THAIS AGUIAR DE ALBUQUERQUE

**OBTENÇÃO DE UMA CEPA DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*
(ACARI:IXODIDAE) RESISTENTE À IVERMECTINA**

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro).**

São Paulo

2007

THAIS AGUIAR DE ALBUQUERQUE

**OBTENÇÃO DE UMA CEPA DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*
(ACARI:IXODIDAE) RESISTENTE À IVERMECTINA**

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências**

Área de Concentração: Parasitologia

Orientador: Profa. Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker

São Paulo

2007

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, sem vocês, onde eu estaria?

À Teca, sem você, onde esta dissertação estaria?

Ao amigo Guilherme, sem você, o que eu estaria fazendo agora?

AGRADECIMENTOS

Às todas as pessoas especiais que nasci por perto e àquelas que escolhi conviver, aos momentos especiais que vivi e aos que me ajudaram neste e em outros momentos da minha vida, eu só tenho a agradecer, muito obrigada !!!

**"O homem pode tornar-se culto a partir da cultura dos outros,
mas somente se torna sábio pela própria experiência."**

Provérbio chinês

RESUMO

ALBUQUERQUE, T. A. Obtenção de uma cepa de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI:IXODIDAE) resistente à ivermectina. 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O estabelecimento de isolados de *Rhipicephalus (B.) microplus* resistentes a drogas é um passo fundamental para pesquisas sobre mecanismos de ação das drogas e desenvolvimento de novos acaricidas. Diferentes tratamentos de pressão de seleção foram efetuados sobre uma população de campo com fator de resistência (FR) à ivermectina (IVM) 1,37 visando obter experimentalmente uma cepa resistente. O tratamento das larvas com IVM não resultou em infestações de bezerros. O tratamento das adultas, por duas gerações consecutivas não alterou o valor do FR da população. A este último procedimento foi associado o tratamento do hospedeiro com IVM, resultando em aumento significativo do FR. Infestações utilizando larvas provenientes de posturas de alta eclodibilidade parece ter contribuído ainda mais para o aumento do FR observado na última geração. Em resumo, foi possível estabelecer pela primeira vez, em laboratório, uma cepa resistente à IVM que apresentou um aumento estatisticamente significativo do valor do FR da última geração analisada (F10) em relação à inicial (F1).

Palavras-chave: Carrapato. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Resistência. Acaricida. Ivermectina. Seleção.

ABSTRACT

ALBUQUERQUE, T. A. Obtention of a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI:IXODIDAE) ivermectin-resistant strain. 2007. 66 f. Master Thesis (Biology of Relationship Host-Pathogen) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

The establishment of drug resistant *Rhipicephalus (B.) microplus* isolates is a fundamental step on researches about drugs mechanisms of action and on the development of new acaricides. Different selection treatments were effectuated upon a field population with an ivermectin (IVM) resistant ratio (RR) 1,37 aiming to obtain experimentally a resistant strain. The larval treatments with IVM do not reach calf infestations. The adult treatments, in two consecutive generations do not changed the population RR. To this last protocol was added the IVM host treatment, increasing significantly the RR. Infestations using larvae obtained from the high-eclodibility oviposition seemed to have contributed much more to the RR increase observed on the last generation. Finally, it was possible to establish for the first time, on laboratory, an IVM resistant strain that showed a significantly higher RR value from the last generation (F10) in relation to the first one analyzed (F1).

Palavras-chave: Tick. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Resistance. Acaricide. Ivermectin. Selection.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	08
1.1 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> : biologia e importância econômica.....	08
1.2 Controle de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	11
1.3 Resistência.....	13
1.4 Lactonas Macrocíclicas: Mecanismo de ação e resistência.....	16
1.5 Seleção de cepas resistentes a antiparasitários.....	17
1.6 Objetivo.....	19
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1 Carrapatos.....	20
2.2 Hospedeiros.....	21
2.3 Local das infestações.....	22
2.4 Avaliação da resistência de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> à ivermectina.....	23
2.4.1 Preparação dos carrapatos.....	23
2.4.2 Teste de imersão de larvas (TIL).....	23

