



ANÁLISE DA RESISTÊNCIA DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* A ORGANOFOSFORADOS E INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO PERFIL RESISTENTE

CAROLINE SANTOS GAMBINI COELHO

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SÃO
PAULO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE, SEGURANÇA ALIMENTAR E
AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO

CAROLINE SANTOS GAMBINI COELHO

Dissertação apresentada para a obtenção
do título de Mestre em Sanidade,
Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio.

Área de concentração: Segurança
Alimentar e Sanidade no Agro
ecossistema.

SÃO PAULO
2025

CAROLINE SANTOS GAMBINI COELHO

**ANÁLISE DA RESISTÊNCIA DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* A
ORGANOFOSFORADOS E INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO PERFIL
RESISTENTE**

Dissertação apresentada para a obtenção
do título de Mestre em Sanidade,
Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio.

Área de concentração: Segurança
Alimentar e Sanidade no Agro
ecossistema.

Orientadora: Professora Dra. Márcia
Cristina Mendes

Coorientador: Dr. Guilherme Marcondes
Klafke

SÃO PAULO
2025

Eu **Caroline Santos Gambini Coelho**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: Caroline S. G. Coelho Data 15 / 09 / 2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Coelho, Caroline Santos Gambini.

Análise da resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a organofosforados e investigação molecular do perfil resistente. / Caroline Santos Gambini Coelho. - São Paulo, 2025.

64 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2025D.CC03

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Sanidade, gestão ambiental e qualidade de alimentos, produtos e processos na produção agropecuária sustentável.

Orientador: Marcia Cristina Mendes

Coorientador: Guilherme Marcondes Klafke

Versão do título para o inglês: Analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistance to organophosphates and molecular investigation of the resistant profile.

1. Acetilcolinesterase 2. TPL 3. Enzima 4. Mutações I. Coelho, Caroline Santos Gambini II. Mendes, Marcia Cristina III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2025/03

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Márcia Cristina Mendes e ao meu co-orientador Dr. Guilherme Marcondes Klafke, por toda a atenção e dedicação ao compartilhar seu conhecimento para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, por todas as boas risadas e as trocas de ideias, tornando essa jornada mais leve e motivadora.

À doutoranda Deborah Mirela de Melo Romano por todo apoio na realização deste trabalho. Sua amizade, parceria e suporte foram fundamentais desde o início.

À doutoranda Isabella Barboza de Almeida, pela constante parceria e apoio ao longo do mestrado, por todos os conselhos valiosos e pelas conversas que fizeram toda a diferença.

À pesquisadora Fernanda Calvo Duarte pelo apoio e pelas conversas esclarecedoras sempre que precisei de ajuda.

Ao Médico Veterinário Oswaldo José Christ Adorno, da CATI Regional de Guaratinguetá, pelo envio dos carrapatos, que foram essenciais para a realização deste projeto.

Ao Professor Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior, do Centro de Biotecnologia da UFRGS, por ceder a cepa suscetível para a realização dos testes.

À equipe do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, minha gratidão pela recepção e por toda a experiência compartilhada.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, pela oportunidade e por todo conhecimento adquirido ao longo do mestrado.

Aos meus amigos e minha família, por acreditarem em mim e me apoiarem em cada etapa desse percurso.

E agradeço ao meu companheiro de vida Kaique, pelo apoio, paciência, carinho e incentivo que me deu durante todo esse período.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Coelho, Caroline. **Análise da resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a organofosforados e investigação molecular do perfil resistente** (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2025.

A resistência do carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, aos carrapaticidas é um problema econômico de grande importância mundial. No Brasil, o carrapato causa perdas acima de 3 bilhões de dólares anualmente. Portanto, é crucial compreender os mecanismos de resistência para auxiliar na identificação de métodos de controle mais eficazes. Dessa forma, este estudo teve como objetivo principal avaliar a resistência de dez populações de *R. microplus* da Região do Vale do Paraíba, estado de São Paulo, ao organofosforado (OF) clorpirifós, por meio do Teste de Pacote de Larvas (TPL) e investigar os mecanismos de resistência presentes. Também foi realizada a caracterização do perfil resistente da cepa denominada PINDA, que demonstrou o maior fator de resistência dentre as cepas estudadas, aos OF clorfenvinfós e clorpirifós, através do TPL, e uma triagem utilizando os acaricidas: doramectina, ivermectina, cipermetrina, fipronil, moxidectina e amitraz, por meio da Dose Diagnóstica (DD). Nos bioensaios TPL e DD, as larvas foram expostas por 24 horas aos acaricidas e após esse período foi feita a contagem para avaliação da mortalidade. Na DD, quatro níveis de resistência foram estabelecidos de acordo com a mortalidade das larvas. Os dados de mortalidade obtidos do TPL, foram submetidos a uma análise Probit para determinação dos valores da concentração letal para 50% (CL₅₀) e os fatores de resistência (FR). As populações de campo foram consideradas resistentes quando a CL₅₀ (IC_{95%}) não se sobrepunha ao da cepa suscetível e o FR ≥ 2 . A fim de investigar o mecanismo de resistência a OF, foram realizados ensaios de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) utilizando propoxur. Além disso, 5 amostras de cada cepa foram submetidas ao sequenciamento de Sanger para identificar possíveis mutações nos genes que codificam as enzimas AChE1 e AChE2. Nos bioensaios das populações de campo do Vale do Paraíba, os resultados demonstraram que 90% das cepas eram resistentes aos organofosforados (OF). O TPL-DD confirmou a multirresistência a carrapaticidas na cepa PINDA para cipermetrina, clorpirifós e amitraz. Enquanto, para as lactonas macrocíclicas (doramectina e moxidectina) se mostraram suscetíveis. Com relação aos OF, a cepa PINDA apresentou fator de resistência (FR) de 24,3 para clorpirifós e 10,3 para clorfenvinfós. No teste com inibidor enzimático, todas as cepas apresentaram diferença estatística em relação à cepa suscetível. Foi possível também identificar 14 mutações na sequência de aminoácidos da AChE1 e 19 na sequência da AChE2. Dentre essas mutações, 9 são inéditas, sendo 3 na AChE1 e 6 na AChE2. Esses achados sugerem que a resistência das cepas de campo aos organofosforados está associada à insensibilidade do sítio-alvo.

Palavras-chave: acetilcolinesterase, TPL, enzima, mutações.

ABSTRACT

Coelho, Caroline. **Analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistance to organophosphates and molecular investigation of the resistant profile.** (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2025

The resistance of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, to acaricides is a significant economic issue worldwide. In Brazil, tick infestations cause annual losses exceeding 3 billion dollars. Therefore, understanding resistance mechanisms is crucial for developing more effective control methods. This study aimed to evaluate the resistance of ten *R. microplus* populations from the Vale do Paraíba region, São Paulo state, to the organophosphate (OP) chlorpyrifos using the Larval Packet Test (LPT) and investigate the underlying resistance mechanisms. Additionally, the resistant profile of the strain named PINDA, which showed the highest resistance factor among the studied strains, was characterized for the OPs chlorfenvinphos and chlorpyrifos through the LPT, alongside screening with the acaricides doramectin, ivermectin, cypermethrin, fipronil, moxidectin, and amitraz using the Diagnostic Dose (DD) method. In both LPT and DD bioassays, larvae were exposed to acaricides for 24 hours, and mortality was assessed thereafter. In the DD method, four resistance levels were defined based on larval mortality. Mortality data from the LPT were analyzed using Probit analysis to determine the lethal concentration for 50% of the population (LC50), and resistance factors (RF). Field populations were considered resistant when the LC50 (95% CI) did not overlap with that of the susceptible strain and the $RF \geq 2$. To investigate the OP resistance mechanism, acetylcholinesterase (AChE) inhibition assays were performed using propoxur. Additionally, five samples from each strain underwent Sanger sequencing to identify potential mutations in the genes encoding AChE1 and AChE2 enzymes. Bioassay results for field populations from Vale do Paraíba demonstrated that 90% of the strains were resistant to organophosphates. The LPT-DD confirmed multi-resistance of the PINDA strain to cypermethrin, chlorpyrifos, and amitraz, while it remained susceptible to macrocyclic lactones (doramectin and moxidectin). Regarding OPs, the PINDA strain showed a resistance factor (RF) of 24.3 for chlorpyrifos and 10.3 for chlorfenvinphos. In enzymatic inhibition assays, all strains showed significant differences compared to the susceptible strain. Furthermore, 14 mutations were identified in the AChE1 amino acid sequence and 19 in the AChE2 sequence, including nine novel mutations (three in AChE1 and six in AChE2). These findings suggest that resistance of field strains to organophosphates is associated with target site insensitivity.

Keywords: acetylcholinesterase, LPT, enzyme, mutations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Teleóquina antes da postura (A) e pós postura (B). Fonte: foto da autora.....	17
Figura 2 – Esquematização das fases do ciclo de vida do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> . Fonte: elaborado pela autora.....	18
Figura 3 – Carrapatos parasitando bovinos, localizadas na orelha (A) e pálpebra (B). Fonte: foto da autora.....	20
Figura 4 – Síntese e hidrólise da acetilcolina. Fonte: Araujo <i>et al.</i> , 2016.....	22
Figura 5 – Moléculas de alguns inseticidas organofosforados. Fonte: Santos <i>et al.</i> , 2007.....	22
Figura 6 – Distribuição Geográfica dos Municípios da Região do Vale do Paraíba. Disponível em: https://rmvpln.pdui.sp.gov.br/?page_id=127 . Acesso em: 20 jul. 2024.....	27
Figura 7 – Pacotes impregnados para bioensaio TPL (A) e os pacotes já fechados com cliques (B). Fonte: foto da autora.....	29
Figura 8 – Placa de 96 poços utilizada para o teste de atividade enzimática. As linhas de A a D contêm homogenato da cepa resistente, enquanto as linhas de E a H apresentam homogenato da cepa suscetível POA. Fonte: foto da autora.....	31
Figura 9 – Espectrofotômetro utilizado para a leitura da absorbância das amostras. Fonte: foto da autora.....	32
Figura 10 – Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato <i>R.</i> <i>microplus</i> das cepas de POA e Alvorada.....	38
Figura 11 – Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato <i>R.</i> <i>microplus</i> das cepas de POA e Cunha.....	38
Figura 12 – Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato <i>R.</i> <i>microplus</i> das cepas de POA e Acácio.....	39
Figura 13 – Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato <i>R.</i> <i>microplus</i> das cepas de POA e Lorena.....	39

Figura 14 – Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato <i>R. microplus</i> das cepas de POA e Lagoinha.....	40
Figura 15 – Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato <i>R. microplus</i> das cepas POA e São Benedito.....	40
Figura 16 – Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato <i>R. microplus</i> das cepas de POA e Bananal.....	41
Figura 17 – Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato <i>R. microplus</i> das cepas de POA e Pinda.....	41
Figura 18 – Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato <i>R. microplus</i> das cepas de POA e GUARA.....	42
Figura 19 – Atividade Remanescente de Acetilcolinesterase das cepas do carrapato <i>R. microplus</i> do Vale do Paraíba, na concentração de 1,25mM de Propoxur.....	42
Figura 20 – Algumas das amostras quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop™.....	43
Figura 21 – Foto do gel de agarose confirmando amplificação do gene AChE1 em 34 amostras + controle negativo (C-), branco (B) e DNA Ladder (L); PB: pares de base.....	44
Figura 22 – Foto do gel de agarose confirmando a purificação da amplificação de DNA do gene AChE2 em 13 amostras + DNA Ladder; PB: pares de base. O controle negativo e o branco da reação, foram incluídos no experimento, porém carregados em um gel separado..	44
Figura 23 – Blast da sequência da amostra AC1 para comparação com sequências depositadas no banco de dados Genbank.....	45
Figura 24 – Trecho do alinhamento das sequências de aminoácidos do gene AChE1 das diferentes cepas do carrapato <i>R. microplus</i> analisadas, destacando a alteração do aminoácido em relação à sequência de referência.....	45/46/47
Figura 25 – Trecho do alinhamento das sequências de aminoácidos do gene AChE2 das diferentes cepas do carrapato <i>R. microplus</i> analisadas, destacando a alteração do aminoácido em relação à sequência de referência.....	47/48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Definição das cepas e seus respectivos municípios.....	28
Tabela 2 – Níveis de resistência a organofosforados, determinado pela taxa de mortalidade das larvas do carrapato <i>R. microplus</i>	30
Tabela 3 – Concentração letal de 50% e seus respectivos Intervalos de confiança para o clorpirifós nas populações da espécie <i>R. microplus</i> , do Vale do Paraíba e da cepa suscetível POA.....	36
Tabela 4 – Porcentagem da taxa de mortalidade das larvas, obtidas por meio da Dose Diagnóstica, para cada acaricida e seu nível de resistência.....	37
Tabela 5 – Concentração letal de 50% e seus respectivos Intervalos de confiança para os ingredientes ativos OF, clorfenvinfós e clorpirifós, nas populações do carrapato <i>R. microplus</i> da cepa PINDA e POA (suscetível).....	37
Tabela 6 – Resultados da análise estatística (One-Way ANOVA seguida pelo teste de Tukey) das porcentagens de atividade enzimática das cepas de campo do carrapato <i>R. microplus</i> em comparação com a cepa suscetível POA. (IC: intervalo de confiança).....	43
Tabela 7 – Frequência das mutações na sequência de aminoácidos da ACHE1 identificadas nas cepas do carrapato <i>R. microplus</i> da região do Vale do Paraíba. A tabela apresenta as mutações detectadas, sua posição e a porcentagem de ocorrência em cada cepa.....	49
Tabela 8 – Frequência das mutações na sequência de aminoácidos da ACHE2 identificadas nas cepas do carrapato <i>R. microplus</i> da região do Vale do Paraíba. A tabela apresenta as mutações detectadas, sua posição e a porcentagem de ocorrência em cada cepa.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

APTA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

WHO – Organização Mundial da Saúde

CATI – Coordenadoria de Assistência Técnica Integral

B.O.D – Biochemical Oxygen Demand

CL50 – Concentração letal 50%

CL99 – Concentração letal 99%

IC95 – Intervalo de confiança 95%

AChE – Acetilcolinesterase

ACh – Acetilcolina

OF – Organofosforado

VPA – Valor da produção agropecuária

TPL – Teste de pacote de larvas

TIL – Teste de imersão de larvas

TIA – Teste de imersão de adultas

TPB – Tristeza parasitária bovina

EUA – Estados Unidos da América

DNA – Ácido desoxirribonucleico

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	OBJETIVOS.....	16
2.1.	Objetivo geral	16
2.2.	Objetivos específicos.....	16
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1.	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	17
3.2.	Caracterização do problema	19
3.3.	Importância do controle.....	19
3.4.	Acaricidas	20
3.5.	Organofosforados	21
3.5.	Mecanismos de Resistência	23
3.6.	Resistência metabólica	23
3.7.	Alteração no sítio de ação.....	24
3.8.	Resistência cuticular	24
3.9.	Monitoramento de resistência.....	25
3.10.	Região de Estudo	26
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1.	Locais dos ensaios	28
4.2.	Obtenção e Preparação das amostras.....	28
4.3.	Teste de Pacote de Larvas	29
4.4.	Dose diagnóstica.....	30
4.5.	Ensaio de inibição de acetilcolinesterase	30
4.6.	Análise estatística dos ensaios de inibição de acetilcolinesterase	33
4.7.	Extração de DNA.....	33
4.7.1.	Desenho dos oligonucleotídeos	33
4.7.2.	Amplificação do DNA	34
4.7.3.	Bioinformática	34
5.	RESULTADOS	36
5.1.	Teste de Pacote de Larvas	36
5.2.	Caracterização de resistência a carrapaticidas - Cepa Pinda	36
5.3.	Ensaio de inibição de acetilcolinesterase.....	38
5.4.	Atividade remanescente de acetilcolinesterase	42
5.5.	Extração de DNA.....	43
5.6.	PCR e análises biomoleculares.....	44
6.	DISCUSSÃO.....	50
7.	CONCLUSÃO.....	57

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
-------------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, causa perdas econômicas superiores a 3 bilhões de dólares por ano (GRISI *et al*, 2014). Esses prejuízos incluem tanto os custos diretos com o controle, quanto os custos indiretos, como com o tratamento de doenças transmitidas pelo carrapato e as lesões na pele dos animais (GUGLIEMONE *et al*, 2006).

O carrapato *R. microplus*, é encontrado em bovinos durante todo o ano no país e transmite agentes infecciosos, como bactérias e protozoários, que causam a tristeza parasitária bovina (TPB), a doença transmitida por carrapatos de maior impacto econômico na pecuária. Entre os agentes etiológicos da TPB estão a bactéria *Anaplasma marginale* e os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* (MYSTERUD *et al.*, 2017; GUGLIEMONE *et al.*, 2006; KUGELER *et al.*, 2017).

Além disso, os carrapatos causam lesões na pele do gado, em decorrência do parasitismo, provocando depreciação do valor do couro dos animais. Os danos causados podem ainda ser atribuídos à perda de peso e à redução da produção de leite, decorrentes da intensa espoliação sanguínea e irritabilidade provocada pelos carrapatos em função de sua picada. A morte de animais, como consequência das altas infestações por carrapatos, também é presente no sistema de produção de bovinos (ANDREOTTI *et al.*, 2019).

Seu controle é feito principalmente por meio de acaricidas químicos sintéticos, no entanto, o uso intensivo e generalizado desses produtos tem acelerado o processo de seleção de carrapatos resistentes, o que compromete a eficácia dos tratamentos (KLAFKE *et al*, 2017).

A aplicação dos acaricidas em animais hospedeiros é feito através de variados métodos, como aspersão, pour-on e injeções (HIGA *et al.*, 2019). A diluição incorreta, aplicação inadequada, uso persistente e superdosagens são os principais fatores que aceleram a seleção de carrapatos resistentes (ABBAS *et al.*, 2014; Higa *et al.*, 2019). Quando o acaricida é utilizado, os carrapatos resistentes sobrevivem ao tratamento, se reproduzem e dão origem a uma nova geração de carrapatos, também resistentes. À medida que, novas aplicações do produto são feitas, a parcela suscetível da população morre e indivíduos resistentes predominam, dessa forma o produto deixa de ser eficaz, posteriormente cada tratamento sucessivo é um processo de seleção (KUNZ; KEMP, 1994).

Há mecanismos fisiológicos que permitem aos indivíduos resistentes a sobrevivência

frente a pressão de seleção, como: a diminuição de penetração da droga, a resistência metabólica e a resistência por insensibilidade de sítio de ação (FFRENCH-CONSTANT; DABORN; LE GOFF, 2004).

