Valeria Lis Le Gall

Bases moleculares da resistência a ivermectina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Molecular bases of ivermectin resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Versão corrigida

Original disponível no Instituto de Biociências da USP

São Paulo
2016

Valeria Lis Le Gall

Bases moleculares da resistência a ivermectina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Molecular bases of ivermectin resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências Biológicas, na Área de Biologia/Genética.

Orientadora: Tatiana Teixeira Torres

Coorientador: Guilherme Marcondes Klafke

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica

Le Gall, Valeria Lis

Bases Moleculares da resistência a ivermectina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

131 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Carrapato bovino 2. Resistência a pesticidas 3. Expressão gênica

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).	Prof(a). Dr(a).
Prof(a). Dr.(a).	Prof(a). Dr.(a). Tatiana Teixeira Torres Orientadora

Em memória da minha amada avó, Secundina,
que tanta falta me faz e que só tem trazido
felicidade e boas lembranças a minha vida.

“Perder-se também é caminho...”

Clarice Lispector

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Nidia e Luis, por terem me acompanhado e apoiado amorosamente e sem condições neste caminho longe de casa.

Agradeço especialmente a meus orientadores, a Dra. Tatiana Teixeira Torres e o Dr. Guilherme Marcondes Klafke pela confiança, pelo apoio e pelos seus ensinamentos fundamentais neste caminho do conhecimento. Por ter me ajudado a conhecer, e a como conhecer mais e melhor, muito obrigada.

Às minhas queridas colegas do Laboratório de Genômica e Evolução de Artrópodes, Nancy, Gisele, Raquel e Marina, pela amizade, pelas longas e divertidas conversas, pela paciência infinita e pela ajuda constante, obrigada. Agradeço especialmente a Gisele Antoniazzi Cardoso pela ajuda acadêmica recebida durante esses anos

Aos meus colegas do Laboratório de Parasitologia (IPVDF-FEPAGRO-RS) por tantos dias de acompanhamento e colaboração no exaustivo e extenso trabalho de bancada, realizado durante longas horas, mas, em compensação, acompanhado de amizade, churrasco e chimarrão.

Agradeço especialmente às agências de financiamento CAPES e FAPESP, que fizeram possível este trabalho. O financiamento do trabalho científico é fundamental para o desenvolvimento de um país.

Um agradecimento especial ao Brasil e aos brasileiros, que me deram uma grande oportunidade de realização pessoal e profissional, e que permanentemente abrem as portas a quem quer mais da vida.

Índice

Capítulo 1 2
Introdução Geral 2
1.1. Biologia e aspectos gerais de *R. microplus* 3
1.1.1. Fase não parasitária 4
1.1.2. Fase parasitária 5
1.2. Os pesticidas e seus modos de ação 6
1.3. Mecanismos de resistência 8
1.4. A resistência aos pesticidas como fenômeno microevolutivo 10
1.5. Resistência a ivermectina 13
1.6. Expressão gênica diferencial e resistência a pesticidas 16
Hipóteses e perguntas 18
Capítulo 2 21
Avaliação de mecanismos de desintoxicação metabólica 21
Metodologia 26
2.1. Material de estudo 26
2.2. Bioensaios I: Ensaio de dose-resposta por meio do teste de imersão larval (TIL) 26
2.2.1. Ensaios de atividade enzimática basal 28
2.2.2. Cálculos da atividade enzimática 30
2.3. Bioensaios II: testes de tempo-mortalidade com sinergistas 31
Resultados 34
2.4. Bioensaios I: Ensaio de dose - resposta por meio do teste de imersão larval (TIL) 34
2.5. Ensaios de atividade enzimática basal 35
2.6. Bioensaios II: testes de tempo-mortalidade com sinergistas 35
Discussão 39
Conclusão do capítulo 43
Capítulo 3 46
Genômica funcional da resistência à ivermectina em *Rhipicephalus microplus* 46
Metodologia 48
3.1. Bioensaios: teste de imersão larval (TIL) 48
3.2. Extração de RNA e sequenciamento 48
3.3. Pré-processamento das sequências brutas 49

3.4. Montagem do transcriptoma 49
3.5. Alinhamento das *reads* aos *contigs* recém-montados 50
3.6. Análises de expressão diferencial 51
3.7. Anotação 51
3.8. Análise de enriquecimento de termos de Ontologia Gênica (GO) 52
Resultados 53
3.9. Ensaio de dose-resposta 53
3.10. Pré-processamento das sequências brutas 54
3.11. Montagem do transcriptoma 54
3.12. Alinhamento das *reads* aos *contigs* recém-montados 56
3.13. Análises de expressão diferencial. 56
3.14. Anotação 57
3.14.1. Genes diferencialmente expressos na mesma cepa entre diferentes concentrações de ivermectina 58
3.14.2. Genes diferencialmente expressos entre cepas diferentes a concentrações de Ivermectina iguais: 68
3.15. Análise de enriquecimento de termos de Ontologia Gênica 74
3.16. *Contigs* comuns a mais de uma comparação 75
Discussão 78
Conclusão do capítulo 87
Conclusões Gerais 88
Bases moleculares da resistência à Ivermectina 88
Resumo 90
Abstract 91
Referências Bibliográficas 92
Anexo 1 102
Anexo 2 107

Abreviaturas

- AChE: Acetilcolinesterase
- ADP: Adenosina Difosfato
- ATP: Adenosina Trifosfato
- BChE: Butirilcolinesterase
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
- BSA: albumina sérica bovina
- CDD: Conserved Domains Database
- cDNA: DNA complementar
- CDNB: 1-Cloro-2,4-Dinitrobenzeno
- CDR: carbohydrate-recognition domains
- CGS: cystathionine beta-lyases/cystathionine gamma-synthase
- CK: creatinina kinase
- CL1: Concentração Letal 1%
- CL50: Concentração Letal 50 %
- CL99: Concentração Letal 99 %
- COI: Subunidad 1 da citocromo oxidase
- CsA: Ciclosporina A
- DDT: dicloro-difenil-tricloroetano
- DEF: tributil fosforotritioato
- DEM: dietilmaleato
- DILAVE: División de Laboratórios Veterinarios

- DNA: ácido desoxi-ribonucleico
- EST: Expressed Sequence Tags
- FAO: Food and Agriculture Organization
- FC: Fold Change
- FEPAGRO: Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
- FMO: Flavin-containing monooxygenases
- FR: Fator de Resistência
- FS: Fator de Sinergismo
- GABA: ácido gamma-aminobutírico
- GSH: glutationa
- GST: Glutationa-S-transferase
- IC: Intervalo de Confiança
- ID: Porcentagem de Identidade
- IPVDF : Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
- kdr: knock down resistance
- LM: Lactonas Macrocíclicas
- LPT: Larval Package Test (Teste Larval de Pacotes Impregnados)
- MFO: Oxidases de Função Mista
- mRNA: ácido ribonucleico mensageiro
- OP: Organofosforados
- PAPS: 3'-phosphoadenosine- 5'-phosphosulfate
- PBO: butóxido de piperonilao
- ppm: partes por milhão
- PS: Piretroides Sintéticos

- PSP: Serine/threonine phosphatases
- PTN: quantidade de proteínas totais
- qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction
- RNA: ácido ribonucleico
- rRNA: RNA ribosomal
- TIA: Teste de Imersão de Adultos
- TIL: Teste de Imersão Larval
- TL50: Tempo Letal 50
- TMBZ: 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina
- USP: Universidade de São Paulo.
- µg/mL: microgramas por mililitro

Capítulo

1

INTRODUÇÃO GERAL

Capítulo 1

Introdução Geral

O rebanho bovino do Brasil é composto por mais 212 milhões de animais. A produtividade da pecuária brasileira sofre um grande impacto com efeitos dos parasitas internos e externos que afetam o rebanho. As perdas causadas anualmente devido à ação dos parasitas podem atingir os 13,96 bilhões de dólares. Dentre os ectoparasitas, a espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) (Canestrini, 1887), comumente conhecida como carrapato do boi ou carrapato bovino, é a maior causadora da queda da produtividade. O carrapato bovino é responsável por perdas de até 3,24 bilhões de dólares ao ano (Grisi *et al*., 2014), somente no Brasil.

R. microplus é um artrópode da classe Arachnida que no momento da alimentação com sangue, inocula substâncias antihemostáticas, anti-inflamatórias e imunomodulatórias contidas na saliva. Essas substâncias modificam a fisiologia no sítio da picada e causam uma importante perda de sangue e uma redução na imunidade do hospedeiro, o que facilita a entrada de microrganismos patogênicos. O estresse causado pelas infestações em larga escala conduz à interrupção da alimentação e, consequentemente, à perda de peso e à redução da fertilidade (FAO, 2004). Também é um importante vetor da rickettsia *Anaplasma marginale* e dos protozoários *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, causadores das doenças anaplasmose e babesiose, respectivamente.

No Brasil, o controle desses ectoparasitas é realizado quase que exclusivamente por meio da aplicação de pesticidas comerciais. Contudo, o uso de pesticidas conduz, invariavelmente, à seleção de linhagens resistentes. Isso ocorre em consequência da seleção de genótipos resistentes previamente presentes nas populações quando os indivíduos são expostos a uma pressão seletiva na presença dos pesticidas. A evolução da resistência em vários grupos de pragas é um fenômeno bem estudado e pode acontecer rapidamente, já que os genótipos resistentes existem antes do surgimento da pressão seletiva e a emergência das linhagens resistentes faz com que os

pesticidas percam sua efetividade no controle das pragas, o que aumenta os custos da produção animal (Hartley *et al*., 2006).

De forma geral, este trabalho visa avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na resistência de *R. microplus* a ivermectina, um dos acaricidas mais amplamente utilizados no controle químico do carrapato bovino no Brasil.

1.1. Biologia e aspectos gerais de *R. microplus*

A espécie *R. microplus*, originária da Ásia, foi introduzida na maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo por meio da importação de gado. Sua distribuição geográfica compreende aproximadamente as áreas entre os paralelos 30º norte e 30º sul. Atualmente, na região neotropical, está distribuída desde o norte da Argentina até o México, à exceção do Chile (figura 1.1).

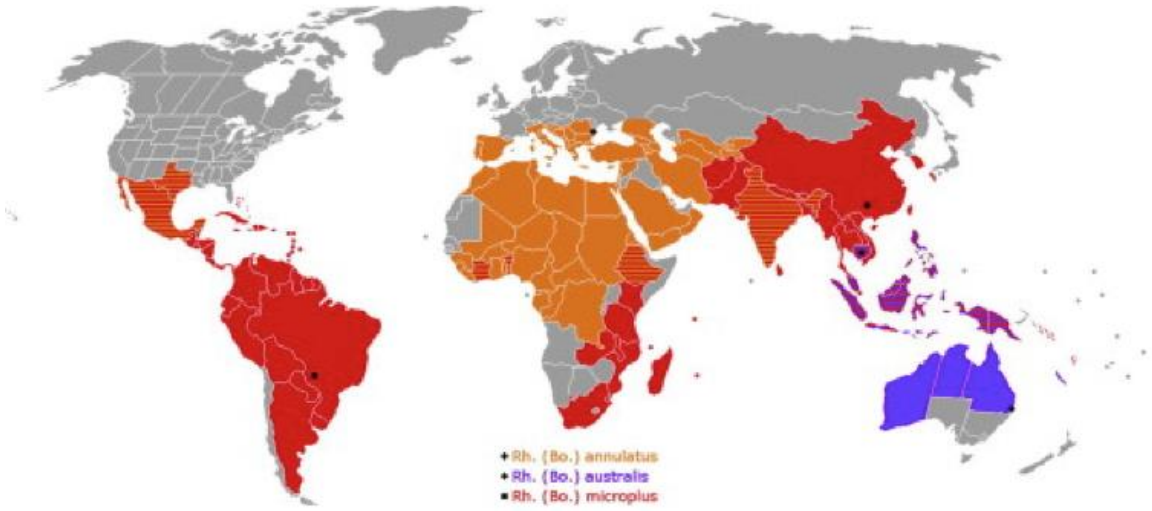

Figura 1.1 Distribuição geográfica das espécies de carrapatos do gênero *Rhipicephalus.* A distribuição do carrapato bovino, *R. microplus* está indicada em vermelho (Burger *et al*., 2014).

Essa espécie de carrapato é um parasita monoxeno, ou seja, precisa de um único hospedeiro para completar seu ciclo de vida (figura 1.2) e realiza todas as mudas no mesmo animal. Eventualmente, pode infestar outros animais, mas o gado bovino é seu principal hospedeiro. O ciclo de vida de *R. microplus* pode ser dividido em dois

estágios ou fases: uma fase não parasitária e uma fase parasitária, que se alternam, respectivamente, entre o solo e os bovinos.

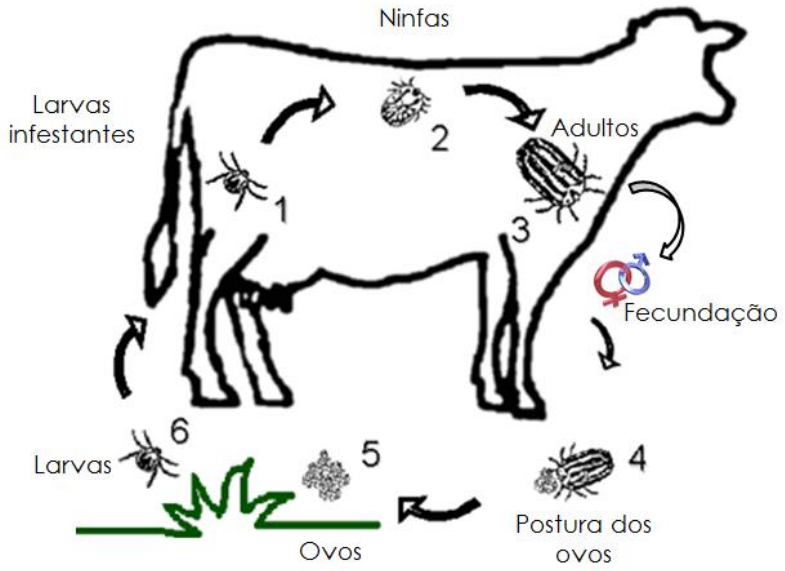

Figura 1.2. Ciclo de vida simplificado do carrapato *R. microlplus.* Adaptado de Andreotti (2010)

1.1.1. Fase não parasitária

Considera-se que aproximadamente 5% de uma população de carrapatos se encontra em parasitose, infestando o hospedeiro. O restante (95%) está no ambiente, na fase não parasitária, na forma de ovos, larvas ou fêmeas em período de pré-postura e postura. A fêmea completamente alimentada com sangue (fêmea ingurgitada), desprende-se do hospedeiro e cai no solo. Por possuir fototaxia negativa, a fêmea procura abrigo e inicia a postura aproximadamente 2 a 3 dias após sua queda do hospedeiro. Esse período é denominado de pré-postura e a duração é proporcional à quantidade de nutrientes ingerida pela fêmea e também é influenciado pela temperatura, sendo que temperaturas baixas prolongam o tempo de pré-postura. Se isso acontece por um tempo muito prolongado, pode levar à morte das fêmeas antes do início da postura (de Campos Pereira *et al*., 2008).

Quando as condições climáticas tornam-se favoráveis, a fêmea inicia a postura dos ovos. O período de tempo no qual a fêmea coloca os ovos chama-se de período de postura ou período de incubação. A duração do período de postura depende das

condições de umidade relativa e temperatura do ambiente e pode durar de três a seis semanas. Aproximadamente 99,9 % dos ovos são postos até o décimo terceiro dia de postura e cada fêmea pode dar origem a mais de 3000 ovos. Os ovos podem eclodir entre uma a três semanas após a postura. Eles constituem o estágio vital mais suscetível à dessecação por ser o único estágio imóvel do ciclo (de Campos Pereira *et al*., 2008; Ferretto, 2013).

Quando os ovos eclodem, emergem as larvas que se diferenciam das ninfas por possuir três pares de pernas. As larvas recém-emergidas são quase translúcidas e após a exposição ao ar sua cutícula se torna marrom-avermelhada. No momento da sua emergência, as larvas não são capazes de infestar os bovinos. Elas só se tornam infestantes de quatro a seis dias após terem emergido, após o espessamento da cutícula. Após esse período, elas tendem a subir agrupadas nas hastes do capim, pois apresentam geotaxia negativa e fototaxia positiva, sendo este último, o fator predominante no comportamento de subida. Além disso, as larvas possuem capacidades sensoriais que fazem com que elas respondam aos estímulos olfatórios das secreções da pele e a expiração do gado. Sendo assim, as larvas ficam na espera do hospedeiro para iniciar a fase parasitária (de Campos Pereira *et al*., 2008).

1.1.2. Fase parasitária

A fase parasitária é iniciada quando as larvas infestantes se fixam ao hospedeiro e termina quando os adultos, incluindo as fêmeas fecundadas e ingurgitadas (teleóginas) se desprendem e caem no chão. A fixação ocorre por meio das peças bucais aproximadamente uma hora após alcançar o hospedeiro. As glândulas salivares começam a secretar um material acelular viscoso que envolve as peças bucais formando um cone de cimento que fixa o carrapato na pele do hospedeiro (de Campos Pereira *et al*., 2008, Anatriello *et al*., 2010).

Dentre as secreções salivares das larvas encontram-se substâncias farmacologicamente ativas com propriedades imunossupresoras, anti-inflamatórias, vasodilatadoras e anti-hemostáticas que permitem evadir o sistema imune do bovino e impedir a coagulação sanguínea favorecendo a alimentação do carrapato (Valenzuela, 2004, de Campos Pereira *et al*., 2008, Anatriello *et al*., 2010).

Entre o quarto e o sétimo dia de fixação acontece a muda de larva para ninfa, estágio que em que o indivíduo permanece aproximadamente até o décimo sexto dia, quando a ninfa muda para a fase adulta, fase na qual acontece o acasalamento e a fertilização.

Após a fertilização, a fêmea completa a alimentação com sangue ou ingurgitamento. Se as fêmeas não forem fecundadas, permanecem no hospedeiro sem ingurgitamento. Quando a fecundação acontece, as fêmeas completam o repasto sanguíneo rapidamente. A fêmea fertilizada e ingurgitada é chamada de teleógina. Sua queda do hospedeiro acontece entre o vigésimo-primeiro e vigésimo-terceiro dia após a fixação no hospedeiro, reiniciando então a fase não parasitária (de Campos Pereira *et al*., 2008).

Cada bovino pode ser parasitado por milhares de carrapatos, o que leva à perda de sangue, a um efeito deletério decorrente da inoculação de substâncias que alteram a imunidade e a coagulação do sangue do hospedeiro e à uma possível transmissão de patógenos como *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*. Dentre os principais efeitos das infestações sobre os animais se encontram (i) modificações do comportamento, (ii) redução da produtividade, imunidade, ganho de peso e produção de leite, (iii) aumento da mortalidade e (iv) diminuição do tempo de vida produtiva (Klafke, 2011).

Nesse cenário, torna-se necessário o controle das infestações por carrapatos. No Brasil, o controle do carrapato é feito principalmente por meio de pesticidas comerciais.

1.2. Os pesticidas e seus modos de ação

A produção agrícola e pecuária atual, bem como muitos programas de saúde humana, precisam do controle de artrópodes que transmitem doenças e geram perdas econômicas. Uma das formas mais amplamente utilizadas é o controle por meio de pesticidas que agem geralmente no sistema nervoso, provocando paralisia. De forma geral, existem quatro modos de ação de pesticidas no sistema nervoso:

- Ativadores de canais de cloro: os canais de cloro, quando unidos a um ligante específico, se abrem para permitir a entrada de Cl^-. Em condições fisiológicas

normais, a união do ligante não é permanente, assim como o efeito do influxo de Cl^-. Determinados pesticidas se unem irreversivelmente a um canal iônico causando um influxo contínuo de íons Cl^- em neurônios da junção neuromuscular ou no sistema nervoso central. O influxo ininterrupto leva à despolarização permanente da membrana e à paralisia do artrópode (ffrench-Constant *et al.*, 2004). Exemplos desse tipo de canal são os receptores ativados pelo neurotransmissor ácido γ-aminobutírico (GABA). O receptor forma um canal transmembrana pelo qual a passagem de íons Cl^- é ativada pela união do GABA ao receptor (Rauh *et al.*, 1990). Agindo de forma análoga ao GABA, determinados pesticidas, como Avermectinas e Milbemicinas, se unem ao receptor de maneira irreversível, o que leva à despolarização da membrana.

- Antagonistas de canais de cloro mediados por GABA: Em condições normais o neurotransmissor GABA se une a seu receptor no sistema nervoso central dos artrópodes induzindo o influxo de Cl^-. Os antagonistas dos canais de cloro mediados por GABA, como os Ciclodienos e os Fenilpirazóis, se unem ao receptor do GABA, competindo com o neurotransmissor e inibindo o influxo de Cl^-. Dessa forma, os antagonistas impedem a inibição neuronal, o que resulta em uma superexcitação do sistema nervoso (Bloomquist, 2003).

- Moduladores de canais iônicos ativados por voltagem: do ponto de vista estrutural, os canais iônicos ativados por voltagem são poros protéicos que, sob condições adequadas, permitem o fluxo de íons, através da membrana plasmática. Esses canais respondem a uma mudança no potencial elétrico transmembra. A mudança do campo eletromagnético induz uma alteração conformacional na estrutura do canal permitindo que ele se abra para admitir o influxo ou efluxo de íons (Sands *et al.,* 2005). A essa categoria pertencem os canais de sódio ativados por voltagem (Davies *et al.*, 2007). Os moduladores de canais iônicos ativados por voltagem induzem, de maneira prolongada, mudanças no potencial transmembrana de forma que os canais iônicos são abertos de forma irreversível. A abertura permite um influxo permanente de íons que leva à paralisia do artrópode (ffrench-Constant *et al.*, 2004). Exemplos deste tipo de pesticida são os Piretróides e as Piretrinas.

- Inibidores de acetilcolinesterase: a acetilcolina é um neurotransmissor que se une a um canal de sódio fazendo com que o canal permita a entrada de sódio na junção neuromuscular. A acetilcolinesterase é uma enzima que tem a função de degradar a acetilcolina, o que pára o influxo de sódio. Os pesticidas organofosforados e carbamatos inibem a função normal desta enzima. Com isso, a acetilcolina permanece ligada ao canal, e o sódio entra na célula de forma permanente. Como nos outros casos, isso resulta na paralisia do artrópode (ffrench-Constant *et al.*, 2004, Rosário-Cruz *et al.*, 2009).

Além da ação no sistema nervoso e muscular, há também pesticidas que atuam em outras vias e sistemas como (i) inibidores da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, (ii) inibidores da biossíntese de quitina, (iii) inibidores da acetil CoA carboxilase e (iv) inibidores de crescimento.

Pesticidas com os modos de ação citados são utilizados para controle da maioria dos artrópodes e, para cada um deles, diferentes modos de resistência foram observados em populações naturais de artrópodes, como será descrito a seguir.

1.3. Mecanismos de resistência

O uso de produtos químicos para controle de pragas leva, invariavelmente, à seleção de linhagens resistentes, capazes de sobreviver à exposição aos pesticidas. A resistência se desenvolve quando esses produtos tornam-se incapazes de exercer sua ação normal.

Já foram propostas várias definições de resistência, mas elas têm em comum o fato de indicar que uma porcentagem da população sobrevive a doses do pesticida que comumente são letais para a maioria dos indivíduos da população (FAO, 2004; Tabashnik *et al.*, 2014; Perry *et al.*, 2011). Um ponto importante que as definições destacam é que a resistência é uma característica genética e, portanto, herdável. Por esse motivo, também constitui um modelo para estudo de processos microevolutivos.

Segundo Perry e colaboradores (2011), a resistência pode ser definida como a sobrevivência de um indivíduo a concentrações de pesticidas que são letais para os indivíduos suscetíveis da mesma espécie. Segundo a FAO (2004), a resistência em

carrapatos se define como uma redução da suscetibilidade dos parasitas aos pesticidas quando os mesmos são utilizados segundo concentrações e modos de uso recomendados. Tabashnik *et al*. (2014) definem resistência como uma suscetibilidade reduzida a um pesticida de base genética.

A resistência aos pesticidas pode ser mediada por vários mecanismos como: (1) substituições de aminoácidos que modificam o alvo molecular nos receptores ou enzimas, (2) desenvolvimento de modificações no comportamento que permite aos parasitas evitar o produto, (3) redução na penetração do pesticida no corpo do parasita e (4) desintoxicação metabólica (Hemingway *et al*., 2004, Mc Kenzie e Batterham, 1998).

As substituições em sítios alvo são um dos mecanismos mais estudados. Exemplos clássicos são as substituições em canais iônicos ativados por ligantes e em canais de sódio ativados por voltagem. No primeiro caso, os receptores GABA são sítios alvo dos ciclodienos, em particular o Dieldrin. Em *Drosophila*, o fenótipo de resistência ao Dieldrin é conhecido como *Rdl.* O mapeamento genético demonstrou que a resistência era conferida pela substituição de uma alanina por uma serina ou glicina na posição 302 de sua sequência de aminoácidos (ffrench-Constant *et al.,* 2004). A alanina nessa posição é crucial para a ligação do inseticida e essa única mudança é responsável pela resistência. O mesmo mecanismo é observado nos genes *kdr* e *superkdr*. Em *Musca domestica*, o canal de sódio ativado por voltagem é o alvo do DDT (diclorodifeniltricloroetano) e dos piretróides. Uma substituição de um único aminoácido foi associada a um fenótipo resistente a piretróides e tal fenótipo foi denominado *knockdown resistance* (kdr). Uma segunda substituição foi associada a um alelo que conferia uma resistência incrementada e foi denominado *super-kdr* (ffrench-Constant *et al.,* 2004).

A resistência comportamental e cuticular são pouco frequentes e pouco estudadas. No primeiro caso, os artrópodes desenvolvem comportamentos com tendência a se afastar dos meios tratados com o pesticidas, reduzindo o contato com o produto. A resistência comportamental é pouco conhecida em carrapatos. No caso da resistência cuticular, o engrossamento da cutícula reduz a penetração do pesticida. Esses dois tipos de resistência são pouco frequentes e geralmente pouco efetivos

quando se apresentam sozinhos, mas combinados com outros mecanismos podem contribuir para um nível mais elevado de resistência (Guerrero *et al.,* 2012).

O processo de desintoxicação metabólica é mediado por grupos de enzimas que incluem as citocromo P450, alfa e beta esterases e Glutationa-S-transferase (GST), bem conhecidas em muitos grupos de artrópodes (Hemingway & Ranson, 2000). O principal mecanismo descrito está relacionado ao metabolismo oxidativo mediado pela citocromo oxidase P450. Mecanismos secundários como conjugação mediada por GST, hidrólise mediada por esterases e desintoxicação mediada por transportadores ABC também foram descritos (Klafke *et al*., 2010; Pohl *et al*., 2011).

Os mecanismos de resistência são geralmente complexos. Um ou mais deles podem estar envolvidos em diferentes populações de carrapatos, aumentando a diversidade e o número de genes que podem contribuir para desenvolvimento da resistência. A resposta fisiológica aos pesticidas é mediada por proteínas resultantes da expressão dos genes que contribuem para a resistência e, portanto, podem existir diferenças na sequência codificante, o que muda a função da proteína, ou nas sequências regulatórias, o que leva a diferentes níveis de expressão entre linhagens com diferentes suscetibilidades. Essa diferença pode ser constitutiva ou manifestar-se apenas quando há exposição a determinadas concentrações de pesticidas.

1.4. A resistência aos pesticidas como fenômeno microevolutivo

O primeiro relato de resistência foi documentado por Melander em 1914, quando observou que algumas populações de *Quadraspidiotus perniciosus* sobreviviam a concentrações de enxofre e cal que matavam insetos de outras populações da mesma espécie, embora nunca tenha sido testado se as diferentes tolerâncias possuíam uma base genética (Coles & Dryden, 2014).

Do ponto de vista microevolutivo as mutações que conferem resistência a pesticidas surgem com baixa frequência nas populações de artrópodes. Quando a população é exposta a pesticidas, há uma forte pressão seletiva e os indivíduos com genótipos resistentes (aqueles que possuem os alelos mutantes de baixa frequência) sobrevivem e causam um aumento da frequência de tais mutações ao se reproduzirem. Isso pode acontecer de forma rápida, quando os genótipos resistentes

estão presentes nas populações naturais antes de serem expostos aos pesticidas (Hartley *et al*., 2006).

O número de genes envolvidos na resistência depende da intensidade da pressão seletiva, ou seja, da concentração do pesticida. Quando um pesticida é inicialmente introduzido em uma população, há uma distribuição de viabilidade devido a fatores preexistentes como tamanho corporal, idade, estado reprodutivo e condições fisiológicas gerais (figura 1.3). As diferenças genéticas entre indivíduos em uma distribuição fenotípica contínua como essa estão distribuídas em diversos genes. Assim, se a concentração do pesticida selecionar indivíduos dentro dessa distribuição de viabilidade (concentração A na figura 1.3), a seleção atuará sobre a variação fenotípica resultante de vários genes (McKenzie & Batterham, 1994). Ao longo das diferentes gerações, se uma mesma dose for aplicada nesses indivíduos repetidas vezes, serão selecionados vários genótipos de efeito menor no fenótipo. Em geral, essas respostas têm pouca importância econômica já que não reduzem de forma acentuada o período de proteção dos pesticidas. Contudo, são respostas generalizadas, que independem do modo de ação dos pesticidas.

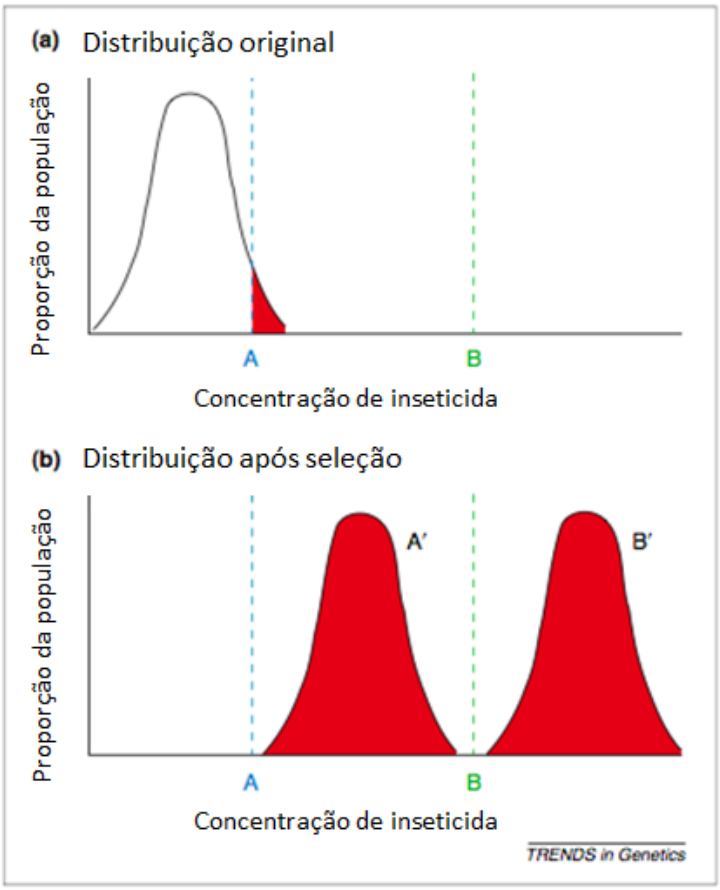

Figura 1.3. Seleção dentro e fora da distribuição de viabilidade uma população de artrópodes. Se a seleção acontece dentro da janela de distribuição da população (Concentração A) serão selecionados genótipos de efeito menor no fenótipo resultando na sobrevivência de um grande número de indivíduos (resistência poligênica). Se a seleção ocorre a concentrações altas, fora do intervalo de distribuição normal da população (concentração B), selecionam-se mutações raras com efeito maior no fenótipo (resistência monogênica). Adaptado de McKenzie & Batterham (2004).

Por outro lado, quando a seleção acontece com doses de pesticidas maiores, fora da distribuição de viabilidade, essas doses não podem ser toleradas pela maioria dos indivíduos da população e serão selecionadas mutações raras com efeito maior no fenótipo, determinando uma resposta monogênica (ffrench-Constant, 2004; McKenzie, 1996). Esses mutantes raros apresentam uma tolerância ao pesticida fora da distribuição da população original.