2.5 Pressão de seleção na obtenção de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> à ivermectina.....	2
6	
2.5.1 Pressão de seleção segundo tratamento das larvas.....	26
2.5.2 Pressão de seleção segundo tratamento das adultas.....	26
2.5.3 Pressão de seleção segundo tratamento das adultas e do hospedeiro.....	27
2.5.4 Pressão de seleção segundo taxa de eclodibilidade das larvas.....	27
2.6 Gerações de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , cepa Piquete: Índice de Fertilidade e resistência à drogas.....	28
2.6.1 Índice de Fertilidade.....	28
2.6.2 Resistência à ivermectina.....	28
2.6.3 Resistência à moxidectina.....	29
3 RESULTADOS.....	30
3.1 Pressão de seleção na obtenção de cepa de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> resistente à ivermectina.....	30
3.1.1 Pressão de seleção segundo tratamento das larvas.....	30
3.1.2 Pressão de seleção segundo tratamento das adultas.....	30
3.1.3 Pressão de seleção segundo tratamento das adultas e do hospedeiro.....	30

3.1.4 Pressão de seleção segundo taxa de eclodibilidade das larvas.....	34
3.2 Gerações de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , população Piquete: Índice de Fertilidade e resistência à drogas.....	37
3.2.1 Índice de Fertilidade.....	37
3.2.2 Resistência à ivermectina.....	40
3.2.3. Resistência a moxidectina.....	44
4 DISCUSSÃO.....	47
5 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*: BIOLOGIA E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Os carrapatos são primariamente ectoparasitos de animais silvestres e a maioria dos vertebrados terrestres está sujeita a seu ataque. Apenas 10% das espécies são consideradas de importância médico-veterinária, envolvidas na epidemiologia de doenças de humanos e animais (WOOLLEY, 1988; OLIVER, 1989). A grande maioria, no entanto, tem importante papel na manutenção de microrganismos no ambiente (BALASHOV, 1972). Há uma porcentagem relativamente pequena de espécies que parasitam animais domésticos que, no entanto, são responsáveis por consideráveis perdas econômicas para a pecuária. Os prejuízos aos animais são determinados pela perda de sangue e transmissão de doenças. Os carrapatos transmitem maior variedade de agentes infecciosos do que qualquer outro grupo de artrópodes hematófagos. A maioria dos microrganismos é transmitida aos vertebrados principalmente através da saliva, pois quando o carrapato suga o sangue do hospedeiro, constantemente injeta saliva no local da picada. Além das toxinas existentes na saliva, há também substâncias anti-coagulantes e anestésicas, que permitem que o carrapato complete seu repasto sanguíneo.

O carrapato bovino *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (Figura 1), causador de grandes perdas econômicas, foi recentemente re-classificado filogeneticamente dentro da família Ixodidae e transferido para o grupo de carrapatos pertencentes ao gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus* (MURRELL e BARKER, 2003). *Rhipicephalus (B.) microplus* apresenta ampla distribuição mundial, podendo ser encontrado nas zonas tropicais e subtropicais (HARWOOD e JAMES, 1979) da Ásia, Austrália, Madagascar, África, grande parte das Américas Central e do Sul e, ainda, no México e Caribe (ESTRADA-PEÑA, 2006).

Este carrapato é um ectoparasito monoxênico, que exige um único hospedeiro, no qual realiza todas as mudas (FORTES, 1997). Seu

desenvolvimento se completa em duas fases: fase parasitária, que ocorre sobre os bovinos, e fase de vida livre, em que o carrapato completa o ciclo no solo, após abandonar seu hospedeiro (Figura 2).

Vistas dorsal e ventral, respectivamente

Figura 1 – Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Figura 2 – Ciclo biológico do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

A fase parasitária que se inicia com a subida das larvas infestantes no animal hospedeiro dura aproximadamente 21 dias. Durante esta fase, o carrapato passa por todos os estádios de desenvolvimento até atingir a fase adulta. Após sua fixação no hospedeiros as larvas são denominadas "larvas parasitárias". Alimentam-se de linfa, estratos teciduais e plasma. Os locais de fixação são normalmente abrigados das defesas mecânicas do hospedeiro, tais como, base da cauda, barbela, peito e parte posterior das coxas, onde aparecem zonas de inflamação. A larva, após a troca de cutícula (metalarva), dá origem à ninfa. Esta se alimenta de sangue, sofre uma muda (metaninfa) e transforma-se em adulto imaturo, neandro (macho) e neógina (fêmea). A fêmea, após o acasalamento, começa a alimentação sanguínea até o ingurgitamento total (partenóginas), que propicia sua queda ao solo (teleóginas), enquanto que o macho ainda pode permanecer no bovino à procura de novas fêmeas por mais de dois meses (TATCHELL, 1987).