Uma mutação de nucleotídeo na região codificadora de um gene, geralmente é o que caracteriza a resistência por insensibilidade de sítios de ação. Essa mutação pode causar um polimorfismo do aminoácido, e conseqüentemente, uma alteração tridimensional nas proteínas que formam o receptor. Essa modificação na estrutura da proteína pode reduzir ou bloquear a capacidade da molécula de se ligar ao sítio de ação, dessa forma, reduzindo a susceptibilidade ao produto químico (KLAFKE *et al.*, 2017).

Baxter e Barker (1998) demonstraram a relação entre o aumento da atividade da acetilcolinesterase (AChE) e a resistência aos organofosforados em linhagens de carrapatos. No Brasil, Baffi *et al.* (2008) relataram resultados semelhantes, em que uma cepa resistente de *R. microplus*, tinha quantidade maiores da atividade de AChE em comparação com as cepas suscetíveis, e os autores sugerem uma contribuição dessa maior atividade para a resistência a OF nessa cepa.

A classe acaricida dos organofosforados (OF), foco do estudo, é a classe mais antiga ainda em uso e permanece entre as mais amplamente utilizadas atualmente (KLAFKE *et al.*, 2024). Os OF atuam no sistema nervoso do carrapato, inibindo a acetilcolinesterase (AChE), enzima que é responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (TEMEYER, 2011). Durante a neurotransmissão, a acetilcolina é liberada do neurônio para a fenda sináptica e se liga aos receptores de ACh na membrana pós-sináptica, retransmitindo o sinal nervoso. A AChE, atua terminando a transmissão do sinal pela hidrólise da ACh. Quando há inibição da AChE no organismo do carrapato, há acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica e o sinal continua sendo transmitido, ocorrendo hiperexcitação e morte (COLOVIĆ *et al.*, 2013).

O carrapato *R. microplus* expressa três genes diferentes que codificam a AChE, que possuem propriedades bioquímicas significativamente diferentes e são expressas em tecidos neurais e não neurais, o que sugere separação de estrutura e função, podendo ter papéis adicionais na fisiologia e no desenvolvimento do carrapato. As mutações genéticas nos genes que expressam as enzimas AChE1, AChE2 e AChE3 conferem o perfil resistente, e já foi demonstrado em estudos, que esses genes possuem diversos polimorfismos que deixam a acetilcolinesterase insensível aos organofosforados (TEMEYER, 2013; KUMAR, 2019).

Portanto, obter o status de resistência de diferentes populações de *Rhipicephalus (B) microplus* aos organofosforados é de suma importância para elaborar estratégias eficazes de controle desse parasito, contribuindo para retardar o processo de seleção de carrapatos

resistentes e mitigar os prejuízos causados por essa resistência. Dessa forma, o presente projeto busca responder se cepas de carrapatos resistentes a OF têm alterações nos genes codificantes de AChE e se cepas resistentes apresentam menor ou maior sensibilidade à inibição pelo Propoxur em comparação à cepa suscetível.

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo geral

Avaliar o perfil de resistência de diferentes populações de *R. microplus* do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo a organofosforados e investigar o possível mecanismo de resistência.

2.2.Objetivos específicos

- Avaliar a resistência de diferentes populações de *R. microplus* ao clorpirifós na Região do Vale do Paraíba – SP;
- Avaliar a atividade enzimática na presença de inibidor da acetilcolinesterase das populações;
- Investigar a presença de mutações nos genes AChE1 e AChE2 de *R. microplus*;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Os carrapatos são ectoparasitos obrigatoriamente hematófagos em pelo menos uma fase de sua vida e são responsáveis pela transmissão de diversos patógenos, tais como vírus, bactérias, protozoários, entre outros (JONGEJAN; ILENBERG, 2004, MYSTERUD *et al.*, 2017; KUGELER *et al.*, 2017). São considerados os principais vetores de agentes infecciosos para animais e os segundos em importância na saúde pública, atrás apenas dos mosquitos (HUSSAIN, 2022). Sua capacidade de transmissão de agentes patogênicos está diretamente vinculada ao longo período de parasitismo e à modelação da resposta imune do hospedeiro a fim de garantir o repasto sanguíneo e, consequentemente, o seu desenvolvimento (DE LA FUENTE *et al.*, 2008; SCHOLL *et al.*, 2016).

O carrapato-do-boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Figura 1), possui uma ampla distribuição geográfica, predominando em regiões tropicais e subtropicais (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2006). Ele é encontrado em praticamente todos os países situados entre os paralelos 32° de latitude norte e 32° de latitude sul, com algumas ocorrências até o paralelo 35° sul. Este ectoparasito é de significativa relevância econômica para a pecuária nessas áreas (NUÑEZ *et al.*, 1982).

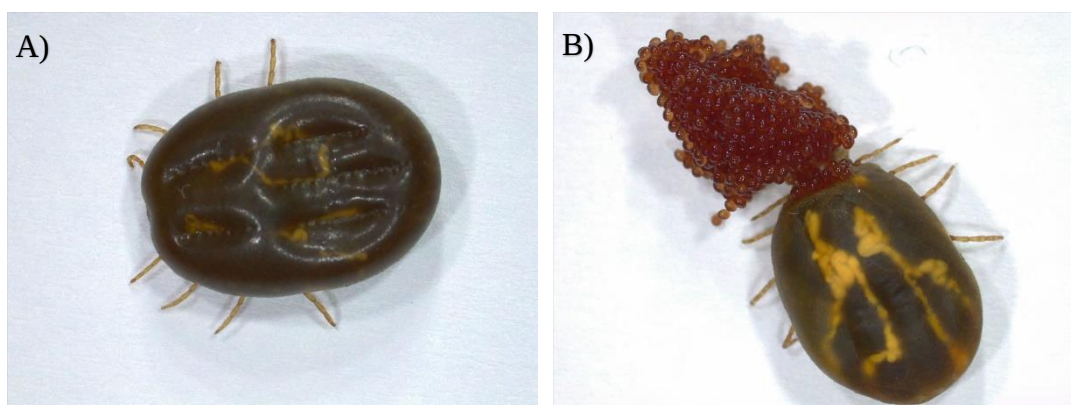


Figura 1. Teleógina antes da postura (A) e pós postura (B). Fonte: Foto da autora.

Sendo assim, o parasitismo deste carrapato em bovinos no Brasil é favorecido por fatores climáticos, principalmente pelo calor e umidade, e pela exploração de raças mais sensíveis, como as raças europeias taurinas e seus cruzamentos (GRISI *et al.*, 2002).

Pertence ao filo Artropoda, classe Aracnida, subclasse Acari, ordem Ixodida, subordem Metastigmata e família Ixodidae (FLECHTMANN, 1990). Estudos morfológicos e moleculares indicaram que as cinco espécies do gênero *Boophilus* deveriam ser reclassificadas como parte do gênero *Rhipicephalus* devido à sua similaridade filogenética. Assim, *Boophilus* se tornou

subgênero dentro de *Rhipicephalus* (MURREL; BARKER, 2003).

A espécie *R. microplus* é um carrapato de ciclo monoxeno, isto é, necessita de apenas um hospedeiro para completar seu ciclo de vida, e tem os bovinos como principal hospedeiro, podendo ser encontrado parasitando outros animais como, equinos, ovinos e cervídeos que compartilhem o ambiente dos bovinos (ANDREOTTI, *et al.*, 2019). Durante sua vida, o carrapato-do-boi passa por quatro estágios de desenvolvimento: ovos, larvas, ninfas e adultos (machos e fêmeas) (Figura 2). Estes estágios podem ser encontrados sob o hospedeiro ou no ambiente, dependendo do momento do ciclo em que se encontram (PEREIRA, 2008).

Seu ciclo de vida, pode ser dividido em duas etapas: a fase parasitária e a fase de vida livre (ou fase não parasitária). A fase parasitária começa quando a larva se fixa em um hospedeiro adequado e continua até o estágio adulto, com consequente desprendimento das fêmeas ingurgitadas. No solo, inicia-se a fase de vida livre, onde a teleógina busca um local apropriado para a ovipostura, seguida pela incubação e eclosão das larvas. A fase não parasitária termina quando as larvas encontram e se fixam em um hospedeiro ou morrem sem encontrar um. Os machos permanecem fixados no hospedeiro para copular com outras fêmeas. Após a postura dos ovos, a fêmea morre, encerrando seu ciclo de vida e deixando os ovos para incubação. Cada teleógina é capaz de converter cerca de 50% do seu peso corporal em massa de ovos, podendo ovipositar aproximadamente 3.000 ovos (FURLONG, 2005; ANDREOTTI *et al.*, 2019).

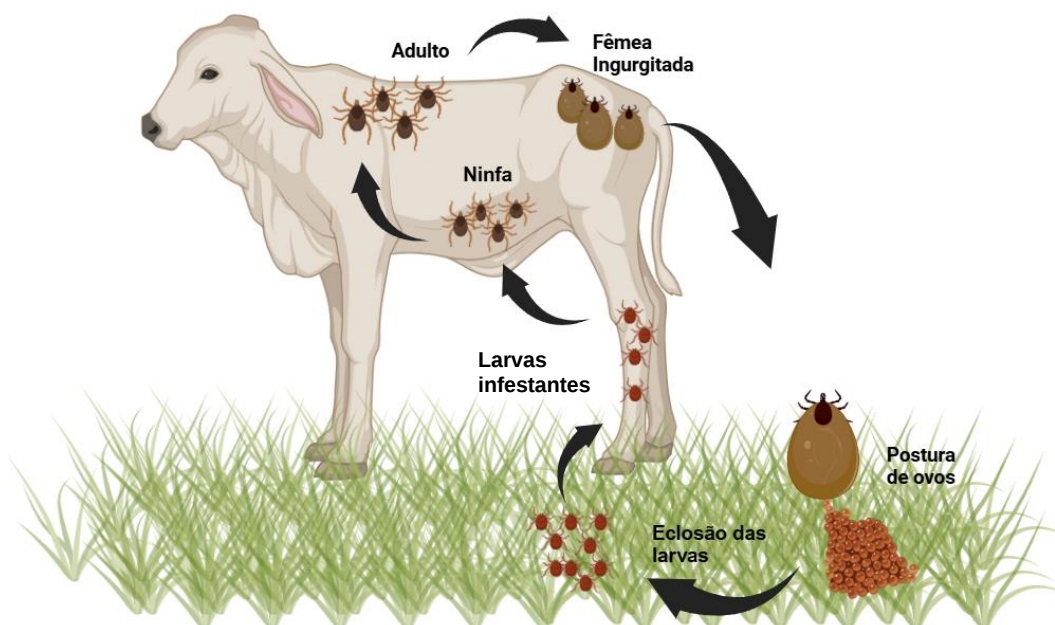


Figura 2. Esquematização das fases do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Fonte: elaborado pela autora.

3.2. Caracterização do problema

Quando o carrapaticida começa a ser utilizado, a maioria dos carrapatos de uma população é suscetível, mas os resistentes sobrevivem, reproduzem-se e geram descendentes igualmente resistentes. Com o uso contínuo do produto, a população de suscetíveis diminui, e os resistentes passam a predominar, reduzindo gradualmente a eficácia do tratamento, que age como um processo de seleção (ROUSH, 1993).

No Brasil, é possível encontrar carrapatos resistentes a grande maioria dos produtos químicos do mercado. Essa resistência, tem se desenvolvido ao longo do tempo principalmente por conta do uso inadequado de acaricidas. O que representa um grande desafio, pois a resistência torna os tratamentos menos eficazes, e a oferta de novos antiparasitários disponíveis no mercado é cada vez mais limitada (CLEMENTE *et al.*, 2008; RODRIGUEZ *et al.*, 2017).

Há muitos fatores que contribuem para a ineficácia dos carrapaticidas utilizados e para a seleção de carrapatos resistentes. A diluição inadequada dos produtos, a aplicação incorreta, desrespeito ao intervalo entre tratamentos, o uso contínuo e as doses excessivas são alguns deles (ABBAS *et al.*, 2014).

É essencial obter um diagnóstico preciso e confiável da resistência, a fim de realizar uma avaliação adequada sobre sua distribuição e frequência nas populações de *R. microplus*. Compreender o comportamento desse tipo de resistência em populações de campo, assim como os mecanismos de resistência envolvidos, pode auxiliar em estratégias eficazes de manejo de resistência a acaricidas (MENDES *et al.*, 2010; KLAFKE *et al.*, 2016).

3.3.Importância do controle

A espécie de carrapato *R. microplus* é reconhecido como o carrapato com a maior importância econômica no contexto global (GUERRERO *et al.*, 2006). No Brasil, o carrapato bovino, causa perdas econômicas superiores a 3 bilhões de dólares por ano. Esses prejuízos incluem tanto os custos diretos com o controle quanto os custos indiretos, como a transmissão de agentes patogênicos e as lesões na pele dos animais (GRISI *et al.*, 2014).

Está associada a grandes perdas na pecuária mundial, uma vez que é transmissor dos agentes etiológicos da “tristeza parasitária bovina” (TPB), doença causada por bactérias da espécie *Anaplasma marginale*, e protozoários da espécie *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* (DE CASTRO, 1997; ALMEIDA *et al.*, 2006; GUGLIEMONE *et al.*, 2006). A TPB se manifesta através de sintomas como febre, icterícia, anemia e aborto, e pode causar a morte dos animais. (SOARES *et al.*, 2000; ZINTL *et al.*, 2005). Além disso, quando há altas infestações ocorre lesões na pele dos animais, permitindo que bactérias oportunistas causem infecções

secundárias nos bovinos, essas lesões, também favorecem o surgimento de miíases (RECK *et al.*, 2014).

As lesões decorrentes do parasitismo (Figura 3) depreciam o valor do couro dos animais. Os danos incluem perda de peso e redução na produção de leite, devido à intensa espoliação sanguínea e irritação causadas pelas picadas dos carrapatos (ANDREOTTI *et al.*, 2019). A inoculação da saliva do carrapato, que possui um forte efeito anticoagulante, desencadeia uma reação alérgica nos bovinos, com a liberação de uma grande quantidade de histamina, a principal responsável pela irritação (TATCHELL, 1987). Em casos de infestações severas, a morte dos animais é uma realidade na produção de bovinos (ANDREOTTI *et al.*, 2019).



Figura 3. Carrapatos parasitando bovinos, localizadas na orelha (A) e pálpebra (B). Fonte: foto da autora.

3.4.Acaricidas

O método de controle mais amplamente utilizado até hoje, é a utilização de acaricidas (VARGAS *et al.*, 2003; KOLLER *et al.*, 2019). As principais classes de acaricidas utilizados são: organofosforados, piretróides, amidinas, lactonas macrocíclicas, fenilpirazóis, benzoilfenilureia e isoxazolininas (FURLONG; MARTINS, 2000; GASSEL *et al.*, 2013; KLAFKE *et al.*, 2024). Esses grupos químicos se diferenciam principalmente por possuírem diferentes mecanismos de ação e alvos específicos (KLAFKE *et al.*, 2017).

A utilização de acaricidas para controle de carrapatos em bovinos iniciou-se com o arsênico em 1896. Em 1910, foi aprovado nos Estados Unidos da América (EUA), criando um mercado internacional para esse produto. No entanto, a resistência dos carrapatos ao arsênico e as preocupações com sua toxicidade e resíduos levaram ao desenvolvimento de novos produtos.

Os organoclorados surgiram em 1946, e em 1953 foi confirmada resistência de carrapatos a este grupo (MARTINS *et al.*, 2003). Os organofosforados chegaram ao mercado em 1950, com o primeiro relato de resistência sendo registrado em 1963 (FURLONG, 1999). O amitraz passou a ser usado em 1975, e o primeiro relato de resistência foi documentada no país em 1993, no estado do Rio de Janeiro (NOLAN *et al.*, 1989 *apud* KLAFKE *et al.*, 2024). Os piretróides sintéticos surgiram em 1981, com a resistência confirmada no Brasil em 1989 (ARANTES *et al.*, 1995). As lactonas macrocíclicas foram lançadas em 1981, e a resistência foi identificada no Brasil em 2001 (Martins & Furlong, 2001; Martins *et al.*, 2003; Klafke *et al.*, 2006). O fluazuron, do grupo químico benzoilfenilureia, foi disponibilizado comercialmente em 1994, e a resistência foi observada pela primeira vez no Brasil em 2014, no estado do Rio Grande do Sul (RECK *et al.*, 2014). Já o fipronil foi lançado em 1996, e, em menos de uma década, a resistência foi confirmada no Brasil, em 2004 (NOLAN *et al.*, 1989 *apud* KLAFKE *et al.*, 2024). O grupo das isoxazolininas, foi introduzido no mercado para bovinos em 2022, e ainda não teve o primeiro relato de resistência (KLAFKE *et al.*, 2024).

Os carrapaticidas utilizados no tratamento de ectoparasitos de importância veterinária atuam sistemicamente, após a absorção do composto pelos tecidos do hospedeiro, ou por contato direto com os parasitos alvo após aplicação externa (RODRIGUEZ-VIVAS *et al.*, 2014).

Atualmente, as principais classes de acaricidas possuem relatos de resistência das populações de carrapatos, pelo mundo todo (HIGA *et al.*, 2016). A diluição inadequada, a aplicação incorreta, o uso contínuo e as doses excessivas são fatores que corroboram com a seleção desses carrapatos resistentes (ABBAS *et al.*, 2014).

Para um controle químico eficaz do carrapato *R. microplus*, é essencial adotar medidas complementares e alternativas, como a rotação de pastagens ou o uso do controle biológico. Além disso, é crucial seguir corretamente as instruções sobre concentrações, doses e frequência de aplicação dos pesticidas, e mudar de produto quando necessário, respeitando as recomendações do fabricante sobre concentração, dose por animal e períodos de carência para abate e ordenha. (PEREIRA; SOUZA; BAFFI, 2010).

3.5.Organofosforados

Dentre os acaricidas, estão os organofosforados (OF), o grupo mais antigo de carrapaticida ainda comercializado para bovinos. Substituíram os organoclorados, como DDT e BHC, que estavam gerando preocupações com relação à sua persistência no ambiente e pela acumulação na gordura corporal de animais (GEORGE *et al.*, 2008; KLAFKE *et al.*, 2024).

Seu mecanismo de ação envolve a acetilcolinesterase (AChE) ou acetilcolina acetilhidrolase, uma enzima que regula a transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses por meio da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Essa é uma função essencial para regular e equilibrar os impulsos nervosos, no entanto, quando essa enzima sofre alguma inibição de suas funções, pode levar o indivíduo à paralisia e morte (GIACOPPO *et al.*, 2014).