Considerando que vários mecanismos podem estar envolvidos na resistência aos acaricidas, em particular à ivermectina, e que eles estão sob controle genético,

este trabalho abordou a questão do tipo de resposta genética que linhagens resistentes do carrapato *R. microplus* apresentam quando são expostos à ivermectina.

1.5. Resistência a ivermectina

O uso de acaricidas data de 1896, quando o arsênico começou a ser utilizado sistematicamente no controle de carrapatos em bovinos. Em 1910, foi liberado nos Estados Unidos e já em 1937 foi detectada resistência ao arsênico na Austrália, o que motivou o desenvolvimento de novos produtos, como os organoclorados em 1946, ciclodienos e toxafeno em 1947, formamidinas em 1975, piretróides em 1977 e lactonas macrocíclicas em 1981 (Andreotti, 2010).

No Brasil as populações de *R. microplus* têm desenvolvido resistência a todos os acaricidas disponíveis comercialmente para o controle de carrapatos (Figura 1.4). Piretróides Sintéticos, Organofosforados, Lactonas Macrocíclicas, Amitraz, Fipronil e Fluazuron têm perdido parte de sua efetividade no controle das populações de carrapatos (Fernandes, 2001; FAO, 2004; andreotti, 2010, Martins & Furlong, 2011; andreotti *et al*., 2011; Klafke *et al*., 2006; Reck *et al*., 2014).

A ivermectina é uma das drogas mais amplamente utilizadas no tratamento das infestações por *R. microplus*. Pertence ao grupo das Lactonas Macrocíclicas, composto por avermectinas (ivermectina, abamectina e doramectina) e milbemicinas (moxidectina) (Klafke, 2011). A resistência à ivermectina no Brasil se encontra disseminada por todo o sul e sudeste do país (Figura 1.4). É um composto derivado e refinado da avermectina, produto isolado pela primeira vez em 1974, a partir da fermentação de um microorganismo encontrado no solo da costa do Japão, *Streptomyces avermitilis*, posteriormente renomeado como *Streptomyces avermectinius*. A ivermectina é o derivado mais seguro e mais potente da avermectina e apresenta propriedades antihelmínticas, acaricidas e inseticidas (Omura, 2008).

Do ponto de vista químico, as avermectinas são um complexo de 16 moléculas relacionadas que compartilham semelhanças estruturais com as milbemicinas (Fisher & Mrozik, 1989), dadas essas semelhanças, as informações sobre um dos membros da família poderiam ser extrapoladas aos outros (Klafke, 2011).

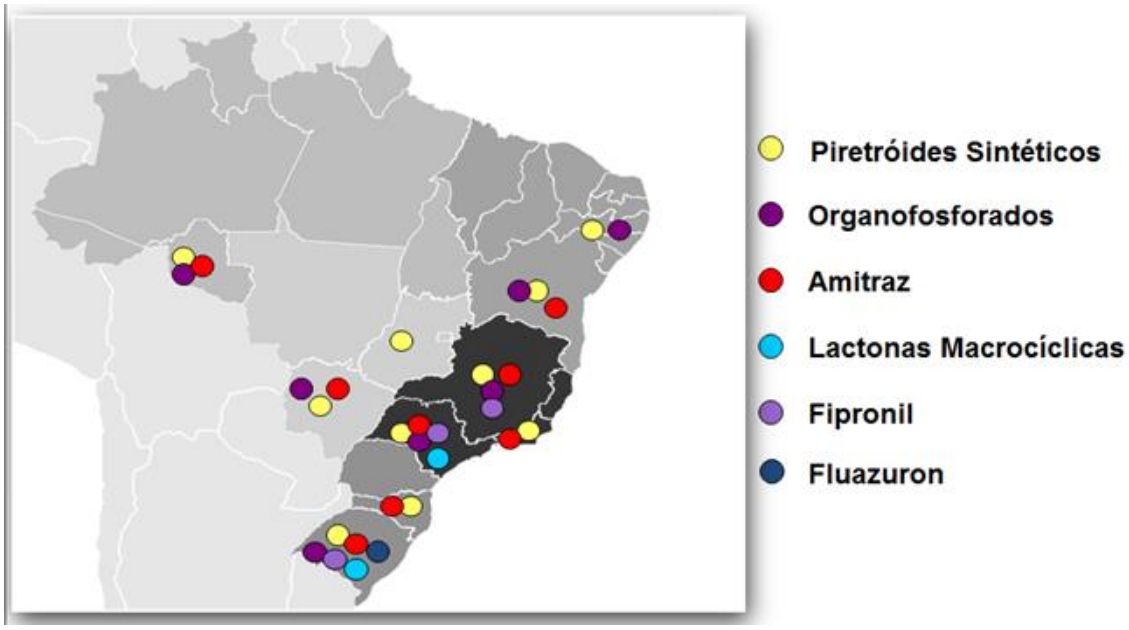

Figura 1.4. Estados brasileiros com registros de resistência a acaricidas (Martins & Furlong, 2001; Fernandes, 2001; Furlong, 2003; Campos-Junior & Oliveira, 2005; Klafke *et al.,* 2006; Camillo *et al.,* 2009; Castro-Janer *et al.,* 2009; Gatto-Brito *et al.,* 2011; Mendes *et al.,* 2011; Andreotti *et al.*, 2012; Reck *et al.,* 2014.

A ivermectina atua como um análogo do neurotransmissor ácido γ-amino butírico (GABA). Atua principalmente nos canais de cloro ligantes de glutamato, comuns a nematódeos, carrapatos e insetos, sendo receptores exclusivos de invertebrados. Ao se ligar a canais de cloro, causa influxo ininterrupto de íons Cl- em neurônios da junção neuromuscular, o que bloqueia a neurotransmissão (Figura 1.5). Dessa forma leva à paralisia da musculatura somática e faríngea (Omura, 2008; Klafke, 2011).

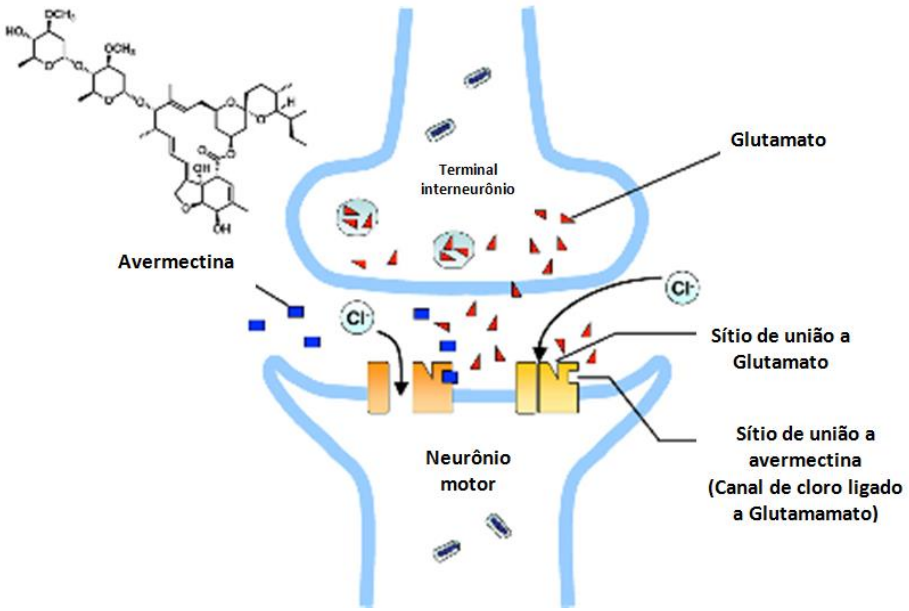

Figura 1.5. Modo de ação das avermectinas nos neurônios da junção neuromuscular. Adaptado de Omura (2007).

Em artrópodes, existem diversos relatos de resistência à ivermectina. Currie *et al* (2004) documentaram casos de resistência à ivermectina em *Sarcoptes scabiei*. Byford *et al* (1999) obtiveram linhagens resistentes de *Hematobia irritans* em colônias de laboratório estabelecidas a partir de indivíduos suscetíveis 30 gerações após o estabelecimento das colônias. Também têm sido registrados inúmeros casos de resistência à abamectinas e milbemectinas em *Tetranychus urticae* (Van Leewen *et al.*, 2010) com fatores de resistência de até 668, com poucos estudos abordando os mecanismos subjacentes.

Martins e Furlong (2001) descreveram o primeiro relato da resistência à Ivermectina e doramectina no carrapato *R. microplus* (cepa São Gabriel). Além deles, Klafke *et al* (2006; 2011) detectaram resistência à Ivermectina em populações de campo do Estado de São Paulo. O diagnóstico foi realizado no laboratório por meio do Teste de Imersão Larval (TIL).

1.6. Expressão gênica diferencial e resistência a pesticidas

Tão importante quanto às mutações pontuais em regiões codificantes, são as mudanças de expressão dos genes envolvidos em fenótipos resistentes. A seleção natural atua sobre as variações do fenótipo, que podem surgir devido a variações nas sequências das regiões codificantes ou regulatórias dos genes – as variações da expressão – ou ambas.

Os genes podem mudar de expressão em diferentes tecidos de um organismo, em diferentes momentos do desenvolvimento, em diferentes condições ambientais e em linhagens diferentes de uma espécie. Neste trabalho, nosso interesse está focado nos dois últimos casos, já que estudaremos a resposta a diferentes concentrações de ivermectina, representando condições ambientais diferentes, assim como diferenças de expressão entre duas cepas de *R. microplus* estabelecidas com diferenças na resistência à ivermectina.

Fenótipos resistentes podem, então, surgir como consequência da variações no nível de expressão em resposta à exposição a pesticidas. Como exemplo disso,um estudo demonstrou que uma cepa de *Drosophila melanogaster* resistente a diazinon apresentava super-expressão do gene *Cyp6g1*, da família das citocromo oxidases quando exposta ao inseticida (ffrench-Constant et al., 2004). Em *Caenorhabditis elegans* a resistência à ivermectina foi associada a super-expressão de proteínas de resistência múltipla ("multidrug resistance proteins" ou MRPs) e transportadores ABC (James & Davey, 2009). Pohl e colaboradores (2011), utilizando PCR quantitativa (qPCR), investigaram os níveis de transcrição de transportadores ABC em duas linhagens de *R. microplus*: POA (suscetível a Ivermectina) e Juarez (resistente a Ivermectina) alimentadas artificialmente com sangue sem ivermectina e com ivermectina. Os autores observaram níveis aumentados do RNA mensageiro do gene RmABC10 em resposta a alimentação com sangue suplementado com ivermectina. A super-expressão de transportadores ABC também se encontra associada à resistência a lactonas macrocíclicas em *Haemonchus contortus* (Coles *et al.,* 2005) e *Sarcoptes scabiei* (Mounsey *et al*., 2006). No mosquito *Culex pipiens*, a inserção CuRE1 no gene *Cyp9m10* está associada à super-expressão da enzima P450 capaz de metabolizar piretróides. A inserção localiza-se na região regulatória do gene e faz com que ele

aumente sua expressão (Feyereisen *et al*., 2015). Esses trabalhos apresentam evidências de que o fenômeno da resistência também pode aparecer por mudanças na expressão e não na função de genes.

Este trabalho visa investigar as mudanças de expressão quando larvas de carrapatos são expostas a diferentes concentrações de ivermectina, pelo teste de imersão larval. Foram utilizadas duas cepas de referência: Mozo, suscetível a ivermectina, e Juarez, resistente a ivermectina. Realizamos comparações entre as cepas a concentrações iguais de acaricida. Também exploramos as respostas de cada uma das cepas quando expostas a diferentes concentrações do acaricida. Assim sendo, investigamos as mudanças de expressão global que acontecem em resposta à exposição à ivermectina, visando identificar genes possivelmente envolvidos na resistência ao acaricida e quantificando seus níveis de expressão.

Complementando os experimentos de RNA-Seq para o estudo da expressão gênica, foram realizados bioensaios com sinergistas para estudar a atividade de enzimas e desintoxicação metabólica e transportadores ABC. Esses ensaios, realizados com as mesmas cepas de referência acima mencionadas, além de determinar a atividade de cada uma dessas proteínas, investigam se o nível de atividade observado para as proteínas estudadas é concordante com os níveis de expressão das mesmas. Dessa forma ambas abordagens são complementares e contribuem a responder as perguntas que conduzem esse trabalho.

Hipóteses e perguntas

Neste estudo utilizamos duas linhagens de carrapatos, uma suscetível e uma resistente à ivermectina. A principal questão é determinar quais são as diferenças entre elas que podem explicar a resistência ao acaricida. Quatro pressupostos conduzem este trabalho:

- a resistência apresenta uma base poligênica a baixas concentrações de Ivermectina e uma base monogênica a concentrações maiores;
- mudanças nos níveis de expressão de um ou mais genes podem gerar fenótipos resistentes;
- existem diferenças de expressão entre as cepas quando expostas às mesmas concentrações de ivermectina;
- a expressão gênica da mesma cepa muda quando exposta a diferentes concentrações de Ivermectina.

Considerando a diversidade de mecanismos de resistência conhecidos e os tipos de seleção acima descritos que podem ocorrer como reposta à pressão seletiva da Ivermectina sobre o carrapato *R. microplus*, buscamos elucidar três questões:

- Quantos genes são diferencialmente expressos entre as duas linhagens de carrapatos?
- Quantos genes e/ou mecanismos de resistência estão envolvidos na resistência à ivermectina no carrapato *R. microplus*? A linhagem resistente apresenta uma resposta monogênica ou poligênica?
- Qual é a função desses genes?

Para responder a essas perguntas utilizamos duas abordagens complementares: o estudo funcional de enzimas possivelmente envolvidas em mecanismos de desintoxicação metabólica e o estudo de níveis globais de RNA mensageiro (expressão gênica).

A desintoxicação é mediada por enzimas que atuam sobre o pesticida uma vez que ele ingressou no meio intracelular. Considerando esse fato, as atividades das enzimas já descritas foram avaliadas indiretamente, por meio de ensaios de tempo-mortalidade com inibidores enzimáticos específicos de cada uma das enzimas estudadas, os sinergistas. Nessa avaliação foram realizadas medições do tempo letal (em minutos) de grupos de larvas de *R. microplus* de duas cepas, Mozo (suscetível) e Juarez (resistente), expostas à ivermectina com e sem sinergistas. Se as enzimas candidatas estudadas não têm envolvimento na resistência à ivermectina, o tempo para a morte de indivíduos de *R. microplus* não é alterado no caso de sua inibição. No entanto, se as enzimas atuam diretamente causando a resistência, a inibição delas por meio dos sinergistas levará à diminuição da resistência (do tempo letal).

O estudo da expressão gênica também foi realizado para verificar alterações nos níveis de RNA mensageiro (mRNA) em resposta ao acaricida. A análise foi realizada por meio da tecnologia do RNA-Seq ou sequenciamento massivo em paralelo do mRNA, em conjunto com ferramentas bioinformáticas. O mRNA contido nas amostras foi sequenciado e as sequências obtidas em cada condição experimental foram utilizadas para realizar a montagem do transcriptoma de *R. microplus*. A partir da montagem e alinhando as sequências (*reads*) brutas contra o transcriptoma, foi possível quantificar os níveis de expressão dos transcritos montados (*contigs*). Os resultados expressam tanto a identidade dos genes com níveis de expressão alterados nas diferentes condições experimentais, quanto a quantificação desses níveis. As diferenças nos níveis de mRNA entre as condições experimentais foram utilizadas para explicar tanto diferenças entre as cepas Mozo (sustetível) e Juarez (resistente) expostas a concentrações de ivermectina iguais, quanto diferenças dentro de cada uma das cepas expostas a concentrações de ivermectina diferentes, sendo que estas diferenças representam a resposta das cepas ao acaricida. Entre os genes diferencialmente expressos anotados são de especial interesse aqueles que explicam o fenômeno da resistência à ivermectina em *R. microplus*.

Em conjunto, as duas abordagens aqui introduzidas confluem no objetivo principal deste trabalho que é de identificar mecanismos de resistência à Ivermectina presentes em *R. microplus*.

Capítulo

2

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE DESINTOXICAÇÃO METABÓLICA

Capítulo 2

Avaliação de mecanismos de desintoxicação metabólica

Neste capitulo são descritos os ensaios de atividade enzimática e de tempo-mortalidade realizados para testar o envolvimento de cinco famílias de enzimas de desintoxicação metabólica na resistência à ivermectina: citocromo P450, esterases α e β, Glutationa-S-Transferase e transportadores ABC. Como descrito na introdução, o processo de desintoxicação é um dos fenômenos mais estudados em vários grupos de pragas e é mediado por famílias enzimáticas que serão descritas a seguir.

As proteínas citocromo P450 fazem parte de uma das maiores superfamílias enzimáticas. Os genes P450, chamados de *CYP* estão presentes nos genomas de todos os organismos. A superfamília de genes *CYP* é classificada seguindo critérios como identidade de aminoácidos, filogenia e organização gênica. Existem mais de 200 famílias gênicas quando uma identidade de aminoácidos maior que 40% é considerada. As sequências de aminoácidos das diferentes P450 são extremamente diversas, com níveis baixos de identidade (até 16%), porém possuem características estruturais conservadas (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). Essa diversidade tem origem, provavelmente, em vários eventos de duplicação gênica. Os genes *CYP* originaram-se nos procariotos antes da acumulação de oxigênio na atmosfera (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). As reações exercidas pelas citocromo P450 são também diversas. Contribuem para processos como assimilação de carbono, biossíntese de hormônios e componentes celulares estruturais, e degradação de xenobióticos. Em eucariotos, essas enzimas geralmente se encontram unidas ao retículo endoplasmático ou membranas mitocondriais internas (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

As esterases são uma família de enzimas que hidrolisam ésteres, compostos presentes em muitos dos inseticidas utilizados em programas de controle de pragas. Diferentes classificações são utilizadas para agrupar as esterases não existindo, por enquanto, uma classificação universal. A maioria das esterases pertence à família

gênica das carboxil/colinesterases, que por sua vez, pertencem à superfamília das α/β hidrolases, que possuem um domínio capaz de hidrolisar substratos muito diversos. O sítio catalítico das carboxil/colinesterases contém uma folha α/β (Reis Montella *et al*., 2012). Essas enzimas não possuem uma alta similaridade em suas sequências primárias de DNA e possuem diversas especificidades de substrato. Porém, possuem alta similaridade estrutural e um arranjo de resíduos de aminoácidos bem conservados, fatos pelos quais se considera que as esterases tenham se originado a partir de um ancestral comum (Nardini & Dijkstra, 1999; Oakeshott *et al*., 2005). No caso das esterases, tanto a expressão gênica alterada e a atividade incrementada, quanto mutações pontuais nas regiões codificantes dos genes têm sido envolvidas na resistência a OP, PS e carbamatos (Reis Montella *et al*., 2012). Neste trabalho, tentamos elucidar o envolvimento de dois grupos de carboxilesterases, na resistência à ivermectina, seguindo uma classificação baseada na hidrólise preferencial de dois substratos artificiais: α e β naftil acetato. Enzimas que hidrolisam especificamente α ou β naftil acetato designam-se como esterases α e esterases β, respectivamente.

As Glutationa-S-Transferases (GSTs) representam um grupo de isoenzimas multigênicas envolvidas na desintoxicação celular de compostos xenobióticos e endobióticos. As GSTs podem ser citosólicas ou podem ser encontradas nos microssomos. As GSTs citosólicas estão classificadas em cinco famílias gênicas: alfa (α), mu (μ), pi (π), theta (θ) e sigma (σ), classificação baseada na similaridade de sequências e na reatividade imunológica cruzada (Salinas & Wong, 1999). As GSTs representam aproximadamente 1% das proteínas celulares e se encontram distribuídas em todos os eucariotos aeróbicos e alguns procariotos. Os níveis intracelulares de GST estão controlados por um único gene que modula a expressão em resposta ao estresse oxidativo. As GSTs protegem as células contra compostos citotóxicos e genotóxicos geralmente hidrofóbicos, catalisando a conjugação com glutationa. As GSTs também sequestram e transportam compostos hidrofóbicos endógenos, como hormônios e esteróides, assim como metabolitos tóxicos exógenos como drogas e pesticidas (Salinas & Wong, 1999).

Os transportadores ABC (*ATP Binding Cassette*) são uma superfamília de proteínas transmembrana presentes em todos os organismos, procariotos e eucariotos.

São importantes em uma variedade de processos fisiológicos que incluem translocação de substratos como aminoácidos, metais iônicos, peptídeos, metabólitos e toxinas. São responsáveis pelo transporte ativo de uma ampla variedade de drogas contra o gradiente de concentração por meio de um processo dependente de ATP. Podem transportar toxinas endógenas e exógenas (Higgins, 2001; Pohl *et al*., 2011; Pohl, 2012). Do ponto de vista estrutural, um transportador ABC é constituído por dois domínios transmembrana (*transmembrane domains* - TMDs) com seis α-hélices que atravessam a membrana formando um poro. Dois domínios, constituídos por uma estrutura α/β na face citoplasmática da membrana constituem os domínios ligadores de ATP (*nucleotide-binding domains* - NBDs) (Higgins, 2001)

Para estudar o envolvimento dessas famílias enzimáticas na resistência à ivermectina, dois testes foram empregados: testes de atividade enzimática basal e testes de tempo mortalidade com inibidores enzimáticos (sinergistas).

O primeiro teste visou avaliar a atividade enzimática basal de quatro famílias enzimáticas (Citocromo-oxidases, α e β esterases e Glutationa-S-transferases) nas duas cepas de referência estudadas, Mozo e Juarez, sem exposição à ivermectina. Com estes testes buscamos entender se existem diferenças constitutivas nas atividades das enzimas entre as duas cepas, mesmo sem exposição à ivermectina. Para isso, foram utilizados homogenatos de larvas de carrapatos das duas cepas nos quais foram adicionados substratos específicos de cada uma das enzimas: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMBZ) para Citocromo-oxidases, α e β-naftil acetato para α e β-esterases, e glutationa (GSH) para GST. Logo após a reação das enzimas com seus respectivos substratos, os produtos foram quantificados por método bioquímico-colorimétrico utilizando a absorbância deles, obtida como descrito no protocolo desenvolvido para ensaios na espécie *Aedes aegypti* (Ministério da Saúde, 2006).

Em paralelo, foram construídas curvas padrão para a absorbância de cada um dos produtos de reação (citocromo C para Citocromo-oxidases e α e β- naftol para α e β- esterases) em concentrações conhecidas. No caso do teste para GST o padrão foi constituído por concentrações conhecidas de GST e do substrato GSH. A partir dessas curvas foi possível comparar a absorbância obtida a partir dos produtos a concentrações conhecidas com a absorbância obtida a partir das amostras-teste. Essa

comparação foi necessária para realizar os cálculos de atividade enzimática. A atividade enzimática das citocromo-oxidases foi medida como µg de citocromo C/ µg de proteínas, a atividade de α e β- esterases como nM/µg proteína/min, e a atividade da GST como µM/µg proteína /min, sendo essa última produto de uma leitura cinética. Para cada amostra, também foi calculada a quantidade total de proteínas, que foi utilizada para normalizar a quantificação da atividade enzimática, tornando os resultados comparáveis mesmo nos casos em que a massa total analisada apresentou diferenças.

O segundo tipo de ensaio foi realizado com o intuito de avaliar as diferenças na mortalidade ao longo do tempo e o Tempo Letal 50 (TL50) das duas cepas, Mozo e Juarez, quando expostas somente a ivermectina, e quando expostas a ivermectina em combinação com sinergistas. Os sinergistas são inibidores enzimáticos específicos de cada uma das famílias enzimáticas estudadas. As citocromo-oxidases são inibidas pelo butóxido de piperonila (PBO), as esterases são inibidas pelo tributil fosforotritioato (DEF), as GSTs pelo dietilmaleato (DEM) e os transportadores ABC são inibidos pela ciclosporina A.

Quando uma cepa suscetível é exposta a ivermectina é esperado que a mortalidade ao longo do tempo seja maior que quando a mesma cepa em condição controle, não exposta a acaricidas. Por outro lado, quando uma cepa resistente é exposta a ivermectina, espera-se que a diferença na mortalidade em relação à mesma cepa sem exposição à ivermectina seja significativamente menor que a diferença observada na cepa suscetível. Se a resistência é uma característica decorrente da ação de enzimas de desintoxicação metabólica, a utilização dos inibidores acima descritos deve aumentar a mortalidade na cepa resistente.

Nos bioensaios de tempo-mortalidade buscamos identificar diferenças na porcentagem de mortalidade ao longo do tempo e no TL_{50} quando uma cepa foi exposta somente a ivermectina e quando a mesma foi exposta a ivermectina em combinação com sinergistas.

Em uma cepa suscetível, não esperamos que enzimas desintoxicadoras estejam agindo no metabolismo da ivermectina. Portanto, não esperamos que a exposição

apenas à ivermectina ou à ivermectina em combinação com sinergistas, resultem em na porcentagens diferentes de mortalidade ao longo do tempo e no TL_{50}.

Se uma determinada família de enzimas está agindo em uma cepa resistente, a presença do sinergista inibirá a ação de tais enzimas. Portanto, é esperado que a porcentagem de mortalidade ao longo do tempo e o TL_{50} da cepa resistente exposta a sinergista e ivermectina, diminuam em relação à mesma cepa exposta unicamente a ivermectina. As enzimas desintoxicadoras, inibidas pelo sinergista, perderão a capacidade de metabolizar a droga e observaremos diferenças quando comparamos ambos os tratamentos, sendo o tempo de mortalidade e o TL_{50} menores na cepa resistente exposta à ivermectina com sinergista. A partir do TL_{50} foi calculado o Fator de Sinergismo (FS) que indica a diferença na porcentagem de mortalidade ao longo do tempo entre uma cepa resistente exposta ao acaricida com sinergista em relação à mesma cepa exposta somente ao acaricida. A mesma lógica pode ser aplicadaa transportadores ABC e seu sinergista.

Levando em consideração os fundamentos anteriores, esperamos que a cepa suscetível Mozo não apresente mecanismos metabólicos de desintoxicação mediados por estas enzimas/transportadores ABC nem diferenças significativas na mortalidade ao longo do tempo entre os carrapatos expostos somente a ivermectina e os carrapatos expostos à ivermectina combinada com sinergistas. No entanto, esperamos que a cepa Juarez exposta à ivermectina em combinação com sinergistas apresente uma porcentagem de mortalidade maior que quando exposta apenas à Ivermectina.

O objetivo de ambos os testes foi compreender quais mecanismos metabólicos estão envolvidos na resistência à ivermectina no carrapato *R. microplus*. Levando em consideração que as proteínas estudadas são codificadas por múltiplos genes, também poderemos responder parcialmente se a resposta a ivermectina apresenta uma base poligênica ou monogênica.

Metodologia

2.1. Material de estudo

Neste trabalho foram utilizadas duas cepas de referência do carrapato *R. microplus*: Mozo, suscetível a ivermectina, e Juarez, resistente a ivermectina.

A cepa Mozo, originária do Uruguai, é a cepa suscetível referência da FAO para estudos e diagnóstico de resistência na América Latina e foi cedida pelo Dr. Ulisses Cuore (DILAVE, Miguel Rubino, Montevidéu). Essa cepa é mantida sem contato com acaricidas na Unidade de Isolamento do Laboratório de Parasitologia do IPVDF - FEPAGRO, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul.

A cepa Juarez foi isolada no ano 2010 no município de Jacareí, Estado de São Paulo. Amostras de teleóginas foram coletadas em uma propriedade de criação bovina com relato de falha na eficácia da ivermectina no controle do carrapato. A primeira geração filial (F1) apresentou um fator de resistência de 5,81 em relação à cepa de referência suscetível Mozo, determinado por meio do teste de imersão larval (TIL). Posteriormente, a cepa foi mantida em animais estabulados, tratados com ivermectina injetável por duas gerações (Ivomec® 1%) na Unidade de Isolamento do Laboratório de Parasitologia do IPVDF - FEPAGRO, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul. Durante as oito gerações posteriores (F2 a F9), as passagens foram realizadas em animais sem tratamento com acaricida. Entre a F10 e a F18, as passagens foram realizadas em animais tratados com ivermectina para selecionar uma cepa homogênea em relação à resistência ao acaricida. Uma vez realizados os experimentos, e com uma cepa resistente, entre a F19 e a F23 as passagens foram realizadas em animais sem tratamento com ivermectina. Este estudo foi realizado com larvas procedentes da vigésima terceira geração da cepa Juarez.

2.2. Bioensaios I: Ensaio de dose-resposta por meio do teste de imersão larval (TIL)

O teste de imersão larval (TIL) (Figura 2.1) é um ensaio de dose-resposta que permite determinar concentrações letais (CL) de um pesticida para duas cepas diferentes de carrapatos, sendo uma delas suscetível ao acaricida. Os pesticidas são diluídos em uma solução de acetona 1% e tritón X 0,002%. A CL_{50} é utilizada para o cálculo do

fator de resistência (FR) que indica quantas vezes uma cepa é mais resistente que a cepa suscetível de referência. O TIL e o teste de imersão de adultos (TIA) representam os testes padrão para o diagnóstico da resistência no carrapato do boi (Klafke *et al.*, 2006).

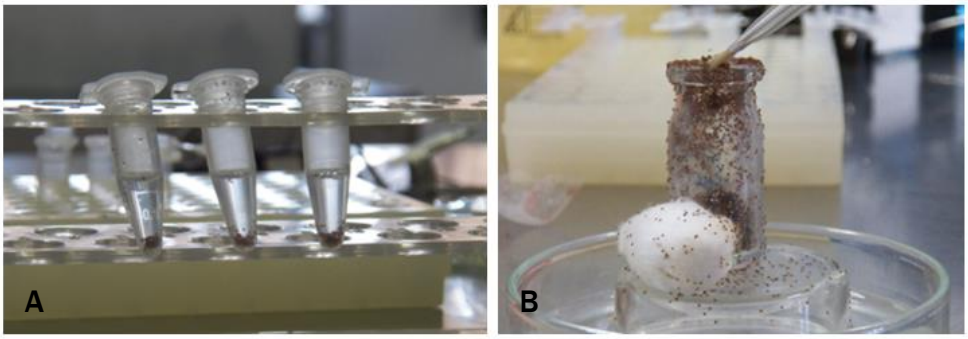

Figura 2.1. Teste de imersão larval. **A.** Larvas em imersão nas soluções de concentrações crescentes de ivermectina. **B.** Larvas de 14 dias utilizadas nos ensaios.

O TIL foi realizado com larvas de 14 a 15 dias das cepas Mozo e Juarez. Soluções com concentrações decrescentes de ivermectina foram preparadas para a posterior exposição das larvas de carrapatos. O TIL foi realizado em triplicatas e, em cada uma delas, aproximadamente 100 a 150 larvas de carrapatos de cada uma das cepas, foram imersas em soluções de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 25, 35, 50, 75 e 100 ppm de ivermectina, durante dez minutos. Posteriormente, as larvas foram colocadas em pacotes de papel de filtro e incubadas em estufa a 27ºC e 80% de umidade relativa, por 24 horas. As larvas sobreviventes foram contabilizadas e foi construída uma curva de dose-resposta, permitindo calcular a CL_{50} de cada uma das cepas. A partir desse dado, foi calculado o FR da seguinte forma:

FR = CL_{50} cepa resistente (Juarez) / CL_{50} cepa suscetível de referência (Mozo)

Os dados de mortalidade das larvas foram analisados utilizando o programa Polo-Plus (LeOra Software). A CL_{50} e o FR foram determinados seguindo o modelo probit incluído no programa. O modelo Probit é um modelo de regressão para variáveis binomiais que permite ajustar uma curva a um conjunto de dados para comparar a relação entre a variável de resposta e a variável independente. No modelo Probit, a

variável dependente ou de resposta toma valores estritamente entre 0 e 1. Esse modelo é utilizado para analisar dados obtidos a partir de bioensaios, já que dada a variável independente (dose de pesticida) a resposta pode ser apenas indivíduos vivos (unidades que não respondem) ou mortos (unidades que respondem). A variável de resposta é binária com distribuição binomial. Nos ensaios de dose-resposta, a curva costuma ser sigmóide. O modelo probit transforma a curva sigmóide em uma curva linear e, dessa forma, as relações entre as variáveis podem se ajustar a uma reta para definir as relações entre concentração de pesticida e resposta. Para realizar essa transformação é necessário que as concentrações de pesticidas sejam convertidas a logaritmo em base 10. Uma vez realizada a regressão, pode-se determinar as quantidades necessárias de pesticidas para atingir 1, 50 e 90 % da mortalidade: as CL1, CL50 e CL90.