A fase de vida livre inicia-se com a queda das fêmeas ingurgitadas e culmina quando as larvas eclodidas encontram o hospedeiro. Ao desprender-se do animal parasitado, a teleógina cai no solo, em geral na primeira metade da manhã, procurando locais abrigados da incidência direta de luz solar, para a sua oviposição. O período compreendido entre a queda e o início da postura é chamado de pré-postura. Em condições ideais de temperatura (em torno de 28°C) e umidade (aproximadamente 80%), a pré-postura leva cerca de dois dias. Após o período de pré-postura, inicia-se a postura propriamente dita, que dura em torno de quinze dias, ao fim do qual a fêmea morre. Cada teleógina é capaz de gerar cerca de 3000 a 4000 ovos (ALVARADO e GONZALEZ, 1979). Em condições climáticas favoráveis, uma semana depois da oviposição inicia-se a eclosão das larvas que, dependendo da época do ano, pode levar até seis meses.

As larvas apresentam geotropismo negativo e fototropismo positivo à intensidade moderada de luz. Sua longevidade depende da temperatura e da umidade relativa, sendo que o calor acelera seu metabolismo. As larvas adquirem poder infestante entre quatro a seis dias de vida. À medida que aumenta sua idade fisiológica, elas vão perdendo sua capacidade infestante (FORTES, 1997). Na vegetação, as larvas ficam agrupadas protegendo-se da

incidência direta dos raios solares, evitando desse modo a perda de umidade, e aguardando a passagem do hospedeiro. Podem permanecer nestes locais, por mais de oito meses, até que um animal adequado seja encontrado. O período de atividade das larvas na vegetação ocorre nas primeiras horas da manhã e no final da tarde, quando a temperatura é mais amena.

Os carrapatos constituem um dos mais importantes grupos de parasitas de bovinos devido ao grande prejuízo causado ao rebanho pela perda de sangue e constante interrupção da alimentação causada pela irritação. Além disto, *R. (B.) microplus* é vetor da babesiose, causada pelos hemoparasitas *Babesia bovis* e *B. bigemina* e da anaplasmoze, causado por *Anaplasma marginale* (SATTLER et al., 1986), parasitoses que podem conduzir a morte dos animais.

Como um bovino pode ser parasitado por milhares de carrapatos, as perdas diárias de sangue são elevadas e as substâncias tóxicas inoculadas pelo parasito também contribuem para debilitar a saúde dos animais (FORTES, 1997). Observa-se uma diminuição na qualidade da conversão alimentar, implicando na redução do ganho de peso e de produção de leite, diminuição da força de tração e no desenvolvimento de imunossupressão, favorecendo infecções (FAO, 2004).

O prejuízo mundial causado pelo *R. (B.) microplus* foi estimado em sete bilhões de dólares em 1984 (FAO, 1984). No Brasil, onde 80% do rebanho bovino encontra-se infestado este prejuízo atinge cerca de dois bilhões de dólares por ano. Neste montante estão incluídos as perdas relativas a: diminuição da produção, mortalidade dos animais, custos com o controle, contratação de mão-de-obra e desenvolvimento de resistência (GRISI et al., 2002).

Desenvolver métodos alternativos de controle é muito importante devido principalmente à ocorrência generalizada de resistência a acaricidas, aos gastos com controle e problemas ambientais causados pela utilização indiscriminada dos mesmos (SATTLER et al., 1986).

1.2 CONTROLE DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*

A forma mais comum de controle de *R. (B.) microplus* ocorre pela utilização de uma variedade de agentes químicos, particularmente na fase parasitária. Esta prática é adotada pelas autoridades de saúde animal dos Estados Unidos, Austrália e África do Sul desde o final do século dezenove (GEORGE et al., 2004).