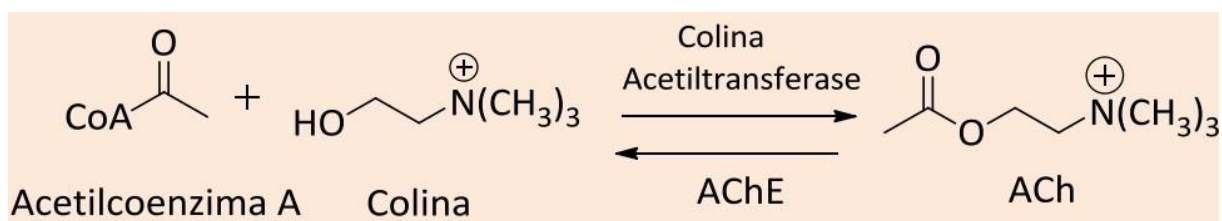


Figura 4. Síntese e hidrólise da acetilcolina. Fonte: Araujo *et al.*, 2016.

A inibição dessa enzima pode ocorrer sob a influência de vários fatores, um deles é devido à ligação covalente de um organofosforado, resultando na fosforilação da enzima e comprometendo sua atividade de forma irreversível. Dessa forma, há um aumento da ACh em níveis tóxicos para os carrapatos, causando um contínuo estímulo neuronal, o que leva a morte do carrapato por paralisia espástica (ABBAS *et al.*, 2014). Os organofosforados reagem diretamente com a hidroxila da serina da tríade catalítica do sítio ativo da enzima, formando um composto relativamente estável (GIACOPPO *et al.*, 2014).

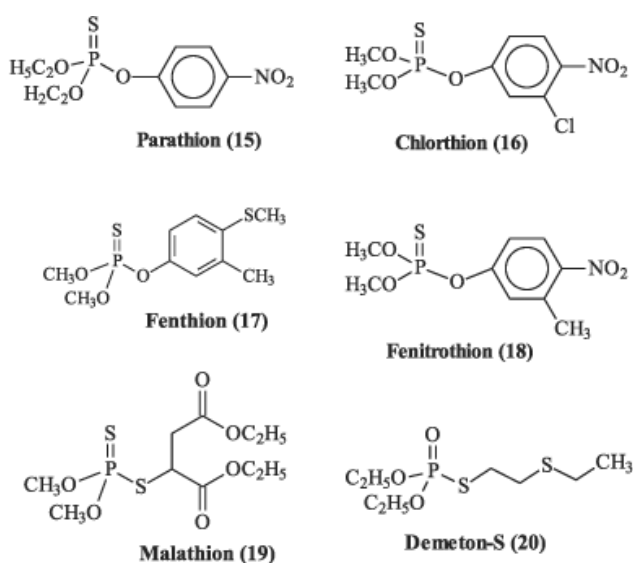


Figura 5. Moléculas de alguns inseticidas organofosforados. Fonte: Santos *et al.*, 2007.

3.5. Mecanismos de Resistência

A resistência é uma adaptação evolutiva sustentada por mecanismos comportamentais e fisiológicos que permitem a sobrevivência de indivíduos resistentes sob pressão seletiva, que neste caso é a utilização dos carrapaticidas. Esses indivíduos sobrevivem e se reproduzem, transmitindo essas características às gerações seguintes, dessa forma, a população resistente torna-se predominante reduzindo gradualmente a eficácia do tratamento (ROUSH, 1993; NAUEN *et al.*, 2019).

Embora a resistência comportamental em carrapatos ainda seja pouco compreendida, os mecanismos fisiológicos e os genes envolvidos têm sido amplamente estudados. Os principais mecanismos de resistência incluem resistência metabólica, modificação do sítio de ação e resistência por redução da penetração da droga (GEORGHIOU, 1994; WHO, 2012). A resistência em um determinado organismo pode ser manifestada para dois ou mais compostos químicos distintos através da resistência cruzada ou resistência múltipla. A resistência cruzada refere-se aos casos em que um único mecanismo de resistência confere resistência a dois ou mais compostos químicos, produtos que geralmente estão relacionados. Já a resistência múltipla ocorre quando pelo menos dois diferentes mecanismos de resistência coexistentes conferem resistência a dois ou mais compostos químicos, produtos estes geralmente não relacionados (GEORGHIOU & TAYLOR, 1977; GEORGHIOU, 1994).

3.6. Resistência metabólica

Os carrapatos resistentes apresentam capacidade de degradação de molécula acaricida mais rápido do que indivíduos suscetíveis. Além de serem mais eficientes, os sistemas enzimáticos desses também podem apresentar maior atividade, ou seja, eles podem degradar mais rapidamente os carrapaticidas (THOMPSON *et al.*, 1993).

Três principais famílias de proteínas estão envolvidas no metabolismo de fármacos e pesticidas: os citocromos P450 (oxidases de função mista ou MFO), as esterases (EST) e as glutathione S-transferases (GSTs). Além de desempenharem esse papel, essas proteínas também participam da síntese e degradação de diversos compostos metabólicos endógenos, da proteção contra o estresse oxidativo, da transmissão de sinais nervosos e do transporte de moléculas através das células (RANSON *et al.*, 2002).

No primeiro estudo bioquímico de resistência de *R. microplus* no Brasil, por Mendes *et al.* (2001), os resultados obtidos sugeriram que a resistência aos piretróides, foram devido ao aumento da atividade de alfa-esterases.

No caso dos organofosforados, a relação entre o aumento na atividade da acetilcolinesterase (AChE) e a resistência em linhagens da espécie *R. microplus* foi demonstrado por Baxter e Barker (1998). E atualmente esse mecanismo permanece sendo alvo de estudos que procuram identificar a causa da resistência aos organofosforados (Baffi *et al.*, 2008; Jyoti *et al.*, 2016).

3.7. Alteração no sítio de ação

A resistência por alteração no sítio de ação é geralmente caracterizada por uma mutação de nucleotídeo na região codificadora de um gene. Essa mutação pode causar uma mudança de aminoácido, e consequentemente, uma alteração tridimensional nas proteínas formadoras do receptor. Essa modificação na estrutura da proteína pode reduzir ou bloquear a capacidade da molécula de se ligar ao sítio de ação, dessa forma, reduzindo a susceptibilidade ao produto químico (SODERLUND; BLOOMQUIST, 1990).

No caso da enzima acetilcolinesterase, estudos mostram que os genes codificadores da AChE1, AChE2 e AChE3 possuem diversos polimorfismos, que em locais-chave alteram a conformação da enzima, resultando em uma acetilcolinesterase insensível aos organofosforados, corroborando com a resistência do carrapato ao OF (TEMEYER, 2013; WANG, 2015).

A substituição de aminoácidos G119S na AChE1 é relacionada com insensibilidade do alvo dos inseticidas organofosforados no gênero *Culex* spp. A comparação de sequências de AChE1 de indivíduos suscetíveis e resistentes permitiu constatar, que essa mutação, dos mosquitos *C. pipiens*, *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensi*, é o suficiente para conferir resistência nestas espécies (WEILL *et al.*, 2003; WEILL *et al.*, 2004).

Comumente, as mutações encontradas em associação geram grande redução a sensibilidade da AChE aos inseticidas organofosforados. (FOURNIER *et al.*, 1993; MUTERO *et al.*, 1994; VONTAS *et al.*, 2002; WEILL *et al.*, 2003; NABESHIMA *et al.*, 2004; HEMINGWAY *et al.*, 2004).

3.8. Resistência cuticular

O acesso reduzido de acaricidas ao ambiente interno do corpo devido a modificações na camada externa do carrapato (exoesqueleto) é chamado de resistência à penetração reduzida ou resistência cuticular (GUERRERO *et al.*, 2012). A molécula do pesticida é absorvida mais lentamente, devido principalmente a essas barreiras desenvolvidas no exoesqueleto, que

impedem ou retardam a absorção da molécula (ROUSH; TABASHNIK, 1990). De maneira simplificada, quanto mais espessa a cutícula (maior teor de proteína e lipídios), menor será a absorção da molécula inseticida. Essa barreira desenvolvida pode proteger os insetos ou ácaros de uma ampla gama de pesticidas (GEORGHIOU, 1994).

3.9. Monitoramento de resistência

A FAO propõe determinar perfis de resistência comparando a mortalidade observada com o esperado para a espécie. Para isso, usa-se cepas de referência suscetíveis, isoladas antes da exposição ao produto sintético e mantidas sob condições controladas (KLAFKE *et al.*, 2024).

Bioensaios *in vitro* são utilizados para o monitoramento e determinação da resistência de cepas de carrapatos, podendo ser realizadas em larvas ou em fêmeas ingurgitadas. O teste do pacote de larvas (TPL) e o teste de imersão de larvas (TIL) são os testes mais eficazes para testar a suscetibilidade de larvas a acariciadas. Enquanto as adultas são submetidas ao teste de imersão de adultas (TIA) (FAO, 2004; KLAFKE *et al.*, 2017).

O TPL, é feito de acordo com o protocolo da Organização das Nações Unidas para agricultura e alimentação (FAO 2004), papéis filtro são recortados em 7,5 cm x 8,5 cm e são impregnados 700 µl da diluição comercial do produto que será testado. Posteriormente, os papéis são secos em temperatura ambiente por 24 horas. Com os papéis secos, aproximadamente 100 larvas de *R. microplus* são colocadas no papel e fechados com presilhas. Após isso são colocadas em estufas a 28°C por 24 horas, passado esse período é feita a contagem de larvas vivas e mortas.

No TIL, modificada por Sabatini *et al.* (2001), aproximadamente 100 larvas são imersas em variadas concentrações de soluções acaricidas por 10 minutos. Após a imersão, são secas com papel filtro e colocadas em pacotes como do TPL. Após 24 horas, a mortalidade das larvas é avaliada. Apesar de também ser eficaz, o TPL é a principal técnica recomendada pela FAO para diagnóstico de resistência (ANDREOTTI, 2010).

Para o TIA, é preparado 200 mL de solução acaricida para cada produto a ser testado, seguindo as diluições recomendadas pelo fabricante. Dez teleóginas são submersas nas soluções por cinco minutos. Após a imersão, as fêmeas são secas com papel filtro e colocadas em placas de Petri, e mantidas em estufa a 28°C e 80% de umidade por 14 dias (DRUMMOND *et al.*, 1973). Após a oviposição, os ovos são transferidos para recipientes com algodão e incubados por mais 10 dias nas mesmas condições. São analisadas, o peso das fêmeas, o peso da massa de ovos e a taxa de eclosão, de acordo com a Eficiência Acaricida (EA) descrita por Drummond e colaboradores (1973). O produto é considerado eficaz quando a EA é superior a 95%. O TIA,

é recomendado como um ensaio preliminar para a resistência por causa de sua simplicidade (ANDREOTTI, 2010).

Além dos métodos fenotípicos, a resistência dos carrapatos aos acaricidas também pode ser identificada por técnicas bioquímicas e moleculares. O diagnóstico molecular, é realizado por meio da amplificação do DNA, que mostra o genótipo da população e permite a identificação de mutações. Já o bioquímico, é realizado por meio da quantificação de atividade enzimática (ANDREOTTI, 2010).

3.10. Região de Estudo

O Vale do Paraíba Paulista, uma região geográfica definida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), possui uma área de 1.626.800 hectares, correspondente a 6,54% do território paulista. Está localizado na região Sudeste do Estado de São Paulo, e é composto por trinta e nove municípios.

A região é uma das principais bacias leiteiras do Estado, com o leite sendo o principal produto agropecuário, seguido pela carne bovina. Em 2004, o valor da produção agropecuária (VPA) do Vale do Paraíba Paulista foi de R\$ 317 milhões, conforme dados do Instituto de Economia Agrícola (IEA). Deste total, a produção animal contribuiu com R\$ 217 milhões, representando 68,2% do VPA da região, com a bovinocultura (tanto de corte quanto de leite) respondendo por 64,2% do VPA. Esses números destacam a importância da pecuária, especialmente a bovinocultura, para o Vale do Paraíba Paulista.

Segundo a Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), o Vale do Paraíba, é amplamente reconhecido como o maior produtor de leite do estado de São Paulo, sendo uma região de grande relevância para a agropecuária. Essa importância torna a área um alvo estratégico para estudos científicos em torno do controle do carrapato *R. microplus*, que prejudicam amplamente a produção de bovinos.



Figura 6. Distribuição Geográfica dos Municípios da Região do Vale do Paraíba. Disponível em: https://rmvpln.pdui.sp.gov.br/?page_id=127. Acesso em: 20 jul. 2024

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais dos ensaios

Os ensaios foram realizados no Instituto Biológico de São Paulo, no Laboratório de Parasitologia Animal e no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, em Eldorado do Sul – RS, no Laboratório de Parasitologia.

4.2. Obtenção e Preparação das amostras

As fêmeas de carrapato da espécie *R. microplus*, foram coletadas de bovinos de diferentes propriedades da Região do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo, Brasil e enviadas para o Laboratório de Parasitologia Animal do Instituto Biológico de São Paulo, para a realização dos ensaios (Tabela 1).

A cepa de referência suscetível utilizada, denominada cepa POA, foi proveniente de Porto Alegre - RS e foi cedida pelo Prof. Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior, do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Tabela 1. Definição das cepas e seus respectivos municípios.

CEPA	MUNICÍPIO
GUARA	Guaratinguetá – SP
LORENA	Lorena - SP
ALVORADA	Lorena - SP
SÃO BENEDITO	Guaratinguetá - SP
PALMEIRA	Guaratinguetá - SP
BANANAL	Bananal - SP
LAGOINHA	Lagoinha - SP
ACÁCIO	Lorena - SP
CUNHA	Cunha - SP
PINDA	Pindamonhangaba - SP

Após a chegada ao laboratório, os carrapatos foram higienizados em água corrente, secos com papel toalha, colocados em placas de Petri, e mantidos em estufa B.O.D. a 28°C e umidade de 80-90%, durante 14 dias, para a postura dos ovos. Após a postura, as fêmeas foram armazenadas em recipientes de vidro, identificados de acordo com a propriedade, contendo álcool 95%, a -20°C, até a extração de DNA. Enquanto os ovos, foram armazenados em tubos com algodão umedecido e permaneceram em estufa B.O.D., a 28°C e 80-90% de umidade, até a eclosão das larvas. Para os experimentos, larvas de 7 a 14 dias foram utilizadas.

4.3. Teste de Pacote de Larvas

Conforme Stone e Haydock (1962), inicialmente, foi realizada a impregnação dos pacotes. Para isso, o clorpirifós foi dissolvido em uma solução de azeite de oliva autoclavado e o solvente tricloroetileno na proporção de 2:1. O clorpirifós foi diluído a 8% nessa solução, que foi utilizada para preparar outras soluções, por meio de diluições seriadas, com concentrações variando de 8 a 0,05%. Após a impregnação, os papéis foram deixados para secar em temperatura ambiente por 24 horas.

Para a confecção dos pacotes de larvas, o teste foi realizado conforme a FAO (2004). No qual, foram utilizados papéis filtros Whatman nº1 recortados nas dimensões de 7,5 cm x 8,5 cm. Esses papéis foram impregnados com 0,7 mL das soluções preparadas anteriormente, nas diferentes concentrações. Enquanto para os papéis controle, apenas tricloroetileno e azeite de oliva na proporção de 2:1 foram utilizados. No TPL da caracterização da cepa PINDA, os papéis utilizados, foram impregnados com os ativos clorpirifós e clorfenvinfós.

Com o auxílio de pincéis, aproximadamente 100 larvas de cada cepa, foram postas em pacotes contendo o ingrediente ativo e seladas com cliques de papel, as concentrações utilizadas variaram entre 8% e 0 (controle), os testes foram feitos em duplicata. Posteriormente, os pacotes de larvas foram incubados, em estufa a 28°C e umidade a 80-90%, durante 24 horas. Após esse período, foi feita a contagem de larvas vivas e mortas, considerando-se mortas aquelas que estavam paralisadas e incapazes de se locomover.



Figura 7. Pacotes impregnados para bioensaio TPL (A) e os pacotes já fechados com cliques (B). Fonte: foto da autora

Os dados obtidos foram analisados por meio do software PoloPlus (LeOra Software, 2002), que forneceu a análise Probit, segundo Finney (1980), para determinação dos valores da concentração letal para 50% (CL₅₀), com seus intervalos de confiança de 95% (IC_{95%}) e a

inclinação (*slope*) da linha de regressão. Os fatores de resistência (FR), foram calculados, utilizando como referência a cepa suscetível POA, utilizando a seguinte equação:

$$\text{Fator de Resistência} = \text{CL}_{50} \text{ da população de campo} \div \text{CL}_{50} \text{ da cepa suscetível}$$

Conforme Robertson *et al.* (2007), o valor de CL_{50} foi considerado significativo apenas nos casos em que o valor não estivesse incluído no IC95 da cepa suscetível, caso contrário o valor de CL_{50} não foi considerado significativamente diferente. Os resultados do diagnóstico de resistência acaricida foram interpretados com base nas seguintes categorias definidas por Castro-Janer *et al.* (2010): a) Suscetível: quando a CL_{50} (IC95%) da população de campo não está inserida na CL_{50} (IC95%) da cepa suscetível; b) Resistência incipiente: quando a CL_{50} da população de campo difere estatisticamente da cepa suscetível, em que $1 < \text{FR} < 2$; c) Resistente: quando a CL_{50} da população de campo apresenta diferença estatística em relação à cepa referência suscetível, com $\text{FR} \geq 2$.

4.4. Dose diagnóstica

Foi realizada uma triagem para caracterizar o perfil de resistência da cepa PINDA, utilizando o teste TPL com Dose Diagnóstica (DD). Duas vezes a CL99 foram utilizadas como doses discriminantes (DCs), conforme recomendação da FAO (2004) para resistência a acaricidas. Foram usados papéis impregnados com concentrações únicas de diferentes produtos: doramectina (1%), ivermectina (1%), cipermetrina (1%), clorpirifós (1%), fipronil (0,04%), moxidectina (0,5%) e amitraz (0,1%). O teste foi realizado em triplicata. Conforme Klafke *et al.*, (2017), foram determinados quatro níveis de resistência de acordo com quartis da porcentagem de mortalidade das larvas.

Tabela 2. Níveis de resistência a organofosforados, determinado pela taxa de mortalidade das larvas do carrapato *R. microplus*.

Níveis de Resistência (NR)	Taxa de mortalidade (m)
Nível I	$97\% > m \geq 81\%$
Nível II	$81\% > m \geq 22\%$
Nível III	$22\% > m > 5\%$
Nível IV	$m \leq 5\%$

4.5. Ensaio de inibição de acetilcolinesterase

Este ensaio, que mede a atividade remanescente de acetilcolinesterase de uma amostra

após inibição com propoxur, foi adaptado da metodologia proposta pelo Ministério da Saúde (2006) para análise de *Aedes aegypti*, com algumas modificações.