Tanto para a CL_{50} quanto para o FR foi determinado o intervalo de confiança de 95%. As diferenças foram consideradas significativas sempre que os intervalos de confiança não se sobrepuseram.

2.2.1. Ensaios de atividade enzimática basal

Foram realizados ensaios enzimáticos para avaliar as atividades enzimáticas constitutivas nas cepas Mozo (suscetível) e Juarez (resistente) das enzimas P450 monoxigenase, α-esterases, β-esterases e Glutationa-S-transferase (GST). Foram utilizadas amostras em *pools* de larvas maceradas em 350 uL de água destilada. Para cada ensaio, as amostras foram distribuídas em placas de 96 poços em três réplicas biológicas, cada uma com três réplicas técnicas, contabilizando um total de nove amostras por ensaio. As atividades de todas as enzimas, a quantificação total de proteínas (PTN) e a construção das curvas padrão de todos os produtos de reação foram realizados por método bioquímico-colorimétrico usando o espectrofotômetro AZ Read 2000 (Biochrom). O programa Galapagos foi usado para a aquisição dos dados de absorbância.

Para cada uma das amostras a PTN foi determinada. Como primeiro passo para a quantificação das proteínas nas amostras, foram construídas curvas padrão com concentrações conhecidas de albumina do soro bovino (BSA) de 0; 2,5; 5; 7,5; 10 e 20

μg/μL adicionadas a 300 μL de reagente de Bradford. A quantificação dos padrões foi realizada pelo método colorimétrico após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, a 620 nm. A partir dessa quantificação foi construída uma curva padrão e foi determinado o coeficiente angular. As amostras foram submetidas a reações equivalentes e a quantidade de proteínas específicas nas amostras foi determinada da mesma forma. O coeficiente angular obtido a partir da curva padrão foi utilizado para realizar os cálculos das quantidades de proteínas totais das amsotras.

Para o teste de oxidases de função mista (MFO) foram construídas curvas padrão a partir de quantidades conhecidas de citocromo C (0; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 μg) diluídas em tampão fosfato de potássio 90 mM pH 7,2, representando o produto da atividade das oxidases. Vinte microlitros de citocromo C nas diferentes concentrações foram incubados por 120 minutos com 25 μL de H_2O_2 3%. A partir dessa reação, os padrões foram determinados por colorimetria. As amostras foram combinadas com o reagente TMBZ diluído em metanol e tampão acetato de sódio 250 mM pH 5,0. Após a adição de 25 μL de H_2O_2 3% a reação foi incubada por 120 minutos e foi realizada a leitura colorimétrica a um comprimento de onda de 650 nm.

Para a determinação da atividade de α-esterases e β-esterases foram construídas curvas padrão de α e β-naftol, respectivamente, com quantidades conhecidas de produto (0, 1, 2, 3, 4, 5 μg). Dez microlitros de α e β-naftol foram incubados em 200 μl de alfa-naftil acetato diluído em fosfato de sódio (20mM pH 7,2) por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, 50 μl de Fast Blue diluídos em SDS 5% foram adicionados e a mistura incubada foi por 5 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para as amostras. Logo após a incubação com Fast Blue foi realizada a leitura colorimétrica a 570 nm.

As curvas padrão foram utilizadas para a determinação do coeficiente angular utilizado nos cálculos das atividades enzimáticas de cada uma das enzimas.

O ensaio para medir a atividade da GST baseia-se no fato de que essa enzima catalisa a conjugação de L-glutationa com 1-Cloro-2,4-Dinitrobenzeno (CDNB):

$$GSH + CDNB \xrightarrow{GST} GS\text{-}DNB\ conjugada + HCl$$

O conjugado de GS-DNB absorve comprimentos de onda de 340 nm e a taxa de absorção é diretamente proporcional à atividade de GST na amostra.

O ensaio de GST foi realizado por meio do kit de reação para GST (Sigma), seguindo as indicações do fabricante. Os ensaios foram realizados com uma solução substrato composta por tampão salino Dulbecco`s (KCl 0,196 g/L, KH_2PO_4 0,196 g/L, NaCl 7,84 g/L, Na_2HPO_4 1,127 g/L (anídrico) 1,15 g/L), glutationa reduzida (2 mM) e CDNB (1 mM). Quatro microlitros de cada uma das amostras e dos controles positivos foram distribuídos em triplicata em placas de Elisa de 96 poços. Foram adicionados 196 uL de solução substrato, para obter um volume final de 200 uL. O controle positivo foi constituído por 4 uL de GST 0,25mg/mL diluída em tampão para amostras do kit na proporção de 1:10. Os controles negativos foram constituídos por 200 uL de solução substrato em triplicata sem adição de GST. A atividade enzimática foi medida por colorimetria começando imediatamente após a preparação da reação, a intervalos de tempo de cinco minutos durante 20 minutos, a um comprimento de onda de 340 nm.

Todos os ensaios, excetuando-se o de GST, foram realizados segundo o protocolo descrito para *Aedes aegypti* (Ministério da Saúde, 2006) e adaptado para *R. microplus*.

2.2.2. Cálculos da atividade enzimática

As atividades enzimáticas foram calculadas segundo as seguintes fórmulas:

- Oxidases de Função Mista (MFO): [(Absorbância da amostra – Absorbância média do branco) x fator de diluição] / coeficiente angular da curva padrão / quantidade total de proteínas
- Esterases alfa e beta: [(Absorbância do branco x fator de diluição)/coeficiente angular da curva padrão/ quantidade total de proteínas] x 1000 x 7 / 30

- Glutationa-S-Transferase (GST): (Absorbância do branco a 20 min - Absorbância do branco a 10 min) x fator de diluição x 0,6 x Δtempo / quantidade total de proteínas x 1000

O branco constitui a medida da absorbância da solução tampão sem a ocorrência da reação enzimática.

2.3. Bioensaios II: testes de tempo-mortalidade com sinergistas

Os sinergistas são inibidores enzimáticos específicos capazes de incrementar a suscetibilidade dos carrapatos aos acaricidas, quando mecanismos enzimáticos estão atuando na resistência. Se em cepas resistentes as enzimas de desintoxicação metabólica/transportadores ABC agem como mecanismos de resistência, elas serão inibidas pelos sinergistas específicos, o que leva a uma diminuição dos níveis de resistência. Nos ensaios de tempo mortalidade com sinergistas, espera-se que, em cepas resistentes, o tempo letal 50 (TL_{50}) diminua. O FS indicará o quão mais rapidamente ocorre a morte dos carrapatos resistentes expostos ao acaricida com sinergista em relação aos carrapatos expostos somente ao acaricida. Por outro lado, se o ensaio é feito com cepas suscetíveis, espera-se que os TLs das amostras expostas ao acaricida e ao acaricida em combinação com sinergistas, não sejam diferentes, pois as enzimas e os transportadores ABC não estariam atuando nestas cepas. Foram testados inibidores de proteínas que possam ter um papel na resistência a acaricidas: PBO, inibidor de citocromo P450, DEF, inibidor de esterases, DEM, inibidor de GST e CsA, inibidor de transportadores ABC.

O TIL foi adaptado para a realização de ensaios de tempo-mortalidade com sinergistas. Os ensaios de tempo-mortalidade permitem avaliar a porcentagem de mortalidade de grupos de larvas após exposição à ivermectina, diluente, sinergista ou ivermectina em combinação com sinergista, a intervalos de tempos regulares. Da mesma forma que o TIL permite determinar a CL_{50}, os testes de tempo-mortalidade permitem determinar o tempo letal para 50% da população (TL_{50}) e o fator de sinergismo (FS). No caso dos testes de tempo-mortalidade com sinergistas o TL_{50} foi determinado para cada um dos grupos experimentais:

- Amostra + 100 ppm de ivermectina (Controle positivo)
- Amostra + Diluente (Controle negativo)
- Amostra + Sinergista
- Amostra + 100 ppm de ivermectina + Sinergista

Como o teste incluiu sinergistas, o FS foi calculado da seguinte maneira:

$$FS = \frac{TL_{50} \text{ cepa testada exposta a ivermectina 100 ppm}}{TL_{50} \text{ cepa testada exposta a ivermectina 100 ppm + sinergista}}$$

Os ensaios foram realizados com as cepas de referência Mozo (suscetível) e Juarez (resistente). Larvas da geração 23 foram utilizadas nos testes de tempo-mortalidade. Foram determinadas as maiores concentrações não letais de sinergistas, por meio do TIL. O DEF foi testado com as seguintes concentrações (em ppm): 0; 0,001; 0,01;10; 100 e 1000. O DEM foi testado a 1,25; 2,5 e 5 ppm. O PBO a 1,5, 2,5 e 5. A CsA foi utilizada a uma concentração de 15 μM segundo a metodologia descrita por Pohl *et al*. (2012). A concentração de ivermectina foi de 100 ppm em todos os casos.

Após a determinação da maior dose não letal para cada sinergista, foram utilizadas as seguintes concentrações finais:

- PBO, inibidor de citocromo P 450: 5 ppm;
- DEF, inibidor de esterases: 1 ppm;
- DEM, inibidor de GST: 100 ppm;
- CsA, inibidor de transportadores ABC: 15 μM.

Foram realizados quatro testes de tempo-mortalidade com a cepa Mozo e a cepa Juarez, cada um correspondente a um sinergista. Para cada grupo experimental, amostras combinadas de aproximadamente 100-150 larvas, em triplicata, foram imersas em 500 µL de cada solução durante 10 minutos. Cada amostra foi transferida para um pacote de papel filtro com a ajuda de um pincel. O pacote foi fechado e as larvas foram incubadas em estufa a 27ºC e 80% de umidade.

A contagem das larvas vivas e mortas foi realizada em seis intervalos de tempo: 10, 120, 240, 360, 480 e 1440 minutos após a exposição às soluções. O primeiro ponto de contagem (10 minutos) representa o momento no qual as larvas são extraídas das soluções. As larvas foram consideradas vivas se apresentassem a capacidade de se locomover. Aquelas sem movimento ou apenas com movimento das pernas foram consideradas mortas.

Os dados de mortalidade das larvas foram analisados utilizando o programa Polo-Plus (LeOra Software). O TL_{50} e o FS foram determinados seguindo o modelo probit incluído no programa. Tanto para o TL_{50} quanto para o FS foi determinado o intervalo de confiança de 95%. As diferenças foram consideradas significativas sempre que não houvesse sobreposição dos intervalos de confiança.

2.4. Bioensaios I: Ensaio de dose - resposta por meio do teste de imersão larval (TIL)

O teste de dose resposta foi utilizado para determinar a CL_{50} e a CL_{90} das duas cepas de referência Mozo (suscetível) e Juarez (resistente), e os fatores de resistência correspondentes a ambas CL (tabela 2.1 e figura 2.2). Para a CL_{50} foi determinado um fator de resistência de 7,029. Para a CL90 foi determinado um fator de resistência 20,443. Em ambos os casos foi confirmado o fato da cepa Juarez ser resistente em relação à cepa Mozo.

Tabela 2.1. Resultados do ensaio de dose-resposta com ivermectina realizados em *R. microplus* da cepa Mozo e Juarez da geração 23.

Cepa	N	Inclinação da reta de regresão	CL50	IC	FR	CL90	IC	FR
Juarez	4539	1,714 +-0,087	84,673	71,467-104,419	7,029	473,498	316,888-863,108	20,443
Mozo	3474	4,514 +-0,203	12,046	10,521-13,523		23,161	20,120-28,232	

N: número de larvas tratadas; CL: concentração letal; IC: intervalo de confiança; FR: Fator de Resistência.

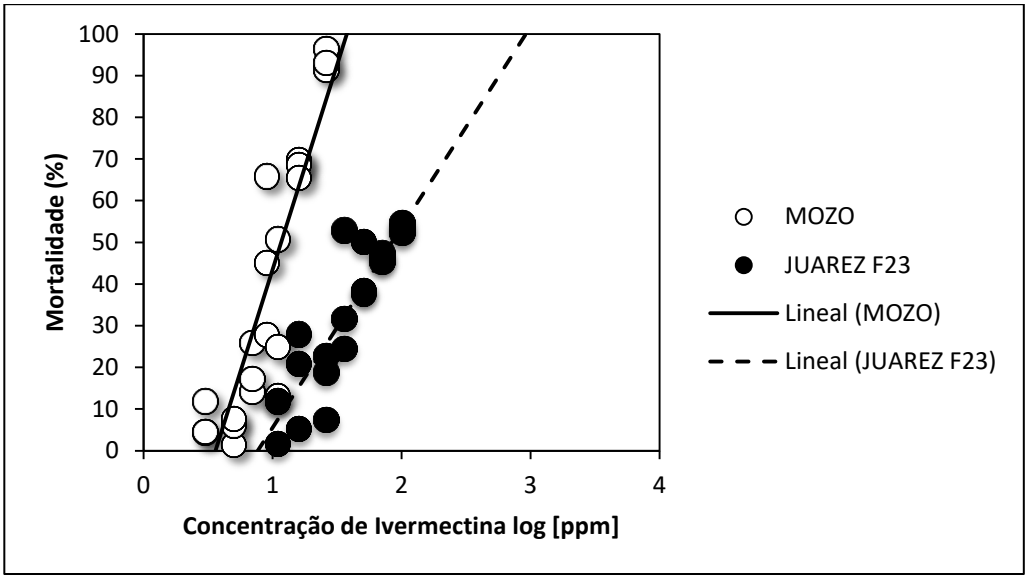

Figura 2.2. Curva de dose-resposta exibindo a porcentagem de mortalidade das cepas Mozo e Juarez em relação aos logaritmos das concentrações crescentes de ivermectina, entre 0 ppm e 100 ppm.

2.5. Ensaios de atividade enzimática basal

Nestes ensaios buscamos elucidar quais eram os níveis constitutivos de atividade das GSTs, citocromo-oxidases e α- esterases e β- esterases em larvas de *R. microplus*, prévios à exposição à Ivermectina. Diferenças de atividade basal poderiam ajudar a explicar diferenças entre a cepa Mozo (suscetível) e a cepa Juarez (resistente) assim como fornecer evidências do envolvimento de determinadas famílias enzimáticas de desintoxicação na resistência à ivermectina.

Nove pontos amostrais foram utilizados para determinar diferenças de atividade enzimática basal entre as cepas Mozo e Juarez. Esses pontos representam as médias obtidas a partir das réplicas técnicas e biológicas dos ensaios. As diferenças entre médias foram avaliadas por meio do teste t comparando os dois grupos. A atividade de GST foi significativamente maior ($p=<0,001$) na cepa Juarez (resistente) em relação à cepa Mozo (suscetível) (Figura 2.3.A)

No ensaio de MFO, a cepa Mozo (suscetível) apresentou atividade basal de citocromo oxidases significativamente aumentada ($p <0,001$) em relação à cepa Juarez (resistente) (Figura 2.3.B).

No teste de α e β-esterases, as médias das atividades enzimáticas basais não apresentaram diferenças significativas ($p = 0,360$ para α-esterases e $p = 0,938$ para β-esterases) (Figura 2.3.C e 2.3.D). Nos dois casos, as diferenças entre as médias não são suficientes para rejeitar a hipótese de que as diferenças entre os grupos experimentais sejam devidas ao acaso.

2.6. Bioensaios II: testes de tempo-mortalidade com sinergistas

Testes de tempo-mortalidade com sinergistas foram realizados para determinar o envolvimento de citocromo oxidases, GST, esterases e transportadores ABC na resistência a ivermectina. Os testes foram utilizados para avaliar a mortalidade ao longo do tempo da cepa resistente, Juarez, quando exposta a ivermectina em combinação com os sinergistas PBO, DEM, DEF e CsA. A resposta da cepa Juarez em cada condição experimental (ivermectina + sinergista, ivermectina, sinergista e diluente) foi comparada com a resposta da cepa Mozo nas mesmas condições.

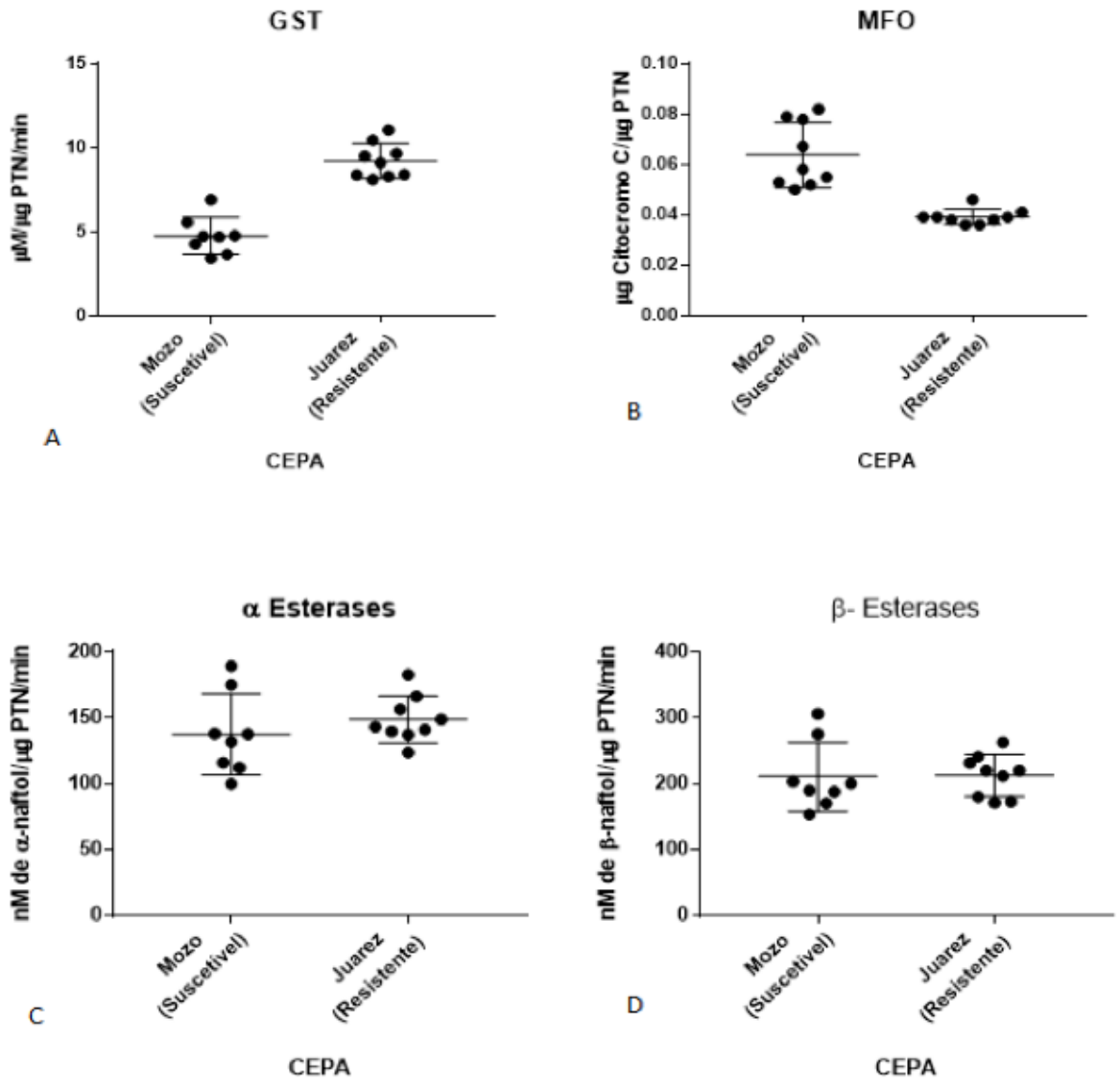

Figura 2.3. Atividade basal de GST, citocromo oxidases, e α e β-esterases das cepas Mozo e Juarez sem exposição à ivermectina. A linha interna representa a mediana de cada grupo de amostras. A atividade enzimática de GST se encontra significativamente aumentada na cepa Juarez em relação à cepa Mozo (A). A atividade das citocromo oxidases encontra-se significativamente aumentada na cepa Mozo em relação à cepa Juarez (B). Nem α nem β esterases apresentam diferenças significativas quando as cepas Mozo e Juarez são comparadas (C e D).

Em uma primeira etapa, foram obtidos os padrões de tempo-mortalidade das duas cepas expostas apenas a ivermectina (100 ppm), a seis intervalos de tempo: 10, 120, 240, 360, 480 e 1440 minutos pós-exposição (Figura A1, Anexo 1). Esses ensaios permitiram comparar o efeito da ivermectina e da ivermectina em combinação com

sinergistas e confirmaram o fenótipo resistente da cepa Juarez em relação à cepa Mozo.

Os testes subsequentes com sinergistas foram realizados considerando a resposta das cepas nestas condições. Nos experimentos com sinergistas, foram utilizados dois controles: (i) larvas expostas somente ao diluente da ivermectina e (ii) larvas expostas somente ao sinergistas.

Quando consideramos a cepa suscetível Mozo, não esperamos mecanismos de desintoxicação mediados pelas enzimas estudadas. Portanto, não se esperam diferenças no TL_{50} e no FS no tratamento com Ivermectina em combinação com sinergistas quando comparada ao tratamento apenas com Ivermectina. De fato, nem o TL_{50} nem o FS apresentam diferenças significativas na comparação entre tratamentos (Tabela 2.2). Já na cepa Juarez, esperamos que pelo menos parte do fenótipo resistente seja devido à ação de enzimas desintoxicadoras. Se elas participam em processos de desintoxicação da ivermectina, sua inibição por sinergistas determinará o aumento da mortalidade ao longo do tempo, diminuindo o TL_{50} e aumentando o FS.

Tabela 2.2. Resultados dos testes de tempo- mortalidade com Ivermectina e sinergistas realizados com *R. microplus* da cepa Mozo (suscetível) e Juarez (resistente).

Cepa	Tratamento	N	Slope ±EP	TL_{50} (minutos)	IC	TL_{50} sem inibidor	IC	FS	IC
Juarez	Ivermectina-PBO	662	1.443+-0.092	886.037	743.836-1089.543	1826.795	1162.477-4018.619	2.062	1.610 - 2.640
	Ivermectina-DEM	927	1.973+-0.098	663.7	566.940-799.559			2.752	2.181 - 3.473
	Ivermectina-DEF	514	1.986+-0.096	351.623	313.030-393.139			5.195	4.125 - 6.544
	Ivermectina-CsA	638	2.896+-0.174	239.793	221.973-257.546			7.618	6.056 - 9.584
Mozo	Ivermectina-PBO	259	4.661+-0.306	161.046	141.007-179.380	173.167	150.853-193.178	1.075	0.981 - 1.178
	Ivermectina-DEM	199	4.009+-0.326	133.862	108.296-154.948			1.294	1.151 - 1.454
	Ivermectina-DEF	502	4.046+-0.343	107.288	92.887-119.571			1.614	1.424 - 1.829
	Ivermectina-CsA	85	4.597+-0.361	168.813	139.812-193.914			1.026	0.926 - 1.136

N: número de larvas; slope: inclinação da reta de regressão; EP: erro padrão; TL: tempo letal; IC: intervalo de confiança; FS: fator de sinergismo; FR: fator de resistência.

Concordando com as expectativas, quando os tratamentos acima mencionados foram aplicados na cepa Juarez (ivermectina + sinergista, ivermectina, sinergista e diluente) observamos uma diminuição significativa do TL_{50} com um aumento significativo do FS no tratamento com ivermectina + sinergistas (tabela 2.2). Esse resultado indica que, como as enzimas agem na cepa resistente em resposta ao acaricida, ao serem inibidas pelos sinergistas há um aumento na susceptibilidade da cepa Juarez. Os mesmos tratamentos na cepa Mozo não resultaram em diferenças significativas no TL_{50} nem no FS (Tabela 2.2 e Figuras A2 a A5 do Anexo 1) quando observamos o efeito dos diferentes sinergistas em conjunto com ivermectina. Considerando que a adição de sinergistas não muda a susceptibilidade da cepa Mozo, entendemos que estas não agem na desintoxicação da ivermectina nessa cepa.

Discussão

A partir do ensaio de dose-resposta verifica-se o caráter resistente da cepa Juarez em relação à cepa Mozo, cepas de referência utilizadas neste estudo para avaliar a resposta das diferentes enzimas de desintoxicação metabólica quando as larvas de *R. microplus* são expostas a ivermectina em combinação com diferentes inibidores enzimáticos ou sinergistas.

Os ensaios de atividade enzimática nas cepas de referência não expostas ao acaricida mostraram resultados particulares, com a cepa Mozo apresentando atividade de citocromo oxidase significativamente aumentada em relação à cepa resistente Juarez. Níveis elevados da enzima P450 são geralmente encontrados em linhagens de artrópodes resistentes a pesticidas. Quando consideramos essa enzima, linhagens suscetíveis geralmente apresentam níveis enzimáticos menores que os níveis presentes nas cepas resistentes (Passay *et al.,* 2009; ffrench-Constant *et al.,* 2004). Van Leeuwen e colaboradores (2005) compararam os níveis de atividades enzimática de monooxigenases em linhagens resistentes coletadas no campo, e uma linhagem suscetível de laboratório de *Tetranychus urticae*. Nesse estudo, determinaram que pelo menos parte da resistência e da resistência cruzada observada nas linhagens resistentes era devida a uma atividade aumentada de uma monoxigenase. Pang *et al* (2014) citaram exemplos de artrópodes nos quais as cepas resistentes a vários tipos de pesticidas apresentaram níveis de atividade de citocromo-oxidases maiores que as cepas suscetíveis e apresentaram evidências de que o mesmo acontece em cepas de *Nilaparvata lugens* resistentes a imidacloprid. Considerando essas observações, esperávamos encontrar níveis maiores de atividade de P450 monoxigenase na cepa Juarez. Porém, neste estudo, a atividade enzimática das citocromo oxidases na cepa resistente mostra-se significativamente diminuída quando comparada à cepa suscetível, sendo esses fatos opostos aos trabalhos acima mencionados. Concordando com estes resultados, Carvalho *et al* (2010) realizaram estudos de expressão em linhagens de *Cochliomyia hominivorax* suscetíveis e resistentes a organofosforados (OP). Dois grupos resistentes, R1 e R2, e um grupo controle, foram avaliados. Entre 18 genes candidatos avaliados por qPCR, esse trabalho mostrou uma sub-expressão do

gene *cyp6g1* nos grupos resistentes após o tratamento com dimetil 2,2-diclorovinil fosfato em relação ao grupo controle. No grupo R1, o gene *cyp6g1* encontrou-se 45 vezes menos expresso do que no grupo controle. O mesmo gene no grupo R2 mostrou-se 10 vezes menos expresso do que no grupo controle.

Por outro lado, de todas as famílias enzimáticas testadas, a família da P450 monoxigenase apresenta o menor FS quando consideramos os resultados dos bioensaios com sinergistas, o que indica que essas enzimas têm um papel relativamente menor na desintoxicação da Ivermectina.

Os níveis basais de atividade de GST de larvas não expostas a ivermectina foram maiores na cepa resistente comparada à cepa suscetível, indicando uma possível expressão constitutiva maior dessa enzima na linhagem resistente. Dessa forma, quando exposta à ivermectina, os níveis elevados de GST já presentes podem agilizar o processo de desintoxicação. De fato, os ensaios com sinergistas mostram alguma atividade de GST nesse sentido, porém sem um papel principal na desintoxicação metabólica. Esses resultados se encontram em concordância com os resultados de Pasay *et al.* (2009), que observaram níveis quatro vezes maiores de GST em ácaros resistentes a permetrina quando comparados aos níveis da enzima na linhagem suscetível. No mesmo trabalho, os ensaios com sinergistas determinaram a diminuição do tempo letal dos ácaros da linhagem resistente expostos a permetrina em combinação com DEM, quando comparados aos ácaros resistentes expostos apenas a permetrina, indicando a participação de GST na resistência.

Nem α-esterases nem β-esterases parecem ter níveis constitutivos de atividade enzimática significativamente diferenciados entre as linhagens resistente e suscetível. Podemos pensar que as duas cepas apresentam níveis constituivos similares, mas que estes são modificados na linhagem resistente quando as larvas entram em contato com a ivermectina, pois os ensaios com inibidores enzimáticos mostraram que as esterases apresentam um papel de maior importância na desintoxicação, juntamente com os transportadores ABC. Por outro lado, Van Leeuwen *et al* (2005) detectaram desintoxicação aumentada decorrente de uma maior atividade de esterases em linhagens resistentes e multirresistentes de *T. urticae*, quando comparadas a uma

linhagem suscetível. Os ensaios com sinergistas mostram que as esterases têm importância na desintoxicação da cepa resistente, mas não parecem atuar na cepa suscetível quando exposta ao acaricida. Concordando com este fato, Passay *et al* (2009) realizaram ensaios com sinergistas em *Sarcoptes scabiei* e observaram uma diminuição significativa da sobrevivência média da linhagem resistente tratada com permetrina e DEF quando comparada à linhagem resistente exposta apenas a permetrina. O papel das esterases no fenômeno de desintoxicação foi corroborado em estudos com fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* resistentes a organofosforados, onde mostra-se um incremento na atividade destas enzimas em cepas resistentes em relação a uma cepa suscetível e o controle, quando expostas ao pesticida (Villarino *et al.,* 2003). Em *S. scabiei*, foi determinado um aumento da atividade de esterases de sete vezes numa linhagem resistente a permetrina em relação à linhagem suscetível (Pasay *et al.,* 2009).

Devemos considerar que nos experimentos realizados com sinergistas não foram caracterizados os tipos de esterases envolvidos. Há uma ampla classificação existente para esse tipo de enzimas, que inclui critérios tão diversos como interação com organofosforados até critérios filogenéticos e filogenômicos. Se considerarmos os ensaios de atividade enzimática, foram testadas α e β esterases, classificação que depende da hidrólise preferencial dos substratos artificiais α e β-naftil acetato. Já que ambos são ésteres carboxílicos, α e β esterases também podem ser classificadas como carboxil/colinesterases, também conhecidas como aliesterases, que atuam preferencialmente sobre moléculas orgânicas de cadeia aberta e possuem no sítio ativo, um resíduo com um papel importante na hidrólise dos ésteres (Reis Montella *et al.,* 2012). Portanto, podemos afirmar que os níveis de carboxilesterases não divergem entre a cepa Mozo e a cepa Juarez, não podendo extrapolar essa afirmação para outras esterases.

Em termos gerais e de acordo com os resultados obtidos a partir dos bioensaios com sinergistas, citocromo P450, GST, esterases e transportadores ABC parecem ter algum grau de envolvimento na desintoxicação metabólica da ivermectina em *R. microplus*, sendo de maior importância, o papel de esterases e transportadores ABC. O tempo letal das larvas da cepa resistente é, pelo menos 40% menor às 24 horas,

quando expostas a ivermectina em combinação com inibidores específicos de esterases e transportadores ABC, em comparação com o tempo letal da mesma cepa exposta somente a ivermectina (Figuras A5 do Anexo 1). A inibição enzimática impossibilita a ação de esterases e transportadores ABC fazendo com que a ivermectina seja capaz de agir. Esses resultados concordam com estudos de inibição enzimática conduzidos em *S. scabiei*. Neles verificou-se a inibição da citocromo P450 por PBO, de esterases por DEF e de GST por DEM, resultando na diminuição da sobrevivência da cepa resistentes, quando os ácaros são expostos a permetrina e sinergistas (Pasay *et al.,* 2009).

