

FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO *KDR* EM POPULAÇÕES NATURAIS E RESISTENTES DE MOSCA-DOS-CHIFRES (*Haematobia irritans*) NO BRASIL

Ana Paula Mioti Grilo (anap_mioti@yahoo.com.br), Renato A. Carvalho, Ana Maria L. Azeredo-Espin
CBMEG – CENTRO DE BIOLOGIA MOLECULAR E ENGENHARIA GENÉTICA

Agência financiadora: CNPq/Fapesp

Palavras-chave: *Haematobia irritans* - piretroides - *kdr* - resistência a inseticidas - mosca-dos-chifres

1. Introdução

A mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*, é considerada o principal ectoparasita bovino em muitas partes do mundo. No Brasil, estima-se que ela cause prejuízos da ordem de 150 milhões de dólares por ano. Devido a sua importância econômica, essa espécie tem sido controlada pela intensa aplicação de inseticidas químicos, o que tem levado à seleção de indivíduos resistentes. Os piretroides correspondem à principal classe de inseticidas utilizados no seu controle.



A resistência mais comum a piretroides, denominada *kdr* (*knockdown resistance*), relatada em diversos trabalhos, se dá por uma mutação pontual no gene do canal de sódio voltagem-dependente, tornando o sítio-alvo do inseticida insensível a este. Evidências foram obtidas de que a desintoxicação metabólica pode contribuir para a resistência a piretroides em *H. irritans*, mas acredita-se que a insensibilidade do sítio alvo é o principal fator de resistência a piretroides nessa espécie [1].

2. Materiais e Métodos

✓Populações naturais: 20 indivíduos/população de Minas Gerais (MG), coletados por Luisa Domingues/UFMG, e 15 indiv./pop. de Mato Grosso do Sul (MS), coletados por Thadeu Barros/Embrapa Pantanal, totalizando 270 em MG e 180 em MS.

✓Todos os indivíduos sobreviventes à dose mais alta dos bioensaios, realizado com diferentes concentrações de **Cipermetrina**

Tabela 1. Populações de moscas do Mato Grosso do Sul.

Cidade	Nº de pop. naturais	Indivíduos de pop. naturais	Sobreviventes ao bioensaio
Coxim	3	45	22
Aquidauana	1	15	9
Dourados	2	30	22
Corumbá	2	30	26
Campo Grande	2	30	17
Maracaju	1	15	12
Corguinho	1	15	5
TOTAL	12	180	113

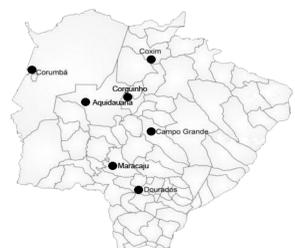


Figura 1. Mapa do Estado do Mato Grosso do Sul, com as cidades de coleta em destaque.

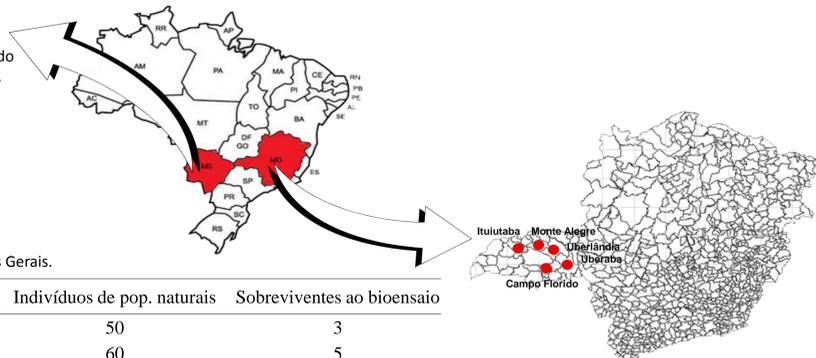


Tabela 2. Populações de moscas de Minas Gerais.

Cidade	Nº de pop. naturais	Indivíduos de pop. naturais	Sobreviventes ao bioensaio
Campo Florido	2	50	3
Uberaba	3	60	5
Uberlândia	5	100	23
Ituiutaba	2	40	13
Monte Alegre	1	20	9
TOTAL	13	270	53

Figura 2. Mapa do Estado de Minas Gerais, com as cidades de coleta em destaque.

✓Extração de DNA total de cada indivíduo pelo método Fenol/Clorofórmio;

✓PCR Alelo-Específica para determinação do genótipo:

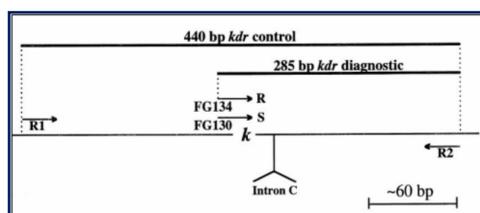


Figura 3. Esquema adaptado [2] mostrando a região codificante do gene do canal de sódio com a mutação *kdr* (k) e as posições de hibridização dos oligonucleotídeos.