Primeiramente, foi realizado o preparo dos homogenatos de larvas. No gelo, 200 μ L de água deionizada gelada foram adicionados em tubos de 1,5 mL. Aproximadamente 200 larvas de *R. microplus*, com 14 a 28 dias de idade foram transferidas aos tubos com ajuda de um pincel. Em seguida as larvas foram maceradas com ajuda de um pistilo plástico e mais 800 μ L de água deionizada foram adicionadas.

Para este ensaio, foi utilizado Tampão Sódio fosfato 100 mM pH 7,0, Triton-X 100 em Tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,8 (TX), iodeto de acetiltiocolina (AcTC) diluído em Água MilliQ, Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) e o Propoxur (PESTANAL ®), um acaricida carbamato não sistêmico, que foi diluído em etanol absoluto. O Tampão Sódio fosfato 100 mM pH 7,0, foi utilizado para diluir o DTNB e o Propoxur já diluído foi adicionado a 3 mL de AcTC.

A atividade de inibição da acetilcolinesterase foi determinada em microplacas de 96 poços, sendo 12 colunas e 8 linhas (Figura 8). Em cada coluna foi adicionado, 145 μ L de TX (2 vezes na 1ª coluna), 10 μ L de DTNB (2 vezes na 1ª coluna), 25 μ L de ACTC da 2ª coluna até a 12ª, 50 μ L do Propoxur + AcTC na 1ª coluna, posteriormente, foi feita a diluição seriada da 1ª coluna até a 10ª coluna, para finalizar, foi aplicado 25 μ L do homogenato de larvas, da 1ª coluna até a 11ª. A 11ª coluna foi o controle e a 12ª coluna o branco. A microplaca foi incubada a temperatura ambiente por 2 horas e a absorbância foi medida com um leitor de placas de 96 poços (Espectrofotômetro) ajustado a 405 nm (Figura 9).

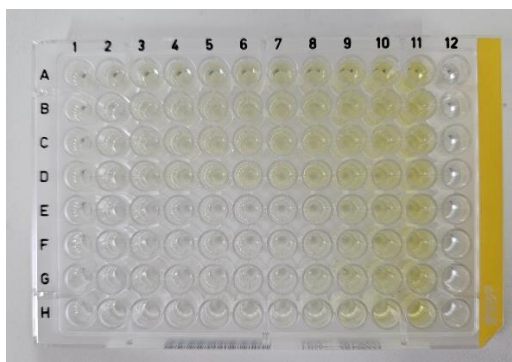


Figura 8. Placa de 96 poços utilizada para o teste de atividade enzimática. As linhas de A a D contêm homogenato da cepa resistente, enquanto as linhas de E a H apresentam homogenato da cepa suscetível POA.

Fonte: foto da autora.

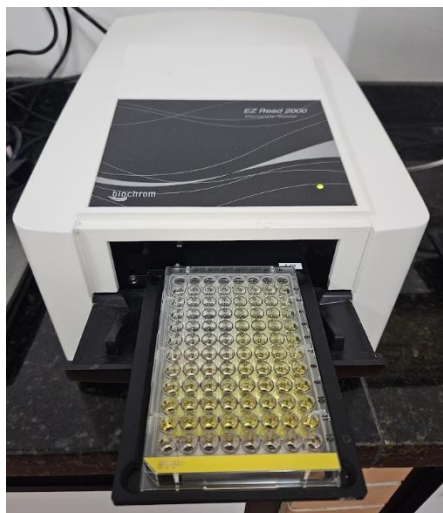


Figura 9. Espectrofotômetro utilizado para a leitura da absorbância das amostras. Fonte: foto da autora

Durante o teste, foram obtidos os valores da atividade da enzima acetilcolinesterase não inibida na presença do propoxur. Para este teste, as cepas de campo do Vale do Paraíba foram utilizadas em comparação com a cepa suscetível POA, a fim de observar a diferença entre elas. Os resultados foram ilustrados por meio de gráficos gerados no programa Microsoft Excel. Para assegurar a precisão e confiabilidade dos dados, cada amostra foi feita em triplicata.

A porcentagem de inibição, para a confecção dos gráficos de curva dose-resposta, foi calculada de acordo com Bustos-Baena (2024), utilizando a seguinte equação:

Porcentagem de inibição = $(\text{controle negativo} - \text{branco}) - (\text{experimento} - \text{branco do experimento}) \times 100 / (\text{controle negativo} - \text{branco})$.

Em que:

- Atividade sem inibidor = Controle Negativo – Branco
- Atividade com inibidor = Experimento – Branco do Experimento

Já o gráfico de barra, com os dados de atividade remanescente da acetilcolinesterase, foi confeccionado a partir da seguinte equação:

Atividade remanescente = $100\% - \text{Porcentagem de Inibição}$.

4.6. Análise estatística dos ensaios de inibição de acetilcolinesterase

Os dados da atividade enzimática com inibidor, foram analisados por ANOVA de um fator, seguida do teste de Tukey para comparação das médias, utilizando o software GraphPad Prism (versão 10.4.1).

4.7. Extração de DNA

Um total de 10 carrapatos de cada propriedade foram submetidos a extração de DNA. Primeiramente, os carrapatos foram higienizados com hipoclorito de sódio, álcool 70% e água destilada, e colocados em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL.

Em seguida, foi adicionado 400 µL de tampão de lise (TRIS-EDTA-NaCl) e utilizando um pistilo a fêmea foi macerada. Posteriormente, foram adicionados 40 µL de SDS 20% e 8 µL de Proteinase K (20 mg/mL), com agitação no vórtex por 10 segundos. O próximo passo consistiu na incubação da amostra a 58 °C por um período de 18 horas. Após a digestão, a Proteinase K foi inativada por meio de outra incubação, a 65 °C por 20 minutos. Foi adicionado 300 µL de NaCl 5M, seguido de nova agitação no vórtex por 10 segundos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 30 minutos em temperatura ambiente, e 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, evitando coletar os detritos. Para remoção do RNA, foi adicionado 1,5 µL de RNase A (20 mg/mL, concentração final de 50 µg/mL) e incubado a 37 °C por 15 minutos. Para separação do DNA das proteínas e outras impurezas presentes na amostra, 300 µL de fenol clorofórmio foi aplicado, e as amostras foram colocadas a -20 °C por 5 minutos e então centrifugadas a 15.000 rpm por mais 5 minutos. A parte aquosa foi retirada e colocada em outro tubo de 1,5 mL. O DNA foi precipitado com a adição de 600 µL de isopropanol, os tubos foram misturados e foi feita o armazenamento das amostras a -20 °C por 1 hora. Após a precipitação, a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 20 minutos. O isopropanol foi descartado, e em seguida, 500 µL de etanol 70% foi aplicado e a amostra centrifugada novamente a 10.000 g por 10 minutos. Após essa etapa, o etanol é removido, e uma centrifugação rápida de 15 segundos foi realizada para eliminar qualquer resíduo. O pellet é então ressuscitado em 50 µL de Tris-EDTA (pH 8,0).

Posteriormente, a concentração de DNA das amostras foi obtida através do espectrofotômetro NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific®).

4.7.1. Desenho dos oligonucleotídeos

Para desenhar os oligonucleotídeos (primers) para cada gene da AChE que foram utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram obtidas no GenBank (NCBI) as

sequências dos genes codificadores da AChE1 (referência suscetível: AJA71270.1) e da AChE2 (referência proveniente do genoma completo: NC_051167.1) de *Rhipicephalus microplus*. Essas sequências, foram editadas com BioEdit e alinhadas com ClustalW. Regiões conservadas das sequências de cada gene, com ~20 nucleotídeos foram selecionadas e a qualidade desses primers foi avaliada com a ferramenta OligoAnalyzer™ (IDT).

4.7.2. Amplificação do DNA

As amostras extraídas foram submetidas à amplificação por PCR de fragmentos do gene AChE1 e AChE2. A PCR foi realizada em um volume final de 30,0 µL contendo ~25 ng de DNA molde e 0,3 µM de cada oligonucleotídeo. Foi aplicado em seguida 15 µL do mix KOD One™ PCR Master Mix-Blue e o volume restante para se atingir 30µL foi completado com água ultrapura.

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação foram: AChE1 senso 5' AGGATCATCATGGAGAGCGG 3' e anti-senso 5' TGATTCGACGGCTCAATG 3'. AChE2 senso 5' CAGGTTGCAGTCATTCGGTT 3' e anti-senso 5' CTTTGGCAAATCACTCCAGAG 3'.

As condições aplicadas para a amplificação foram: desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento a 60°C por 5s e extensão a 68°C por 1s, em 35 ciclos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,5% com marcador molecular Mid Range DNA Ladder, de 100bp a 3 kb (Cellco) e o padrão de migração das bandas dos fragmentos amplificados (amplicons) foi analisado em um fotodocumentador Axygen® Gel (Corning®). Os produtos da PCR, foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), e sequenciados pela plataforma de sequenciamento (Sanger) da Fiocruz.

4.7.3. Bioinformática

As sequências parciais senso e antisense obtidas através do sequenciamento foram editadas através do software BioEdit (versão 2023 7.7.1) para obtenção de sequências consenso dos genes AChE1 e AChE2. Os nucleotídeos obtidos foram convertidos em aminoácidos utilizando a ferramenta de Tradução disponível na plataforma ExPASy (Expert Protein Analysis System) (<https://web.expasy.org/translate/>). Posteriormente, essas sequências de aminoácidos foram comparadas com o banco de dados do National Center of Biotechnology Information (NCBI) utilizando a ferramenta BLASTp, para confirmar a identidade das amostras. As amostras foram alinhadas com sequências de referência suscetíveis dos genes

AChE1 (AJA71270.1) e AChE2 (NC_051167.1) de *R. microplus* com o algoritmo ClustalW, por meio do software Jalview (versão 2.11.4.1).

5. RESULTADOS

5.1. Teste de Pacote de Larvas

A partir dos testes de pacote de larvas (Tabela 3), foi possível observar que 90% das cepas de campo foram resistentes ao clorpirifós, exceto pela São Benedito cujo a CL50 se sobrepôs a da cepa suscetível POA, o que indica que não há diferença estatística. Os fatores de resistência variaram de 5,37 (São Benedito) a 86,11 (Pinda).

Tabela 3. Concentração letal de 50% e seus respectivos Intervalos de confiança para o clorpirifós nas populações da espécie *R. microplus*, do Vale do Paraíba e da cepa suscetível POA.

CEPA	N	SLOPE ($\pm$ EP)	CL50 (IC95%)	FR
POA	1060	5,100 $\pm$ 0,471	0,038 (0,029 – 0,047)	-
GUARA	1527	2,359 $\pm$ 0,128	1,495 (1,150 – 1,855)	39,34
LORENA	2149	1,878 $\pm$ 0,129	1,481 (0,869 – 2,005)	38,97
ALVORADA	1727	1,934 $\pm$ 0,246	0,969 (0,434 – 1,773)	25,50
SÃO BENEDITO	1424	1,086 $\pm$ 0,067	0,204 (0,028 – 0,561)	5,37
PALMEIRA	1409	1,597 $\pm$ 0,102	0,706 (0,445 – 0,988)	18,58
BANANAL	1479	1,896 $\pm$ 0,098	0,596 (0,486 – 0,711)	15,68
LAGOINHA	1880	1,980 $\pm$ 0,143	1,011 (0,706 – 1,299)	26,61
ACÁCIO	1560	2,561 $\pm$ 0,212	2,139 (1,817 – 2,706)	56,29
CUNHA	1794	2,059 $\pm$ 0,100	0,559 (0,400 – 0,742)	14,71
PINDA	1526	3,319 $\pm$ 0,294	3,272 (2,527 – 3,990)	86,11

N: número de larvas; EP: erro padrão; CL: concentração letal; FR: fator de resistência.

5.2. Caracterização de resistência a carrapaticidas - Cepa Pinda

A Tabela 4 apresenta os resultados da triagem realizada com o Teste de Larvas com Doses Discriminatórias (DD), avaliando diferentes carrapaticidas contra a cepa Pinda, na qual foram estabelecidos os níveis de resistência. Foi observada resistência a cipermetrina, clorpirifós e fipronil, com mortalidade abaixo de 25%, sendo classificadas como níveis IV, II e III, respectivamente. Em relação à ivermectina, a cepa Pinda foi classificada como nível I, com 88% de mortalidade, enquanto para o amitraz a mortalidade foi de 73%, correspondendo ao nível II. Em contrapartida, a cepa Pinda foi considerada suscetível aos acaricidas doramectina e moxidectina.

Tabela 4. Porcentagem da taxa de mortalidade das larvas, obtidas por meio da Dose Diagnóstica, para cada acaricida e seu nível de resistência.

COMPOSTO	MORTALIDADE	NÍVEL DE RESISTÊNCIA
CONTROLE	98%	
DORAMECTINA	97%	Suscetível
IVERMECTINA	88%	Nível I
MOXIDECTINA	97%	Suscetível
AMITRAZ	73%	Nível II
CIPERMETRINA	5%	Nível IV
CLORPIRIFÓS	23%	Nível II
FIPRONIL	17%	Nível III

A tabela 5 apresenta os resultados dos TPL de caracterização da cepa Pinda quanto a resistência aos organofosforados. A amostra resistente apresentou uma CL_{50} de 1,77 para clorpirifós e 0,16 para clorfenvinfós, enquanto para a cepa suscetível POA, foi obtido um CL_{50} de 0,073 para clorpirifós e 0,016 para clorfenvinfós. Os fatores de resistência foram de 24,3 para clorpirifós e 10,3 para clorfenvinfós, sendo considerada resistente para ambos os organofosforados.

Tabela 5. Concentração letal de 50% e seus respectivos Intervalos de confiança para os ingredientes ativos OF, clorfenvinfós e clorpirifós, nas populações do carrapato *R. microplus* da cepa PINDA e POA (suscetível).

PRINCÍPIO ATIVO	CEPA	N	INCLINAÇÃO (EP)	CL50	FR
CLORPIRIFÓS	POA	6863	3,527±0,146	0,073 (0,0603 – 0,093)	
CLORPIRIFÓS	PINDA	3242	3,223±0,1655	1,775 (1,47 – 2,044)	24,3
CLORFENVINFÓS	POA	2173	8,475±0,5145	0,016 (0,014 – 0,018)	
CLORFENVINFÓS	PINDA	2575	3,467±0,160	0,16 (0,1355 – 0,188)	10,3

N: número de larvas; EP: erro padrão; CL: concentração letal; FR: fator de resistência, IC: intervalo de confiança

5.3. Ensaio de inibição de acetilcolinesterase

Por meio do teste com inibidor de acetilcolinesterase, os valores de porcentagem de inibição foram obtidos. Conforme os gráficos a seguir, foi possível verificar que a porcentagem de inibição do Propoxur foi maior na cepa suscetível POA, em relação as demais, exceto pela propriedade São Benedito que mesmo nas maiores concentrações de Propoxur se mostrou similar aos valores da cepa POA.

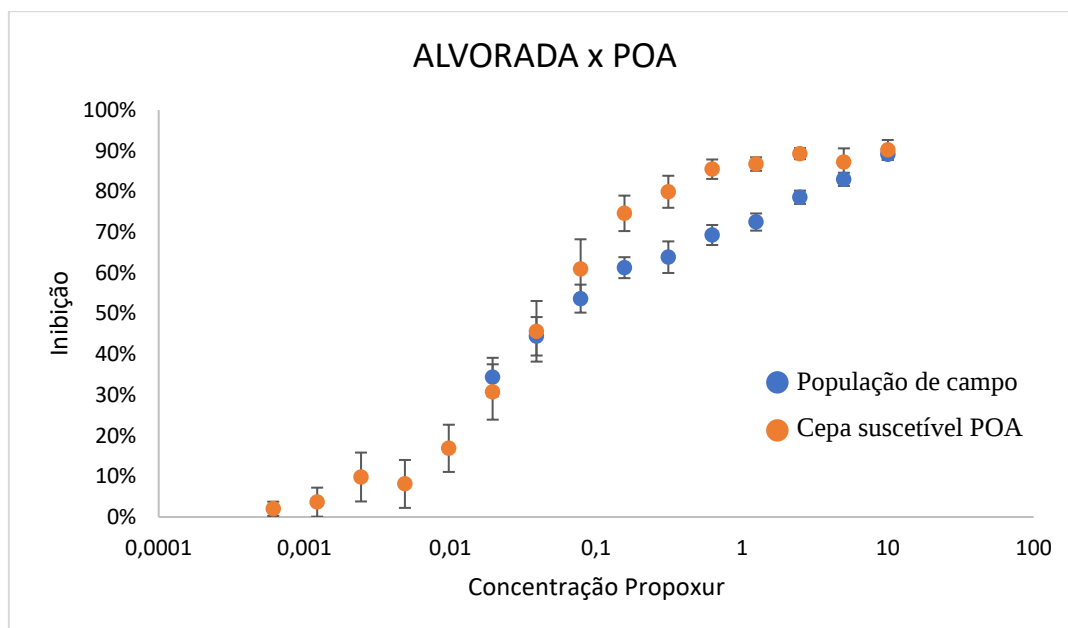


Figura 10 – Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato *R. microplus* das cepas de POA e Alvorada.

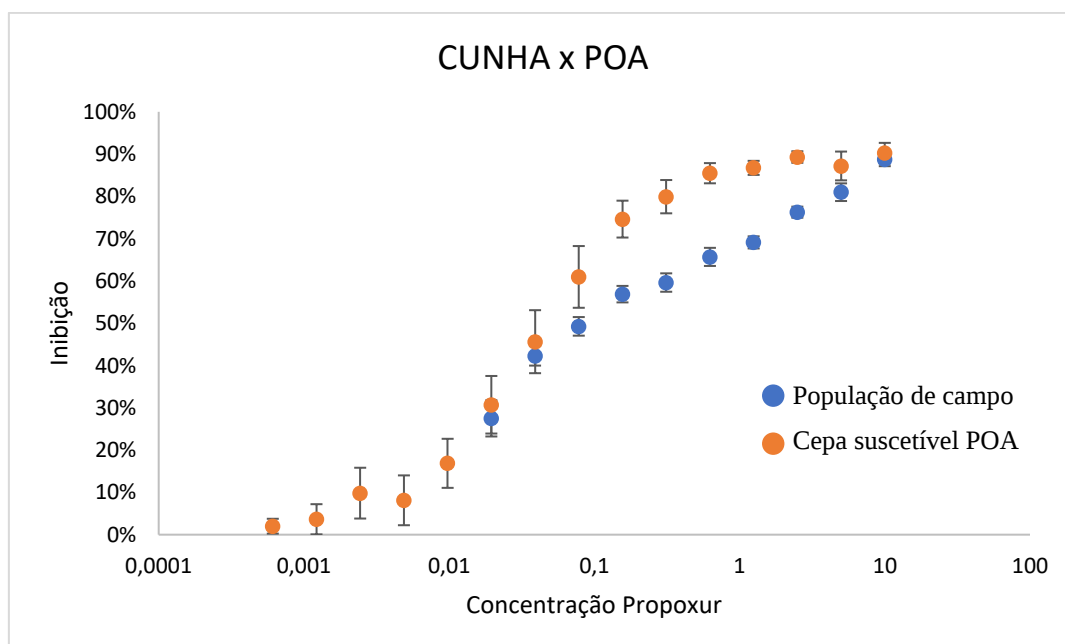


Figura 11 – Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato *R. microplus* das cepas de POA e Cunha.