Segundo nossos ensaios de tempo-mortalidade, os transportadores ABC parecem ser responsáveis por maior parte da resistência a ivermectina no carrapato *R. microplus*. O maior valor do FS, 7,618, é verificado para a combinação de ivermectina com CsA. A cepa Juarez exposta a ivermectina e CsA apresenta uma mortalidade mais de 50% maior do que a cepa Juarez exposta somente à ivermectina, às 24 horas (Figura A5, Anexo 1). Pohl (2012) explorou o envolvimento dos transportadores ABC na resistência a ivermectina em populações resistentes de *R. microplus*. Em concordância com nossos resultados, determinou uma diminuição significativa da CL_{50} quando as larvas foram pré-expostas a CsA no teste de pacotes impregnados (Larval Package Test ou LPT). No entanto, o nível de suscetibilidade de populações suscetíveis a ivermectina permaneceu sem variações. Também determinou um aumento da toxicidade da ivermectina em fêmeas adultas alimentadas artificialmente com sangue suplementado com CsA, o que levou à diminuição da oviposição e à viabilidade dos ovos. Porém, nas populações suscetíveis a toxicidade da ivermectina não foi alterada.

Conclusão do capítulo

Neste capítulo buscamos descrever a investigação dos mecanismos de resistência metabólica do carrapato do boi, *R. microplus*, caracterizado por ser uma espécie multiresistente. A resistência a PS, OP, LM, Amitraz, Fipronil e Fluazuron têm sido observada em populações brasileiras desse organismo (Fernandes, 2001; FAO, 2004; Andreotti, 2010, Martins & Furlong, 2011; Andreotti *et al*., 2011; Klafke *et al*., 2006; Reck *et al*., 2014).

Diversos mecanismos de resistência são bem conhecidos em artrópodes pragas: substituições de aminoácidos decorrentes de mutações pontuais que afetam o sítio alvo dos pesticidas ou em regiões regulatórias de genes envolvidos na desintoxicação dos pesticidas, espessamento da cutícula que diminui a penetração dos pesticidas no corpo das pragas, mecanismos comportamentais nos quais os artrópodes reduzem o contato com os pesticidas, e mecanismos de desintoxicação metabólica onde diversas proteínas desintoxicadoras aumentam sua atividade para eliminar as moléculas de pesticidas. Neste capítulo descrevemos o estudo desse último mecanismo e apresentamos evidências do envolvimento das famílias proteicas citocromo P450, GST, esterases e transportadores ABC. Em termos gerais, era esperado que as proteínas estudadas tivessem funções na desintoxicação metabólica da ivermectina. Mesmo sem exposição a pesticidas, algumas delas agem em condições fisiológicas normais, atuando na desintoxicação dos produtos do metabolismo normal dos organismos. Assim sendo, a atividade das enzimas desintoxicadoras e transportadores ABC pode ser incrementada ou direcionada em presença de uma molécula tóxica como a ivermectina.

Os ensaios enzimáticos realizados revelaram níveis basais diferenciados de citocromo P450 e GST entre as cepas de referência utilizadas neste trabalho, Mozo (suscetível) e Juarez (resistente). A atividade da citocromo P450 foi maior na cepa suscetível, e a atividade de GST, maior na cepa resistente. Porém, os níveis de esterases permaneceram indiferenciados entre as cepas estudadas. Os ensaios com sinergistas mostram envolvimento de citocromo P450, GST, esterases e

transportadores ABC na resistência a ivermectina na cepa Juarez do carrapato *R. microplus*, sendo o papel de esterases e transportadores ABC de maior importância.

Capítulo

3

GENÔMICA FUNCIONAL DA RESISTÊNCIA À IVERMECTINA EM RHIPICEPHALUS MICROPLUS

Capítulo 3

Genômica funcional da resistência à ivermectina em *Rhipicephalus microplus*

Neste terceiro capítulo será abordado o estudo comparativo dos perfis diferenciais de expressão gênica entre as cepas de referência Mozo (suscetível) e Juarez (resistente) e entre concentrações diferentes de Ivermectina dentro de cada uma das cepas.

No estudo de diferentes fenótipos devemos considerar que eles são produtos da expressão dos genes. Como anteriormente mencionado, os genes podem mudar de expressão em diferentes tecidos de um organismo, em diferentes momentos do desenvolvimento, em diferentes condições ambientais e em linhagens diferentes de uma espécie.

Neste capítulo estudaremos as respostas a diferentes concentrações de ivermectina, assim como diferenças de expressão entre as duas cepas de *R. microplus* com diferenças no fenótipo de resistência à ivermectina.

Dois tipos de comparações foram feitas a fim de caracterizar tanto possíveis mecanismos de resistência à ivermectina, quanto diferentes respostas das duas cepas a diferentes concentrações de acaricida. A cepa Mozo foi comparada com a cepa Juarez a 0 e 10 ppm de ivermectina para determinar diferenças de expressão gênica decorrentes de diferenças genéticas entre cepas (diferentes genomas na mesma condição). Simultaneamente, foram avaliadas as respostas da cepa Mozo e Juarez a 0, 10 e 100 ppm de ivermectina para determinar as diferenças de expressão que surgem por decorrência das diferenças entre concentrações de acaricida (mesmo genoma em diferentes condições experimentais).

Os perfis de expressão gênica foram avaliados utilizando a metodologia do RNA-Seq ou sequenciamento massivo em paralelo do RNA mensageiro, em conjunto com ferramentas bioinformáticas (Oshlack et al., 2010, Wolf, 2013). Essa abordagem permite avaliar o conteúdo de mRNA de uma ou mais amostras e identificar genes diferencialmente expressos sob diferentes condições. Em um experimento de RNA-Seq,

o mRNA das amostras é convertido em cDNA e sequenciado numa plataforma de alto rendimento, já que milhões de sequência de cDNA são obtidas simultaneamente (sequenciamento massivo em paralelo). Neste estudo, a plataforma de sequenciamento de escolha foi a Illumina HiSeq (Illumina).

O número de sequências geradas durante o processo do sequenciamento é proporcional a quantidade do RNA transcrito numa condição particular. Uma característica importante da tecnologia do RNA-Seq é a possibilidade de realizar análises em organismos não modelo, já que informações prévias de sequência não são requeridas (Wolf, 2013). Dado que o genoma completo do carrapato *R. microplus* não se encontra ainda disponível, essa abordagem é apropriada para atingir os objetivos propostos.

Uma vez quantificados os níveis de expressão dos transcritos é possível atribuir a eles uma identidade e função por meio da anotação funcional, o que permite determinar em quais processos esses transcritos estão envolvidos.

Essa abordagem nos permite atingir os objetivos propostos em dois sentidos: (i) abordamos a investigação dos mecanismos de resistência à ivermectina, já que a anotação funcional dos genes diferencialmente expressos pode fornecer informações acerca de quais genes podem estar envolvidos nestes mecanismos e (ii) comparamos o tipo de resposta genética que surge como consequência de diferenças entre cepas e como consequência da exposição de cada uma das cepas a diferentes concentrações de ivermectina.

Metodologia

3.1. Bioensaios: teste de imersão larval (TIL)

O TIL foi realizado conforme a metodologia descrita no Capítulo 2. Foi necessário realizar esse teste novamente pois as larvas utilizadas nos bioensaios pertenciam a uma geração diferente das larvas utilizadas neste experimento do RNA-Seq. Portanto foi necessário verificar os níveis de resistência da geração específica. O TIL foi realizado em triplicatas e, em cada uma delas, aproximadamente 100 a 150 larvas de carrapatos, foram imersas em soluções de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 25, 35, 50, 75 e 100 ppm de ivermectina, durante dez minutos. A partir da CL_{50} de cada uma das cepas foi calculado o FR da seguinte forma:

$$FR = CL_{50} \text{ cepa resistente (Juarez)} / CL_{50} \text{ cepa suscetível de referência (Mozo)}$$

Os dados de mortalidade foram analisados como descrito no Capítulo 2. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Polo Plus, seguindo o modelo Probit, detalhado no capítulo anterior. Foram determinados os intervalos de confiança de 95% para a CL_{50} e para o FR. As diferenças foram consideradas significativas sempre que os intervalos de confiança não se sobrepuseram.

3.2. Extração de RNA e sequenciamento

Um ensaio independente do TIL foi realizado para a obtenção do RNA a partir de larvas de *R. microplus*. Larvas da cepa Mozo e da cepa Juarez foram expostas a 0, 10, e 100 ppm de Ivermectina. As larvas sobreviventes foram utilizadas para a extração de RNA. O RNA total foi extraído com reagente TRIzol®, segundo as recomendações do fabricante com algumas modificações. As larvas sobreviventes de cada ensaio foram imersas em 1 mL de reagente TRIzol® e maceradas. Logo após, a mistura foi centrifugada a 10.000 g, a 4ºC por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Um volume de 100 µl de clorofórmio foi adicionado. Essa solução foi homogeneizada, incubada a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugada a 10.000 g por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado. Foram adicionados 250 µl de isopropanol e o material foi incubado por período de 14 a 16 horas a -20º C. As amostras foram centrifugadas

novamente por 15 minutos a 4ºC. O isopropanol foi descartado e, para a lavagem do precipitado, foram acrescentados 250 µl de etanol 75%. Após a homogeneização, uma nova centrifugação foi realizada a 7.500 g por 5 minutos a 4ºC. Após descarte do etanol, o precipitado foi deixado a temperatura ambiente até a completa secagem. Logo após, o RNA foi ressuspendido em 20 µl de água DEPC, incubado por 10 minutos a 55ºC e quantificado. O RNA foi conservado a -80ºC.

O material obtido foi sequenciado na plataforma Illumina, pela equipe de sequenciamento oferecido pelo Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) - Universidade de São Paulo (USP).

3.3. Pré-processamento das sequências brutas

O processamento das sequências brutas foi realizado com o programa Trimommatic (Bolger *et al*., 2014) para encontrar e excluir regiões de baixa qualidade (valor menor que 15) dentro de janelas deslizantes na sequência com tamanho de 4 nucleotídeos. Foi realizada também uma verificação adicional de presença de adaptadores. Foram descartadas as sequências que, após a exclusão de regiões de baixa qualidade, apresentaram menos de 20 nucleotídeos.

3.4. Montagem do transcriptoma

A montagem *de novo* do transcriptoma foi realizada com software Trinity (Grabherr *et al*., 2011). Para formar uma coleção de sequências contíguas lineares (*contigs*), utilizando as *reads* sem um genoma de referência, foram utilizados os parâmetros padrão do programa, com exceção do número de processadores e memória (foi utilizada a capacidade computacional máxima). Além disso, foi utilizada a opção "normalize_reads" para a realização de uma normalização *in silico* das *reads*. A normalização se dá pela exclusão de parte das *reads* de regiões com maior cobertuta. Esse passo é importante para reduzir a complexidade dos dados e, consequentemente, os requerimentos e temoi computacional. O tamanho mínimo dos *contigs* foi 200 pb.

Após a montagem, foi realizada uma avaliação do transcriptoma por meio do programa BUSCO (Simão *et al.,* 2015), que fornece medições quantitativas da completude da montagem. O programa procura *contigs* completos, fragmentados,

simples e duplicados utilizando uma base de dados de artrópodes contendo 2675 sequências codificantes.

3.5. Alinhamento das *reads* aos *contigs* recém-montados

Após a montagem, foi construído um banco de sequências de referência a partir dos *contigs* resultantes da montagem. O alinhamento das *reads* contra a referência foi realizado com o programa Bowtie (Langmead et al., 2009). As *reads* obtidas a partir de cada condição experimental foram alinhadas separadamente.

A contagem das *reads* que alinharam contra cada *contig* em cada condição, foi realizada utilizando um *script* em Perl (Bowtie_parser.pl, disponível em http://biologia.ib.usp.br/torres/Valeria.html). O *script* gera uma tabela com os nomes dos *contigs* estabelecidos pelo programa Trinity e o número de número de *reads* alinhadas a cada um deles. Esse valor (o número de *reads* alinhadas contra cada *contig*) foi utilizado como seu nível de expressão (após normalização pelo tamanho da biblioteca). As *reads* mapeadas a dois ou mais *contigs* foram consideradas ambíguas e foram desconsideradas na contagem. Por outro lado, *reads* mapeadas a dois ou mais *contigs* representando o mesmo gene (diferentes alelos ou diferentes isoformas) foram consideradas.

Com os níveis de expressão de cada *contig* obtidos, foram construídas tabelas para cada par de amostras. As comparações par a par entre condições foram:

- Mozo 0 ppm-Mozo10 ppm
- Juarez 0 ppm-Juarez 10 ppm
- Juarez 0 ppm-Juarez 100 ppm
- Juarez 10 ppm- Juarez 100 ppm
- Mozo 0 ppm- Juarez 0 ppm
- Mozo 10 ppm- Juarez 10 ppm

As tabelas combinadas para cada comparação foram utilizadas nas análises subsequentes para determinar níveis significativos de expressão diferencial.

3.6. Análises de expressão diferencial

Para as análises de expressão diferencial foi utilizado o programa EdgeR (Robinson *et al.*, 2009) que permite determinar se a expressão média em uma condição experimental é significativamente diferente da expressão média em uma condição diferente, usando um modelo de distribuição binomial negativa. O programa EdgeR testa a diferença de expressão de cada gene entre grupos, com um teste exato.

Para as análises de expressão diferencial foram utilizadas, como arquivos de entrada, as tabelas com as comparações par a par mencionadas no parágrafo anterior. Cada uma das condições foi testada em comparação às outras, e foram determinados os *contigs* diferencialmente expressos para cada uma delas.

3.7. Anotação

Para o processo de anotação foram construídos três bancos de dados para os alinhamentos locais: um banco de EST, um banco de nucleotídeos e um banco de dados de proteínas. As sequências utilizadas eram provenientes de carrapatos ixodídeos e estavam publicamente disponíveis no Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/).

Para a anotação, os genes diferencialmente expressos foram alinhados separadamente contra as sequências dos três bancos de dados utilizando o pacote BLAST+ (Camacho *et al.,* 2009) por meio de alinhamentos locais. Para o alinhamento com bases de dados de EST e nucleotídeos, foi utilizado o algoritmo blastn, e para o alinhamento com banco de dados de proteínas, foi utilizado o algoritmo blastx, ambos incluídos no pacote BLAST+ (Camacho *et al.,* 2009).

Os alinhamentos foram realizados com a opção megablast (para sequências altamente similares), e com um e-value máximo de 0,0001. O restante dos parâmetros utilizados foram aqueles estabelecidos como padrão do programa. Posteriormente, foi selecionado o subconjunto de alinhamentos que apresentavam pelo menos 40% de similaridade por meio do script Blast_parser.pl (disponível em http://biologia.ib.usp.br/torres/Valeria.html).

Sendo que os alinhamentos mais informativos foram aqueles procedentes dos bancos de dados de proteínas, as anotações que serão descritas estão baseadas nos alinhamentos contra ele.

3.8. Análise de enriquecimento de termos de Ontologia Gênica (GO)

Os transcritos diferencialmente expressos foram anotados utilizando o banco de dados *de Ixodes scapularis* (Gulia-Nuss *et al.,* 2016). O conjunto de genes anotados foram utilizados para a obtenção dos termos GO, disponível na base de dados de ontologia do GO liberada no dia 22 de agosto de 2016, disiponível no Gene Ontoloy Consortium (http://geneontology.org/).

O enriquecimento dos termos GO dos genes anotados foi testado utilizando o algoritmo da plataforma Panther (Protein Analysis Through Evolutionary Relatinships) versão 10.0 (Mi *et al.,* 2016). O teste foi baseado na diferença do número de ocorrência dos termos entre os *contigs* diferencialmente expressos e sua ocorrência no genoma de *I. scapularis*, já que o genoma de *R. microplus* ainda não está completamente sequenciado e anotado. Foi testado o enriquecimento de três conjuntos de termos GO: processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares. Foi utilizada a correção de Bonferroni para testes múltiplos e foram considerados apenas os termos que apresentaram um valor de p corrigido < 0,05.

3.9. Ensaio de dose-resposta

Para a obtenção do material para sequenciamento, foi realizado um teste de dose resposta (Figura 3.1). Por meio dele, foram determinadas a CL50 e a CL90 das duas cepas de referência suscetível e resistente (Mozo e Juarez). Com esses valores, os fatores de resistência correspondentes a ambas concentrações letais foram calculados (Tabela 3.1). Para A CL50 foi determinado um fator de resistência de 3,796 (95% IC = 3,365-4,283) e para a CL90 foi determinado um fator de resistência 5,041 (95% IC = 3,987 a 6,372). Em ambos os casos, é possível observar que a cepa Juarez é resistente em relação à cepa Mozo.

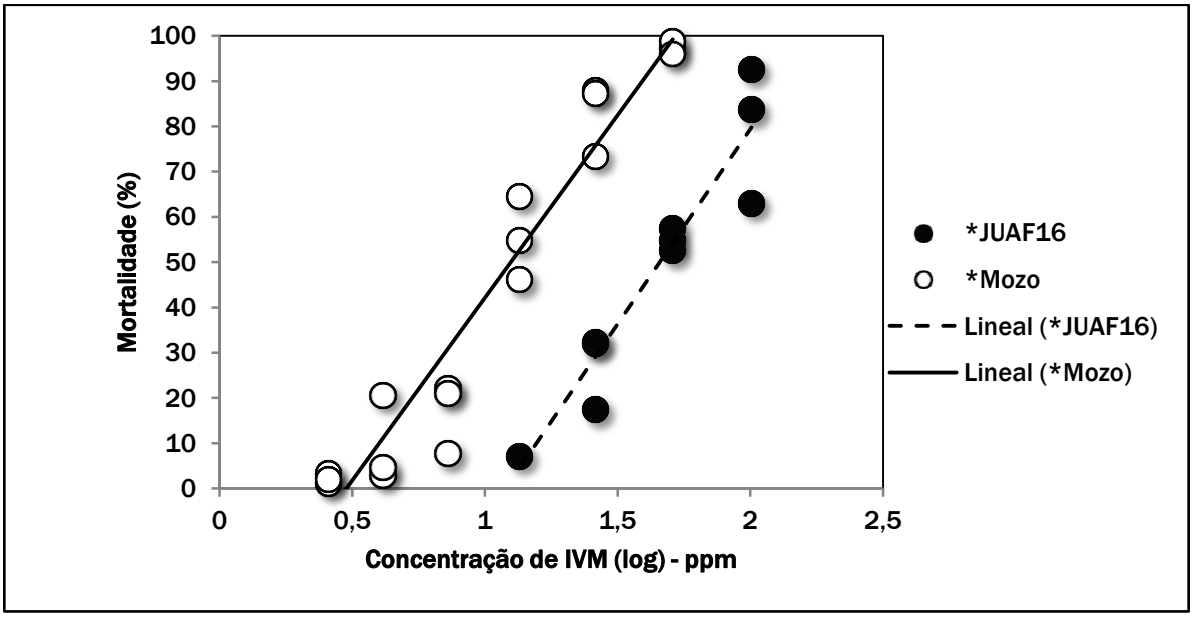

Figura 3.1. Curva de dose-resposta exibindo a porcentagem de mortalidade das cepas Mozo e Juarez em relação aos logaritmos de concentrações crescentes de Ivermectina, entre 0ppm e 100 ppm.**Tabela 3.1.** Resultados do ensaio de dose-resposta com Ivermectina conduzidos com *R. microplus* da cepa Mozo (suscetível) e Juarez (resistente).

Cepa	N	Inclinação da reta de regressão	CL 50	IC	FR	CL90	IC	FR
Juarez (F16)	996	2,162+-0,139	43,174	34,245-54,716	3,79	169,053	116,430-318,473	5,04
Mozo	2085	2,729+-0,099	11,374	9,715-13,467		33,538	26,509–45,688	

N: número de larvas tratadas; CL: tempo letal; IC: intervalo de confiança.

3.10. Pré-processamento das sequências brutas

O RNA total foi extraído a partir das larvas sobreviventes dos TIL em cada experimento com diferentes concentrações de ivermectina (Tabela 3.2). As larvas da cepa suscetível apresentaram 100% de mortalidade com 100 ppm de ivermectina.

A partir do sequenciamento, foram obtidos 170.180.729 pares de sequências (Tabela 3.2). Cada fragmento foi sequenciado nos dois sentidos obtendo dois tipos de sequência, as sequências R1 e R2. O sequenciamento realizado não foi direcional (não é possível saber a orientação do sequenciamento) e, por esta razão, a atribuição das *reads* a R1 ou R2 é arbitrária.

Após a avaliação da qualidade das sequências brutas e corte das regiões de baixa qualidade, foram descartadas 0,0128% das sequências (Tabela 3.2). Algumas *reads* passam a não apresentar seu par correspondente, as chamadas *singles,* após a seleção de sequências por qualidade. Isso acontece quando uma das sequências, R1 ou R2, é muito pequena e/ou constituída predominantemente de adaptadores e é excluída. Essas sequências não foram incluídas na montagem do transcriptoma por representar uma fração mínima de todas as sequências obtidas (1,82 %).

3.11. Montagem do transcriptoma

Para gerar um conjunto de transcritos de referência para o alinhamento das *reads* e obtenção dos níveis de expressão, foi realizada a montagem das sequências. Excluindo as sequências sem par, foram obtidas 360.942 sequências contíguas ou *contigs* com pelo menos 200 pb. O conjunto final de *contigs* inclui, não somente os transcritos de *R. microplus*, mas também de toda a microbiota associada. Além disso, isoformas e alelos diferentes são mantidos como *contigs* diferentes. Uma avaliação da montagem foi realizada por meio da comparação dos *contigs* montados a um conjunto de transcritos conservados em artrópodes (grupos BUSCO). A maior parte dos contigs observados consiste de completos duplicados (46,06 %). Apenas 8,63% dos transcritos não foram amostrados (Tabela 3.3).

Tabela 3.2. Resultados sumarizados para cada cepa nas condições experimentais distintas. São apresentados os resultados brutos de sequenciamento na plataforma Illumina para cada cepa, o número e porcentagem de sequências que sobreviveram ao corte de qualidade e o número de sequências que foram alinhadas ao conjunto de contigs montados.

Concentração de Ivermectina	Juarez			Mozo		Total
	0 ppm	10 ppm	100 ppm	0 ppm	10 ppm	
Número de larvas sobreviventes[1]	377	411	39	776	761	-
Mortalidade	4,3%	13,03%	89,9%	5,2%	24,8%	-
Sequências Brutas (pares)	38 579 182	30 922 799	30 241 899	36 081 002	34 355 847	170 180 72
Sequências Processadas (pares)[2]	37 855 524 (98,12%)	30 364 294 (98,19%)	29 634 897 (97,99%)	35 455 161 (98,26%)	33 744 597 (98,22%)	167 054 47 (98,16%)
Sequências R1 não pareadas[3]	698 054 (1,81%)	538 098 (1,74%)	588 134 (1,94%)	603 114 (1,67%)	588 623 (1,71%)	3 016 023 (1,77%)
Sequências R2 não pareadas[3]	20 550 (0,05%)	16 632 (0,05%)	15 742 (0,05%)	18 528 (0,05%)	18 149 (0,05%)	89 601 (0,05%)
Sequências alinhadas (pares)[4]	19 919 155 (52,62%)	16 215 819 (53,40%)	18 247 737 (61,58%)	20 553 968 (57,97%)	19 874 679 (58,90%)	94 811 358 (56,75%)

[1] Larvas sobreviventes ao teste de imersão larval a 10 e 100 ppm de Ivermectina. Todas as larvas sobreviventes foram utilizadas para o experimento de RNA-Seq.
[2] Sequências pareadas que passaram pelos filtros de qualidade e tamanho.
[3] Sequências não-pareadas que passaram pelos filtros de qualidade e tamanho (não foram utilizadas nos passos subsequentes).
[4] Sequências pareadas que alinharam aos contigs montados. A porcentagem foi calculada a partir do número de sequências pareadas processadas.

Tabela 3.3. Resultados da avaliação da montagem do transcriptoma.

Nº de contigs	Qualidade dos contigs
968 (36,19%)	Únicos completos
1232 (46,06%)	Completos duplicados
244 (9,12 %)	Fragmentados
231 (8,63%)	Não alinhados
2675	Grupos BUSCO procurados

3.12. Alinhamento das *reads* aos *contigs* recém-montados

Os 360.942 *contigs* foram utilizados para criar o banco de referência para o alinhamento das *reads*. As *reads* obtidas a partir de cada condição experimental foram alinhadas separadamente. A eficiência do alinhamento obtida por meio do programa Bowtie (Langmead *et al.,* 2009) foi de 52,6 a 61,6 (Tabela 3.2). A eficiência do mapeamento foi baixa pois muitos *contigs* menores que 200 pb foram descartados da análise por serem pouco informativos nos passos subsequentes.

3.13. Análises de expressão diferencial.

Após o alinhamento, foi realizada a contagem das *reads* que alinharam contra cada *contig*, em cada condição. O número de *reads* alinhadas a cada *contig* é proporcional ao número de transcritos. Isso nos permite utilizar o número absoluto de *reads* alinhadas ao *contig* como o nível de expressão do transcrito e esse valor precisa apenas ser corrigido pelo tamanho da biblioteca, evitando distorções técnicas, o que poderia acontecer se fossem obtidas muito mais *reads* para uma condição que para outra (Robinson & Oshlack, 2010). Como não temos uma identificação prévia da identidade desses transcritos, utilizamos o *contig* como unidade de teste. Uma vez contadas as *reads* alinhadas a cada *contig*, testamos as diferenças de contagens entre as condições par-a-par. Realizamos dois tipos de comparações:

a) entre concentrações diferentes de Ivermectina dentro da mesma cepa. Nessas comparações, buscamos entender quais são os genes que têm a expressão alterada por decorrência do contato com o acaricida. Dentro desta classe estão as seguintes comparações:

- Mozo 0 ppm-Mozo10 ppm
- Juarez 0ppm-Juarez 10 ppm
- Juarez 0ppm-Juarez 100 ppm
- Juarez 10 ppm- Juarez 100 ppm

b) entre cepas com iguais concentrações de ivermectina: nessas comparações pretendemos identificar quais são as diferenças entre as duas cepas. Dentro dessa classe estão as seguintes comparações:

- Mozo 0ppm- Juarez 0 ppm
- Mozo 10 ppm- Juarez 10 ppm

Na comparação dentro da mesma cepa, a menor diferença foi obtida (em número de *contigs* diferencialmente expressos) entre as concentrações de 0 ppm e 10 ppm da cepa Juarez (Tabela 3.4). Uma resposta muito maior foi observada na comparação entre concentrações de 0 ppm e 100ppm dentro da cepa Juarez (Tabela 3.4), apresentando o maior número de *contigs* diferencialmente expressos, 2936. Nas comparações entre cepas, o maior número de *contigs* diferencialmente expressos, 2952, se encontra na comparação a 10 ppm de ivermectina (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Número de *contigs* diferencialmente expressos entre cepas a iguais concentrações de ivermectina e nas mesmas cepas expostas a diferentes concentrações de ivermectina.

Comparações	Número de *contigs* diferencialmente expressos	Subexpressos	Superexpressos
Mozo 0 - Mozo 10	394	133	261
Juarez 0 - Juarez 10	25	3	22
Juarez 0 - Juarez 100	2936	1743	1193
Juarez 10 - Juarez 100	2146	1270	876
Mozo 0 - Juarez 0	2576	1270	1306
Mozo 10 - Juarez 10	2952	1618	1334

Em média, *os contigs* apresentaram uma razão de aumento de expressão de 2,02 vezes. Os dez *contigs* mais diferentes entre as condições tiveram valores de -618,50 a 46,14 vezes.

3.14. Anotação

A anotação consiste em atribuir uma identidade aos *contigs* montados. Uma das formas de realizar essa etapa é comparando as sequências de interesse com sequências já caracterizadas e depositadas em bancos públicos de sequências. Foram

anotados os genes diferencialmente expressos nas seis comparações, que incluem as comparações entre cepas e entre diferentes concentrações de ivermectina. A lista completa dos *contigs* diferencialmente expressos anotados está disponível no endereço eletrônico http://biologia.ib.usp.br/torres/Valeria.html.

3.14.1. Genes diferencialmente expressos na mesma cepa entre diferentes concentrações de ivermectina

a) Mozo 0 ppm Ivermectina - Mozo 10 ppm Ivermectina

Nessa comparação, 399 *contigs* foram diferencialmente expressos. Entre eles, 18 foram anotados. O *contig* com a maior diferença entre os dois tratamentos foi anotado como citocromo oxidase subunidade 1, um gene do genoma mitocondrial. A expressão desse gene teve uma diminuição de 618 vezes como resposta ao tratamento com 10 ppm de ivermectina. Analisando apenas os 10 *contigs* anotados com a maior diferença entre as amostras há uma diminuição observada de 3,7 a 628 vezes e um aumento que vai de 4,9 a 13 vezes no nível de expressão dos transcritos representados por esses *contigs* no tratamento da cepa Mozo com 10 ppm de ivermectina (Tabela 3.5). Alguns genes foram bem caracterizados e suas funções serão descritas a seguir. Alguns deles podem estar relacionados à resistência.

1. *Cytochrome oxidase subunit 1 (mitochondrion)* [Subunidade 1 da citocromo oxidase (mitocôndria)]

Do ponto de vista estrutural, a citocromo oxidase é um complexo protéico transmembrana que possui entre cinco a treze subunidades, dez das quais estão codificadas por genes nucleares em eucariotos, e as três restantes, por genes mitocondriais. A subunidade 1 é codificada por um gene mitocondrial, o COI. A subunidade 1 da citocromo oxidase é a principal unidade catalítica da enzima (Denis, 1986).

Tabela 3.5. Dez *contigs* anotados com maior diferença de expressão entre a cepa Mozo controle e a capa Mozo tratada com 10 ppm de Ivermectina. São apresentados os níveis de expressão (considerando o *fold change* (FC) e o número absoluto de *reads* alinhados aos *contigs*) dos genes anotados com maior diferença de expressão e os *contigs* correspondentes.

Contig	Anotação	Fold Change	Nº de reads[1] Mozo0	Nº de reads[1] Mozo10	p-valor
c123311_g1_i1	cytochrome oxidase subunit 1 (mitochondrion) [Ixodes vespertilionis]	-618,50	14274	20	$1,91x10^{-51}$
c132059_g1_i1	metalloprotease, putative [Ixodes scapularis]	-6,50	35	149	$8,27x10^{-8}$
c132584_g1_i1	hypothetical protein IscW_ISCW022773 [Ixodes scapularis]	-3,75	298	847	$7,17x10^{-6}$
c133189_g1_i2	putative na+/dicarboxylate na+/tricarboxylate and phosphate transporter [Amblyomma triste]	-3,73	60	187	$3,86x10^{-5}$
c133483_g1_i1	Putative tick transposon, partial [Rhipicephalus pulchellus]	-3,8	89	287	$1,60x10^{-5}$
c125790_g1_i1	putative secreted protein [Amblyomma triste]	4,87	28	91	$4,44x10^{-6}$
c130973_g1_i2	Putative acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase [Ixodes ricinus]	6,54	83	234	$2,62x10^{-8}$
c131011_g1_i2	Putative lipoprotein amino terminal region [Rhipicephalus pulchellus]	7,00	152	398	$1,76x10^{-8}$
c140161_g3_i1	cysteine-rich protein 2 [Rhipicephalus microplus]	7,90	49	142	$1,37x10^{-9}$
c140814_g2_i1	Putative metastriate one of each protein family [Rhipicephalus pulchellus]	13,16	2438	5808	$3,41x10^{-15}$

[1]Número de sequências alinhadas em cada condição.

A citocromo oxidase, normalmente, faz parte da cadeia de transporte de elétrons, recebendo-os do citocromo c e passando-os para o último elemento da cadeia: o oxigênio (Denis, 1986), mas também pode assumir funções de desintoxicação metabólica em artrópodes. Particularmente a subunidade1 tem sido investigada em *Blattella germanica*. Pridgeon e Liu (2003) encontraram a subunidade 1 da citocromo oxidase diferencialmente expressa entre duas linhagens de barata: uma resistente a piretróide e outra suscetível. Em tecidos de abdômen foram encontrados níveis de mRNA da subunidade 1 até três vezes maiores na linhagem resistente em relação a linhagem suscetível. Neste trabalho, esta enzima é encontrada 618,5 vezes menos expressa na cepa suscetível exposta a 10 ppm de ivermectina quando comparada à mesma cepa a 0 ppm de acaricida. Este fato é interessante e contrário ao esperado quando consideramos o trabalho acima descrito, pois esperaríamos que o contato com o acaricida desencadeasse a expressão da enzima se considerarmos que esta tem sido envolvida na resistência em baratas.

