A. E. Cattle Tick Base: An integrated Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 161-169, 2012.
- BURGE, S.; PARKINSON, G. N.; HAZEL, P.; TODD, A. K.; NEIDLE, S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 34, n. 19, p. 5402-5415, 2006.
- DRUMMOND, R. O.; CRUST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAN, O. H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus decoloratus* laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.
- GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v. 30, n. 6, p. 503-512, 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.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2012.
- JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 8, p. 253-262, 2007.
- MANSON, J.; MURPHY, M.; RICHDAL, N.; SMITH, M. Effects of oral exposure to trichloroethylene on female reproductive function. **Toxicology**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 229-242, 1984.
- RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABEGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M.V.; UNGER, M.F.; COLLINS, F.H.; FEYEREISEN, R. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. **Science**, New York, v. 298, n. 5591, p. 179-181, 2002.
- SCOTT, J. A. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. **The Florida Entomologist**, Gainesville, v. 78, n. 3, p. 399-414, set. 1995.

TAYLOR, P.; RADIC, Z. The cholinesterases: from genes to proteins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 34, p. 281-320, 1994.

TEMEYER, K. B.; OLAFSON, P. U.; PRUETT, J. H. Sequence Polymorphism in Acetylcholinesterase Transcripts and Genotyping Survey of BmAChE1 in Laboratory and Mexican Strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Journal of Medical Entomology**, Boston, v. 49, n. 3, p. 555-562, 2012.

TEMEYER, K. B.; OLAFSON, P. U.; BRAKE, D. K.; TUCKOW, A. P.; LI, A. Y.; PEREZ DE LEÓN, A.A. Acetylcholinesterase of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Phlebotomus papatasi*: Gene identification, expression and biochemical properties of recombinant proteins. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 106, p. 118-123, 2013.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, p. 134, 2012.

Embrapa

Rondônia