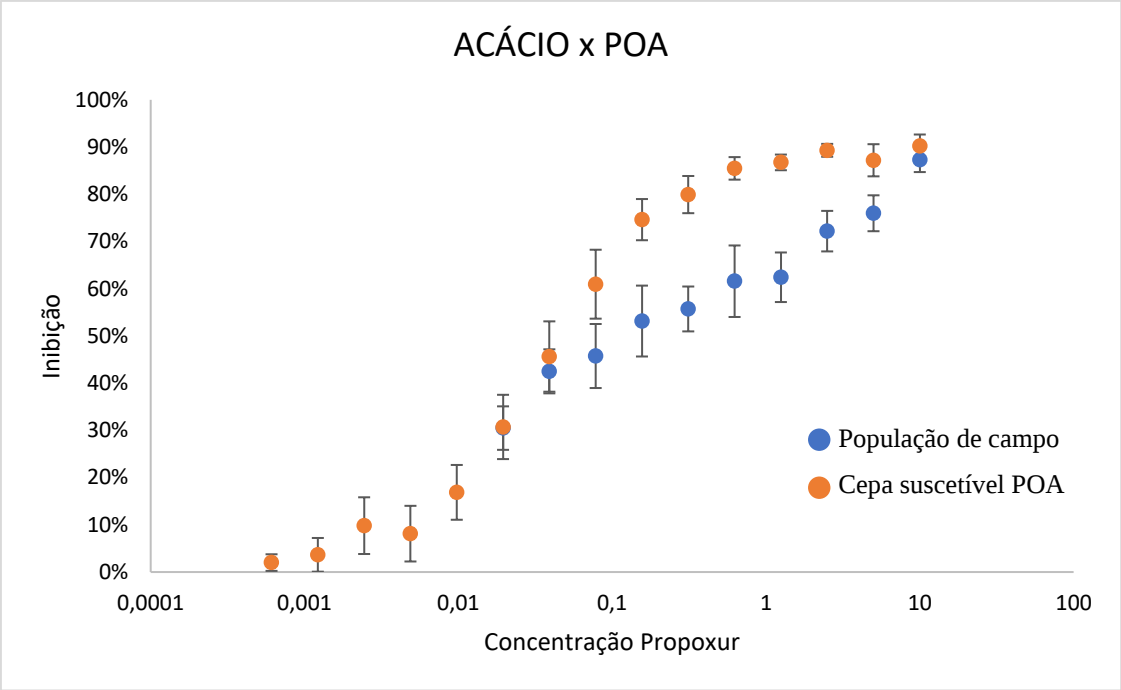


Figura 12 – Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato *R. microplus* das cepas de POA e Acácio.

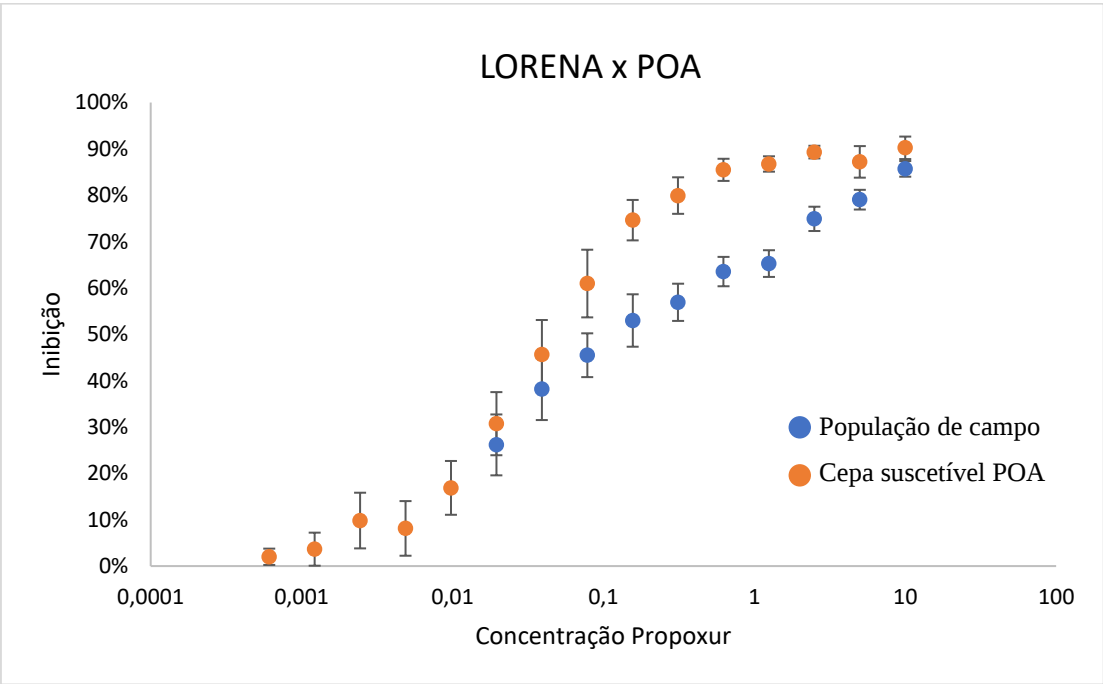


Figura 13 - Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato *R. microplus* das cepas de POA e Lorena.

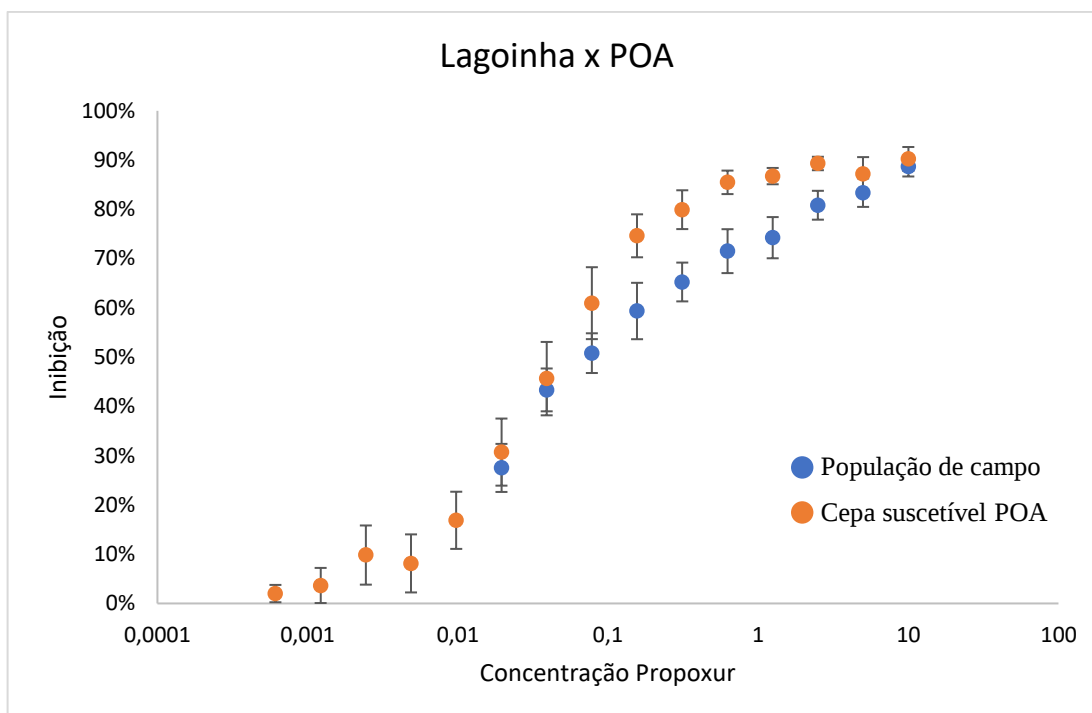


Figura 14 - Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato *R. microplus* das cepas de POA e Lagoinha.

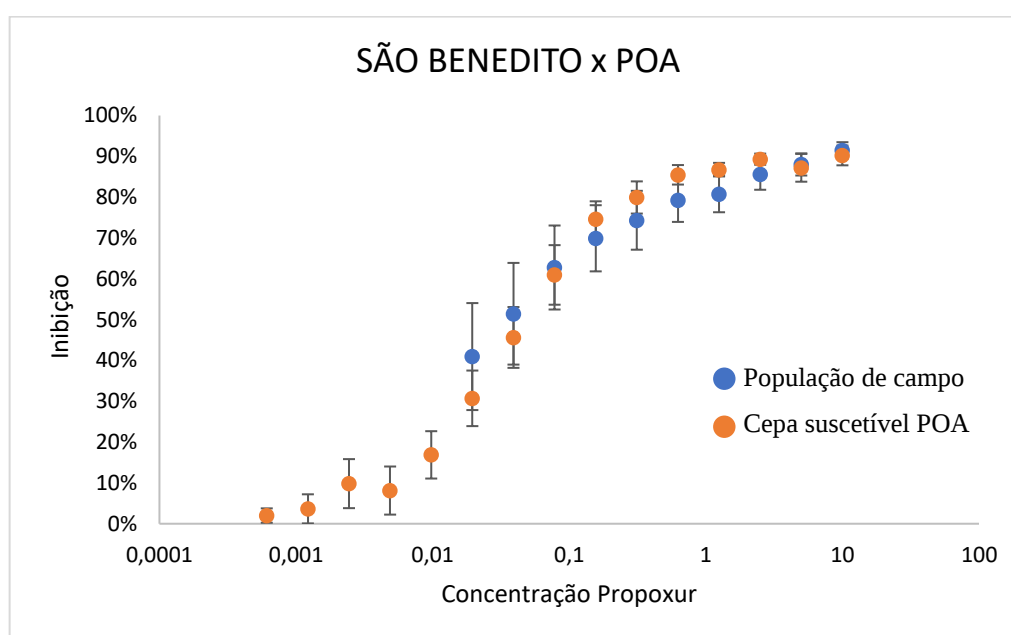


Figura 15 – Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato *R. microplus* das cepas POA e São Benedito.

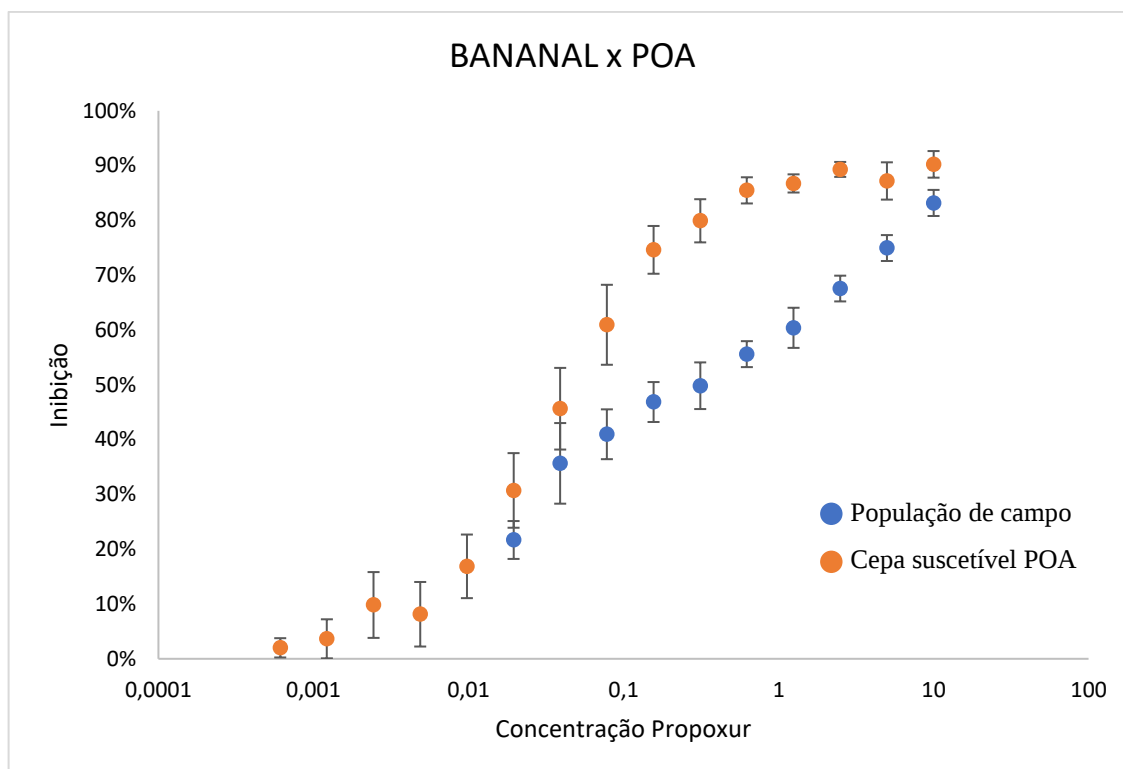


Figura 16 - Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato *R. microplus* das cepas de POA e Bananal.

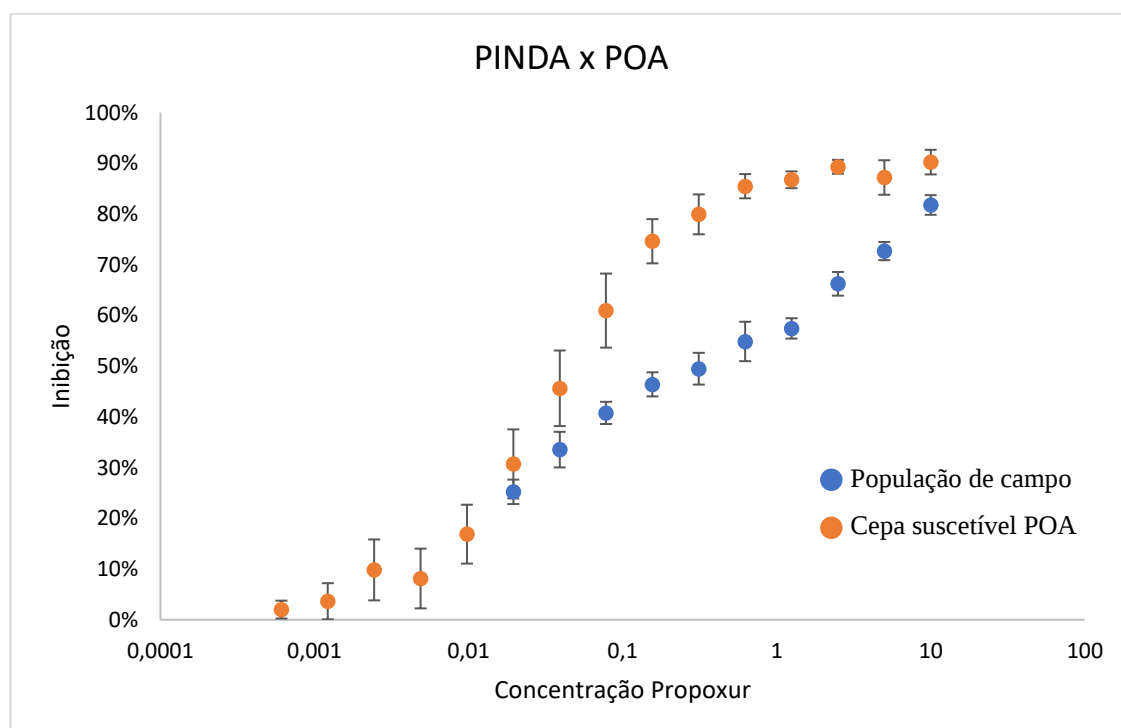


Figura 17 - Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato *R. microplus* das cepas de POA e Pinda.

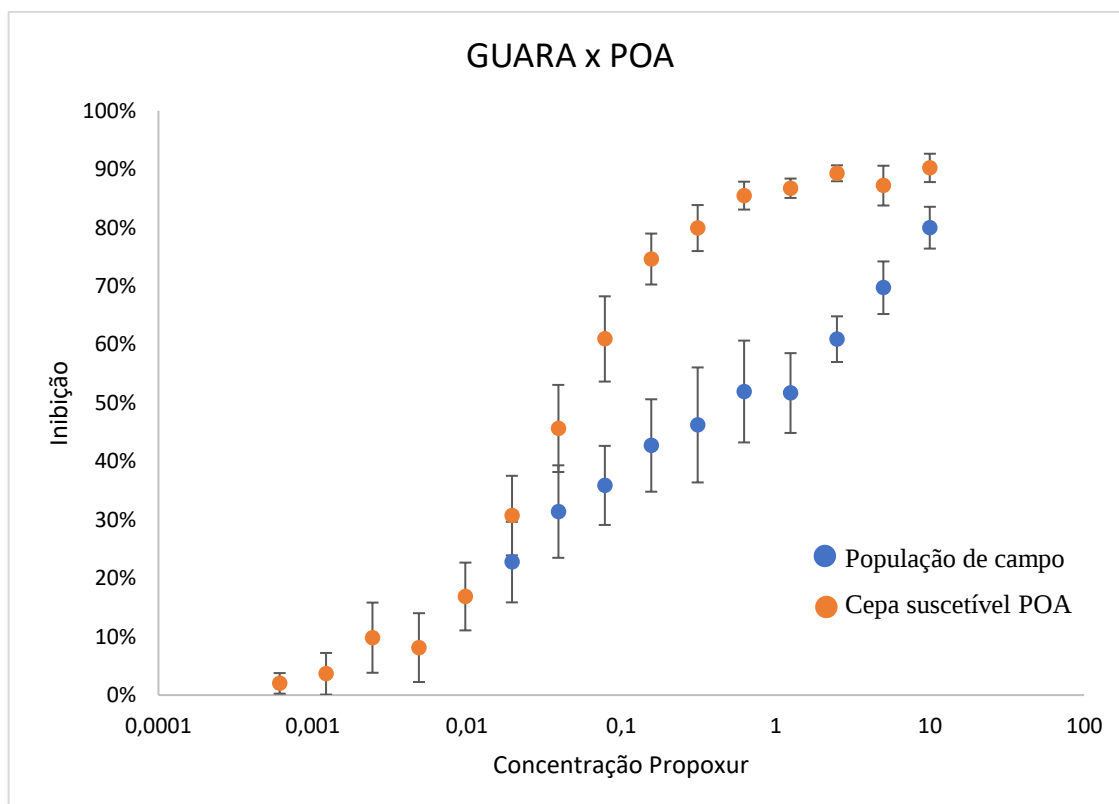


Figura 18 - Comparação entre a porcentagem de inibição das populações do carrapato *R. microplus* das cepas de POA e GUARA.