Pridgeon e Liu (2003) destacam o envolvimento de COI na geração de ATP e consideram a enzima como chave na fosforilação oxidava em neurônios, levando em consideração que a redução da função de COI é importante na depolarização dos neurônios. A função de COI na resistência a inseticidas ainda não tem sido bem estudada mas estes autores sugerem relação entre a superexpressão da COI e a capacidade oxidava neuronal em cérebros de mamíferos que, quando inibida, leva a morte celular. Além disso apresentam evidências da mesma enzima estar envolvida na resistência de *Schistosoma mansoni* ao praziquantel, droga utilizada no controle da esquistossomose.

2. *Metalloprotease, putative* (Metaloprotease)

As metaloproteases são uma família multigênica expressa nas glândulas salivares dos carrapatos. Quando eles se alimentam, precisam evitar as defesas do hospedeiro, que incluem barreira física dos tecidos (cutícula), dor, homeostase e as respostas imune e inflamatória. Durante esse processo, a secreção de metaloproteases na saliva do carrapato é induzida. Essas enzimas, por meio da fibrinólise, são capazes de remodelar a estrutura dos tecidos do hospedeiro e digerir componentes estruturais, que podem provocar hemorragias (Decrem *et al*., 2008).

O *contig* correspondente a esse gene foi 6,5 vezes menos expresso na cepa Mozo a 10 ppm de ivermectina quando comparada à cepa exposta a 0 ppm de ivermectina. O significado dessa resposta em relação a possíveis mecanismos de resistência não é claro, mas a ivermectina parece conduzir à uma diminuição da expressão da enzima. O efeito tóxico da molécula poderia interferir nos processos fisiológicos importantes do carrapato, como a secreção das substâncias bioativas da saliva.

3. *Putative na+/dicarboxylate na+/tricarboxylate and phosphate transporter* (transportador de na+/dicarboxilato na+/tricarboxilato e fosfato)

A proteína codificada por esse gene é classificada como uma permease e é descrita no VectorBase como integrante do genoma de *I. scapularis* (ISCW015195). Essa enzima transloca sódio, arseniato, sulfato, antimônio e ânions orgânicos através de membranas biológicas. Ela possui de 8 a 13 hélices transmembrana que podem funcionar independentemente como transportadores quimiosmóticos ou unidades

formadoras de canais de bombas aniônicas dependentes de ATP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8043648).

Essa permease se encontra 3,7 vezes menos expressa na cepa suscetível exposta a 10 ppm de Ivermectina do que na condição controle. Considerando que a Ivermectina é uma molécula orgânica, a enzima transportadora poderia ser responsável pelo seu transporte através das membranas celulares. Dessa forma, a diminuição de sua expressão poderia ser uma resposta para diminuir a permeabilidade das membranas ao carrapaticida.

4. *Putative tick transposon* (Transposon)

O genoma de *R. microplus* é complexo e comporta varias regiões altamente repetitivas. Tem sido demonstrada a presença de elementos repetitivos como Ruka SINE, previamente identificado em *Rhipicephalus appendiculatus,* e outras repetições como LINEs L2 e R1, LTR Gypsy e transposons de DNA. Cerca de 30% do genoma de *I. scapularis* contém elementos transponíveis de classe I e II em numerosas cópias. Nessa espécie também foi identificado o elemento LTR Gypsy. Considerando o alto número de regiões repetitivas é esperado que numerosos transcritos apresentem essas repetições. Mas isso não explica por que a cepa suscetível a 10 ppm de ivermectina apresenta transcritos derivados de transposons 3,7 vezes menos expressos do que a mesma cepa a 0 ppm de ivermectina. Em *D. melanogaster* resistente ao DDT a inserção do elemento transponível Accord no gene *Cyp6g1* tem sido relacionada ao aumento da transcrição deste gene responsável pela resistência ao inseticida (Daborn *et al*., 2002), mas estudos relacionados à superexpressão do próprio elemento não foram encontrados. Além disso, este trabalho mostra que a exposição ao acaricida da cepa Mozo leva à sub-expressão do transposon e não há uma relação entre um aumento da concentração de ivermectina e um aumento da expressão do transposon.

5. *Acetylcholinesterase/Butirylcholinesterase* (Acetilcolinesterase - AChE / Butirilcolinesterase BChE)

A AChE é uma enzima que degrada o neurotransmissor acetilcolina nas junções nervosas. Quando isso acontece, o influxo de sódio para os neurônios é interrompido, o que permite a sua função normal. Organofosforados e carbamatos inibem a função normal desta enzima. Com isso, a acetilcolina permanece ligada ao canal, e o sódio

entra na célula de forma permanente conduzindo a paralisia muscular (ffrench-Constant *et al.*, 2004). Mutações no sítio alvo dessa enzima têm sido associadas à resistência a pesticidas. Além disso, o aumento de expressão da AChE mutada em *T. urticae*, devido a um incremento no número de cópias gênicas, foi associado à resistência ao OF monocrotofós.

Neste trabalho encontramos AChE/BChE 6,5 vezes mais expressas em larvas de *R. microplus* suscetíveis expostas a 10 ppm de ivermectina quando comparadas com o controle. Considerando os relatos de envolvimento dessas enzimas na resistência a substâncias tóxicas, a superexpressão representa uma resposta da cepa Mozo (suscetível) à exposição à ivermectina desencadeando o aumento da expressão destas enzimas. Na condição controle também observamos a expressão de AChE/BChEA, portanto uma expressão constitutiva é revelada neste trabalho. Essas observações indicam que mesmo sendo suscetíveis à ivermectina, os carrapatos são capazes de responder à presença do pesticida por meio do aumento da expressão de enzimas desintoxicadoras.

6. *Putative lipoprotein amino terminal region* (Região amino terminal de lipoproteína)
De acordo com o banco de dados do UniProtKB, a proteína codificada por esse gene é em transportador de lipídeos. Ela permite a movimentação de lipídeos dentro das células, para dentro ou fora delas, ou entre células. Os registros no banco de dados correspondem a dois números de acesso, L7LWI3 e L7M721, ambos com atividade de transporte de lipídeos. Existem poucos estudos em carrapatos, mas duas lipoproteínas hemolinfáticas foram detectadas em *Dermacentor variabilis* e *Ornithodoros parkeri* (Gudderra *et al.,* 2001, Gudderra *et al.,* 2002).

Neste trabalho a lipoproteína anotada apresenta uma expressão 7 vezes maior na cepa suscetível a 10 ppm de ivermectina do que na condição controle. Considerando que a ivermectina é uma molécula lipossolúvel, a sua presença poderia estar ativando os sistemas de transporte da hemolinfa para conduzir a ivermectina a órgãos específicos onde o efeito tóxico possa ser neutralizado. A presença de uma molécula exógena na circulação poderia disparar os mecanismos de transporte.

b) Juarez 0 ppm Ivermectina - Juarez 10 ppm Ivermectina

Na comparação dentro da cepa Juarez, entre 0 e 10 ppm de Ivermectina, um único contig foi anotado. Trata-se de uma proteína sem função definida identificada como *putative secreted protein precursor* (Tabela 3.6). Devido à pouca informação disponível para esse gene, não foi possível atribuir uma função a este *contig*. Consequentemente, também não é possível conjeturar um significado para a super-expressão de 8,06 vezes na cepa Juarez a 10 ppm de Ivermectina em relação à condição controle, e como esta diferença pode ser relacionada à resposta a Ivermectina.

c) Juarez 0 ppm Ivermectina - 100 ppm Ivermectina

Nessa comparação 3442 *contigs* foram diferencialmente expressos, demonstrando uma maior diferença na cepa Juarez entra 0 e 10 ppm de Ivermectina do que na mesma cepa a 0 e 10 ppm de Ivermectina. Dos *contigs* diferencialmente expressos, 487 foram anotados. Nessa comparação, a maior diferença também foi observada na expressão do gene citocromo oxidase subunidade 1, mas, ao contrário da comparação na cepa Mozo, há um aumento na expressão do gene com a exposição à ivermectina. Dentre os 10 *contigs* com maior diferença na expressão, observamos uma razão entre níveis de expressão que vai de 6 a 7, para genes com diminuição na expressão com o tratamento; e de 14 a 31 para os genes com aumento no nível de expressão (Tabela 3.6). É possível discutir as funções de alguns genes, bem como seu envolvimento na resistência.

1. Dicer-1, putative (Dicer)

As proteínas Dicer são endoribonucleases ou helicases que clivam RNA de dupla fita e pre-microRNA em RNAs de cadeia curta. Os fragmentos gerados são porções de 20 a 25 pares de bases (small interferring RNA) capazes de silenciar a expressão de outros mRNAs. Portanto, as helicases Dicer são importantes na regulação da expressão gênica (Lee *et al.,* 2004) Aqui, são encontradas 6,3 vezes menos expressas na cepa Juarez exposta a 100 ppm de ivermectina como resposta ao aumento da ivermectina, sem que seja possível estabelecer uma relação funcional direta entra a função das helicases Dicer e o incremento da concentração da ivermectina.

Tabela 3.6. *Contigs* anotados com maior diferença de expressão nas comparações par-a-par da cepa Juarez tratada com diferentes concentrações de Ivermectina (0, 10 e 100 ppm de Ivermectina). São apresentados os níveis de expressão (considerando o *fold change* (FC) e o número absoluto de *reads* alinhados aos *contigs*) dos genes anotados com maior diferença de expressão e os *contigs* correspondentes.

Contig	Anotação	Fold Change	Nº de reads[1] Jua0	Nº de reads[1] Jua10	Nº de reads[1] Jua100	p-valor
Juarez 0 ppm Ivermectina - Juarez 10 ppm Ivermectina						
c135980_g1_i2	putative secreted protein precursor, partial [Amblyomma triste]	8,06	53	328	-	$4,95x10^{-10}$
Juarez 0 ppm Ivermectina - Juarez 100 ppm Ivermectina						
c144010_g1_i1	Hypothetical protein, partial [Rhipicephalus pulchellus]	-7,00	180	-	21	$1,17x10^{-7}$
c142912_g1_i2	putative gtpase rab1/ypt1 small g protein superfamily [Amblyomma parvum]	-6,60	266	-	33	$4,47x10^{-8}$
c141542_g3_i1	dicer-1, putative [Ixodes scapularis]	-6,32	171	-	22	$4,02x10^{-7}$
c138246_g1_i1	Putative glycine rich protein [Rhipicephalus pulchellus]	-6,03	747	-	101	$1,43x10^{-8}$
c143663_g1_i1	putative rna polymerase i second largest subunit, partial [Ixodes ricinus]	-6,03	451	-	61	$3,37x10^{-8}$
c145136_g1_i1	Putative lipoprotein amino terminal region [Rhipicephalus pulchellus]	14,52	478	-	5668	$8,04x10^{-17}$
c132585_g1_i1	Hypothetical protein [Rhipicephalus pulchellus]	15,89	66	-	858	$2,61x10^{-16}$
c140153_g1_i1	Putative bitil peptide [Rhipicephalus pulchellus]	18,26	20	-	300	$3,81x10^{-15}$
c128865_g3_i7	Putative similar to chymotrypsin-elastase inhibitor ixodidin [Rhipicephalus pulchellus]	28,57	52	-	1216	$1,23x10^{-21}$
c123311_g1_i1	cytochrome oxidase subunit 1 (mitochondrion) [Ixodes vespertilionis]	31,00	42	-	1066	$5,09x10^{-22}$
Juarez 10 ppm Ivermectina - Juarez 100 ppm Ivermectina						
c142912_g1_i2	putative gtpase rab1/ypt1 small g protein superfamily [Amblyomma parvum]	-5,77	-	188	33	$4,04x10^{-7}$
c141157_g4_i1	hypothetical protein [Amblyomma maculatum]	-5,49	-	147	28	$1,55x10^{-6}$
c139115_g1_i1	putative sterol reductase/lamin b receptor [Amblyomma triste]	-5,47	-	183	35	$8,38x10^{-7}$
c129469_g2_i1	Putative integral to membrane [Rhipicephalus pulchellus]	-5,38	-	103	20	$6,18x10^{-6}$
c137058_g3_i4	Putative sulfotransferase [Rhipicephalus pulchellus]	-5,24	-	330	66	$3,08x10^{-7}$
c131894_g1_i6	hypothetical protein [Amblyomma maculatum]	21,04	-	18	400	$5,31x10^{-16}$

Tabela 3.6 (continuação). *Contigs* anotados com maior diferença de expressão nas comparações par-a-par da cepa Juarez tratada com diferentes concentrações de ivermectina.

Contig	Anotação	Fold Change	Nº de reads[1] Jua0	Nº de reads[1] Jua10	Nº de reads[1] Jua100	p-valor
c131377_g1_i1	putative unknown product, partial [Ixodes ricinus]	22,04	-	27	627	$1,11x10^{-17}$
c130490_g3_i1	Putative similar to chymotrypsin-elastase inhibitor ixodidin [Rhipicephalus pulchellus]	24,25	-	25	639	$2,31x10^{-18}$
c123311_g1_i1	cytochrome oxidase subunit 1 (mitochondrion) [Ixodes vespertilionis]	42,13	-	24	1066	$1,25 \times 10^{-23}$
c128865_g3_i7	Putative similar to chymotrypsin-elastase inhibitor ixodidin [Rhipicephalus pulchellus]	46,14	-	25	1216	$1,12 \times 10^{-24}$

[1]Número de sequências alinhadas em cada condição, Jua: Juarez.

2. *Putative glycine rich protein* (Proteinas ricas em glicina)

Essa família de proteínas, presentes tanto em procariotos como eucariotos, contem mais de 60% de glicina. Em insetos, fazem parte das proteínas cuticulares (Mousavi & Hotta, 2005). A expressão 6 vezes menor na cepa Juarez exposta a 100 ppm de Ivermectina em relação ao controle observada neste trabalho, contrasta com as observações realizadas em *Leptinotarsa decemlineata* por Zhang *et al.* (2008), que detectaram a superexpressão dessas proteínas induzidas pela presença do pesticida azifosmetil (OF). Níveis de expressão maiores também foram observados em linhagens resistentes a azifosmetil de *L. decemlineata* em relação a linhagens suscetíveis. Seguindo estas observações, seria esperado que a exposição a concentrações maiores de ivermectina conduzisse à superexpressão dessas proteínas. Porém este fato não se verifica neste trabalho. Mesmo assim, podemos afirmar que a expressão diminuída na cepa Juarez a 100 ppm de Ivermectina em relação à condição controle representa uma resposta ao aumento da concentração de acaricida sendo preciso explorar outras possibilidades para as funções dessas proteínas.

3. *Putative lipoprotein amino terminal region* (Região amino terminal de lipoproteína)

Como mencionado anteriormente, os lipídeos precisam de lipoproteínas para circular na hemolinfa devido a sua hidrofobicidade (Cunningham *et al.,* 2007). Na comparação dentro da cepa Juarez, o *contig* mapeado a esse gene apresentou uma expressão 14,2 vezes maior quando as larvas foram expostas a 100 ppm e Ivermectina que na

condição controle. Como no caso da cepa suscetível Mozo, a presença da ivermectina desencadeia a expressão das lipoproteínas, possívelmente ativando o transporte da Ivermectina na hemolinfa, uma molécula liposolúvel que poderia precisar de lipoproteínas para seu transporte.

4. *Putative similar to Chymotrypsin-elastase inhibitor ixodidin* (Similar a inibidor de quimotripsina e elastase Ixodidina)

A ixodidina é um peptídeo antimicrobiano, rico em cisteína, que apresenta atividade inibitória proteolítica contra duas serina-proteases exógenas: quimotripsina e elastase. Tem um papel importante na resposta imune dos artrópodes. Presente na hemocele, é essencial para a prevenção das invasões de patógenos. Fogaça *et al* (2006) a caracterizaram nos hemócitos de *R. microplus*. Além da atividade proteolítica, foi descrita uma atividade inibitória contra *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus.*

O gene codificante para este peptídeo encontra-se 28,6 vezes mais expresso na cepa Juarez exposta a 100 ppm de Ivermectina do que na condição controle. A expressão aumentada na cepa Juarez (resistente) a 100 ppm de Ivermectina constitui uma resposta ao acaricida, mas não foram encontrados trabalhos que forneçam uma explicação para esse fato. Talvez a presença de uma substância tóxica seja suficiente para desencadear a expressão do gene da ixodidina, numa tentativa de inibir os efeitos nocivos da droga.

5. *Cytochrome oxidase subunit 1 (mitochondrion)* [Subunidad 1 da citocromo oxidase (mitocôndria)]

A estrutura e função regulares da COI foram descritos na seção anterior. Quando comparada à condição controle, a cepa Juarez a 100 ppm de Ivermectina apresenta a COI 31 vezes mais expressa. Como dito anteriormente, a COI tem sido envolvida em processos de resistência em *B. germanica* (Pridgeon e Liu, 2003). A maior expressão na cepa resistente exposta ao acaricida tem maior concordância com os fatos descritos por Pridgeon e Liu (2003).

d) Juarez 10 ppm Ivermectina – 100ppm Ivermectina

Essa comparação apresentou 2336 *contigs* diferencialmente expressos. Apenas 312 *contigs* puderam ser anotados por meio da comparação com os bancos de dados selecionados. O gene com a maior diferença de expressão entre as duas amostras foi o gene da ixodidina, que teve um aumento na expressão com a ivermectina. Nessa comparação, houve uma variação de 5 a 46 vezes no nível de expressão [olhando apenas para os dez genes com expressão mais diferente (Tabela 3.6)]. Outros genes são também discutidos.

1. Putative sulfotransferase [Rhipicephalus pulchellus]

As sulfotransferases são enzimas que realizam sulfonação, gerando produtos como sulfatos ou ésteres de ácido sulfurico. A sulfonação é uma reação de conjugação e está associada à inativação de drogas e químicos tóxicos (Schwab, 2012,). Em *I. scapularis* duas sulfotransferases, Sult1 e Sult2, foram identificadas na saliva contribuindo para a modulação da resposta imune e da coagulação sanguínea no hospedeiro (Pichu *et al.,* 2011). Aqui, encontramos sulfotransferases 5,2 vezes menos expressas na condição de maior concentração de ivermectina. Levando em consideração a função desintoxicadora dessas enzimas é chamativa a subexpressão quando as larvas de carrapatos são expostas a concentrações de acaricida maiores. Seria esperado que, frente a altas concentrações de pesticidas, enzimas desintoxicadoras respondessem com um aumento de sua expressão. Porém isto não acontece. A resposta da cepa Juarez a concentrações maiores de ivermectina envolve sub-expressão dos genes das sulfotransferases.

2. Putative similar to chymotrypsin-elastase inhibitor ixodidin (Similar a inibidor de quimotripsina e elastase Ixodidina)

Nesta comparação da cepa Juarez a 10 e 100ppm ivermectina, dois *contigs* correspondem ao inibidor de quimotripsina e elastase Ixodidina, ambos apresentando superexpressão na cepa exposta a maior concentração do pesticida. A ixodidina já foi descrita como um peptídeo antimicrobiano com atividade inibitória proteolítica contra quimotripsina e elastase exógenas, com um papel importante na resposta imune dos artrópodes. Um dos contigs correspondentes ao gene codificante desse peptídeo, encontra-se 24,25 vezes mais expresso na cepa resistente Juarez a 100 ppm em relação à cepa exposta a 10 ppm de Ivermectina. Na mesma comparação, outro *contig*

se encontra 46,1 vezes mais expresso a 100 ppm de Ivermectina. A expressão aumentada na cepa Juarez (resistente) a 100 ppm de Ivermectina constitui uma resposta ao acaricida. Considerando o envolvimento do peptídeo na resposta imune, podemos inferir que a presença de uma substância tóxica a altas doses desencadeie a resposta imune. Quando comparada a cepa Juarez na condição controle à cepa Juarez a 100 ppm de ivermectina também observamos superexpressão de Ixodidina na maior concentração de acaricida. Quando comparamos a cepa Juarez a 10 ppm de Ivermectina à mesma cepa a 100 ppm de Ivermectina, a maior expressão é observada também na maior concentração. Isto é um fato muito interessante pois demostra que a expressão da Ixodidina aumenta conforme aumenta a concentração de ivermectina, constituindo uma resposta dose dependente.

3. *Cytochrome oxidase subunit 1 (mitochondrion)* (Subunidad 1 da citocromo oxidase (mitocôndria))

Nesta comparação, realizada dentro da mesma linhagem resistente, observamos uma expressão 42,1 vezes maior na cepa Juarez exposta a 100 ppm quando comparada à mesma cepa a 10 pmm de Ivermectina. Quando consideramos a comparação entre a cepa Juarez a 0 e 100 ppm de Ivermectina também observamos um aumento de 27,6 vezes na expressão, na maior concentração. Portanto podemos observar como a expressão da COI aumenta conforme aumenta a concentração de Ivermectina, constituindo uma resposta ao acaricida. É possível que a expressão aumentada da COI esteja relacionada ao fenótipo resistente da cepa Juarez.

3.14.2. Genes diferencialmente expressos entre cepas diferentes a concentrações de Ivermectina iguais:

a) Mozo 0 ppm de Ivermectina – Juarez 0 ppm Ivermectina

Essa comparação representa a expressão basal dos transcritos de ambas as cepas estudadas. O fato de elas não estarem expostas a ivermectina permite estudar as diferenças constitutivas entre as cepas Mozo e Juarez. Foram encontrados 2615 *contigs* diferencialmente expressos, e dentre eles, 296 *contigs* foram anotados. Entre os dez *contigs* com maiores diferenças na expressão, as razões variaram entre 8 e 352 vezes (Tabela 3.7). Foi observada, mais uma vez, uma grande diferença de expressão do gene mitocondrial, citocromo oxidase, subunidade 1. Essa diferença deve-se ao alto nível observado na cepa Mozo. Diferentemente das outras comparações, esta, sem a

exposição ao acaricida, não resultou em muitos genes diferencialmente expressos com relação direta com a resistência ao acaricida. Muitas das diferenças na expressão devem resultar em outros fenótipos diferentes entre essas linhagens.

1. *Cytochrome oxidase subunit 1 (mitochondrion)* [Subunidade 1 da citocromo oxidase-COI (mitocôndria)]

A estrutura e função da COI foram apresentadas anteriormente. Também apresentamos evidências que associam a sobre-expressão destas enzima a fenótipos resistentes de *B. germanica* (Pridgeon e Liu, 2003) mas que contrariam os resultados aqui obtidos, nos quais o fenótipo resistente a ivermectina apresenta uma expressão 353,5 vezes menor que a linhagem suscetível.

2. *Actin* (actina)

A actina é uma proteina ubíqua que compõe estruturas celulares de todos os eucariotos. A actina pode ser classificada em citoesquelética e muscular. A actina citoesquelética tem uma expressão constitutiva em todas as células. Já a actina muscular se expressa em tecidos específicos com padrões de expressão específicos. Nos resultados aqui apresentados, a actina se encontra 34,3 vezes menos expressa na cepa Juarez em relação à cepa Mozo. Silva *et al* (2012) realizaram um estudo comparativo com três genótipos de *M. persicae*, um genótipo suscetível, um resistente a inseticidas anti-colinesterase e um terceiro multiresistente. Todos os genótipos foram submetidos a um inseticida anti-colinesterase e a resposta ao inseticida foi avaliada por meio de microarrays. O genótipo suscetível apresentou 183 genes superexpressos. Concordando com nossos resultados, entre os genes anotados encontravam-se genes envolvidos em processos que envolvem actina. O mesmo não acontecia nos genótipos resistentes. Mesmo que as linhagens suscetíveis a pesticidas apresentem superexpressão dos genes de actina, não é possível explicar como eles contribuem para fenótipo suscetível. Por enquanto, somente podemos afirmar que a expressão diferencial dos genes de actina entre a cepa Mozo e a cepa Juarez constitui uma diferença constitutiva entre elas.

Tabela 3.7. *Contigs* anotados com maior diferença de expressão nas comparações entre as duas cepas (Mozo e Juarez) tratadas com as mesmas concentrações de ivermectina (0 ou 10 ppm). São apresentados os níveis de expressão (considerando o *fold change* (FC) e o número absoluto de *reads* alinhados aos *contigs*) dos genes anotados com maior diferença de expressão e os *contigs* correspondentes.

Contig	Anotação	Fold Change	Nº de reads[1] Mozo	Nº de reads[1] Juarez	p-valor
0 ppm Ivermectina					
c123311_g1_i1	cytochrome oxidase subunit 1 (mitochondrion) [Ixodes vespertilionis]	-353,56	14274	42	$1,36x10^{-47}$
c139338_g5_i1	actin [Ixodes ricinus]	-34,31	826	25	
c138401_g1_i2	Putative cystathionine beta-lyases/cystathionine gamma-synthase [Rhipicephalus pulchellus]	-25,27	681	28	$7,96x10^{-22}$
c143663_g1_i2	putative rna polymerase i second largest subunit, partial [Ixodes ricinus]	-20,53	514	26	$5,3x10^{-17}$
c135588_g1_i1	40S ribosomal protein S2/30S ribosomal protein S5 [Hyalomma marginatum rufipes]	-15,86	3787	249	$1,94x10^{-17}$
c124526_g2_i1	putative creatine kinase [Amblyomma triste]	8,00	38	318	$1,18x10^{-9}$
c142138_g1_i2	Putative gram domain-containing protein 4 [Rhipicephalus pulchellus]	8,03	29	244	$3,3x10^{-9}$
c146710_g3_i1	serine protease inhibitor 5 RmS5 [Rhipicephalus microplus]	8,08	383	3232	$1,65x10^{-11}$
c142213_g2_i2	Putative sulfotransferase [Rhipicephalus pulchellus]	12,71	40	532	$1,38x10^{-13}$
c145136_g1_i1	Putative lipoprotein amino terminal region [Rhipicephalus pulchellus]	13,43	34	478	$9,92x10^{-14}$
10 ppm Ivermectina					
c143663_g1_i2	putative rna polymerase i second largest subunit, partial [Ixodes ricinus]	-14,84	461	28	$3,44x10^{-14}$
c138401_g1_i2	Putative cystathionine beta-lyases/cystathionine gamma-synthase [Rhipicephalus pulchellus]	-14,82	493	30	$2,30x10^{-14}$
c139366_g3_i1	Putative tick transposon [Rhipicephalus pulchellus]	-14,02	327	21	$3,77x10^{-13}$
c135588_g1_i1	40S ribosomal protein S2/30S ribosomal protein S5 [Hyalomma marginatum rufipes]	-10,16	3416	304	$1,98x10^{-13}$
c134337_g3_i4	Putative serine/threonine protein phosphatase [Rhipicephalus pulchellus]	-7,24	337	42	$3,73x10^{-9}$
c142213_g2_i2	Putative sulfotransferase [Rhipicephalus pulchellus]	-15,33	29	404	$1,45x10^{-14}$
c144204_g3_i1	flavin-containing monooxygenase, putative [Ixodes scapularis]	20,41	31	575	$2,56x10^{-17}$
c135739_g1_i1	putative triacylglycerol lipase [Ixodes ricinus]	21,06	26	498	$3,13x10^{-17}$
c146710_g3_i1	serine protease inhibitor 5 RmS5 [Rhipicephalus microplus]	21,65	192	3765	$2,39x10^{-20}$
c142333_g4_i3	Putative pentalaris [Rhipicephalus pulchellus]	40,56	26	959	$1,4x10^{-23}$

[1]Número de sequências alinhadas em cada condição.

3. *Putative creatine kinase* (Creatina-quinase)

Uma das enzimas com um papel chave na economia energética é a creatinina kinase (CK), cujos níveis flutuam intermitentemente dependendo do balanço energético e metabólico. CK cataliza a reação de conversão da creatina e consome trifosfato de adenosina (ATP) para criar fosfocreatina e difosfato de adenosina (ADP) (Walliman, 1994). Os resultados deste trabalho mostram uma super-expressão de CK na cepa Juarez sem exposição a ivermectina do que na cepa Mozo na mesma condição (7 vezes mais expressa).

Tsagkarakou *et al* (1996) encontraram atividade aumentada da enzima em cepas gregas resistentes a vários pesticidas de *Tetranychus urticae* expostas a metil-paration e metidation, utilizando eletroforese. Considerando que uma atividade aumentada não significa necessariamente aumento de expressão, por enquanto não encontramos o significado fisiológico da sobre-expressão da CK na cepa Juarez em relação à resistência a ivermectina.

4. *Serine protease inhibitor 5 RmS5* (Inibidor de serina-protease 5 RmS5)

Os inibidores de serina-proteases (serpinas) são uma superfamilia de proteínas que regulam enzimas proteolíticas necessárias para a manutenção da homeostase. Em artrópodes essas proteínas estão presentes na imunidade inata, morfogênese e desenvolvimento. Em mamíferos as serpinas atuam na coagulação sanguinea, fibrinólisis, inflamação, e ativação do complemento. Nesse sentido, os carrapatos usariam as serpinas para evadir as defesas do hospedeiro facilitando o parasitismo, sendo que elas teriam um efeito antitrombótico na saliva de *R. microplus*, e possuíriam efeitos imunomodulatórios, anticoagulantes e anti-inflamatórios. (Tirloni *et al.*, 2014a, Tirloni *et al.,* 2014b). Em *R. microplus* as serpinas têm sido denominadas RmS. Neste trabalho encontramos RmS5 superexpresas na cepa Juarez quando comparada à cepa Mozo (8 vezes mais expressas). Seria interessante investigar diferenças na eficiência de infestação nas duas cepas para entender o envolvimento de RmS5 no hábito hematófago.

5. Putative sulfotransferase (Sulfotransferase)

A função e características das sulfotransferases foram descritas anteriormente, na comparação entre a cepa Juarez exposta a 10 e 100 ppm de ivermectina. As

sulfotransferases foram 12,7 vezes mais expressas na cepa Juarez sem exposição a ivermectina quando comparada à cepa Mozo na mesma condição.

Nkya *et al* (2014) realizaram estudos de expressão por meio de qPCR, em *An. gambiae*. Após um processo de seleção de 20 gerações, selecionaram uma linhagem de *An. gambiae* resistente aos pesticidas mais comuns utilizados na agricultura na Tanzânia (organoclorados, organofosforados, piretróides, glifosato e atrazina). Quando a linhagem obtida foi comparada a uma linhagem suscetível, a linhagem resistente apresentou uma superexpressão significativa de genes de sulfotransferase, evidenciando um papel importante dessas enzimas nos processos de resistência a pesticidas. Os resultados desse trabalho são concordantes com os resultados aqui obtidos, por meio de RNA-Seq.

6. *Putative lipoprotein amino terminal region* (Região amino terminal de lipoproteína)
Como descrito anteriormente, as lipoproteínas são moléculas que atuam no transporte de lipídeos hidrofóbicos no meio aquoso da hemolinfa. Na cepa Juarez condição controle, essas os contigs referentes a essas proteínas se encontram 13,4 vezes mais expressas do que na cepa Mozo na mesma condição. Portanto a maior expressão na cepa Juarez em relação a Mozo parece ser uma diferença constitutiva entre as cepas, e pode caracterizar o fenótipo resistente.

b) Mozo 10 ppm Ivermectina – Juarez 10 ppm Ivermectina
Nessa comparação avaliamos as diferenças de expressão entre as cepas estudadas Mozo e Juarez, ambas expostas a 10 ppm de ivermectina. Como ambas cepas estão expostas a concentrações de ivermectina iguais, as diferenças resultantes permitem avaliar as respostas a ivermectina que resultam das diferenças genéticas entre as cepas. Foram encontrados 2615 *contigs* diferencialmente expressos. Dentre eles, 296 foram anotados. A expressão apresentou diferenças que variaram de 7 a 40 vezes dentre os dez *contigs* anotados com maior diferença na expressão (Tabela 3.7).

1. Putative tick transposon (Transposon)
Como descrito na comparação entre a cepa Mozo sem tratamento e tratada com 10 ppm de ivermectina, o genoma de *R. microplus* tem varias regiões altamente repetitivas, incluindo elementos transponíveis como o LTR Gypsy e transposons de

DNA. Quando comparada à cepa Mozo a 10 ppm de Ivermectina, a cepa Juarez na mesma condição apresenta genes derivados de transposons 14 vezes menos expresssos. A sub-expressão caracteriza a cepa Juarez.