Os programas de erradicação foram bem-sucedidos em algumas áreas subtropicais ecologicamente marginais, como o sul dos EUA, área central da Argentina e sul da África. Medidas rigorosas de quarentena são exigidas para prevenir as reintroduções em países em que os carrapatos e as doenças por eles transmitidas foram erradicados. Entretanto, os programas foram menos eficientes em áreas tropicais ecologicamente mais favoráveis aos ectoparasitos como o noroeste da Austrália, América do Sul e Central, ilhas do Caribe e África oriental (MANUAL MERCK DE VETERINÁRIA, 1999). Nestas áreas, onde a erradicação não foi atingida, os custos de manutenção dos programas de controle de carrapatos são muito altos. Por esta razão, estratégias de controle químico e biológico integradas têm sido adotadas. Estas estratégias, de custo mais efetivo, têm sido facilitadas pelo aumento do conhecimento da ecologia da relação carrapato-hospedeiro, dos efeitos dos carrapatos na produtividade do rebanho, da epidemiologia das doenças transmitidas por carrapatos e do controle dessas doenças por métodos imunológicos. Modelos de populações de carrapatos e da epidemiologia de doenças por eles transmitidas estão sendo desenvolvidos usados para simular estratégias de controle, possibilitando identificar as melhores a serem implementadas em situações socioeconômicas e ecologicamente diferentes.

A implementação de programas de controle e de erradicação tem sido historicamente seguidos pelo desenvolvimento de resistência química (DAVEY e GEORGE, 1998).

Os arsenicais foram os primeiros compostos químicos carrapaticidas a serem utilizados. Surgiram no início do século XX, e foram responsáveis pelo sucesso dos programas governamentais de erradicação de *R. (B.) microplus* dos EUA e África do Sul e, por aproximadamente 40 anos, mantiveram-se como única alternativa para o controle dos carrapatos (MARTINS, 2004). A resistência em populações de *R. (B.) microplus* aos arsenicais foi identificada

entre 1930-1960 em diversas áreas do mundo (WHARTON, 1976) e, no Brasil, em 1950 (OLIVEIRA et al., 1986).

Posteriormente, entre 1960-1970, o desenvolvimento e a ampla utilização de organofosforados (OF) também resultou em resistência à muitos acaricidas desta classe (ROULSTON e WHARTON, 1967; SHAW et al., 1968). No Brasil a resistência a OF foi notificada em 1963, constituindo o primeiro relato da América do Sul (WHARTON e ROULSTON, 1977). Da mesma maneira, o desenvolvimento e uso de piretróides sintéticos, entre 1970-1980, foi inevitavelmente seguido de resistência a estes acaricidas, atualmente assinalada na Austrália, África, Ásia e América do Sul (NOLAN et al., 1977; BRUN, 1992; ARANTES et al. 1996, DAVEY e GEORGE, 1998, MARTINS et al., 1999).

Da classe das formamidinas, o amitraz, seu principal representante, permanece no mercado carrapaticida há mais de 20 anos em várias regiões do mundo (MARTINS, 2004). Entretanto, relatos de resistência a ele já foram registrados nos estados do Rio Grande do Sul (MARTINS, 1995; VARGAS, 2003) e Minas Gerais (FURLONG, 1999).

A partir de 1980, novas classes de acaricidas foram desenvolvidas: as lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas), as fenilpirazolonas, as benzoilfeniluréias e as espinosinas (KLAFKE, 2006). Entre estas, as lactonas macrocíclicas (LMs) são as mais utilizadas devido ao baixo custo e pela facilidade de aplicação. O primeiro membro desta família a ser comercializado foi a ivermectina, a partir de 1981 (YATES et al., 2003). Em um período de cinco anos, esta droga ocupou lugar de destaque na venda mundial de parasiticidas (BLOOMFIELD, 1988). Até hoje a venda de avermectinas e milbemicinas tem grande importância econômica. Somente no Brasil, em 2006 foram gastos cerca de 300 milhões de reais (SINDAN, 2007), demonstrando sua ampla utilização no controle de ecto e endoparasitas no país. As LMs podem ser encontradas no mercado sob várias apresentações: injetável, oral ou tópica (MCKELLAR e BENCHAOUI, 1996).

1.3 RESISTÊNCIA

A história da resistência dos carrapatos aos acaricidas vem paralelamente ou relativamente poucos anos após a introdução de uma nova droga (GEORGE et al., 2004). A grande diversidade de acaricidas resulta do desenvolvimento da resistência dos carrapatos às drogas e esta ocorre na maior parte das regiões onde carrapaticidas são empregados para o controle deste parasito.