5.4. Atividade remanescente de acetilcolinesterase

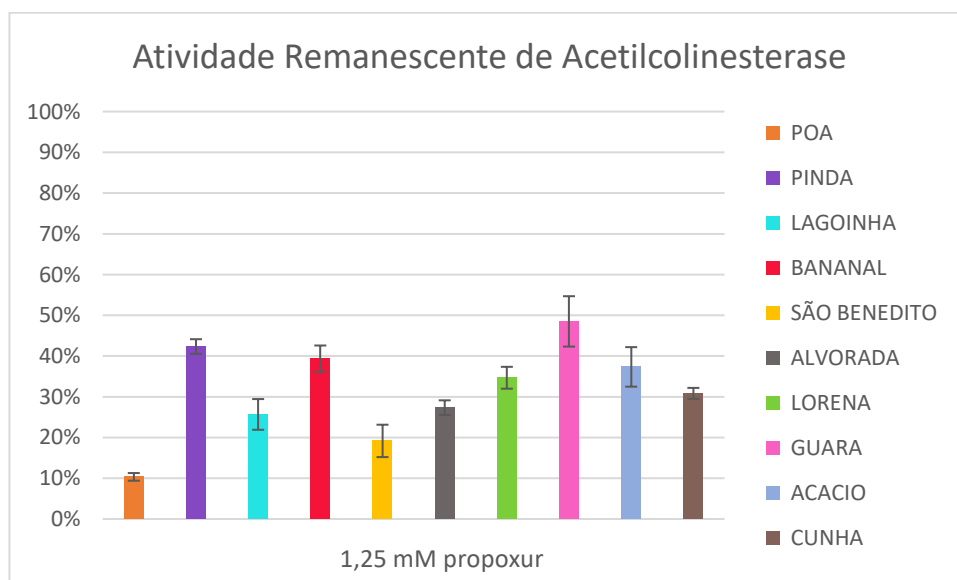


Figura 19 - Atividade Remanescente de Acetilcolinesterase das cepas do carrapato *R. microplus* do Vale do Paraíba, na concentração de 1,25mM de Propoxur.

Os valores de porcentagem de inibição se mostraram maiores nas cepas de campo (Figura 19), segundo o teste ANOVA seguido do teste Tukey, há diferença estatística entre a

porcentagem inibida entre a cepa suscetível POA e todas as cepas de campo, em que $p < 0,05$ (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados da análise estatística (One-Way ANOVA seguida pelo teste de Tukey) das porcentagens de atividade enzimática das cepas de campo do carrapato *R. microplus* em comparação com a cepa suscetível POA. (IC: intervalo de confiança).

POA	% Inibição a 1,25mM		
	90%		
Comparações		Diferença das médias (CI 95%)	Valor de P
Poa X Pinda	58%	0,32 (0,2479 - 0,3921)	<0,0001
Poa X Lagoinha	74%	0,1533 (0,08119 - 0,2255)	<0,0001
Poa X Bananal	61%	0,29 (0,2179 - 0,3621)	<0,0001
Poa X São Benedito	81%	0,08833 (0,01619 - 0,1605)	0,0062
Poa X Alvorada	73%	0,17 (0,09785 - 0,2421)	<0,0001
Poa X Lorena	65%	0,2433 (0,1712 - 0,3155)	<0,0001
Poa X Guara	52%	0,3817 (0,3095 - 0,4538)	<0,0001
Poa X Acacio	68%	0,27 (0,1979 - 0,3421)	<0,0001
Poa X Cunha	66%	0,205 (0,1329 - 0,2771)	<0,0001

5.5.Extração de DNA

A quantidade de DNA extraído foi de aproximadamente 200 ng/μL a 3000 ng/μL, conforme determinado pelo espectrofotômetro NanoDrop™ (Figura 20). A razão de absorbância 260/280 variou entre 1,8 e 2,0, indicando boa pureza do DNA. Os resultados obtidos confirmaram a eficácia do protocolo de extração utilizado, fornecendo DNA de alta qualidade e integridade para a realização das análises de PCR e sequenciamento.

Para os testes moleculares, as amostras foram diluídas para padronização, em água destilada em uma concentração de 25 ng/μL.

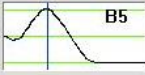
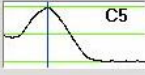
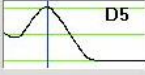
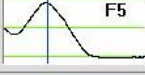
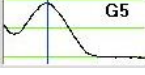
Active ☐ # 1		Sample # 1	nm 1 abs. 50,82	A-260 50,82	ng/ul 2541
Sample ID LAG12		A-280 26,458	260/280 1,92	260/230 2,30	
Active ☐ # 1		Sample # 1	nm 1 abs. 48,45	A-260 48,45	ng/ul 2423
Sample ID LAG13		A-280 25,105	260/280 1,93	260/230 2,23	
Active ☐ # 1		Sample # 1	nm 1 abs. 50,97	A-260 50,97	ng/ul 2548
Sample ID LAG14		A-280 25,911	260/280 1,97	260/230 2,28	
Active ☐ # 1		Sample # 1	nm 1 abs. 41,02	A-260 41,02	ng/ul 2051
Sample ID LAG15		A-280 21,226	260/280 1,93	260/230 2,27	
Active ☐ # 1		Sample # 1	nm 1 abs. 36,69	A-260 36,69	ng/ul 1834
Sample ID LAG16		A-280 18,764	260/280 1,96	260/230 2,33	
Active ☐ # 1		Sample # 1	nm 1 abs. 18,61	A-260 18,61	ng/ul 930,7
Sample ID LAG17		A-280 9,573	260/280 1,94	260/230 2,30	

Figura 20 – Algumas das amostras quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop™.

5.6.PCR e análises biomoleculares

As amostras apresentaram bandas de DNA visíveis em gel de agarose 0,5%, correspondentes aos fragmentos alvos. A PCR realizada amplificou fragmentos de DNA com aproximadamente 694 pares de base para o gene da AChE1 (Figura 21) e 1001 pares de base para o gene AChE2 (Figura 22).

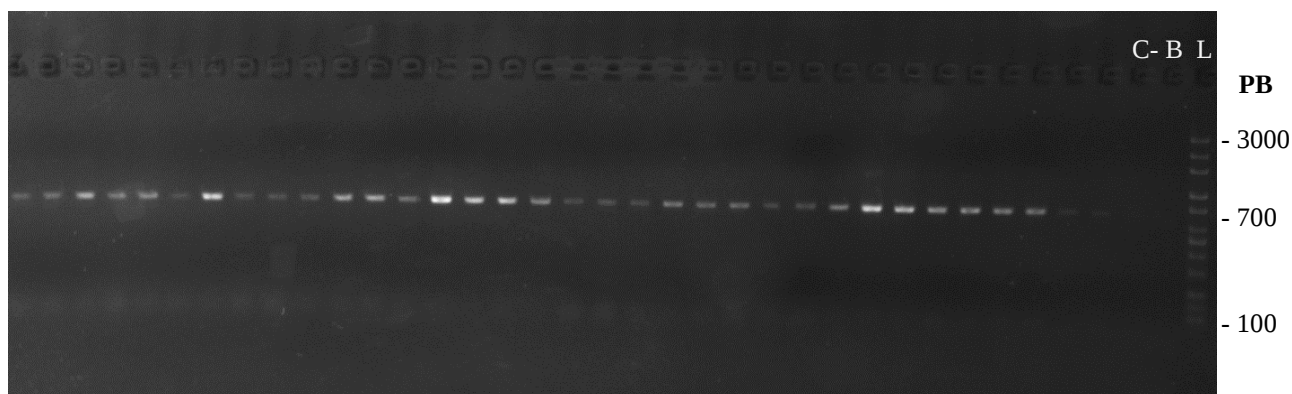


Figura 21 – Foto do gel de agarose confirmando amplificação do gene AChE1 em 34 amostras + controle negativo (C-), branco (B) e DNA Ladder (L); PB: pares de base.

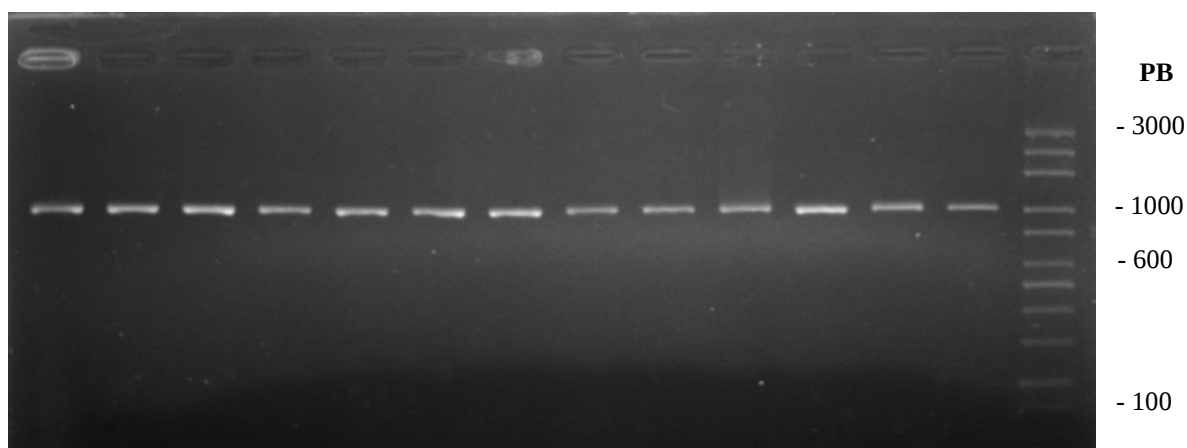


Figura 22 – Foto do gel de agarose confirmando a purificação da amplificação de DNA do gene AChE2 em 13 amostras + DNA Ladder; PB: pares de base. O controle negativo e o branco da reação, foram incluídos no experimento, porém carregados em um gel separado.

Após o sequenciamento do produto de PCR, por meio da ferramenta BLAST, do NCBI, na qual as sequências da espécie *R. microplus* foram inseridas, foi obtida um percentual de identidade entre 96% e 97% com as sequências de AChE1 e AChE2 de *R. microplus* depositadas no banco de dados (Figura 23).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Boophilus microplus mRNA for acetylcholinesterase 2 (achE2 gene), control strain	Rhipicephalus micro...	1498	1498	100%	0.0	97.96%	1828	AJ278342.1
Boophilus microplus mRNA for acetylcholinesterase 2 (achE2 gene), Biarra strain	Rhipicephalus micro...	1489	1489	100%	0.0	97.73%	1828	AJ278343.1
Boophilus microplus mRNA for acetylcholinesterase 2 (achE2 gene), Mt. Alford strain	Rhipicephalus micro...	1480	1480	100%	0.0	97.50%	1828	AJ278344.1
Boophilus microplus mRNA for acetylcholinesterase 2 (achE2 gene), Ultimo strain	Rhipicephalus micro...	1480	1480	100%	0.0	97.50%	1828	AJ278345.1
Rhipicephalus microplus isolate Sikar acetylcholinesterase 2 (AChE2) mRNA, complete cds	Rhipicephalus micro...	1475	1475	100%	0.0	97.39%	1692	KC493618.1
Rhipicephalus microplus isolate Chandausi acetylcholinesterase 2 (AChE2) mRNA, complete cds	Rhipicephalus micro...	1475	1475	100%	0.0	97.39%	1692	KY908387.1
Rhipicephalus microplus isolate Phrae_1 acetylcholinesterase (AChE) mRNA, partial cds	Rhipicephalus micro...	1471	1471	100%	0.0	97.28%	1017	PQ615939.1
Rhipicephalus microplus isolate MKT acetylcholinesterase 2 (AChE2) mRNA, complete cds	Rhipicephalus micro...	1471	1471	100%	0.0	97.28%	1692	KT215343.1
Rhipicephalus microplus isolate Uganda acetylcholinesterase 2 gene, complete cds	Rhipicephalus micro...	1467	1467	100%	0.0	96.37%	1992	OR587920.1
Rhipicephalus microplus isolate D19-00963 acetylcholinesterase 2 gene, complete cds	Rhipicephalus micro...	1467	1467	100%	0.0	96.37%	1992	OR587936.1
Rhipicephalus microplus isolate Banswara acetylcholinesterase 2 mRNA, complete cds	Rhipicephalus micro...	1466	1466	100%	0.0	97.16%	1692	JN624772.1
Rhipicephalus microplus isolate Lucknow acetylcholinesterase 2 (AChE2) mRNA, complete cds	Rhipicephalus micro...	1466	1466	100%	0.0	97.16%	1692	KY908389.1
Rhipicephalus microplus isolate D19-01430 acetylcholinesterase 2 gene, complete cds	Rhipicephalus micro...	1463	1463	100%	0.0	96.37%	1992	OR587930.1
Rhipicephalus microplus acetylcholinesterase 2 gene, partial cds	Rhipicephalus micro...	1462	1462	100%	0.0	96.48%	1992	OR965976.1
Rhipicephalus microplus isolate CVSA0022 acetylcholinesterase 2 gene, complete cds	Rhipicephalus micro...	1458	1458	100%	0.0	96.03%	1992	OR587945.1
Boophilus microplus putative acetylcholinesterase mRNA, complete cds	Rhipicephalus micro...	1458	1458	100%	0.0	97.04%	1851	AF067771.1

Figura 23 – Blast da sequência da amostra AC1 para comparação com sequências depositadas no banco de dados Genbank.

As sequências de nucleotídeos foram traduzidas em aminoácidos, que foram alinhadas e comparadas com sequências da referência, que mostraram variadas substituições. As figuras 24 e 25, representam o resultado do alinhamento dos aminoácidos traduzidos em comparação com as referências suscetíveis do gene *BmAChE1* (AJA71270.1) e *BmAChE2* (NC_051167.1) para a identificação de mutações.

		430	440	450	460	470	480
REF.ACHE1.AJ223965.1		-----	-----	-----	-----	-----	-----
		PIAEI	MKTYTAG	IPS	TAADIL	ALDSIVGDYHFTCPVVRWADTFARAGIPVYQYVFARR	
AC1							
AC2							
AC3							
AC4							
AC5							
BA1							
BA2							
BA3							
BA4							
BA5							
GUA1							
GUA2							
GUA3							
GUA4							
GUA5							

	430	440	450	460	470	480
REF.ACHE1.AJ223965.1	----- ----- ----- ----- ----- -----					
	PIAEI[K]KTYTAG[K]IPS[K]AADI[K]KALDSIVGDYHFTCPVVRWADTFARAGIPVYQYVFARR					
PA1	T.....					
PA2	T.....					
PA3	T.....					
PA4	T.....					
PA5	T.....					
ALV1						
ALV2	T.....					
ALV3	T.....					
ALV4	T.....					
ALV5	T.....					
LAG1	T.....					
LAG2	T.....					
LAG3	T.....					
LAG4	K.....					
LAG5	K.....					
LO1	T.....					
LO2	T.....					
LO3	V.....A.....					
LO4	V.....A.....					
LO5						
PIN1	T.....					
PIN2	T.....					
PIN3	T.....					
PIN4	T.....					
PIN5	T.....					
POA1	T.....					
POA2	T.....					
POA3	T.....					
POA4	T.....					
POA5	T.....					
SB1						
SB2	V.....A.....					
SB3						
SB4						
SB5	K.....					

```

                                430      440      450      460      470      480
REF.ACHe1.AJ223965.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|
PIAEI[K]KTYTAG[Q]IPS[A]ADIL[A]ALDSIVGDYHFTCPVVRWADTFARAGIPVYQYVFARR

C1      .....T.....
C2      .....T.....
C3      .....T.....
C4      .....T.....
C5      .....K.....

```

Figura 24 – Trecho do alinhamento das sequências de aminoácidos do gene AChE1 das diferentes cepas do carrapato *R. microplus* analisadas, destacando a alteração do aminoácido em relação à sequência de referência.

```

                                280      290      300      310      320      330
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
AChE2.ref.NC_051167.1  [R]KFAANFGCYGGDS[T]ANASQ[N]IA[A]CMR[F]VNASLIVAVEAT[F]VGS GSGKFEP IYGD

BA1  Q.....A....D..D..T.....
BA2  .....A....D....T.....F.....
BA3  .....A....D..D..T.....
BA4  Q.....A....D....T.....
BA5  .....A....D..D..T.....
PA1  .....A....D....T.....F.....
PA2  .....A....D....T.....F.....
PA3  .....A....D....T.....F.....
PA4  .....T....D....T.....
PA5  .....T....D....T.....
SB1  .....A....D....T.....F.....
SB2  .....A....D..D..T.....
SB3  .....T....D....T.....
SB4  .....A....D....T.....F.....
SB5  .....T....D....T.....
POA1 Q.....A....D....T.....
POA2 Q.....A....D....T.....
POA3 Q.....A....D....T.....
POA4 Q.....A....D....T.....
POA5 Q.....A....D....T.....
PIN1 .....A....D..D..T.....
PIN2 .....A....D..D..T.....
PIN3 Q.....A....D....T.....
PIN4 .....A....D....T.....F.....
PIN5 .....A....D..D..T.....
GUA1 .....A....D....T.....F.....
GUA2 .....A....D....T.....F.....
GUA3 .....T....D....T.....
GUA4 .....T....D....T.....
GUA5 .....A....D..D..T.....
AC1  .....A....D....T.....F.....
AC2  .....T....D....T.....

```

	280	290	300	310	320	330
	----	-----	-----	-----	-----	-----
AChE2.ref.NC_051167.1	RKFAANFGCYGGDS	TANASQNI	AACMR	RVNASLIVAVEAT	FV	GSGSGKFEPIYGD
AC3		T.....	D.....	T.....		
AC4		T.....	D.....	T.....		
AC5		A.....	D.....	D.....	T.....	
ALV1		A.....	D.....	T.....	L.....	
ALV2		A.....	D.....	T.....	F.....	
ALV3		T.....	D.....	T.....		
ALV4		T.....	D.....	T.....		
ALV5		T.....	N.....	R.....		
LO1		T.....	D.....	T.....		
LO2		A.....	D.....	T.....	F.....	
LO3		T.....	D.....	R.....		
LO4		T.....	D.....	R.....		
LO5		T.....	D.....	T.....		
LAG1		A.....	D.....	T.....	F.....	
LAG2	Q.....	A.....	D.....	T.....		
LAG3	Q.....	A.....	D.....	T.....		
LAG4		T.....	D.....	T.....		
LAG5		T.....	D.....	T.....		
C1		A.....	D.....	T.....	F.....	
C2		T.....	D.....	T.....		
C3		A.....	D.....	T.....	L.....	
C4		A.....	D.....	T.....	F.....	
C5		A.....	D.....	T.....	F.....	