2. *Putative sulfotransferase* (Sulfotransferase)

Como discutido anteriormente, a superexpressão de sulfotransferases poderia contribuir para o fenótipo resistente e a diferença de expressão entre as cepas confirma que, de fato, constitui uma diferença entre cepas. Além disso, a expressão das sulfotransferases aumenta quando a cepa Juarez é exposta a 10 ppm de ivermectina. Na comparação da cepa suscetível com a cepa resistente na condição controle observamos que a expressão diferencial reflete uma diferença constitutiva entre elas. Quando comparamos as cepas expostas a 10 ppm de ivermectina essa diferença permanece, pois esse gene apresenta uma expressão 15,3 vezes maior na cepa Juarez. Esse gene pode estar relacionado à resistência a ivermectina, como uma enzima que contribui a neutralizar o efeito do pesticida.

3. *Flavin-containing monooxygenases*- FMOs (Monooxigenases contendo flavina)

A função desintoxicadora destas proteína foi abordada anteriormente. Os genes codificadores de FMOs encontram-se 20,4 mais expressos na cepa resistente Juarez. A expressão de MFOs é desencadeadada pela exposição a ivermectina, pois quando as cepas são comparadas na condição controle estes genes não se encontram diferencialmente expressos.

4. Putative triacylglycerol lipase (Triacilglicerol lipase)

A triacilglicerol lipase tem um papel muito importante no metabolismo dos ácidos graxos (Watt & Steinberg, 2008). O contig mapeado ao gene codificante desta enzima está 21 vezes mais expresso na cepa Juarez do que na cepa Mozo. Essa diferença entre cepas não aparece na comparação entre as cepas em condições basais mas quando expostas a ivermectina parecem se apresentar em resposta ao acaricida. Porém não é possível explicar esta diferença de expressão em função da condição resistente da cepa Juarez.

5. *Serine protease inhibitor 5 RmS5* (Inibidor de serin-protease 5 RmS5)

Quando consideramos as cepas Mozo e Juarez expostas a 10 ppm de ivermectina, encontramos as RmS5 21,6 vezes mais expressa na cepa Juarez. A superexpressão da RmS5 na cepa Juarez em condições basais representa uma diferença genética entre as cepas e isso é confirmado na comparação das cepas a 10 ppm de ivermectina.

6. Putative pentalaris (Pentalaris)

Pentalaris é uma proteína que pertence à familia das proteínas com domínio Kunitz. Proteínas dessa família são abundantes em transcriptomas de saliva de vários artrópodes hematófagos, incluindo carrapatos. São inibidores de proteases envolvidos na coagulação sanguínea e na vasodilatação, facilitando a hematofagia (Anatriello *et al.,* 2010; Rocha-Garcia *et al.,* 2014).

O *contig* que mapeou ao gene codificante de pentalaris apresentou uma expressão 40,5 vezes maior na cepa resistente em relação à cepa suscetível. Sendo que ambas as cepas precisam do repasto sanguíneo e de toda a maquinaria necessária para a hematofagia, a superexpressão de genes relativos a esse hábito alimentar apenas em uma cepa é de difícil interpretação. Mesmo sem relação com a resistência à ivermectina é uma diferença interessante a ser estudada para entender as diferenças entre cepas.

3.15. Análise de enriquecimento de termos de Ontologia Gênica

Para cada uma das comparações foram realizadas análises de enriquecimento de termos de Ontologia Gênica (GO). O consórcio GO fornece uma estrutura unificadora de vocabulário controlado para definir termos que representam propriedades de produtos gênicos. Os termos são classificados em três grandes domínios:

- processos biológicos, que comportam um conjunto de processos gerais procedentes de funções moleculares organizadas;
- funções moleculares, que representam atividades organizadas em um nível molecular. Estas atividades geralmente são executadas por produtos gênicos específicos, mas podem acontecer pela atividade conjunta de vários produtos gênicos e;

- componentes celulares, que referem-se a partes da célula, sejam elas componentes moleculares ou estruturas anatômicas, incluindo estruturas do ambiente extracelular.

Para cada uma das comparações, entre cepas e dentro de cada uma delas, os genes diferencialmente expressos foram categorizados nos termos correspondentes às três categorias. As tabelas completas com as informações dos termos enriquecidos podem ser obtidas no Anexo 2. Três das seis comparações apresentaram enriquecimento nas três categorias: Juarez 0-100 ppm de ivermectina, Juarez 10-100 ppm de ivermectina e Mozo- Juarez 0 ppm de ivermectina (tabelas A1 a A9 do Anexo 2)

A partir das análises de GO observamos que nas comparações dentro da cepa Juarez, entre 0 e 100, e 10 e 100 ppm de ivermectina processos como transporte transmembrana, transporte de substâncias orgânicas e processos catabólicos de substâncias orgânicas se encontram enriquecidos. Nessas mesmas comparações componentes celulares integrais de membrana também se encontram enriquecidos. Por outro lado funções moleculares como atividade de simportador, atividade secundária de transporte transmembrana e união a ATP enfatizam o fato de substâncias estarem sendo importadas e exportadas através das membranas, o que possivelmente acontece como parte do metabolismo da ivermectina.

Quando comparadas na condição controle, as cepas Mozo e Juarez apresentam enriquecimento de processos metabólicos de compostos de nitrogênio e carbono. Funções como atividade oxidoreductase também se apresentaram enriquecidas.

3.16. *Contigs* comuns a mais de uma comparação

Como a lista de *contigs* diferencialmente expressos é muito extensa na maioria das comparações, verificamos se havia *contigs* comuns às diferentes comparações. A questão específica é se os transcritos com expressão alterada após exposição à ivermectina seriam os mesmos nas concentrações e cepas diferentes. Ao comparar as listas não obtivemos nenhum *contig* comum em todas as comparações juntas.

Quando consideramos as comparações com exposição à Ivermectina encontramos quatro *contigs* comuns a todas as comparações (Figura 3.2A). Dois contigs correspondem à proteína *TPA_inf: hypothetical secreted protein 790*

[Amblyomma variegatum]. Os dois restantes representam duas proteínas não caracterizadas *Uncharacterized protein APZ42_030415 [Daphnia magna]* e *secreted protein, putative [Ixodes scapularis]*.

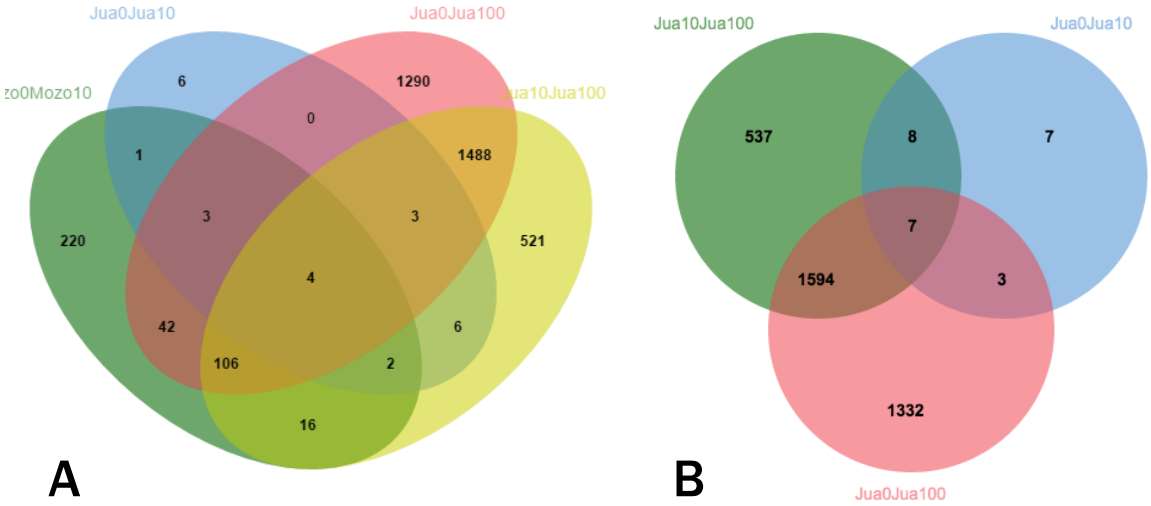

Figura 3.2. Diagrama de Venn mostrando o número de *contigs* comuns às comparações das condições com exposição à Ivermectina. A: nas duas cepas; B: somente na cepa Juarez.

Ao considerar as comparações dentro da cepa Juarez são observados sete *contigs* diferencialmente expressos comuns entre as comparações, tanto super como sub-expressos (Figura 3.2B). Dois destes *contigs* representam isoformas ou alelos diferentes do gene correspondente a TPA_inf: hypothetical secreted protein 790 [Amblyomma variegatum]. Os transcritos restantes correspondem aos genes *secreted salivary gland peptide, putative [Ixodes scapularis], hemelipoglycoprotein precursor [Dermatocentor variabilis], secreted protein, putative [Ixodes scapularis], hypothetical protein BVRB_037930, partial [Beta vulgaris subsp. vulgaris]*. Um ultimo transcrito não apresentou similaridade a nenhuma outra sequência depositada no GenBank.

Ao comparamos as cepas Mozo e Juarez a concentrações de ivermectina iguais, se encontram 1382 *contigs* diferencialmente expressos comuns. Esses *contigs* constituem as diferenças entre as cepas que são mantidas mesmo em condições diferentes. A última comparação nos dá os *contigs* que respondem ao carrapaticida da mesma forma nas duas cepas. Nesta comparação obtivemos sete *contigs* comuns, todos com expressão aumentada (Figura 3.3). Os sete *contigs* observados

correspondem a cinco genes diferentes: *Carboxypeptidase inhibitor, TPA_inf: hypothetical secreted protein 790 [Amblyomma variegatum], Uncharacterized protein APZ42_030415 [Daphnia magna], secreted salivary gland peptide, putative [Ixodes scapularis], secreted protein, putative [Ixodes scapularis]*.

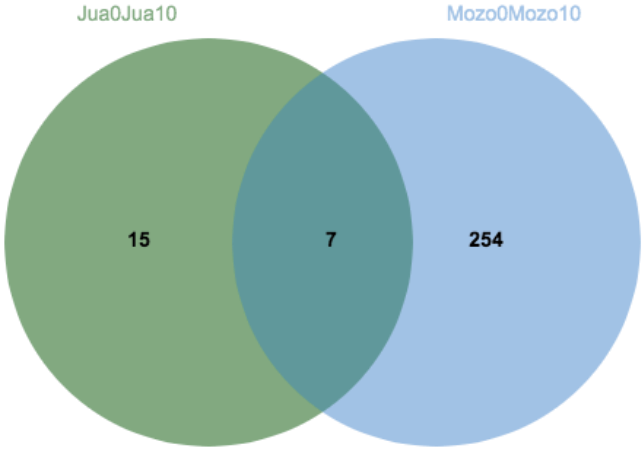

Figura 3.3. Número de *contigs* compartilhados entre comparações da mesma cepa a 0 e 10 ppm de ivermectina que respondem ao carrapaticida da mesma forma nas duas linhagens.

Discussão

R. microplus é uma espécie de carrapato resistente a todos os acaricidas comercialmente disponíveis (de Oliveira Souza Higa *et al.,* 2015). Fernandez-Salas *et al.* (2012) documentaram a presença de resistência aos quatro grupos químicos de acaricidas: OP, SP, amitraz e LM em populações mexicanas de *R. microlplus*. No Brasil, Reck *et al.* (2014) testaram a cepa Jaguar para resistência a cipermetrina, clorpirfós, fipronil, amitraz, ivermectina e Fluazuron, mostrando resistência para todos os acaricidas avaliados.

Os principais mecanismos subjacentes à resistência já descritos incluem mecanismos de desintoxicação e mutações de sítio alvo (Guerrero *et al.,* 2012; Rodruígez-Vivas *et al*., 2012). Expressão aumentada de genes de enzimas de desintoxicação também foi envolvida na resistência a acaricidas (de Oliveira Souza Higa *et al*., 2015). Guerrero *et al* (2012) discutiram diferentes mecanismos de resistência presentes em *R. microplus*, entre eles mutações de sitio alvo, mecanismos metabólicos e penetração reduzida dos acaricidas. No caso das mutações de sítio alvo podemos destacar aquelas presentes nos receptores de GABA. Em indivíduos de *R. microlplus* resistentes a organoclorados uma mutação no gene do receptor GABA (*RdI)* na posição Ala301 foi identificada e uma mutação no mesmo gene foi identificada em indivíduos resistentes ao dieldrin. Resistência ao Fipronil foi associada a mutações múltiplas, como por exemplo, uma mutação no gene *RdI* na posição Ala301 em combinação com uma segunda mutação Thr35Met ou Arg357Gln (Feyereisen *et al.,* 2015).

Entre os mecanismos metabólicos as famílias enzimáticas do citocromo P450, GSTs e carboxilesterases foram implicadas como mecanismos gerais de desintoxicação, destacando a utilidade do uso de sinergistas na investigação destes mecanismos (Guerrero *et al*., 2012, Rodriguez-Vivas et al. 2012). Guerrero *et al* (2012) resumiram os mecanismos de resistência para os principais acaricidas químicos utilizados no controle do carrapato: piretróides, organofosforados, amitraz, fipronil e lactonas macrocíclicas.

No caso dos piretróides, Guerrero *et al* (2012) destacam três substituições de aminoácidos no canal de sódio disparado por voltagem, que é o alvo dos piretróides, como o principal mecanismo de resistência a esse grupo químico coexistindo com mecanismos metabólicos. Na população mexicana de Coatzacoalcos os mecanismos metabólicos possuem maior relevância, principalmente auqueles mediados pela esterase CzEst9 que hidrolisa a permetrina que. Logo em seguida, foi encontrado em populações brasileiras do Mato Grosso do Sul. Citocromo P450 e a GST também possuem um papel na resistência a piretróides em populações mexicanas.

Com relação aos OP e carbamatos, cujo alvo é a acetilcolinesterase, há um caráter multigênico da resposta, sendo que mais de uma acetilcolinesterase poderia estar envolvidas na resistência acaricida (Guerrero *et al*. 2012). Duas esterases, EST-1 e EST-2, classificadas como acetilcolinestareses, foram detecdadas em linhagens suscetíveis e resistentes a piretroides e organofosforados, especificamente malation e deltametrina (Baffi *et al*, 2008). O caráter multigênico da resposta a OP quando consideramos acetilcolinesterases foi reforçado por um trabalho onde foram identificados sete *contigs* com sequência similar a acetilcolinesterases (Bellgard *et al.,* 2012). No mesmo sentido, em outro estudo foram expressos três transcritos similares a acetilcolinesterases isolados a partir de linhagens de *R. microplus* resistentes a OP (Temeyer *et al*., 2010). Mecanismos metabólicos também têm sido relacionados à resistência OP: quando linhagens suscetíveis e resistentes são expostas a coumaphous superexpressam transcritos similares a citocromo P450. Mecanismos mediados por P450 monoxigenases em cepas mexicanas de *R. microplus* têm sido envolvidos na resistência a diazinon e coumaphous a través de ensaios com sinergistas (Li *et al.* 2003). Além disso, também foi demonstrado que, na cepa multirresistente San Alfonso, a expressão do transcrito TC9004 se encontra incrementada em 5 vezes. Este transcrito, quando traduzido a sua sequência protéica, demostrou alta similaridade à GST (Saldivar *et al.,* 2008). Estudos com sinergistas mostraram resistência metabólica ao amitraz em uma linhagem mexicana de *R. microplus* (Guerrero *et al*, 2012).

O primeiro relato de resistência a LM foi realizado por Martins & Furlong (2001) no Rio Grande do Sul, Brasil. A partir de então, vários trabalhos abordaram o estado da resistência a ivermectina no México (Perez-Cogollo *et al.,* 2010, Fernández-Salas *et al.,* 2012a, Fernández-Salas *et al.,* 2012b), no Uruguai (Castro-Janner *et al.,* 2011), e em

diversas regiões do Brasil (Klafke *et al.,* 2006 Andreotti *et al*., 2011, de Oliveira Souza Higa *et al.,* 2015) porém a maioria sem aprofundar nos mecanismos de resistência implicados. Guerrero *et al* (2011) destacam que o alvo desta droga poderiam ser os canais de cloro disparados por glutamato e GABA. O principal mecanismo de resistência a ivermectina em *R. microplus* foi descrito por Pohl *et al* (2012) que demonstrou, por meio do uso dos inibidores de transportadores ABC, CsA e MK571, a atividade destas enzimas na cepa resistente Juarez. Além disso, demonstrou a superexpressão na cepa resistente Juarez de transcritos destes transportadores em relação à cepa suscetível POA. Klafke (2010) também demonstrou envolvimento de citocromo P450 e GSTs na resistência a ivermectina na cepa resistente ZOR de *R. microplus*, porém não sendo os mecanismos de resistência principais. Considerando a pouca informação que se tem sobre os mecanismos de resistência à ivermectina, este trabalho visou identificar os possíveis mecanismos envolvidos. Ao avaliar diferenças de expressão entre uma cepa resistente e uma cepa suscetível, identificamos genes que possivelmente conferem o fenótipo à cepa resistente. O grande número de genes diferencialmente expressos e a predominância de genes e vias envolvidas na desintoxicação que observamos pode ser explicada pela complexidade dos mecanismos de resistência de *R. microplus* e seu caráter multirresistente.

No Capítulo 2 descrevemos que citocromo-oxidases, GST, esterases e transportadores ABC possuem um papel relevante na desintoxicação da Ivermectina na cepa resistente. Portanto é importante avaliar se estas enzimas conferem o fenótipo resistente da cepa Juarez apenas por atividade aumentada ou se também existem diferenças de expressão nos genes destas enzimas que expliquem este fenótipo. Assim sendo, discutiremos as diferenças de expressão encontradas nos genes codificantes para as enzimas avaliadas no capítulo anterior. Quando consideramos as diferenças entre cepas observamos que vários transcritos apresentam similaridade de pelo menos 70% com genes que codificam enzimas e transportadores ABC, envolvidos na desintoxicação metabólica.

Alguns dos transcritos anotados como citocromo oxidases se encontram subexpressos. A subexpressão de genes de citocromo oxidases foi observada em uma linhagem de *Cochliomya hominivorax* resistente a OP (Carvalho *et al*. 2010). Porém, em *R. microlplus* outros transcritos desses genes se encontram superexpressos entre

2,94 e 4,13 vezes na cepa resistente em relação à cepa suscetível. As citocromo P450 fazem parte de uma superfamília gênica que comporta mais 200 famílias gênicas com características estruturais conservadas. Por tanto não é infrequente que alguns deles se encontrem superexpressos enquanto outros se apresentam subexpressos na mesma condição. A superexpressão de um único gene *Cyp* foi associada ao fenótipo resistente ao DDT da cepa Hikone em *D. melanogaster* indicando que a resistência a pesticidas pode ser conferida por poucos genes (ffrench-Constant *et al.,* 2004). Neste trabalho sete transcritos similares a genes P450 se encontram super-expressos na cepa Juarez em relação à cepa Mozo na condição controle, motivo pelo qual podemos afirmar que, pelo menos parte do fenótipo resistente, é devido à super-expressão de genes da citocromo P450 e que estas enzimas podem contribuir à desintoxicação metabólica da Ivermectina na cepa resistente, como demonstrado no Capítulo 2 por meio de bioensaios com sinergistas.

Outros transcritos super-expressos na cepa resistente pertencem à família das acetil/butirilcolinesterases (AChE/BChE). Múltiplas AChE foram implicadas na resistência a OP (Guerrero *et al.* 2012), destacando o caráter multigênico da resposta a OP. Concordando com estas observações, neste trabalho, três transcritos que correspondem a AChE se encontram superexpressos entre 2,6 e 4,28 na cepa resistente à ivermectina em relação à cepa suscetível, na condição controle. Quando comparamos ambas cepas a 10 ppm de Ivermectina dois transcritos correspondentes a AChE se encontram superexpressos 6,18 e 6,19 vezes respectivamente na cepa resistente.

As butirilcolinesterases (BChE) são enzimas irmãs das acetilcolinesterases também conhecidas como colinesterases, pseudocolinesterases ou plasma-colinesterases. Em mamíferos, têm sido descritas como enzimas desintoxicadoras. Existem evidências que BChEs podem ter função desintoxicadora, como demonstrado quando camundongos pré-tratados com BChE exibem proteção contra agentes tóxicos como OP. O knockout de genes de BChE em camundongos os torna mais suscetíveis a intoxicações por estes agentes (Lockridge, 2015). Um transcrito anotado como AChE/BChE se encontra super-expresso 4,28 vezes na cepa resistente em relação à cepa suscetível, ambas na condição controle. A 10 ppm de Ivermectina três transcritos correspondem a AChE/BChE e se encontram entre 3,56 e 4,33 vezes mais expressos

na cepa Juarez. Outras esterases, representadas por quatro transcritos encontram-se entre 3,03 e 4,33 vezes mais expressas na cepa Juarez em relação à cepa Mozo a 10 ppm de ivermectina. Com isso, mais de uma esterase poderiam estar envolvidas na resistência à ivermectina. Essas observações indicam que a diferença de expressão reflete a diferença entre as cepas e que a superexpressão de esterases e AChE/BChE pode ser responsável parcialmente pelo fenótipo resistente da cepa Juarez. No capítulo anterior, as esterases demonstraram estar envolvidas na desintoxicação da ivermectina na cepa resistente.

Quando consideramos diferenças dentro da cepa suscetível Mozo a diferentes concentrações de Ivermectina encontramos que as AChE/BChE se encontram 6.54 vezes mais expressas em larvas de *R. microplus* suscetíveis expostas a 10 ppm de ivermectina. Considerando os relatos de envolvimento dessas enzimas na resistência a substâncias tóxicas a superexpressão representa uma resposta da cepa Mozo à exposição à ivermectina desencadeando o aumento da expressão dos genes destas enzimas. Na condição controle também observamos a expressão de AChE/BChEA, portanto uma expressão constitutiva é revelada neste trabalho. Esses fatos indicam que mesmo sendo suscetíveis à ivermectina, os carrapatos são capazes de responder à presença do pesticida por meio do aumento da expressão de enzimas desintoxicadoras.

A atividade das GST foi avaliada por meio de bioenssaios com sinergistas no Capítulo 2. Os resultados obtidos mostram que parte da atividade desintoxicadora de Ivermectina da cepa Juarez é devida a atividade dessas enzimas. Quando consideramos as análises comparativas de expressão entre as cepas Mozo e Juarez na condição controle observamos a superexpressão de 3,22 vezes de um gene correspondente a GST na cepa Juarez em relação à cepa Mozo. De forma concordante, o trabalho de Saldivar *et al.* (2008) demonstrou que quando larvas de *R. microlplus* foram tratadas com OP, um dos sete transcritos com maior expressão apresentou similaridade significativa com GST, encontrando-se 4,4 vezes superexpresso nas cepas resistentes Munoz e San Roman quando expostas a coumaphous. Estudos de expressão foram realizados em linhagens de insetos resistentes a pesticidas, utilizando genes candidatos como os genes *Cyp*, esterases e GST. Desta forma foi identificada superexpressão de genes de GST em linhagens de *Anopheles gambiae* resistentes ao

DDT e piretroides (David *et al*., 2005) e em linhagens resistentes a OP de *Lygus lineolaris* foi demonstrada superexpressão significativa de GSTs quando comparadas a linhagens suscetíveis (Zhu *et al.,* 2012).

Quando observamos a resposta a ivermectina dentro das cepas tanto a cepa Mozo como a cepa Juarez apresenta um aumento da expressão de GST conforme aumenta a concentração de acaricida. A cepa Mozo a 10 ppm de ivermectina apresenta um aumento de expressão de 3,00 vezes quando comparada à mesma cepa na condição controle. A cepa Juarez a 100 ppm de ivermectina, quando comparada à mesma cepa na condição controle apresenta uma superexpressão de 4,33 vezes. O mesmo acontece na comparação entre 10 e 100 ppm de ivermectina, com uma superexpressão de 3,51 vezes na maior concentração de ivermectina. Isso revela que a cepa Mozo, mesmo sendo suscetível, tem capacidade de responder às mudanças da concentração de ivermectina, com diferenças na expressão de genes de enzimas de desintoxicação metabólica. Também na cepa Juarez, os genes de GST respondem ao aumento da concentração de acaricida, aumentando sua expressão.

Em relação à resistência a ivermectina em *R. microplus* não foram encontrados registros prévios de trabalhos envolvendo superexpressão de genes de GST em linhagens com suscetibilidades diferentes a ivermectina. Portanto este trabalho representa o primeiro relato envolvendo expressão diferencial de genes de GST quando consideramos duas cepas de *R. microplus*, uma suscetível e outra resistente a ivermectina, e quando consideramos a resposta das cepas a diferentes concentrações do acaricida.

No Capítulo 2 os transportadores ABC demonstraram ter o papel de maior relevância na desintoxicação da ivermectina. Este fato já foi descrito por Pohl *et al* (2011, 2012) também utilizando bioensaios com inibidores enzimáticos nas cepas POA (suscetível) e Jaguar (resistente) de *R. microplus.* Quando comparamos as cepas Mozo e Juarez tanto na condição controle como a 10 ppm de ivermectina, transportadores da superfamília ABC e da subfamília ABCD, denominados *peroxisomal long-chain acyl-coa transporter abc superfamily*, aparecem superexpressos na cepa Juarez em relação à cepa Mozo. Essas enzimas estão presentes em todos os eucariotos e transportam ésteres de ácidos graxos de acetil coenzima A através das membranas. No lúmen dos

peroxisomos os ácidos graxos são oxidados. Estes transportadores têm sido identificados em leveduras, plantas e mamíferos (Wanders *et al.,* 2007, Morita & Imanaka, 2012). No entanto, estes transportadores, superexpressos na cepa Juarez, não parecem ser os responsáveis pela desintoxicação da ivermectina observadas nos bioensaios, pois a função destas enzimas parece estar restrita ao transporte de ácidos graxos. Assim sendo, a desintoxicação da ivermectina poderia estar mediada por aumento da atividade de outras subfamílias de transportadores ABC, mais do que por sua expressão aumentada. Por outro lado, os transportadores de acil CoA de cadeia muito longa da superfamília ABC poderiam ter alguma função ainda desconhecida relacionada à desintoxicação de xenobióticos.

Dois transcritos superexpressos na cepa Juarez em relação à cepa Mozo são os que correspondem as Monoxigenase contendo flavina e Sulfotransferases, duas enzimas descritas anteriormente e relacionadas à desintoxicação de xenobióticos. Quando comparamos as cepas Mozo e Juarez a 10 ppm de ivermectina, as monoxigenases contendo flavina encontram-se 20,4 vezes mais expressas na cepa Juarez. Na mesma comparação as sulfotransferases se encontram 15,33 vezes mais expressas na cepa Juarez. Essa enzima também se encontra superexpressa na cepa Juarez a 100 ppm de ivermectina quando comparada à mesma cepa a 10 ppm de Ivermectina, portanto o aumento na expressão desse gene representa uma resposta ao aumento da concentração de acaricida na cepa resistente. Nenhuma das enzimas acima mencionadas foi previamente relacionada à desintoxicação da ivermectina. Portanto, este trabalho constitui o primeiro relato de um possível papel de Monoxigenases contendo flavina e Sulfotransferases conferindo parte do fenótipo resistente da cepa Juarez e fazendo parte dos mecanismos de resistência.

Mesmo que não se encontrem entre os genes com maior diferença de expressão as citocromo P450, esterases, GST e transportadores ABC da superfamília ABCD se apresentam superexpressos na cepa resistente (Juarez) quando comparada à cepa suscetível (Mozo). Em conjunto com Monoxigenases contendo flavina e Sulfotransferases, entre outros genes, essas enzimas contribuem aos processos metabólicos de desintoxicação da ivermectina.

Nas comparações entre cepas, quando consideramos os dez genes anotados com maior diferença de expressão, encontramos quatro produtos gênicos comuns entre as duas comparações: *serine protease inhibitor 5 RmS5, Putative sulfotransferase, putative rna polymerase i second largest subunit, partial e 40S ribosomal protein S2/30S ribosomal protein S5*. O primeiro faz parte da família das serpinas. O segundo é uma enzima envolvida no metabolismo de substâncias tóxicas. O terceiro é uma enzima envolvida no alongamento de cadeias de RNA. O quarto representa proteínas ribosomais que fazem parte dos ribossomos envolvidos na tradução de mRNA a proteínas. Assim sendo, a diferença de expressão, tanto dos genes codificantes para estas enzimas quanto dos restantes, constituem diferenças que ocorrem devido à diferenciação inicial das linhagens por seleção da cepa resistente.

A partir das análises de GO observamos que nas comparações dentro da cepa Juarez, entre 0 e 100, e 10 e 100 ppm de ivermectina processos como transporte transmembrana, transporte de substâncias orgânicas e processos catabólicos de de substâncias organicas se encontram enriquecidos. Isso corrobora as observações acerca dos transportadores ABC, que apresentam um papel importante na excreção da ivermectina, que é, de fato, uma substância orgânica. Se a ivermectina também é degradada, isso explicaria pelo menos parte do enriquecimento em processos catabólicos de compostos orgânicos. Nessas mesmas comparações, componentes celulares integrais de membrana também se encontram enriquecidos. Por outro lado, funções moleculares como atividade de simportador, atividade secundária de transporte transmebrana e união a ATP enfatizam o fato de substâncias estarem sendo importadas e exportadas a traves das membranas, o que possivelmente acontece como parte do metabolismo da ivermectina. Este enriquecimento destacado em união a ATP também foi observado em linhagens resistentes a pesticidas de *Cimex lectularius* que também superexpressavam transportadores ABC, que se encontravam entre os 5000 genes com maior diferença de expressão (Mamidala *et al.,* 2012).

Quando comparadas na condição controle, as cepas Mozo e Juarez apresentam enriquecimento de processos metabólicos de compostos de nitrogênio e carbono. Funções como atividade oxidoredutase atuando em grupos –OH-OH de compostos

orgânicos cíclicos, tal como acontece na estrutura da ivermectina, se encontram enriquecidos e são concordantes com o fato da ivermectina estar sendo degradada.

A expressão alterada de múltiplos genes entre as cepas estudadas e entre concentrações confirmam que o fenótipo resistente é produto da uma resposta poligênica à ivermectina. Tanto a cepa resistente como a cepa suscetível são capazes de responder a mudanças nas concentrações de ivermectina, inclusive com expressão aumentada de enzimas de desintoxicação metabólica na cepa suscetível. Portanto, ambas cepas, apresentam uma resposta poligênica, tanto quando consideramos diferenças entre as cepas como quando consideramos diferentes concentrações de ivermectina dentro de cada uma delas.

Conclusão do capítulo

No total, cinco comparações foram realizadas entre cepas e dentro de cada uma delas. Relembrando os resultados das análises de expressão diferencial, 399 transcritos foram diferencialmente expressos dentro da cepa Mozo. Dentro da cepa Juarez a 0 e 10 ppm de ivermectina foram encontrados 20 transcritos diferencialmente expressos. Dentro da cepa Juarez a 0 e 100 ppm de Ivermectina, 3442 transcritos se encontram diferencialmente expressos e, por último na comparação dentro da cepa Juarez a 10 e 100 ppm de Ivermectina 2336 transcritos apresentam expressão diferencial.

Retomando as hipóteses iniciais deste trabalho podemos rejeitar a primeira: a resistência apresenta uma base poligênica a baixas concentrações de ivermectina e uma base monogênica a concentrações maiores. Nossos resultados, envolvendo múltiplos genes em cada uma das comparações, permitem afirmar que *R. microplus* apresenta uma resposta poligênica, tanto a baixas quanto a altas concentrações de ivermectina,

A segunda hipótese, mudanças nos níveis de expressão de um ou mais genes podem gerar fenótipos resistentes, não foi rejeitada pois genes que codificam enzimas de desintoxicação de subtâncias tóxicas encontram-se superexpressos na cepa resistente Juarez.

A terceira hipótese também não foi rejeitada, pois verificamos que existem diferenças de expressão entre as cepas quando expostas às mesmas concentrações de Ivermectina.