O estudo da resistência em seu estado elementar serve como modelo de estudo da evolução. A seleção diferencial de um *pool* de genes através da pressão por drogas diminui o número de indivíduos susceptíveis e aumenta o número de resistentes em uma população (SHOOP et al., 1990).

Resistência pode ser definida como uma mudança na frequência de genes em uma população, promovida pela seleção artificial. Sendo que, esta mudança pode ser detectada através do aumento significativo do número de indivíduos desta população que, necessitam de uma dose superior à letal para a maioria dos indivíduos da mesma espécie. Este fenômeno é uma habilidade fundamental dos seres vivos que possibilita a evolução em condições ambientais em constante transformação. A resistência, enfim, é uma resposta genético-evolutiva das populações de parasitos expostos a um estresse ambiental severo e contínuo, como são às aplicações freqüentes de um produto.

A emergência de resistência foi descrita por Sutherst e Comins (1979) em três fases: 1. Devido à mutação, o alelo de resistência ao acaricida emerge na população. Este processo é independente de seleção de resistência, a mutação é uma fatalidade; 2. Depois do tratamento e da morte dos carrapatos susceptíveis o alelo que determina resistência se torna mais freqüente na população; 3. A frequência do alelo de resistência é suficiente para reduzir notavelmente a eficácia do tratamento e cada tratamento sucessivo é potencialmente um processo de seleção. O intervalo de tempo para a emergência de resistência em uma população de organismos depende de vários fatores, dentre os quais: a taxa de mutação, seleção, fluxo dos genes, grau de dominância e frequência dos genes, entre outros (SUTHERST e COMINS, 1979).

A medida alternativa de maior sucesso no controle da resistência é a disseminação das raças bovinas de *Bos indicus*, que apresentam capacidade

imunitária inerente contra *Rhipicephalus (B.) microplus*, limitando a infestação e fazendo com que um número menor de tratamentos químicos seja necessário (WAMBURRA et al., 1998).

Outra medida alternativa, o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra o *R. (B.) microplus*, foi um passo importante conseguido em Cuba (DE LA FUENTE, 1995) e na Austrália (WILLADSEN et al., 1995) que possibilitou uma redução na perda de produção causada pelos carrapatos (RODRÍGUEZ et al., 1995a, b). O uso da vacina associado a aplicação de acaricidas, proporcionou um aumento do controle das infestações com significativa diminuição do uso de produtos químicos (WILLADSEN et al., 1995; COBON et al., 1995; CANALES et al., 1997). Porém o seu uso não foi satisfatório em outras regiões.

O desenvolvimento comercial de um novo composto acaricida pode durar longos períodos (10 anos, por exemplo) e envolver a síntese de moléculas altamente complexas (WITTY, 1999). Considerando-se os gastos com pesquisa, desenvolvimento e registro do produto, o custo total pode ultrapassar 100 milhões de dólares (SOLL, 1997).

Além disto, sabe-se, atualmente, da necessidade de controlar e evitar a contaminação do meio-ambiente com resíduos químicos, o que constitui um dos maiores desafios para o desenvolvimento de novos pesticidas (NOLAM e SCHNITZERLING, 1986). Por isso, é muito importante prolongar a vida útil dos produtos químicos disponíveis no mercado. Além do uso racional dos produtos por parte dos pecuaristas, com a utilização de controle estratégico, os métodos de diagnósticos de resistência, como os bioensaios, devem ser utilizados para monitorar a evolução da resistência e inclusive indicar o melhor acaricida a ser utilizado em determinada região ou propriedade.

Os bioensaios, *in vitro* ou *in vivo*, foram desenvolvidos para detectar essa resistência o mais breve possível e, há mais de 40 anos, têm sido utilizados com sucesso no diagnóstico de resistência a carrapaticidas (FAO, 2004). Os bioensaios *in vitro* utilizam os estágios de vida livre do carrapato, como larvas ou fêmeas ingurgitadas logo antes da oviposição (SCOTT, 1995) e os bioensaios *in vivo* são conduzidos com os carrapatos na fase parasitária, em bovinos naturalmente ou artificialmente infestados.