Figura 25 – Trecho do alinhamento das sequências de aminoácidos do gene AChE2 das diferentes cepas do carrapato *R. microplus* analisadas, destacando a alteração do aminoácido em relação à sequência de referência.

Após o alinhamento, foi possível identificar variadas mutações, sendo 14 polimorfismos na sequência traduzida da AChE1 (Tabela 7) e 19 na sequência traduzida da AChE2 (Tabela 8).

Tabela 7. Frequência das mutações na sequência de aminoácidos da ACHE1 identificadas nas cepas do carrapato *R. microplus* da região do Vale do Paraíba. A tabela apresenta as mutações detectadas, sua posição e a porcentagem de ocorrência em cada cepa.

Posição	Referência AJA71270.1	Variante	Ocorrência na cepa										
	AA ID	AA ID	POA	ACÁCIO	BANANAL	GUARÁ	PALMEIRA	ALVORADA	LAGOINHA	LORENA	PINDA	SÃO BEN.	CUNHA
344	P	S	100%	80%	20%	40%	100%	80%	60%	40%	80%	0%	80%
349	A	V	100%	80%	80%	80%	100%	100%	60%	100%	100%	80%	80%
360	A	T	0%	0%	20%	20%	0%	0%	40%	0%	0%	20%	20%
362	T	M	0%	0%	20%	20%	0%	0%	40%	0%	0%	20%	20%
364	K	R	0%	0%	20%	20%	0%	0%	40%	40%	0%	40%	20%
368	A	G	0%	0%	20%	20%	0%	0%	40%	0%	0%	20%	20%
392	F	L	100%	80%	40%	40%	100%	80%	60%	40%	100%	0%	80%
398	T	I	0%	0%	0%	0%	0%	0%	20%	0%	0%	20%	20%
400	E	V	100%	60%	0%	40%	100%	40%	60%	40%	80%	0%	80%
426	M	V	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	40%	0%	20%	0%
433	E	K	0%	0%	20%	20%	0%	0%	40%	0%	0%	0%	40%
437	T	A	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	40%	0%	20%	0%
443	K	T	100%	80%	40%	40%	100%	80%	60%	40%	100%	0%	80%
488	Q	R	100%	100%	100%	100%	100%	100%	80%	60%	100%	80%	100%

Posição: Com base na sequência de AChE1 de *R. microplus* do GenBank (Acesso N° AJA71270.1).

Tabela 8. Frequência das mutações na sequência de aminoácidos da ACHE2 identificadas nas cepas do carrapato *R. microplus* da região do Vale do Paraíba. A tabela apresenta as mutações detectadas, sua posição e a porcentagem de ocorrência em cada cepa.

Posição	Referência NC_051167.1	Variante	Ocorrência na cepa										
	AA ID	AA ID	POA	BANANAL	PALMEIRA	SÃO BEN.	PINDA	GUARA	ACÁCIO	ALVORADA	LORENA	LAGOINHA	CUNHA
246	Q	K	100%	20%	0%	100%	20%	0%	0%	0%	0%	40%	0%
247	T	A	0%	0%	40%	0%	0%	40%	60%	40%	40%	40%	20%
250	K	R	0%	0%	40%	0%	0%	40%	60%	40%	40%	40%	20%
269	T	N	100%	60%	60%	100%	40%	60%	20%	40%	20%	60%	80%
276	R	Q	100%	40%	0%	100%	20%	0%	0%	0%	0%	40%	0%
290	T	A	100%	100%	60%	100%	100%	60%	40%	40%	20%	60%	80%
296	N	D	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	80%	60%	100%	100%
299	A	D	0%	60%	0%	0%	60%	20%	20%	0%	0%	0%	0%
303	R	T	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	80%	60%	100%	100%
317	V	F	0%	20%	60%	0%	20%	40%	20%	20%	20%	0%	60%
317	V	L	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	20%	0%	0%	20%
339	V	M	0%	80%	100%	0%	80%	100%	100%	80%	100%	60%	100%
347	D	N	0%	20%	0%	0%	60%	0%	20%	0%	0%	0%	0%
355	N	Y	0%	40%	60%	0%	20%	40%	20%	40%	20%	0%	80%
365	F	Y	0%	0%	40%	0%	0%	40%	60%	40%	40%	40%	20%
396	P	S	0%	80%	100%	0%	80%	100%	100%	100%	100%	80%	100%
451	G	E	100%	40%	0%	100%	20%	20%	0%	0%	0%	40%	0%
453	E	D	0%	20%	60%	0%	20%	40%	20%	20%	20%	20%	60%
464	A	T	0%	0%	0%	0%	20%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Posição: Com base na sequência de AChE2 de *R. microplus* do GenBank (Acesso N° NC_051167.1).

6. DISCUSSÃO

O estudo investigou a resistência de populações de *Rhipicephalus microplus* a organofosforados, um desafio significativo para o controle desses parasitos no Vale do Paraíba, SP. Através do bioensaio Teste de Pacote de Larvas (TPL), foi constatado que 90% das cepas testadas apresentaram resistência ao organofosforado clorpirifós. Para compreender os mecanismos de resistência envolvidos, foram identificadas mutações nas sequências de aminoácidos das enzimas AChE1 e AChE2, além de observada uma maior atividade enzimática na presença de Propoxur em cepas resistentes.

A utilização de acaricidas para o controle dos carrapatos, é o método mais amplamente utilizado até hoje (KOLLER *et al.*, 2019). Porém, quando o acaricida é utilizado, os carrapatos resistentes sobrevivem ao tratamento, se reproduzem e dão origem a uma nova geração de carrapatos, também resistentes. À medida que, novas aplicações do produto são feitas, a parcela suscetível da população morre e indivíduos resistentes predominam, dessa forma o produto deixa de ser eficaz, posteriormente cada tratamento sucessivo é um processo de seleção (KUNZ; KEMP, 1994). Dessa forma, é importante acompanhar e avaliar a situação de cada propriedade para determinar se os carrapaticidas utilizados ainda são eficazes. E para a avaliação da susceptibilidade aos acaricidas, o teste de pacote de larvas (TPL) está entre os dois bioensaios *in vitro* mais utilizados (FAO, 2004).

No presente trabalho, o TPL realizado, utilizando as propriedades do Vale do Paraíba, determinou que 90%, das 10 cepas do carrapato *R. microplus* testadas, foram consideradas resistentes, exceto pela cepa São Benedito, cujo menor IC95% foi 0,028 e o maior IC95% da cepa POA foi 0,047, de acordo com os critérios, essa cepa foi considerada suscetível pois não há diferença estatística da cepa POA.

Outro estudo com populações de *R. microplus* provenientes da região do Vale do Paraíba, obtiveram resultados similares. Mendes *et al.* (2010) avaliaram uma cepa de Jambeiro – SP (Vale do Paraíba), em que a cepa apresentou um fator de resistência de 1,31 para clorpirifós. Também foi possível observar que essa cepa era resistente a cipermetrina com FR de 8,68, assim como foi demonstrado pela Dose Diagnóstica da cepa PINDA neste trabalho, em que se obteve apenas 5% de mortalidade das larvas para a cipermetrina, maior do que para o clorpirifós que obteve 23%.

Resultados semelhantes foram determinados por Duarte *et al.* (2021) que avaliaram cepas de 16 propriedades do Vale do Paraíba utilizando o TPL, e relataram que todas as propriedades apresentaram resistência ao organofosforado diazinon.

A cepa Pinda apresentou o maior FR entre as cepas estudadas no Vale do Paraíba, de 86,11. Por isso, foi realizada uma triagem com diversos carrapaticidas, empregando o método DD, para avaliar sua resistência a outros grupos químicos.

O teste revelou a multirresistência da cepa Pinda à cipermetrina, clorpirifós e fipronil, com mortalidade das larvas de apenas 5%, 23% e 17%, respectivamente. Como cada classe de acaricida atua em um alvo específico, os resultados indicam que a cepa Pinda possui mecanismos de resistência distintos, lhe conferindo resistência a variadas classes. Em contrapartida, a moxidectina e doramectina foram eficazes, eliminando 97% das larvas, esse resultado mostra que essa cepa é suscetível às lactonas macrocíclicas, o que as torna uma alternativa promissora para uso nessa propriedade enquanto mantêm sua eficácia.

As propriedades avaliadas possuíam um histórico de uso de carrapaticidas de variados grupos químicos, incluindo organofosforados. Assim, a presença de cepas resistentes ao OF clorpirifós, demonstra a relação entre a resistência e o padrão de uso intenso e prolongado dessas substâncias na região (Duarte *et al.*, 2021; Klafke *et al.*, 2024).

HIGA *et al.* (2015) também identificaram resistência aos organofosforados presente no estado de São Paulo, bem como aos piretroides, amidinas, fipronil e às associações entre organofosforados e piretroides.

Dessa forma, a multirresistência do carrapato *R. microplus*, é esperada para o estado de São Paulo, onde é utilizado todos os grupos químicos de acaricidas, tornando possível encontrar populações do mesmo local resistentes a maioria das classes acaricidas (MENDES *et al.*, 2010; HIGA *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2021).

Evidencia-se, portanto, a necessidade de buscar alternativas para o controle do carrapato bovino, como o Manejo Integrado de Pragas (MIP) e o controle biológico, pois as cepas do Vale do Paraíba apresentam resistência ao clorpirifós, um dos produtos mais utilizados, comprometendo sua eficácia. Além disso, o uso desse produto foi proibido em países como os Estados Unidos e membros da União Europeia, devido aos riscos comprovados à saúde humana e ao meio ambiente. No entanto, no Brasil, o clorpirifós ainda é comercializado (ANVISA, 2021), o que destaca a importância de uma avaliação mais detalhada sobre seu uso e impactos.

Há mecanismos fisiológicos que permitem aos indivíduos resistentes a sobrevivência frente a pressão de seleção, como: a diminuição de penetração cuticular da droga, a resistência metabólica e a resistência por insensibilidade de sítio de ação (FFRENCH-CONSTANT; DABORN; LE GOFF, 2004).

Para investigar as causas do perfil resistente das cepas estudadas, foram realizados os ensaios com inibidor enzimático. Em que, as curvas de dose-resposta, mostraram níveis mais elevados de atividade da AChE nas cepas de campo estudadas, expostas ao Propoxur, em comparação com a cepa suscetível POA, com exceção da cepa São Benedito, que também foi a única definida como suscetível.

Os resultados do teste com inibidor enzimático estão de acordo com os resultados obtidos pelos bioensaios, em que as cepas de campo se mostraram resistentes e obtiveram maior atividade enzimática. Além disso, a análise estatística confirmou a diferença significativa, em que ($p < 0,05$), ao comparar a atividade enzimática remanescente entre a cepa suscetível POA e as cepas de campo, inclusive a cepa São Benedito, considerada suscetível com base nos resultados do TPL.

Em um estudo, realizado por Jyoti *et al.* (2016), na Índia, foi demonstrado que a porcentagem de atividade desinibida da AChE em larvas de *R. microplus* expostas ao propoxur foram de acordo com os resultados obtidos por bioensaios em isolados de campo, em que as cepas resistentes obtiveram maior atividade enzimática remanescente. Baffi *et al.* (2008), relataram que uma cepa resistente de carrapato-do-boi, do Estado de Minas Gerais, tinha quantidades maiores da atividade de AChE em comparação com as cepas suscetíveis. Os resultados desses estudos sugeriram que o aumento da desintoxicação metabólica contribuiu para o desenvolvimento de resistência a OF nessas cepas.

No presente estudo, foi obtido resultados que corroboram com os trabalhos citados, em que houve maior atividade remanescente de AChE nas cepas resistentes quando comparadas a cepa suscetível, contribuindo assim para o entendimento da resistência aos organofosforados. Pode-se sugerir que neste trabalho a atividade enzimática da AChE é um fator significativo no desenvolvimento de resistência das cepas.

Nas cepas resistentes, a acetilcolinesterase demonstrou menor inibição pelo propoxur, evidenciando uma insensibilidade da enzima à molécula do acaricida. Essa insensibilidade pode ter sido um fator determinante no desenvolvimento da resistência observada nessas populações. Uma possível explicação para isso, seria a ocorrência de mutações no sítio-alvo da enzima, que

poderiam alterar sua estrutura e reduzir a afinidade pelo acaricida, comprometendo a eficácia do composto.

A insensibilidade do sítio-alvo é um mecanismo comumente associado como a causa da resistência para os carrapatos. Mutações nos genes que expressam as enzimas AChE1, AChE2 e AChE3 podem conferir o perfil resistente das populações de *R. microplus*, e estudos relatam, que esses genes possuem diversos polimorfismos que deixam a acetilcolinesterase insensível aos organofosforados (TEMEYER, 2013; KUMAR, 2019). No presente estudo, os genes codificadores da AChE1 e AChE2 foram sequenciados para identificar possíveis mutações, resultando na detecção de diversos polimorfismos, sendo 14 mutações na sequência de aminoácidos da AChE1 e 19 na sequência da AChE2.

Na sequência de aminoácidos da AChE1 foram identificadas as seguintes mutações: P344S, A349V, A360T, T362M, K364R, A368G, F392L, T398I, E400V, M426V, E433K, T437A, K443T, Q488R. No entanto, os polimorfismos, P344S, A349V, F392L, E400V, K443T, Q488R, além de estarem presentes na maior parte das cepas de campo resistentes, também foram identificadas na cepa suscetível POA. Nas cepas POA, PINDA, PALMEIRA, ALVORADA e ACÁCIO, apenas esses polimorfismos foram identificados. Comparando com a literatura, são polimorfismos que geralmente ocorre tanto em cepas resistentes quanto sensíveis (TEMEYER, 2019; BENDELE, 2015). Isso sugere que, embora essas mutações possam contribuir para o desenvolvimento de resistência, de forma independente são insuficientes para produzir o fenótipo resistente (Temeyer *et al.*, 2007).

As variantes A360T, T362M, K364R, A368G, T398I, M426V, E433K, T437A, de *BmAChE1* foram observadas apenas em linhagens resistentes a OP, o que pode indicar um fator importante para a insensibilidade do organofosforado em se ligar à região-alvo, ainda mais quando encontradas em associação. Entre essas mutações, as substituições A360T, T398I e E433K, não foram relatadas anteriormente, e todas elas resultam em uma mudança significativa de grupo químico do aminoácido.

Nas posições A360T e T398I ocorre o mesmo tipo de mudança, a treonina é um aminoácido polar e neutro, contendo um grupo hidroxila (-OH) em sua cadeia lateral, o que permite interações por pontes de hidrogênio com o meio aquoso e outras moléculas. Já a isoleucina, assim como a alanina, é um aminoácido apolar e hidrofóbico. Essa substituição altera a hidrofobicidade local da proteína e pode impactar sua estrutura e função. A substituição E433K envolve uma mudança de grupo químico de ácido para básico, o que pode impactar, devido a inversão de carga de negativa para positiva, alterando interações eletrostáticas da

proteína. Essa mudança pode afetar a estabilidade estrutural, a ligação com outras moléculas e até a função enzimática.

Na posição 362, geralmente é relatada na literatura a substituição T362A que é relacionada a resistência (TEMEYER, 2019). Neste trabalho, foi encontrada a substituição T362M, e em ambos os casos, tanto na substituição por Alanina quanto Metionina, ocorrem a mudança de grupo químico citada anteriormente, de polar para apolar, o que pode impactar sua estrutura e função.

Apesar dessas mutações aparentarem ser potencialmente problemáticas, nenhuma delas foi identificada em 100% das cepas analisadas. Além disso, a presença de uma alteração no grupo químico do aminoácido não implica, necessariamente, no fenótipo de resistência. Esse fato é evidenciado pela cepa suscetível, que apresentava seis mutações, das quais cinco resultavam em mudanças no grupo químico dos aminoácidos.

Na sequência de aminoácidos da AChE2, foram encontradas as mutações: Q246K, T247A, K250R, T269N, R276Q, T290A, N296D, A299D, R303T, V317F, V317L, V339M, D347N, N355Y, F365Y, P396S, G451E, E453D e A464T. Dessas, apenas as mutações Q246K, V317L, V339M, D347N, G451E e A464T não foram relatadas anteriormente (KUMAR *et al.*, 2019; MEIRING C, LABUSCHAGNE M 2024).

As substituições Q246K, R276Q, T290A, N296D, R303T e G453D ocorreram tanto em cepas suscetíveis quanto resistentes. Tais achados também foram observados por Meiring e Labuschagne (2024), que analisaram cepas de diferentes regiões e constataram que mutações previamente descritas na literatura estavam presentes tanto em isolados resistentes quanto suscetíveis. É o caso das substituições N355Y e E453D, que não foram detectadas na cepa suscetível POA analisada neste trabalho, mas estavam presentes na cepa suscetível descrita no estudo citado.

Meiring e Labuschagne (2024) também destacaram que a mutação N355Y está próxima ao resíduo catalítico E356, podendo influenciar a atividade enzimática. A substituição introduz um anel aromático (tirosina), o que pode favorecer interações com o anel aromático do organofosforado, devido à sua proximidade com o sítio ativo. Neste trabalho, essa mutação foi encontrada apenas nas cepas resistentes.

Mutações como T247A, A299D, D347N, N355Y, P396S e A464T, além de terem sido identificadas apenas nas cepas de campo resistentes, também são alterações em que ocorrem a

mudança de grupo químico dos aminoácidos. Essas mudanças podem alterar a conformação da proteína e a afinidade da enzima com o organofosforado. O que indica que neste estudo, essas mutações podem ter um potencial papel na resistência das cepas estudadas.

Foi observado que, no gene *BmAChE1*, algumas cepas resistentes apresentaram apenas as mesmas variantes encontradas na cepa suscetível, sugerindo que neste trabalho, esse gene, isoladamente, pode não desempenhar um papel determinante no mecanismo de resistência. Apesar de que no gene *BmAChE2* também foi possível observar algumas mutações presentes na cepa suscetível, nesse caso foi demonstrado um perfil de alta variabilidade nas cepas, com múltiplas mutações identificadas em todas as cepas analisadas, sendo a maioria exclusiva das cepas resistentes. Esses achados indicam que *BmAChE2* pode estar mais diretamente envolvido no fenótipo resistente observado.