A última hipótese afirma que a expressão gênica da mesma cepa muda quando exposta a diferentes concentrações de ivermectina, o que de fato acontece conforme mostram os resultados das comparações dentro das cepas.

Conclusões Gerais

Bases moleculares da resistência à Ivermectina

Para atingir os objetivos foram utilizadas duas cepas de referência de *R. microplus:* a cepa Mozo, suscetível à ivermectina, e a cepa Juarez, resistente. Ambas as cepas foram submetidas a ensaios de dose resposta para determinar o fator de resistência e, com isso, verificar a condição resistente da cepa Juarez em relação à cepa Mozo. Para o primeiro bloco experimental foi verificado um fator de resistência de 7,029, e para o segundo determinou-se um fator de resistência de 3,796, confirmando assim a natureza resistente da cepa Juarez.

Os ensaios enzimáticos com sinergistas foram utilizados para testar a atividade de quatro enzimas de desintoxicação metabólica, conhecidas por estarem envolvidas na resistência a pesticidas em vários grupos de artrópodes. Citocromo-oxidases, esterases, glutationa-S-transferases e transportadores ABC foram testados nesses experimentos. Foram determinados os fatores de resistência para cada uma das enzimas testadas, considerando a relação da CL50 de cada uma das cepas expostas aos diferentes sinergistas em combinação com ivermectina, e cada cepa exposta somente à ivermectina. Os resultados obtidos permitem afirmar que as quatro enzimas avaliadas apresentam algum grau de envolvimento na resistência metabólica. Porém o maior envolvimento foi determinado para os transportadores ABC, seguido de esterases, glutationa-S-transferases e citocromo-oxidases.

Para determinar diferenças de expressão gênica entre as cepas estudadas, as comparações consideraram cada uma delas expostas a concentrações de ivermectina iguais: a cepa Mozo e Juarez a 0 ppm de Ivermectina, e a cepa Mozo e Juarez a 10 ppm de Ivermectina. Esse experimento também demostrou múltiplos genes com expressão diferencial entre cepas. Entre eles, os genes de enzimas de desintoxicação metabólica avaliadas por meio de bioensaios e outros como o gene codificante para a sulfotransferase e o gene codificante para monoxigenases contendo flavina, que são interessantes por sua função em processos de resistência a substâncias tóxicas. Esses

genes se encontram entre os dez genes anotados com maior diferença de expressão quando as duas cepas estudadas são comparadas, e poderiam conferir parte do fenótipo resistente da cepa Juarez, pois se encontram superexpressos nesta cepa. Os genes codificantes das enzimas testadas por meio de ensaios enzimáticos também se encontram diferencialmente expressos. Porém não se encontram entre os genes com maior diferença de expressão.

Considerando o conjunto dos experimentos podemos afirmar que os resultados de ambos os blocos experimentais são complementares e ambos corroboram a hipótese de que as cepas Mozo e Juarez apresentam uma resposta poligênica à ivermectina, mesmo levando em consideração que atividade enzimática e expressão gênica são processos biológicos diferentes.

Resumo

O carrapato do boi *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita de bovinos de grande importância sanitária e econômica, que produz grandes prejuízos na bovinocultura do Brasil. O uso de ivermectina como meio de controle químico, ao longo dos anos, levou à seleção de linhagens de *R. microplus* resistentes a ivermectina. A consequência desse processo é a perda da eficácia do acaricida. Este trabalho teve por objetivo determinar as bases moleculares da resistência a ivermectina. Para o estudo dos mecanismos envolvidos na resistência a ivermectina de *R. microplus* foram utilizadas duas cepas de referência: a cepa Mozo, suscetível a ivermectina, e a cepa Juarez, resistente, e duas abordagens experimentais complementares: ensaios enzimáticos com sinergistas e estudos de expressão gênica por meio de sequenciamento massivo em paralelo do RNA ou RNA-Seq. Os resultados deste trabalho permitem afirmar que o mecanismo de desintoxicação metabólica de maior importância é mediado por transportadores ABC, seguido de esterases, glutation-S-transferases e citocromo-oxidases. As diferenças de expressão gênica observadas entre as cepas, e dentro das cepas a diferentes concentrações de ivermectina, confirmam os resultados e permitem concluir que *R. microplus* apresenta uma resposta poligênica à ivermectina.

Abstract

The cattle tick *Rhipicephalus microplus* is one of the most important ectoparasites with great sanitary and economic importance for cattle rearing in Brazil. Ivermectin is a drug used in the chemical control of *R. microplus*. The utilization of ivermectin in the last 30 years has led to the selction of resistant populations of *R. microplus*, and thus, the loss of efficacy in the cattle tick control. To study the molecular basis of ivermectin resistance in *R. microplus*, two strains of ticks were used: the susceptible strain Mozo, and the resistant strain Juarez. Two complementary approaches were carried out: enzimatic assays using sinergists and gene expression studies using massive parallel sequencing of RNA or RNA-Seq. The results of this work indicate the involvement of various mechanisms of metabolic resistance. Detoxification mechanisms mediated by ABC transporters are probably the most important. Esterases, gluthathion-S-transferases and citochrome-oxidases play a less important role in detoxification. Differences in gene expression were observed between strains and among samples of the same strain exposed to different concentrations of ivermectin, confirming the result with the assays. Hence, the response of *R. microplus* to ivermectin is, probably, complex and poligenic.

Referências Bibliográficas

- Akbar SM, Aurade RM, Sharma HC, Sreeramulu K (2014) Mitochondrial P-Glycoprotein ATPase Contributes to Insecticide Resistance in the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Noctuidae: Lepidoptera). Cell Biochem Biophys 70 (1), 651-660.
- Anatriello E, Ribeiro JM, de Miranda-Santos IK, Brandão LG, Anderson JM, Valenzuela JG, Maruyama SR, Silva JS, Ferreira BR (2010) An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. BMC Genomics 11 (1), 450.
- Andreotti R (2010) Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. Embrapa Gado de Corte, Mato Grosso do Sul. [online] Disponível em: http://cloud.cnpgc.embrapa.br/controle-do-carrapatoms/files/2011/11/DOC1801.pdf .Arquivo capturado em agosto de 2016.
- Andreotti R, Guerrero F D, Soares M A, Cavalcante Barros J, Miller R J, Pérez de Léon A. (2011). Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 20 (2),127-133.
- Andrews S (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. [online] Disponível em: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/. Arquivo capturado em agosto de 2016.
- Arolas JL, Lorenzo J, Rovirat A, Castella J, Aviles FX, Sommerhoff CP (2004) A Carboxypeptidase Inhibitor from the Tick *Rhipicephalus bursa*. J Biol Chem 280 (5), 3441-3448.
- Baffi MA, de Souza GRL, Soares de Sousa C, Ceron CR (2008) Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Riphicephallus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari, Ixodidae). Mol Biochem Parasitol 160 (1), 70–73.
- Bellgard MI, Moolhhuijzen PM, Guerrero FD, Schibechi D, Rodríguez-Valle M, Peterson DG, Dowd SE, Barrero R, Hunter A, Miller RJ, Lew-Tabor AE (2012) Cattle TickBase: An Integrated Internet-based bioinformatic resourse for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Int J Parasitol 42 (2), 161-169.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. J R Statist Soc 57 (1), 289-300.
- Bloomquist JR (2003) Chloride channels as tools for developing selective insecticides. Arch Insect Biochem Physiol 54 (4),145-156.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30 (15), 2114-2120.
- Burger TD Shao R, Barker SC (2014) Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, Rhipicephalus (Boophilus) microplus, contains a cryptic species. Mol Phylogenet Evol. 76, 241–253.

- Byford RL, Craig ME, DeRouen SM, Kimball MD, Morrison DG, Wyatt WE, Foil LD (1999) Influence of permethrin, diazinon and ivermectin treatments on insecticide resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). Int J for Parasitol 29, 125-135.
- Cabrera-Brandt M, Silva AX, Le Trionnaire G, Tagu D, Figueroa CC (2015) Transcriptomic responses of the aphid *Myzus persicae nicotianae* Blackman (Hemiptera: Aphididae) to insecticides: Analyses in the single Chilean clone of the tobacco aphid. Chilean J Agric Res 74 (2), 191-199.
- Caizzi R, Bozzetti M P, Caggese C, Ritossa F (1990) Homologous Nuclear Genes Encode Cytoplasmic and Mitochondrial Glutamine Synthetase in Drosophila melanogaster. J Mol Biol 212, 17-26.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL (2009) BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics 10,421-430.
- Campbell WC (1989) Ivermectin and abamectin. Primeira Edição. New York. Springer-Verlag 347 p.
- Carvalho RA, Azeredo-Espin AML, Torres TT (2010) Deep sequencing of New World screw-worm transcripts to discover genes involved in insecticide resistance. BMC Genomics 11(1), 695-708.
- Castro-Janner E, Martins JR, Mendez MC, Namindome A, Klafke GM, Schumaker TTS. Diagnoses of Fiponil resistance in Brazilian cattle ticks Rhipicephalus (Boophilus) microplus using in vitro larval bioassay. Vet Parasitol 173 (3-4), 300-306.
- Castro-Janner E, Rifran L, González P, Niell C, Paggio J, Gil A, Schumaker TT (2011) Determination of the susceptibility of Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay. Vet Parasitol 178 (1-2), 148-155.
- Coles GC, Rhodes AC, Wolstenholme AJ (2005) Rapid selection for ivermetin resistance in *Haemonchus contortus*. Vet Parasitol 129, 345-347.
- Coles TB, Dryden W (2014) Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. Parasit Vectors 7, 8-18.
- Cunningham M, Garcia F, Pollero RJ (2007) Arachnid lipoproteins: Comparative aspects. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 146 (1-2), 79-87.
- Currie BJ, Harumal P, McKinnon M, Walton SF (2004) First Documentation of In Vivo and In Vitro Ivermectin Resistance in Sarcoptes scabiei. Clin Infect Dis 39 (1), 8-12.
- David JP, Strode C, Vontas J, Nikou D, Vaughan A, Pignatelli PM, Louis C, Hemingway J, Ranson H (2005) The Anopheles gambiae detoxification chip:a highly specific microarray to studymetabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. Proc Natl Acad Sci U S A.102 11, 4080-4084.
- Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR,Williamson MS (2007) DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels. IUBMB Life 59 (3),151-162.

- De Campos Pereira M, Bahia Labruna M, Szabó MPJ, Klafke GM (2008) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência. Primeira edição. São Paulo. Editorial MedVet. 192 p.
- Decrem Y, Beaufays J, Blasioli V, Lahaye K, Brossard M, Vanhamme L,Godfroid E (2008) A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick Ixodes ricinus. FEBS J 275 (7),1485-1499.
- Denis M (1986) Structure and function of cytochrome-c oxidase. Biochimie 68 (3), 459-470.
- Doerks T, Strauss M, Brendel M, Bork P (2000) GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins. TIBS 25 (10), 483–485
- Eswaramoorthy S, Bonanno JB, Burley SK, Swaminathan S (2007) Mechanism of action of a flavincontaining monooxygenase. PNAS 104 (36), 9832–9837.
- FAO - Food And Agriculture Organisation (2004). Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines. Roma: Food and Agriculture Organisation, Animal Production and Health Division. [online] Disponível em: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ag014e/ag014e00.pdf. Arquivo capturado em agosto de 2016.
- Fernández-Salas A, Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA (2012) First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. Vet Parasitol 183(3-4),338-42.
- Feyereisen R, Dermauw W, Van Leeuwen T (2015) Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. Pestic Biochem Physiol (121), 61-77.
- ffrench-Constant R, Daborn PJ, Le Goff G (2004) The genetics and genomics of insecticide resistance. Trends Genet 20 (3), 163-170.
- Fogaça AC, Almeida IC, Eberlin MN, Tanaka AS, Bulet P, Daffre S (2006) Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick Boophilus microplus with inhibitory activity against serine proteinases. Peptides 27(4), 667-674.
- Fundação Oswaldo Cruz (2006) Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em Aedes aegypti. Brasília: Ministério da Saúde.
- Garcia GR, Gardinassi LG, Ribeiro JM, Anatriello E, Ferreira BR, Moreira HN, Mafra C, Martins MM, Szabó MP, de Miranda-Santos IK, Maruyama SR (2014) The sialotranscriptome of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. Parasit Vectors 7:430.
- Gilbert LI, Gill SS (2010) Insect pharmacology: Channels, receptors, toxins and enzymes. Amsterdam. Primeira edição. Editorial Academic Press.381 p.
- Gomes A, Koller W W, Medeiros de Barros A T (2011) Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. Ciênc Rural, 41(8),1447-1452.

- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, et al. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without reference genome. Nat Biotechnol 29 (7), 644-652.
- Grisi L, Leite RC, Martins JR, Barros AT, Andreotti R, Cançado PH, León AA, Pereira JB, Villela HS (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 23(2), 150-156.
- Gudderra NP, Sonenshine DE, Apperson CS, Roe RM (2002) Tissue distribution and characterization of predominant hemolymph carrier proteins from *Dermacentor variabilis* and *Ornithodoros parkeri*. J Insect Physiol 48, 161–170.
- Gudderra, NP, Neese, PA, Sonenshine, DE, Apperson CS, Roe RM (2001). Developmental profile, isolation, and biochemical characterization of a novel lipoglycoheme-carrier protein from the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and observations on a similar protein in the soft tick, *Ornithodoros parkeri* (Acari: Argasidae). Insect Biochem Mol Biol 31, 299–311.
- Guerrero FD, Lovis L, Martins JR. (2012) Acaricide resistance mechanisms in Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Rev Bras Parasitol 21(1),1-6.
- Gulia-Nuss M, Nuss AB, Meyer JM, Sonenshine DE, Roe RM, et al (2016) Genomic insights into the Ixodes scapularis tick vector of Lyme disease. Nature Communications 7, 1-13.
- Hansruedi G (2012) Sulfotransferases. In Encylopedia of cancer. Terceira edição. Volume 6. P 3558-3561.
- Hartley CJ, Newcomb RD, Russell RJ, Yong CG, Stevens JR, Yeates DK, La Salle J, Oakeshott JG (2006) Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance. Proc Natl Acad Sci USA 103 (23), 8757-8762.
- Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, Bolon B, Ochoa R (2013) Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Amsterdam. Terceira edição. Editorial Academic Press.3064 p.
- Hemingway J, Hawkes NJ, Mc Carroll L, Ranson H (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol 34, 653-665.
- Hemingway J, Ranson H (2000) Insecticide resistance in insect vectors of human diseases. Annu Rev Entomol 45, 371-391.
- Higa LOS, Garcia MV, Barros JC, Koller WW, Andreotti R (2015) Acaricide Resistance Status of the Rhipicephalus microplus in Brazil: A Literature Overview. Med chem 5,326-333.
- J. Zhang J,Goyer C, Pelletier Y (2008) Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say) Ins Mol Biol 17 (3),209–216
- James CE, Davey MW (2009) Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. Int J Parasitol 39 (2),213-220
- Karim K, Singh P, Ribeiro JMC (2011) A Deep Insight into the Sialotranscriptome of the Gulf Coast Tick, *Amblyomma maculatum*. PLoS ONE 6 (12): 1-19.

- Kihara A (2012) Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. J Biochem 152 (5), 387-395.
- Klafke GM, de Albuquerque TA, Miller RJ, Sato Schumaker TT(2010) Selection of an ivermectin-resistant strain of Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae) in Brazil. Vet Parasitol168 (1-2), 97-104
- Klafke GM, Sabatini GA, Alburquerque TA, Martins JR, Kemp DH, Miller RJ, Schumaker TTS (2006) Larval Immersion Tests with ivermectin in populations of the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) from State of São Paulo, Brazil. Vet Parasitol 142 (3-4), 386-390.
- Klafke, GM. (2011) Diagnóstico e mecanismos de resistência a ivermectina em Rhipicephalus (Boophilus) microlplus (Acari: Ixodidae). 176 f. Tése (Doutorado em Ciências) Intituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.
- Kuhr RJ and Motoyama N (1998) Pesticides and the future. Minimizing chronic exposure of humans and the enviroment. Amsterdam. Primeira edição. Editorial IOS Press. 332 p.
- Kwon DH, Clark JM, Lee SH (2010) Extensive gene duplication of acetylcholinesterase associated with organophosphate resistance in the two-spotted spider mite. Ins Mol Biol 19 (2), 195–204
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol 10 (3), 25-35.
- Lara FA, Pohl PC, Gandara AC, Ferreira JDS, Nascimento-Silva MC, Bechara GH, Sorgine MHF, Almeida IC, da Silva Vaz Jr I, Oliveira PL (2015) ATP Binding Cassette Transporter Mediates Both Heme and Pesticide Detoxification in Tick Midgut Cells. PLoS ONE 10 (8), 1-7.
- Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carthew RW (2004) Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. Cell 117(1), 69-81.
- Li X, Roberti R, Blobel G (2015) Structure of an integral membrane sterol reductase from Methylomicrobium alcaliphilum. Nature 517, 104–107
- Lockridge O (2015) Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. Pharmacology & Therapeutics 148, 34-46.
- Mamidala P, Wijeratne AJ, Wijeratne S, Kornacker K, Sudhamalla B, Rivera-Vega LJ, Hoelmer A, Meulia T, Jones SC, Mittapalli O (2012) RNA-Seq and molecular docking reveal multi-level pesticide resistance in the bed bug. BMC Genomics 13(6), 17-23.
- Martins JR, Furlong J (2001) Avermectin resistance of the cattle tick Boophilus microplus in Brazil. Vet Rec 149, 64.
- Maya-Monteiro CM, Daffre S, Logullo C, Lara FA, Alves EW, Capurro ML, Zingali R, Almeida IC, Oliveira PL (2000) HeLp, a Heme Lipoprotein from the Hemolymph of the Cattle Tick, *Boophilus microplus*. J Biol Chem 275(47), 36584–36589

- Mc Kenzie JA, Batterham P (1998) Predicting insecticide resistance: mutagenesis, selection and response. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 353 (1376), 1729–1734.
- McKenzie JA, Batterham P. (1994). The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. Trends Ecol. Evol 9 (5), 166-169.
- Mi H, Poudel S Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD (2016) PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools.Nucleic Acids Res. 44,336–342.
- Miller WL (2007) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. Biochim Biophys Acta 1771, 663-676.
- Mitchell III R D, Ross E, Osgood C, Sonenshine D E, Donohue K V, Khalil S M, Thompson D M, Roe R M (2007) Molecular characterization, tissue-specific expression and RNAi knockdown of the first vitellogenin receptor from a tick. Insect Biochem Mol Biol 37(4), 375-388.
- Moolhuijzen PM, Lew-Tabor AE, Morgan JAT, Rodriguez Valle M, Peterson DG, Dowd SE, Guerrero FD, Bellgard MI, Appels R (2011). The complexity of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* genome characterized through detailed analysis of two BAC clones, BMC Res Notes 4, 254-270.
- Morita M, Imanaka T (2012) Peroxisomal ABC transporters: Structure, function and role in disease. Biochim Biophys Acta 1822 (9),1387-1396.
- Mounsey KE, Holt DC, McCarthy J, Walton SF (2006) Identification of ABC transporters in *Sarcoptes scabiei*. Parasitology 132, 883-892
- Mousavi A, Hotta Y (2005) Glycine-Rich Proteins: A Class of Novel Proteins • . Appl Biochem Biotechnol 120 (3),169-74.
- Nardini M, Dijkstra BW 1999. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. Curr Opin Struct Biol 9, 732-737.
- Nkya TE, Akhouayri I, Poupardin R,Batengana B, Mosha F, Magesa S, Kisinza W, David JP (2014) Insecticide resistance mechanisms associated with different environments in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a case study in Tanzania. Malar J 13,28-43.
- Oliveira CJ, Anatriello E, de Miranda-Santos IK, Francischetti IM, Sá-Nunesd A, Ferreira BR, and Ribeiro JMC (2013) Proteome of *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva induced by the secretagogues pilocarpine and dopamine. Ticks Tick Borne Dis 4(6), 469–477.
- Õmura S (2008) Ivermectin: 25 years and still going • strong. Int J Antimicrob Agents 31(2), 91-98.
- Oshlack A, Robinson MD, Young MD (20103) From RNA-Seq reads to differential expression. Genome Biol 11(12), 220-229.
- P. J. Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR,Le Goff G, Feil E, Jeffers S,Tijet N,Perry T, Heckel D, Batterham P, Feyereisen R, Wilson TG, ffrench-Constant RH (2002) A Single P450 Allele Associated with Insecticide Resistance in *Drosophila.* Science 297 (5590), 2253-2256
- Parizi LF, Pohl1 PC; Masuda A, Da Silva Vaz Junior A (2009) New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. Rev Bras Parasitol Vet 18 (1), 1-7.

- Pasay C, Arlian L, Morgan M, Gunning R,Rossiter L,Holt D, Walton S,Beckham S and McCa rthy J (2009) The Effect of Insecticide Synergists on the Response of Scabies Mites to Pyrethroid Acaricides. PLoS Negl Trop Dis. 3 (1), 354-362.
- Perez-Cogollo LC, Rodriguez-Vivas RI, Ramirez-Cruz GT, Miller RJ (2010a) First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. Vet Parasitol 168 (1-2), 165-169.
- Perez-Cogollo LC, Rodriguez-Vivas RI, Ramirez-Cruz GT, Rosado-Aguilar (2010b) Survey of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin at cattle farms with history of macrocyclic lactones use in Yucatan, Mexico. Vet Parasitol 172 (1-2),109-113.
- Perry T, Batterham P, Daborn P J (2011) The biology of insecticidal activity and resistance. Insect Biochem Mol Biol 41 (7), 411-422.
- Pichu S, Yalcin EB, Ribeiro JMC, Kingg RS, Mather TN (2012) Molecular characterization of novel sulfotransferases from the tick, *Ixodes scapularis.* BMC Biochemistry 12 (32), 1-11.
- Pohl PC, Klafke GM, Reck Júnior J, Martins JR, Itabajara da Silva VJ, Masuda A. (2012) ABC transporters as a multidrug detoxification mechanismin Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Parasitol Res 111 (6), 2345-2351.
- Pohl PC, Klafke GM, Carvalho DD, Martins JR, Daffre S, da Silva Vaz I Jr, Masuda A (2011) ABC transporter efflux pumps: A defense mechanism against ivermectin in Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Int J Parasitol 41(13-14), 1323-1333.
- Pridgeon JW, Liu N (2003) Overexpression of the cytochrome c oxidase subunit I gene associated with a pyrethroid resistant strain of German cockroaches, *Blattella germanica* (L.) Insect Biochem Mol Biol 33 (10), 1043-1048.
- Rauh JJ, Lummis SC, Sattelle DB (1990) Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors. Trends Pharmacol Sci 11(8),325-329.
- Reck J, Marks FS, Rodrigues RO, Souza UA, Webster A, Leite RC, Gonzales JC, Klafke GM, Martins JR (2014) Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle? Prev Vet Med 113(1),59-62.
- Reis Montella I, Schama R, Valle D (2012) The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 107(4), 437-449.
- Robinson MD, McCarthy DJ and Smyth GK (200910) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26 (1), 139-140.
- Robinson MD, Oshlack A (2010) A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. Genome Biology 11, 1-9.
- Rodríguez-Vivas RI, Arieta-Román RJ, Pérez-Cogollo LC, Rosado-Aguilar JA, Ramírez-Cruz GT, Basto-Estrella G. (2010) Use of macrocyclic lactones to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Arch Med Vet 42 (3), 115-123.
- Rodriguez-Vivas RI, Trees AJ, Rosado-Aguilar JA, Villegas-Perez SL, Hodgkinson JE (20121) Evolution of acaricide resistance: phenotypic and genotypic changes in field populations of

Rhipicephalus (Boophilus) microplus in response to pyrethroid selection pressure. Int J Parasitol 41(8), 895-903.

- Rosario-Cruz R, Almazan C, Miller RJ, Dominguez-Garcia DI, Hernandez-Ortiz R, de la Fuente5 J (2009). Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. Front Biosci 14, 2657-2665.
- Saldivar L , Guerrero FD, Miller RJ, Bendele KG, Gondro C, Brayton KA (2008) Microarray analysis of acaricide-inducible gene expression in the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus.* Ins Mol Biol 17(6), 597–606.
- Salinas, A E, Wong M G (1999) Glutathione-S-Transferase-A review. • Curr Med Chem 6 (4), 279-309.
- Sands Z, Grottesi A and Sansom M S P (2005) Voltage-gated ion channels • . Curr Biol 15 (2), 44-47.
- Schwab N (2012) Encylopedia of cancer. Terceira edição. Berlin. Editorial Springer Berlin Heidelberg. 344 p.
- Schwarz A, Valdés JJ and Kotsyfakis M (2012) The role of cystatins in tick physiology and blood feeding. Ticks Tick Borne Dis 3 (3), 117–127.
- Silva AX, Jander G,Samaniego H, Ramsey JS, Figueroa CC (2012) Insecticide Resistance Mechanisms in the Green Peach Aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: A Transcriptomic Survey. PLoS ONE 7, 6-20.
- Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM (2015) BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics 31(19), 3210-3212
- Smith A D and Reuben Kaufman W (2013) Molecular characterization of the vitellogenin receptor from the tick, Amblyomma hebraeum (Acari: Ixodidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology 43 (12), 1133-1141.
- Soneshine DE, Roe RM. (2014) The biology of ticks. Segunda edição. New York. Editorial Oxford University. 496 p.
- Stenmark H, Olkkonen VM (2001) Protein family review: The Rab GTPase family. Genome Biol 2 (5), 1-7.
- Tabashnik BE, Mota-Sanchez D, Whalon ME, Hollingworth RM, Carrie Y (2014) Defining Terms for Proactive Management of Resistance to Bt Crops and Pesticides. J Econ Entomol 107(2), 496-507.
- Temeyer KB, Pruett JH, Olafson PU (2010) Baculovirus expression, biochemical characterization and organophosphatesensitivity of rBmAChE1, rBmAChE2 and rBmAChE3 of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vet Parasitol 172: (1-2), 114-121.
- Tirloni L, Reck J, Terra RMS, Martins JR, Mulenga A, Sherman NE, Fox JW, Yates JR 3rd, Termignoni C, Pinto AF, Vaz Ida S Jr (2014) Proteomic Analysis of Cattle Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Saliva: A Comparison between Partially and Fully Engorged Females. PLoS ONE 9(4), 1-19.

- Tirloni L, Seixas A, Mulenga A, Vaz Ida S Jr, Termignoni C (2014b). A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Exp Parasitol 137, 25-34.
- Tsagkarakou A, Navajas A, Lagnel N, Gutierrez J, Pasteur N (1996) Genetic Variability in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from Greece: Insecticide Resistance and Isozymes. J Econ Entomol 89 (6),1354-1358.
- Valenzuela JG (2004) Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. Parasitology 129, 83-94.
- Valenzuela JG, Francischetti IM, Pham VM, Garfield MK, Mather TN, Ribeiro JM (2002) Exploring the sialome of the tick Ixodes scapularis. J Exp Biol 205, 2843-2864.
- Van Leeuwen T, Van Pottelberge S, Tirry L (2005) Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of Tetranychus urticae. Pest Manag Sci 61(5), 499-507.
- Van Leeuwen T, Vontas T, Tsagkarakou A, Dermauw W, Tirry L (2010) Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae and other important Acari: A review. Insect Biochem Mol Biol 40 (8),563-572.
- Villarino MA, Waghela SD,Wagner GG (2003) Biochemical detection of esterases in the adult female integument of organophosphate-resistant Boophilus microplus (Acari, Ixodidae). J Med Entomol 40 (1),52-57.
- Vontas J, Blass C, Koutsos AC, David JP, Kafatos FC, Louis C, Hemingway J, Christophides GK, Ranson H. (2005) Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. Insect Mol Biol 14 (5), 509-521.
- Wallimann (1994) Bioenergetics: Dissecting the role of creatine kinase. Curr biol 4 (1), 42-46.
- Wanders RJA, Visser WF, Carlo WT, van Roermund CWT, Kemp S, Waterham HR (2006) The peroxisomal ABC transporter family. Pflugers Arch 453(5),719-734.
- Watt MJ, Steinberg G R (2008) Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. Biochem J 414 (3),313–325.
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R (2000) Cytochromes P450: a success story. Genome Biol 1(6), 1-9.
- Wolf, JBW (2013) Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-Seq tutorial. Mol Ecol Resour 13 (4),559-572.
- Xia X, Yu L, Xue M, Yu X, Vasseur L, Gurr M, Baxter SW, Lin H, Lin J,You M (2015) Genome-wide characterization and expression profiling of immune genes in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) Sci Rep 5, 1-13.
- Zhang L, Liu N, Ma X, Jiang L. (2013) The transcriptional control machinery as well as the cell wall integrity and its regulation are involved in the detoxification of the organic solvent dimethyl sulfoxide in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Yeast Res 13(2), 200–218.

- Zhong R, Ding TB, Niu JZ, Xia WK, Liao CY, Dou W, Wang JJ (2015) Molecular Characterization of Vitellogenin and Its Receptor Genes from Citrus Red Mite, Panonychus citri (McGregor). Int J Mol Sci 16 (3), 4759-4773
- Zhou Z, Zhou J, Du Y (2012) Estrogen Receptor Alpha Interacts with Mitochondrial Protein HADHB and Affects Beta-Oxidation Activity. Mol Cell Proteomics 11(7), 1-12.
- Zhu YC, Guo Z, He YLuttrell R (2012) Microarray analysis of gene regulations and potencial association with acephate-resistance and fitness cost in Lygus lineolaris. PLoS One 7 (5), 1-17.
- Zumpt F (1965) Myiasis in man and animals in the Old World: A Textbook for Physicians, Veterinarians, and Zoologists. London. Primeira edição. Editorial Butterworths, 267p

Anexo 1

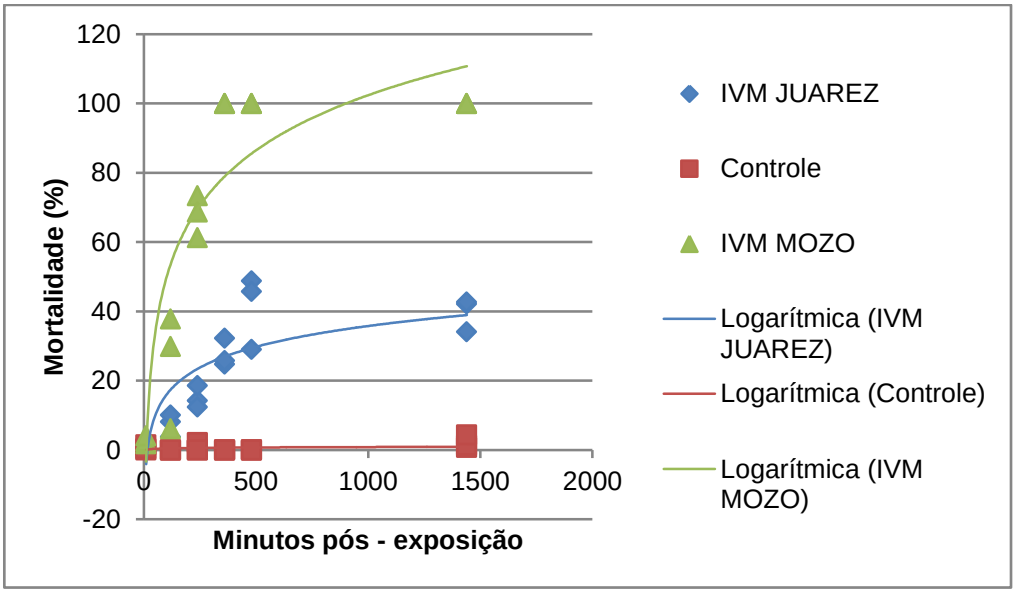

Figura A1. Porcentagem de mortalidade ao longo do tempo da cepa Mozo comparada à cepa JUA, expostas a 100 ppm de IVM e diluente. A cepa Mozo atinge 100% de mortalidade aos 240 minutos e, no entanto, a cepa JUA atinge apenas cerca de 40% de mortalidade aos 1440 minutos. Na condição controle a mortalidade não supera 4,34 %.