✓Sequenciamento de algumas amostras para validação do resultado da PCR.

3. Resultados e Discussão

Uma recente revisão dos produtos registrados no Brasil para controle de *H. irritans* mostrou que 78% dos produtos contêm piretroides como princípio ativo (Fig. 4). Essa intensa pressão seletiva evidencia a importância em determinar os mecanismos genéticos envolvidos na resistência a tal classe de inseticidas.

Princípios ativos usados no controle de *Haematobia irritans*

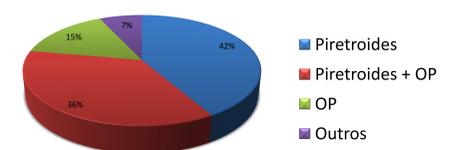


Figura 4. Gráfico evidenciando a importância dos piretroides no controle de *H. irritans*. Fonte: <http://www.cpv.com.br/cpv/inicio.aspx>, acesso em Outubro/2011. OP = Organofosforados.

Na PCR Alelo-Específica, a banda superior, relativa ao fragmento maior, representa o controle da reação de PCR e deve estar presente em todas as reações. Já a banda diagnóstica (fragmento menor) é específica para cada alelo (Fig 5).

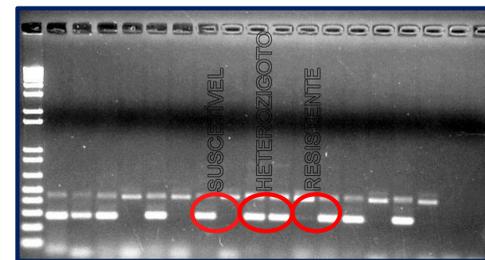


Figura 5. Resultado de uma PCR Alelo-Específica, na qual cada reação representa um alelo. O genótipo do indivíduo representado pelas reações 7 e 8 é suscetível; 9 e 10 é heterozigoto (note ambas as bandas diagnósticas); 11 e 12 é resistente.

Um intervalo de confiança foi calculado com o Teste Binomial para analisar os dados da Tabela 3, comparando-se Naturais x Bioensaios em MG ($H_0: p=4/624$), e o mesmo entre os dois grupos de MS ($H_0: p=15/586$). Observa-se que as populações de bioensaios são estatisticamente iguais às populações naturais, pois a hipótese de que não diferem (H_0) é confirmada.

Tabela 3. Frequências encontradas nos 4 grupos de populações, com os números de alelos *kdr* em cada grupo. Como o número observado se enquadra dentro do intervalo de confiança gerado, infere-se que as populações não diferem entre si.

Populações	Indivíduos analisados	Heterozigotos	Homo Mutantes	Frequência alélica do <i>kdr</i>	Número de alelos <i>kdr</i>	
					Intervalo de Confiança	Observado
MG naturais	259*	4	0	0,77%	de 0 a 8	4
MG bioensaios	53	1	0	0,94%	de 0 a 2	1
MS naturais	180	6	0	1,67%	de 4 a 15	6
MS bioensaios	113	7	1	3,69%	de 2 a 10	9

*Excluindo-se 11 dos 270 iniciais, cuja genotipagem não foi possível.

4. Conclusões

Os resultados indicam que a frequência da mutação *kdr* não é significativamente alta, mesmo entre indivíduos resistentes a Cipermetrina, para explicar os problemas de resistência encontrados, em algumas regiões, no controle dessa espécie. A desintoxicação metabólica talvez seja o mecanismo que explique tal resistência observada. Resultados semelhantes foram encontrados por Sabatini *et al.* [3] em algumas populações naturais brasileiras.

A mutação *kdr* tem sido encontrada em muitas partes dos EUA, México e Argentina, mas com pouca frequência no Brasil [4]. Isso pode ser resultado de um controle não uniforme em todas as áreas de manejo, de maneira que a ausência do inseticida pode conferir uma desvantagem no valor adaptativo do indivíduo mutante *kdr*, não permitindo a fixação desse alelo.

Referências

- [1] Bull, D.L., Harris, R.L., Pryor, N.W., 1988, The contribution of metabolism to pyrethroid and DDT resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). J Econ Entomol 81, 449-458.
- [2] Jamroz, R.C., Guerrero, F.D., Kammlah, D.M., Kunz, S.E., 1998, Role of the *kdr* and super-*kdr* sodium channel mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). Insect Biochem Mol Biol 28, 1031-1037.
- [3] Sabatini, G.A., Ribolla, P.E.M., Barros, A.T.M., Guerrero, F.D., Schumaker, T.T.S., 2009, Knockdown resistance in pyrethroid-resistant horn fly (Diptera: Muscidae) populations in Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 18, 8-14.
- [4] Guerrero, F.D., Barros, A.T., 2006, Role of *kdr* and esterase-mediated metabolism in pyrethroid-resistant populations of *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae) in Brazil. J Med Entomol 43, 896-901.