Também já foi demonstrado que, isoladamente, mutações pontuais podem conferir baixa resistência. No entanto, quando ocorrem em combinação, podem reduzir significativamente a sensibilidade da AChE aos organofosforados. Neste trabalho, foram identificados indivíduos com múltiplas mutações simultâneas, além do ensaio com inibidor enzimático que demonstrou que houve uma menor inibição da acetilcolinesterase pelo Propoxur em cepas resistentes, o que reforça que essas associações podem ter contribuído de forma agravante para o desenvolvimento do fenótipo resistente. (NABESHIMA *et al*, 2004; HEMINGWAY *et al*, 2004).

O estudo atual identificou variadas mutações em *BmAChE1* e *BmAChE2* que estavam associadas exclusivamente ou em frequência relativamente alta às linhagens resistentes a organofosforados, em comparação com as linhagens sensíveis a OP de *R. microplus*. Porém, o *R. microplus* possui três variantes desse gene (*BmAChE1*, *BmAChE2* e *BmAChE3*), com polimorfismos significativos, algumas mutações associadas à resistência, e um alto número de cópias gênicas, o que pode dificultar a identificação de mutações específicas responsáveis pela resistência (Temeyer, 2012).

Neste trabalho, foi possível observar esse mesmo padrão, já que não foi possível estabelecer uma correlação direta entre mutações específicas identificadas e o fenótipo resistente. Os polimorfismos apresentaram grande variação entre as diferentes cepas, e algumas mutações foram observadas apenas em um único indivíduo.

A resistência por insensibilidade de sítio de ação, pode ser a causa da resistência neste estudo, porém não pode ser atribuída exclusivamente a uma mutação específica relacionada a

resistência, mas sim a um conjunto de variações genéticas que contribuem para o fenótipo resistente. Além disso, os dados indicaram um aumento significativo na atividade enzimática das cepas de campo em relação a cepa suscetível, o que evidencia que a associação de mutações pode ter ocasionado na insensibilidade do sítio alvo, dificultando a ligação entre o acaricida e a enzima.

Dessa forma, os resultados sugerem que a insensibilidade do sítio-alvo desempenha um papel significativo na resistência das cepas de campo aos organofosforados, evidenciada pelas diversas mutações identificadas e pela maior atividade da acetilcolinesterase nas cepas resistentes.

7. CONCLUSÃO

- O fenótipo resistente ao composto clorpirifós foi identificado em 90% das populações de *R. microplus* estudadas nas propriedades do Vale do Paraíba, com exceção da cepa São Benedito.
- Os resultados obtidos demonstraram que houve maior inibição da acetilcolinesterase nas cepas resistentes em relação a cepa suscetível POA.
- Foram identificados diversos polimorfismos nas populações estudadas, inclusive mutações inéditas, ainda não descritas na literatura.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, R. Z. *et al.* Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology*, 2014. v. 203(1-2), p. 6-20. DOI:10.1016/j.vetpar.2014.03.006
- ALI A, K. *et al.* Seasonal Dynamics, Record of Ticks Infesting Humans, Wild and Domestic Animals and Molecular Phylogeny of *Rhipicephalus microplus* in Khyber Pakhtunkhwa Pakistan. *Front. Physiol.* 2019, 10:793. doi: 10.3389/fphys.2019.00793
- ALMEIDA, M.B.; TORTELLI, F.P.; RIET-CORREA, B.; FERREIRA, J.L.M.; SOARES, M. P.; FARIAS, N.A.R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 26, p. 237-242, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2006000400008>
- ALON M. *et al.* Organophosphates' resistance in the B-biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an ace1-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. *Insect Biochem Mol Biol.* 2008 Oct;38(10):940-9. doi: 10.1016/j.ibmb.2008.07.007. Epub 2008 Aug 5. PMID: 18721883.
- ANDREOTTI, R. *et al.* Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Microbiology*, v.11, n. 1, p. 1-11, 2011.
- ANDREOTTI, R. *et al.* Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. [s.l.] Brasília, DF: Embrapa, 2019., 2019.
- ARAÚJO, C; SANTOS, V; GONSALVES, A. Acetylcholinesterase - AChE: a pharmacological interesting enzyme. *Revista Virtual de Química*, v. 8, p. 1818-1834, 2016. DOI: 10.21577/1984-6835.20160122.
- BARROS, M. N. D. L.; RIET-CORREA, F.; AZEVEDO, S. S.; LABRUNA, M. B. Off-host development and survival of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the Brazilian semiarid. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v. 9, 2017. 17-24 p. - barros, 2017
- BAXTER GD, GREEN P, STUTTGEN M, BARKER SC. Detecting resistance to organophosphates and carbamates in the cattle tick *Boophilus microplus*, with a propoxur-based biochemical test. *Exp Appl Acarol.* 1999 Nov;23(11):907-14. doi: 10.1023/a:1006364816302. PMID: 10668865.
- BAFFI MA, DE SOUZA GR, DE SOUSA CS, CERON CR, BONETTI AM. Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari, Ixodidae). *Mol Biochem Parasitol.* 2008 Jul;160(1):70-3. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.03.009. Epub 2008 Apr 7. PMID: 18472171.

BENDELE, K.G. et al. Acetylcholinesterase 1 in populations of organophosphate-resistant North American strains of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). 114. ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2015. 3027–3040 p.

BERNARDI, O.; OMOTO, C. Manejo de resistência de insetos e ácaros a pesticidas. In: ZAMBOLIM, L.; SILVA, A. A. da; PICANÇO, M.C. (Org). O que Engenheiros Agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários. 4 ed. Viçosa, v.1, p.495-528, 2014.

BLOM, N; GAMMELTOFT S; BRUNAK, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol.* 1999 Dec 17;294(5):1351-62. doi: 10.1006/jmbi.1999.3310. PMID: 10600390.

BRITO, L. G.; NERY, L. O.; BARBIERI, F. S.; HUACCA, M. E. F.; PEREIRA, S. S.; SILVA, R. R.; FERNANDES, C. C. F.; OLIVEIRA, M. C. S. Molecular quantitative assay for esterase-mediated organophosphate resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 8, n. 5, p. 725-732, 2017. ISSN 1877-959X. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.05.006>.

BUSTOS-BAENA AS, BRAVO-RAMOS JL, ROMERO-SALAS D, SÁNCHEZ-MONTES S, ORTIZ-CARBAJAL LA, SÁNCHEZ-OTERO MG. In vitro and in silico studies of the acaricidal and anticholinesterase activities of *Randia aculeata* seeds against the southern cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2024 Apr 29;33(2):e001524. doi: 10.1590/S1984-29612024021. PMID: 38695451; PMCID: PMC11065400.

CASTRO-JANER E, MARTINS JR, MENDES MC, NAMINDOME A, KLAFFKE GM, SCHUMAKER TT. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. *Vet Parasitol.* 2010 Oct 29;173(3-4):300-6. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.06.036. Epub 2010 Aug 4. PMID: 20688434.

CLEMENTE, Mateus Aparecido *et al.* Avaliação do potencial de plantas medicinais no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, n.2, p.516-518, 2008.

COLOVIĆ MB, *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol.* 2013 May;11(3):315-35. doi: 10.2174/1570159X11311030006. PMID: 24179466; PMCID: PMC3648782.

DE LA FUENTE, J. *et al.* Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. *Frontiers*, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00114>. Acesso em: 10 out. 2022.

DÍAZ, E. Evaluación in vitro de resistencia a acaricidas en *Rhipicephalus microplus*. Estudio de caso en el norte del Tolima, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, v. 8, p. 37-43, 2015.

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

ELLMAN GL, COURTNEY KD, ANDRES V JR, FEATHERSTONE RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961. 7(2): 88-90. [http://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](http://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

ESTRADA-PEÑA A, BOUATTOR A, CAMICAS JL, GUGLIELMONE A, HORAK I, JONGEJAN F, LATIF A, PEGRAM R, WALKER AR. 2006. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental & Applied Acarology*. 38:219–235.

GUERRERO, F. D.; NENE, V. M.; GEORGE, J. E.; BARKER, S. C.; WILLADSEN, P. Sequencing a new target genome: the *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) genome project. *Journal of Medical Entomology*, v. 43, n. 1, p. 9-16, 1 jan. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1093/jmedent/43.1.9>.

GUERRERO, F. D., LOVIS, L., MARTINS, J. R. (2012). Acaricide Resistance Mechanisms in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *Microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 1–6. doi: 10.1590/S1984-29612012000100002

FFRENCH-CONSTANT, RH; DABORN PJ; LE GOFF G. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet.* 2004 Mar;20(3):163-70. doi: 10.1016/j.tig.2004.01.003. PMID: 15036810.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION (FAO) (Roma, Itália). Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines. Roma: Food and Agriculture Organisation, Animal Production and Health Division, 2004. 53p.

FOURNIER, D. *et al.* Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. *Journal of Biological Chemistry*. Volume 267, Issue 20, 1992. Pages 14270-14274, ISSN 0021-9258. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)49708-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)49708-1).

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S. Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite. 2000. 25 p.

GASSEL, M; WOLF C; NOACK S; WILLIAMS H; ILG T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. *Insect Biochem Mol Biol.* 2014 Feb;45: 111-24. doi: 10.1016/j.ibmb.2013.11.009. Epub 2013 Dec 21. PMID: 24365472.

GEORGE, J. E.; POUND, J. M.; DAVEY, R. B. Acaricides for controlling ticks on cattle and the problem of acaricide resistance. In: BOWMAN, A. S.; NUTTALL, P. A. *Ticks: biology, disease and control*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2008. p. 415-416.

GIACOPPO, J. O. S.; LIMA, W. E. A.; KAMIL, K.; FRANÇA, T. C. C.; DA CUNHA, E. F. F.; RAMALHO, T. C. Guerra química: perspectivas no estudo de reativadores da enzima acetilcolinesterase inibida por organofosforados. *Revista Virtual de Química*, v. 6, n. 3, p. 653-670, 2014. Data de publicação na Web: 13 abr. 2014.

GRISI, L. *et al.* Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, Jaboticabal, v. 23, n. 2, 2014. 150-156 p.

GUERRERO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R.. Acaricide Resistance Mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Rev. Bras. Parasitol. Vet., 2012. V. 21, 1–6. DOI: 10.1590/S1984-29612012000100002

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. Experimental and Applied Acarology, v. 40, n. 2, 2006. 83-100 p.

HEMINGWAY J. *et al.* The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochemistry and Molecular Biology. Volume 34, Issue 7, 2004, Pages 653-665, ISSN 0965-1748, <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>.

HIGA, L. *et al.* Effects of cypermethrin, chlorpyrifos and piperonyl butoxide-based pour-on and spray acaricides on controlling the tick *Rhipicephalus microplus*. Systematic and Applied Acarology, 2019. v. 24, p. 278-286. DOI: 10.11158/saa.24.2.10

JANADAREE BANDARA, K. M. U., & PARAKRAMA KARUNARATNE, S. H. P. (2017). Mechanisms of acaricide resistance in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Sri Lanka. Pesticide Biochemistry and Physiology, 139, 68–72. doi:10.1016/j.pestbp.2017.05.002

JYOTI, SINGH, N. K., SINGH, H., SINGH, N. K., & RATH, S. S. (2016). Multiple mutations in the acetylcholinesterase 3 gene associated with organophosphate resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks from Punjab, India. Veterinary Parasitology, 216, 108–117. doi:10.1016/j.vetpar.2015.12.004

KHAJEHALI J. *et al.* Acetylcholinesterase point mutations in European strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) resistant to organophosphates. Pest Manag Sci. 2010 Feb;66(2):220-8. doi: 10.1002/ps.1884. PMID: 19894225.

KLAFKE, G. Diagnóstico e mecanismos de resistência a ivermectina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) 2011. 176 f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

KLAFKE, G. *et al.* Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. Ticks and tick-borne Diseases, v.8, p. 73-80, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.019>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X1630173X?via%3Dihub>. Acesso em: 10 out. 2022.

KLAFKE GM, GOLO PS, MONTEIRO CMO, COSTA-JÚNIOR LM, RECK J. Brazil's battle against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks: current strategies and future directions. Braz J Vet Parasitol 2024; 33(2): e001423. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612024026>

KUMAR, R. Molecular markers and their application in the monitoring of acaricide resistance in *Rhipicephalus microplus*. Exp Appl Acarol 78, 149–172 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00394-0>

KUNZ, S. E.; KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. Rev. Sci. Technol. OIE. v. 13, p. 1249–1286, 1994.

MARTINS, J. R. A situation report on resistance to acaricides by the cattle tick *Boophilus microplus* in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, 3., 1995, Acapulco, México. Anais... Acapulco: INIFAP, 1995. p.1-8.

MARTINS, J. R.; CORREA, B. L.; MALA, J. Z. Resistência de carrapatos a carrapaticidas piretróides no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11, 1992, Gramado. Anais... Gramado: SOVERGS, 1992. p. 46.

MARTINS, J. R.; FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. Veterinary Record, v. 149, n.2, p. 64, 2001.

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, São Paulo, Brazil. Arquivos do Instituto Biológico, v.74, n.2, p.81-85, 2007.

MENDES, M. C.; PINTO LIMA, C. K.; PEREIRA, J. R. Práticas de manejo para o controle de o carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) em propriedades localizadas na região de Pindamonhangaba, Vale do Paraíba, São Paulo. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 75, n. 3, p. 371-373, 2008.

MENDES, M. C.; SILVA, M. X.; BRACCO, J. E. Teste bioquímico para determinar a resistência de duas cepas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 10, n. 2, p. 61-65, 2001.

MEIRING, C., & LABUSCHAGNE, M. (2024). Genomic assessment of targets implicated in *Rhipicephalus microplus* acaricide resistance. PLOS ONE, 19 (12), e0312074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0312074>

MENOZZI, P. *et al.* Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. BMC Evol Biol. 2004 Feb 5;4:4. doi: 10.1186/1471-2148-4-4. PMID: 15018651; PMCID: PMC362867.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti*. [s.l.: s.n.], 2006. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/dengue/manual_novo_protocolo_dengue.pdf/view. Acesso em: 05 set. 2024.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). Systematic Parasitology, 56, n. 3, p. 169-172, 2003/11/01 2003.

NABESHIMA, T. *et al.* An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jan 16;313(3):794-801. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.141. PMID: 14697262.

NUNES, L. F. B., RAMOS, E. T. B., ALVES-RIBEIRO, B. S., MAIA, G. O., ROCHA, A. C. da S., SILVA, Z. M. A., MORAES, I. de S., & VASCONCELOS, V. S. (2023). Análise da

comercialização de carrapaticidas em uma casa de distribuição de medicamentos em Jataí, Goiás, Brasil. Cuadernos De Educación Y Desarrollo, 15(12), 16635–16643. <https://doi.org/10.55905/cuadv15n12-081>

OBAID, M. K. *et al.* Acaricides Resistance in Ticks: Selection, Diagnosis, Mechanisms, and Mitigation. Mardan: Front. Cell. Infect. Microbiol., 2022. v. 12:941831. DOI: 10.3389/fcimb.2022.941831

PEREIRA, Cícero Donizete; SOUZA, Guilherme Rocha Lino de; BAFFI, Milla Alves. Carrapato dos bovinos: métodos de controle e mecanismos de resistência a acaricidas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. 30 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 278).

PEREIRA, MARCELO DE CAMPOS; LABRUNA, MARCELO BAHIA; SZABÓ, MATIAS PABLO JUAN; KLAFKE, GUILHERME MARCONDES. 2008 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, Controle e Resistência. [S.l: s.n.], 2008

RECK, J.; MARKS, et al. Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle? Preventive Veterinary Medicine, 2014, v. 1, p. 59-62. DOI:10.1016/j.prevetmed.2013.10.006

RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; HODGKINSON, J. E.; TREES, A. J.. Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia: Acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Current status and mechanisms of resistance. México: Rev. mex. de cienc. pecuarias, 2012. 9-24 p. v. 3. ISSN 2448-6698.

RODRIGUEZ-VIVAS R.I., JONSSON N.N. & BHUSHAN C. 2018. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. Parasitology Research. 117(1): 3-29.

ROUSH, R. T. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. Parasitology Today, v.9, n. 5, p. 174-179, May 1993.

KLAFKE, G. M.; SABATINI, G. A.; ALBUQUERQUE, T. A. de; MARTINS, J. R.; KEMP, D. H.; MILLER, R. J.; SCHUMAKER, T. T. S. Larval Immersion Tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. Veterinary Parasitology, v. 142, p. 386-390, Dec. 2006. Issues 3-4

SANTOS, Viviane Martins Rebello dos; DONNICI, Claudio Luis; D'ACOSTA, João Batista Neves; CAIXEIRO, Janaína Marques Rodrigues. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007.

Tatchell, R. J. (1987). *Interactions between ticks and their hosts. International Journal for Parasitology*, 17(2), 597–606. doi:10.1016/0020-7519(87)90136-6

STONE BF, HAYDOCK KP. A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). *Bulletin of Entomological Research*. 1962;53(3):563-578. doi:10.1017/S000748530004832X

TEMEYER K. B. *et al.* Genetic factors potentially reducing fitness cost of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase(s) in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Zoosymposia*, 2011. v. 6, p. 260–266. ISSN 1178-9913

TEMEYER KB, DAVEY RB, CHEN AC. Identification of a third *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cDNA presumptively encoding an acetylcholinesterase. *J Med Entomol.* 2004 May;41(3):259-68. doi: 10.1603/0022-2585-41.3.259. PMID: 15185924.

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*, 2012. v. 49, Edição 3., p. 555-562, <https://doi.org/10.1603/ME11215>.

VALSONI LM, FREITAS MG, BORGES DGL, BORGES FA. Status of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin, fipronil and fluzuron in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 2021; 30(1): e025220.<https://doi.org/10.1590/S1984-296120201091>

VILLATTE F. *et al.* A High Number of Mutations in Insect Acetylcholinesterase May Provide Insecticide Resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Volume 67, Issue 2, 2000. Pages 95-102, ISSN 0048-3575, <https://doi.org/10.1006/pest.2000.2478>. Disponível em: (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048357500924787>)

WALKER A.R., BOUATTOUR A., CAMICAS J.-L., ESTRADA-PENA A., HORAK I., LATIF A., PEGRAM R., PRESTON P. 2003. *Ticks of Domestic Animals in Africa. A Guide to Identification of Species.* University of Edinburgh, 221 pp.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual).* [s.l.] World Health Organization, 1998. . Acesso em: 10 set. 2024.

ZHANG Y. *et al.* Overexpression of carboxylesterase-1 and mutation (F439H) of acetylcholinesterase-1 are associated with chlorpyrifos resistance in *Laodelphax striatellus*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2013. Volume 106, Issues 1–2. Pages 8-13, ISSN 0048-3575. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.03.002>. Disponível em: (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048357513000461>)