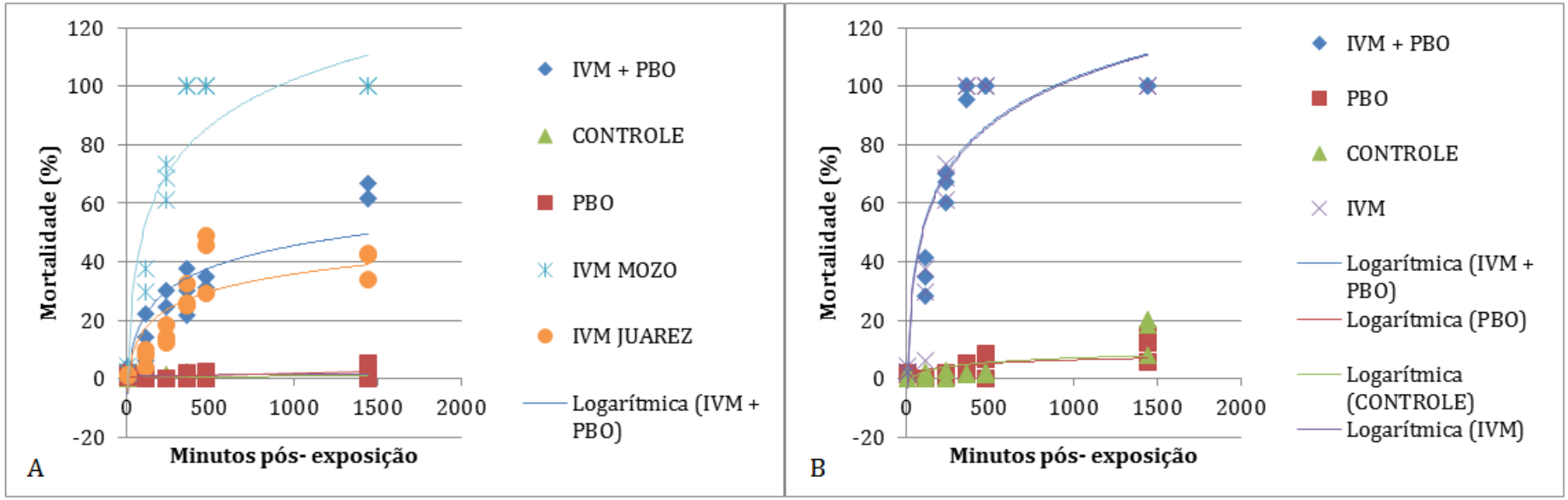

Figura A2. Porcentagem de mortalidade ao longo do tempo das cepas Mozo e JUA expostas a 100 ppm de IVM, IVM, diluente e PBO. **A.** A cepa Jurez atinge 40 % da mortalidade às 24 horas quando exposta apenas a ivermectina. Esta porcentagem aumenta 10 % quando a mesma cepa é exposta a ivermectina em combinação com PBO. **B.** A cepa mozo atinge 100% da mortalidade aos 240 minutos quando exposta apenas a ivermectina ou exposta a ivermectina em combinação com PBO.

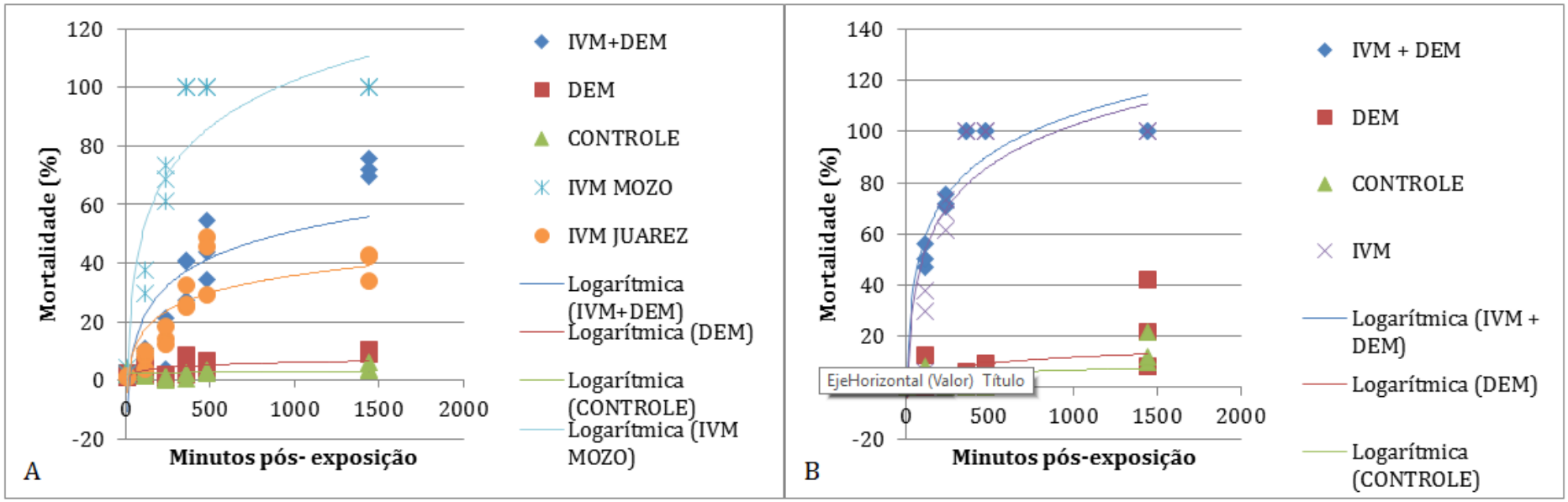

Figura A3. Porcentagem de mortalidade ao longo do tempo da cepa JUA (resistente) exposta a 100 ppm de IVM com DEM e da cepa Mozo (suscetível) exposta a 100 ppm de IVM. Também se observa a mortalidade dos controles com IVM, DEM, e diluente. **A.** Quando comparada à mortalidade da cepa Juarez exposta apenas com ivermectina, a mortalidade aumenta 20 % quando a epa é exposta a ivermectina em combinação com DEM. **B.** A cepa Mozo não apresenta diferenças na mortalidade quando exposta apenas a ivermectina ou ivermectina em combinação com DEM.

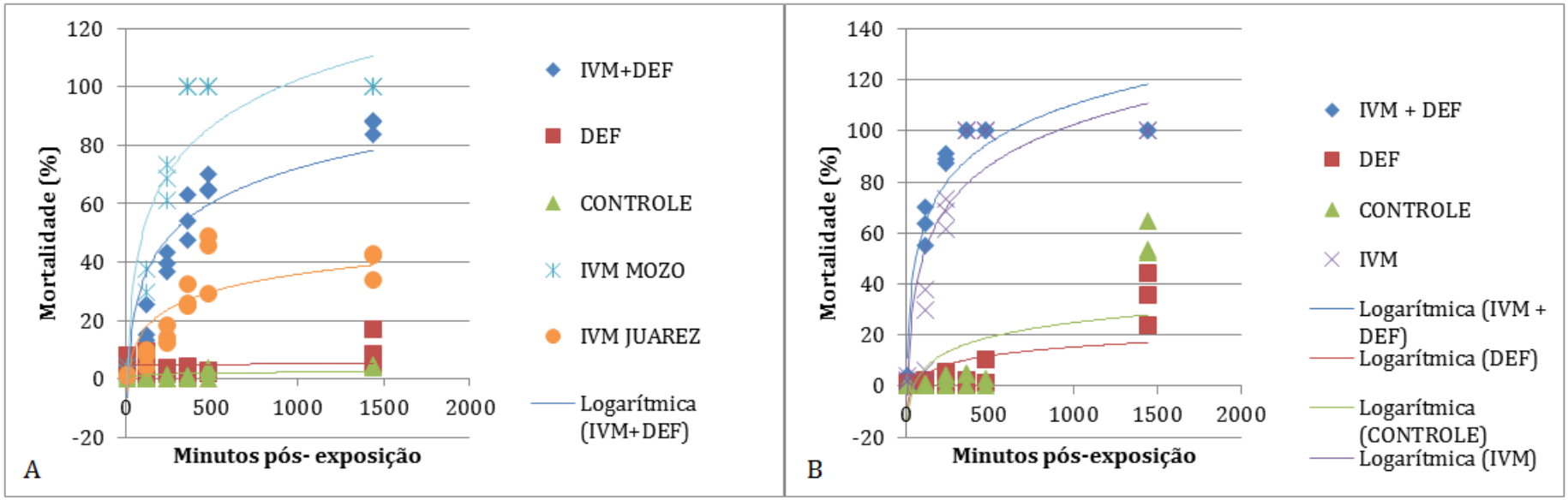

Figura A4. Porcentagem de mortalidade ao longo do tempo da cepa JUA exposta a 100 ppm de IVM com DEF e da cepa Mozo exposta a 100 ppm de IVM. IVM, DEF e diluente constituem os controles. **A.** Quando exposta apenas a ivermectina a cepa Juarez atinge 40 % da mortalidade aos 1440 minutos. Quando exposta a ivermectina em combinação com DEF a mortalidade aumenta 40 % no mesmo tempo. **B.** A cepa Mozo não apresenta diferenças na mortalidade quando exposta apenas a ivermectina ou ivermectina em combinação com DEF.

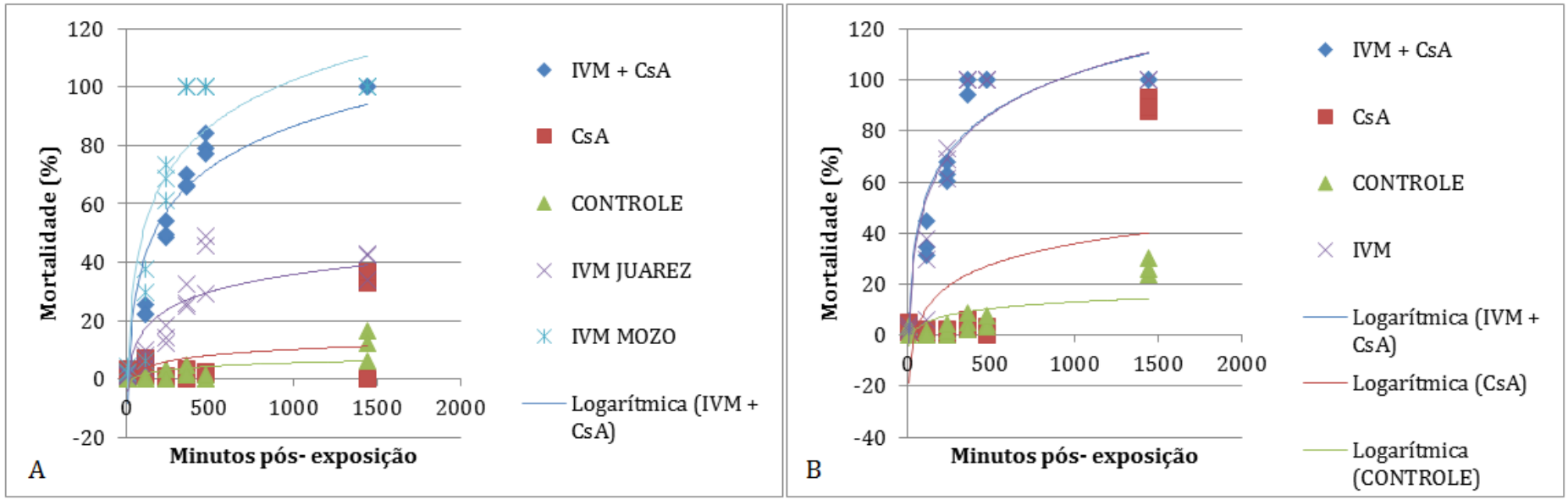

Figura A5. Porcentagem de mortalidade ao longo do tempo da cepa JUA exposta a 100 ppm de IVM com CsA e da cepa Mozo exposta a 100 ppm de IVM. IVM, CsA e diluente constituem os controles. A. Quando exposta a ivermectina em combinação com CsA a mortalidade da cepa Juarez atinge 100 %, o que significa um aumento de 60% da mortalidade quando a mesma cepa é exposta apenas a ivermectina, igualando a mortalidade da cepa Mozo (suscetível) B. Seja exposta apenas a ivermectina ou ivermectina em combinação com CsA, a cepa Mozo não apresenta diferenças na mortalidade.

Anexo 2

	Ixodes scapularis (Gulia-Nuss et al., 2016)					
GO biological process complete	Number of observed occurences	Number of expected occurences	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
carboxylic acid biosynthetic process	101	17	4.13	4.12	+	1.78E-03
carboxylic acid metabolic process	296	33	12.09	2.73	+	4.62E-04
oxoacid metabolic process	301	33	12.30	2.68	+	6.64E-04
organic acid metabolic process	345	36	14.09	2.55	+	6.47E-04
organic substance metabolic process	4217	269	172.26	1.56	+	3.88E-12
metabolic process	5573	359	227.65	1.58	+	1.47E-19
single-organism cellular process	2518	192	102.86	1.87	+	1.15E-14
single-organism process	3939	304	160.90	1.89	+	6.14E-28
cellular process	4833	328	197.42	1.66	+	8.76E-21
small molecule metabolic process	646	63	26.39	2.39	+	5.21E-07
single-organism metabolic process	2058	168	84.07	2.00	+	4.66E-15
cellular metabolic process	3468	233	141.66	1.64	+	2.83E-12
organic acid biosynthetic process	106	17	4.33	3.93	+	3.35E-03
small molecule biosynthetic process	128	21	5.23	4.02	+	1.66E-04
single-organism biosynthetic process	383	40	15.64	2.56	+	1.50E-04
biosynthetic process	1318	87	53.84	1.62	+	1.11E-02
organic substance biosynthetic process	1251	82	51.10	1.60	+	2.59E-02
fatty acid metabolic process	104	15	4.25	3.53	+	4.20E-02
cellular lipid metabolic process	249	29	10.17	2.85	+	9.87E-04
lipid metabolic process	318	38	12.99	2.93	+	1.06E-05
primary metabolic process	3978	255	162.49	1.57	+	1.79E-11

GO biological process complete (Cont.)	Number of observed occurences	Number of expected occurences	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
lipid biosynthetic process	151	21	6.17	3.40	+	2.24E-03
dephosphorylation	206	25	8.41	2.97	+	2.73E-03
phosphate-containing compound metabolic process	988	86	40.36	2.13	+	8.87E-08
phosphorus metabolic process	993	86	40.56	2.12	+	1.13E-07
anion transport	233	27	9.52	2.84	+	2.56E-03
ion transport	605	54	24.71	2.19	+	1.60E-04
transport	1481	121	60.50	2.00	+	5.14E-10
establishment of localization	1498	121	61.19	1.98	+	1.09E-09
localization	1547	125	63.19	1.98	+	4.18E-10
transmembrane transport	841	80	34.35	2.33	+	6.73E-09
single-organism transport	547	49	22.34	2.19	+	5.53E-04
single-organism localization	568	49	23.20	2.11	+	1.57E-03
protein phosphorylation	435	38	17.77	2.14	+	1.82E-02
phosphorylation	633	54	25.86	2.09	+	6.35E-04
cellular protein modification process	1178	80	48.12	1.66	+	9.71E-03
protein modification process	1178	80	48.12	1.66	+	9.71E-03
macromolecule metabolic process	3303	184	134.92	1.36	+	6.62E-03
macromolecule modification	1273	84	52.00	1.62	+	1.62E-02
cellular macromolecule metabolic process	2505	146	102.32	1.43	+	8.38E-03
organic substance transport	600	51	24.51	2.08	+	1.45E-03
signal transduction	909	74	37.13	1.99	+	3.11E-05
single organism signaling	944	79	38.56	2.05	+	3.14E-06
signaling	946	79	38.64	2.04	+	3.44E-06
cellular response to stimulus	1131	84	46.20	1.82	+	1.73E-04
response to stimulus	1371	97	56.00	1.73	+	1.63E-04
regulation of cellular process	1978	130	80.80	1.61	+	6.49E-05

GO biological process complete (Cont.)	Number of observed occurences	Number of expected occurences	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
biological regulation	2256	155	92.15	1.68	+	1.12E-07
regulation of biological process	2029	137	82.88	1.65	+	5.18E-06
cell communication	957	83	39.09	2.12	+	2.32E-07
oxidation-reduction process	1159	91	47.34	1.92	+	3.90E-06
Unclassified	12031	285	491.45	.58	-	0.00E00

Tabela A1. Termos GO enriquecidos para processos biológicos para a comparação dentro da cepa Juarez a 0 e 100 ppm de ivermectina

	Ixodes scapularis (Gulia-Nuss et al., 2016)					
GO molecular function complete	Number of observed occurences	Number of expected occurences	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
anion transmembrane transporter activity	109	16	4.45	3.59	+	1.80E-02
ion transmembrane transporter activity	501	46	20.46	2.25	+	6.09E-04
substrate-specific transmembrane transporter activity	684	60	27.94	2.15	+	5.48E-05
substrate-specific transporter activity	760	71	31.04	2.29	+	2.30E-07
transporter activity	1031	92	42.11	2.18	+	4.64E-09
transmembrane transporter activity	842	73	34.39	2.12	+	2.96E-06
symporter activity	124	17	5.07	3.36	+	2.34E-02
secondary active transmembrane transporter activity	203	24	8.29	2.89	+	6.29E-03
active transmembrane transporter activity	369	34	15.07	2.26	+	1.67E-02
2-alkenal reductase [NAD(P)] activity	158	21	6.45	3.25	+	4.23E-03
oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors, NAD or NADP as acceptor	185	24	7.56	3.18	+	1.34E-03
oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors	218	27	8.90	3.03	+	7.10E-04
oxidoreductase activity	1128	90	46.08	1.95	+	2.13E-06
catalytic activity	5911	412	241.45	1.71	+	2.25E-32
phosphatase activity	206	25	8.41	2.97	+	2.59E-03
phosphoric ester hydrolase activity	315	37	12.87	2.88	+	2.43E-05
hydrolase activity, acting on ester bonds	748	67	30.55	2.19	+	3.97E-06
hydrolase activity	2501	178	102.16	1.74	+	1.33E-10
protein serine/threonine kinase activity	231	25	9.44	2.65	+	1.76E-02
protein kinase activity	434	38	17.73	2.14	+	1.64E-02
kinase activity	605	51	24.71	2.06	+	1.74E-03
transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	791	67	32.31	2.07	+	3.28E-05

GO molecular function complete (Cont.)	Number of observed occurences	Number of expected occurences	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
transferase activity	2072	137	84.64	1.62	+	1.75E-05
phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	504	44	20.59	2.14	+	3.83E-03
ATP binding	800	66	32.68	2.02	+	1.08E-04
purine ribonucleoside binding	981	80	40.07	2.00	+	7.19E-06
purine nucleoside binding	981	80	40.07	2.00	+	7.19E-06
nucleoside binding	989	81	40.40	2.01	+	4.76E-06
organic cyclic compound binding	2934	180	119.85	1.50	+	1.44E-05
binding	4563	301	186.39	1.61	+	1.78E-16
carbohydrate derivative binding	1129	90	46.12	1.95	+	2.23E-06
small molecule binding	1335	107	54.53	1.96	+	4.04E-08
heterocyclic compound binding	2924	179	119.44	1.50	+	1.87E-05
ribonucleoside binding	988	81	40.36	2.01	+	4.56E-06
adenyl ribonucleotide binding	803	66	32.80	2.01	+	1.23E-04
adenyl nucleotide binding	805	66	32.88	2.01	+	1.34E-04
purine nucleotide binding	989	80	40.40	1.98	+	1.02E-05
nucleotide binding	1295	105	52.90	1.98	+	3.30E-08
nucleoside phosphate binding	1295	105	52.90	1.98	+	3.30E-08
purine ribonucleotide binding	985	80	40.24	1.99	+	8.55E-06
ribonucleotide binding	1015	81	41.46	1.95	+	1.46E-05
purine ribonucleoside triphosphate binding	980	80	40.03	2.00	+	6.88E-06
zinc ion binding	500	41	20.42	2.01	+	3.36E-02
metal ion binding	1560	112	63.72	1.76	+	6.77E-06
cation binding	1580	114	64.54	1.77	+	3.70E-06
ion binding	1631	118	66.62	1.77	+	1.61E-06
Unclassified	10945	208	447.08	.47	-	0.00E00

Tabela A2. Termos GO enriquecidos para funções moleculares para a comparação dentro da cepa Juarez a 0 e 100 ppm de ivermectina

	Ixodes scapularis (Gulia-Nuss et al., 2016)					
GO cellular component complete	Number of observed occurences	Number of expected occurences	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
integral component of plasma membrane	398	41	16.26	2.52	+	5.70E-05
plasma membrane	644	60	26.31	2.28	+	2.71E-06
cell part	4202	278	171.64	1.62	+	3.02E-15
cell	4236	278	173.03	1.61	+	8.91E-15
membrane	4049	239	165.39	1.45	+	2.92E-07
cell periphery	662	60	27.04	2.22	+	7.15E-06
integral component of membrane	3632	214	148.36	1.44	+	4.09E-06
intrinsic component of membrane	3639	214	148.65	1.44	+	4.79E-06
membrane part	3812	223	155.71	1.43	+	3.15E-06
intrinsic component of plasma membrane	401	41	16.38	2.50	+	6.91E-05
plasma membrane part	461	45	18.83	2.39	+	6.25E-05
cytoplasmic part	1369	86	55.92	1.54	+	2.72E-02
intracellular part	3333	193	136.15	1.42	+	1.01E-04
intracellular	3655	225	149.30	1.51	+	2.68E-08
cytoplasm	1981	131	80.92	1.62	+	1.53E-05
Unclassified	13016	394	531.68	.74	-	0.00E00

Tabela A3. Termos GO enriquecidos de componentes celulares para a comparação dentro da cepa Juarez a 0 e 100 ppm de ivermectina

Ixodes scapularis (Gulia-Nuss et al., 2016)						
GO biological process complete	Number of observed occurences	Number of expected occurences	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
carboxylic acid biosynthetic process	101	12	2.74	4.37	+	3.29E-02
carboxylic acid metabolic process	296	22	8.04	2.74	+	3.47E-02
oxoacid metabolic process	301	22	8.18	2.69	+	4.43E-02
organic acid metabolic process	345	25	9.37	2.67	+	1.55E-02
organic substance metabolic process	4217	183	114.56	1.60	+	1.00E-08
metabolic process	5573	255	151.40	1.68	+	5.90E-18
single-organism cellular process	2518	120	68.41	1.75	+	7.27E-07
single-organism process	3939	199	107.01	1.86	+	5.96E-17
cellular process	4833	212	131.30	1.61	+	1.87E-11
small molecule metabolic process	646	47	17.55	2.68	+	2.24E-06
single-organism metabolic process	2058	128	55.91	2.29	+	5.66E-16
cellular metabolic process	3468	155	94.22	1.65	+	1.05E-07
small molecule biosynthetic process	128	16	3.48	4.60	+	8.47E-04
single-organism biosynthetic process	383	29	10.40	2.79	+	1.38E-03
lipid metabolic process	318	29	8.64	3.36	+	3.18E-05
primary metabolic process	3978	176	108.07	1.63	+	6.26E-09
organic substance catabolic process	491	31	13.34	2.32	+	2.16E-02
catabolic process	493	32	13.39	2.39	+	9.26E-03
transmembrane transport	841	51	22.85	2.23	+	1.47E-04
transport	1481	75	40.23	1.86	+	2.17E-04
establishment of localization	1498	76	40.70	1.87	+	1.65E-04
localization	1547	80	42.03	1.90	+	3.34E-05
oxidation-reduction process	1159	66	31.49	2.10	+	1.97E-05

GO biological process complete (Cont.)	Number of observed occurences	Number of expected occurences	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
phosphate-containing compound metabolic process	988	53	26.84	1.97	+	3.20E-03
phosphorus metabolic process	993	53	26.98	1.96	+	3.69E-03
Unclassified	12031	191	326.85	.58	-	0.00E00

Tabela A4. Termos GO enriquecidos para procesos biológicos na comparação dentro da cepa Juarez a 10 e 100 ppm de ivermectina.

	Ixodes scapularis (Gulia-Nuss et al., 2016)					
GO molecular function complete	Number of observed occurences	Number of expected occurences	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
lyase activity	138	17	3.75	4.53	+	4.45E-04
catalytic activity	5911	284	160.58	1.77	+	4.47E-25
2-alkenal reductase [NAD(P)] activity	158	15	4.29	3.49	+	4.33E-02
oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors, NAD or NADP as acceptor	185	18	5.03	3.58	+	5.45E-03
oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors	218	19	5.92	3.21	+	1.38E-02
oxidoreductase activity	1128	64	30.64	2.09	+	3.60E-05
secondary active transmembrane transporter activity	203	18	5.51	3.26	+	1.86E-02
transmembrane transporter activity	842	47	22.87	2.05	+	4.12E-03
transporter activity	1031	56	28.01	2.00	+	1.07E-03
ion transmembrane transporter activity	501	33	13.61	2.42	+	4.70E-03
substrate-specific transmembrane transporter activity	684	39	18.58	2.10	+	1.77E-02
substrate-specific transporter activity	760	46	20.65	2.23	+	6.26E-04
transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	791	44	21.49	2.05	+	9.22E-03
transferase activity	2072	99	56.29	1.76	+	2.80E-05
hydrolase activity	2501	122	67.94	1.80	+	1.12E-07
binding	4563	178	123.96	1.44	+	9.09E-05
Unclassified	10945	156	297.34	.52	-	0.00E00

Tabela A5. Termos GO enriquecidos para funções moleculares na comparação dentro da cepa Juarez a 10 e 100 ppm de ivermectina.

	Ixodes scapularis (Gulia-Nuss et al., 2016)					
GO cellular component complete	Number of observed occurences	Number of expected occurences	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
integral component of plasma membrane	398	27	10.81	2.50	+	8.45E-03
plasma membrane	644	40	17.50	2.29	+	7.57E-04
cell part	4202	167	114.16	1.46	+	3.33E-05
cell	4236	167	115.08	1.45	+	5.75E-05
membrane	4049	154	110.00	1.40	+	1.90E-03
cell periphery	662	41	17.98	2.28	+	6.02E-04
integral component of membrane	3632	136	98.67	1.38	+	1.86E-02
intrinsic component of membrane	3639	136	98.86	1.38	+	2.04E-02
membrane part	3812	146	103.56	1.41	+	2.61E-03
intrinsic component of plasma membrane	401	27	10.89	2.48	+	9.60E-03
plasma membrane part	461	31	12.52	2.48	+	2.46E-03
cytoplasm	1981	88	53.82	1.64	+	1.55E-03
Unclassified	13016	280	353.61	.79	-	0.00E00

Tabela A6. Termos enriquecidos GO para componentes celulares na comparação dentro da cepa Juarez a 10 e 100 ppm de ivermectina.

	Ixodes scapularis (Gulia-Nuss et al., 2016)					
GO biological process complete	Number of observed occurences	Number of expected occurences	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
fatty acid biosynthetic process	67	11	2.17	5.08	+	1.88E-02
lipid biosynthetic process	151	17	4.88	3.48	+	1.53E-02
lipid metabolic process	318	36	10.29	3.50	+	2.43E-07
organic substance metabolic process	4217	212	136.40	1.55	+	4.67E-09
metabolic process	5573	298	180.27	1.65	+	1.15E-19
primary metabolic process	3978	199	128.67	1.55	+	4.89E-08
single-organism metabolic process	2058	148	66.57	2.22	+	2.06E-17
single-organism process	3939	228	127.41	1.79	+	3.17E-17
organic substance biosynthetic process	1251	72	40.47	1.78	+	2.49E-03
biosynthetic process	1318	77	42.63	1.81	+	6.11E-04
single-organism biosynthetic process	383	34	12.39	2.74	+	2.53E-04
fatty acid metabolic process	104	16	3.36	4.76	+	5.65E-04
monocarboxylic acid metabolic process	125	17	4.04	4.20	+	1.33E-03
carboxylic acid metabolic process	296	30	9.57	3.13	+	8.56E-05
oxoacid metabolic process	301	30	9.74	3.08	+	1.22E-04
organic acid metabolic process	345	33	11.16	2.96	+	7.24E-05
single-organism cellular process	2518	138	81.45	1.69	+	4.83E-07
cellular process	4833	247	156.33	1.58	+	2.66E-12
small molecule metabolic process	646	52	20.90	2.49	+	4.04E-06
cellular metabolic process	3468	188	112.18	1.68	+	1.95E-10
cellular lipid metabolic process	249	29	8.05	3.60	+	7.60E-06
monocarboxylic acid biosynthetic process	71	12	2.30	5.23	+	5.87E-03
carboxylic acid biosynthetic process	101	16	3.27	4.90	+	3.86E-04
organic acid biosynthetic process	106	16	3.43	4.67	+	7.22E-04
small molecule biosynthetic process	128	19	4.14	4.59	+	8.50E-05

GO biological process complete (Cont.)	Number of observed occurences	Number of expected occurences	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
cellular biosynthetic process	1237	71	40.01	1.77	+	3.24E-03
cellular catabolic process	385	30	12.45	2.41	+	1.59E-02
catabolic process	493	35	15.95	2.19	+	2.18E-02
oxidation-reduction process	1159	81	37.49	2.16	+	1.24E-07
organic substance catabolic process	491	34	15.88	2.14	+	4.66E-02
organonitrogen compound metabolic process	896	53	28.98	1.83	+	2.88E-02
nitrogen compound metabolic process	1932	103	62.49	1.65	+	4.70E-04
cellular component organization or biogenesis	1069	60	34.58	1.74	+	3.76E-02
cellular nitrogen compound metabolic process	1694	89	54.79	1.62	+	5.74E-03
Unclassified	12031	248	389.16	.64	-	0.00E00

Tabela A7. Termos GO enriquecidos para processos biológicos na comparação entre as cepas Mozo e Juarez a 0 ppm de ivermectina.

	Ixodes scapularis (Gulia-Nuss et al., 2016)					
GO molecular function complete	Number of observed occurences	Number of expected occurences	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
3-oxo-lignoceronyl-CoA synthase activity	53	10	1.71	5.83	+	1.33E-02
transferase activity	2072	120	67.02	1.79	+	3.45E-07
catalytic activity	5911	332	191.20	1.74	+	1.29E-27
3-oxo-cerotoyl-CoA synthase activity	53	10	1.71	5.83	+	1.33E-02
3-oxo-arachidoyl-CoA synthase activity	53	10	1.71	5.83	+	1.33E-02
oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors	192	19	6.21	3.06	+	2.69E-02
oxidoreductase activity	1128	81	36.49	2.22	+	3.25E-08
nucleotide binding	1295	72	41.89	1.72	+	7.67E-03
nucleoside phosphate binding	1295	72	41.89	1.72	+	7.67E-03
heterocyclic compound binding	2924	136	94.58	1.44	+	8.23E-03
binding	4563	200	147.60	1.36	+	1.54E-03
organic cyclic compound binding	2934	136	94.90	1.43	+	9.76E-03
small molecule binding	1335	74	43.18	1.71	+	6.28E-03
hydrolase activity	2501	127	80.90	1.57	+	2.15E-04
Unclassified	10945	205	354.03	.58	-	0.00E00

Tabela A8. Termos GO enriquecidos para funções moleculares na comparação entre as cepas Mozo e Juarez a 0 ppm de ivermectina.

	Ixodes scapularis (Gulia-Nuss et al., 2016)					
GO cellular component complete	Number of observed occurences	Number of expected occurences	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
cytoplasmic part	1369	79	44.28	1.78	+	2.62E-04
intracellular part	3333	169	107.81	1.57	+	4.00E-07
intracellular	3655	181	118.23	1.53	+	4.92E-07
cell part	4202	208	135.92	1.53	+	1.37E-08
cell	4236	209	137.02	1.53	+	1.61E-08
cytoplasm	1981	116	64.08	1.81	+	1.54E-07
intracellular organelle part	1297	72	41.95	1.72	+	3.24E-03
intracellular organelle	2553	132	82.58	1.60	+	1.65E-05
organelle	2566	132	83.00	1.59	+	2.22E-05
organelle part	1304	72	42.18	1.71	+	3.87E-03
intracellular membrane-bounded organelle	2232	109	72.20	1.51	+	4.34E-03
membrane-bounded organelle	2232	109	72.20	1.51	+	4.34E-03
Unclassified	13016	332	421.02	.79	-	0.00E00

Tabela A9. Termos GO enriquecidos para componentes celulares na comparação entre as cepas Mozo e Juarez a 0 ppm de ivermectina.