Entre os testes *in vitro* com teleóginas, o mais utilizado é o Teste de Imersão de Adultas (TIA) (DRUMMOND et al. 1973) onde fêmeas ingurgitadas são imersas em acaricidas técnicos ou comerciais e são avaliadas as mortalidades das fêmeas ou a ação da droga na taxa de oviposição / eclodibilidade de larvas entre as fêmeas dos grupos controle e tratados. Os resultados do TIA são obtidos em aproximadamente 4 semanas. A principal

desvantagem dos testes com teleóginas é a dependência do número de fêmeas ingurgitadas, que nem sempre é suficiente para se obter um resultado confiável (SABATINI et al., 2001).

Os testes *in vitro* com larvas mais utilizados são: Teste do Pacote com Larvas (TPL) (STONE e HAYDOC, 1962) e Teste de Imersão com Larvas (TIL) (SHAW, 1966). Nas duas técnicas, a resposta é avaliada com base na porcentagem de larvas que morrem frente ao tratamento. Os resultados são obtidos em seis semanas a partir da coleta das teleóginas no campo.

Como alternativa aos bioensaios para diagnóstico de resistência aos acaricidas, estão os diagnósticos moleculares. Estes são altamente específicos e sensíveis e podem ser realizados com pequenas quantidades de DNA (SANGSTER et al., 2002). Permitem detectar resistência em seu estágio inicial e em tempo mais curto que o dos bioensaios. O ensaio molecular é o que mais se aproxima de um teste ideal para detecção da resistência (ARONSTEIN et al. 1994). A obtenção de uma cepa resistente seria de fundamental importância para desenvolvimento deste tipo de teste.

1.4 LACTONAS MACROCÍCLICAS: MECANISMO DE AÇÃO E RESISTÊNCIA

As avermectinas e milbemicinas são compostos derivados da fermentação do actinomiceto *Streptomyces avermetilis* e possuem propriedades anti-helmínticas, inseticidas e acaricidas (BURG e STAPLEY, 1989; FISHER e MROZIK, 1989).

O espectro de ação destes fármacos é amplo, apresentando tanto atividade sistêmica contra vários artrópodes parasitas externos, como também contra adultos e larvas da maioria dos nematódeos gastrintestinais e pulmonares (BENZ et al. 1989; MCKELLAR e BENCHAOU, 1996).

Pelo fato das avermectinas e milbemicinas serem semelhantes estrutural e funcionalmente, pode-se assumir que as informações obtidas sobre um dos membros desta família possa ser extrapolado a todos os outros (YATES et al., 2003).

A eficácia destes antiparasitários é atribuída à ligação irreversível e de alta afinidade aos canais de cloro controlados pelo glutamato (Glu-Cl), presentes nas células musculares e nervosas dos invertebrados (CHEESEMAN et al., 2001). A abertura destes canais gera um aumento da condutância de íons cloreto pela membrana, o que provoca paralisia da musculatura somática dos parasitos (GEARY et al., 1993). A ligação aos canais de cloro controlados pelo

ácido gama-aminobutírico (GABA) também foi observada após administração de altas doses destes fármacos (TURNER e SCHAEFFER, 1989; MCKELLAR e BENCHAOUI, 1996). Estes mecanismos de ação estão descritos em *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* (CULLY et al., 1996). Como as seqüências de aminoácidos e nucleotídeos para os receptores Glu-Cl de *C. elegans* e *D. melanogaster* apresentam nível significativo de identidade (CULLY et al., 1996), é possível que estas seqüências sejam também conservadas em *R. (B.) microplus*. podendo-se supor que o mecanismo de ação das avermectinas nos carrapatos seja o mesmo que aquele descrito anteriormente para os outros organismos.

O primeiro relato de resistência ao grupo das LM em carrapatos foi constatado a partir de um teste *in vivo* realizado em bovinos de uma propriedade no Rio Grande do Sul comprovando-se que a cepa estudada (São Gabriel) era resistente à doramectina (MARTINS e FURLONG, 2001). Na Colômbia, Benavides e Romero (2000) identificaram, de acordo com o teste *in vitro* recomendado pela FAO (KEMP et al., 1998), uma cepa de *R. (B.) microplus* (Montecitos) que apresentava uma diferença discreta de toxicidade em relação à cepa controle susceptível. Mais recentemente, um estudo *in vitro*, também realizado segundo recomendações da FAO, demonstrou positividade para resistência à LM em carrapatos *R. (B.) microplus* provenientes de diferentes propriedades da região do Vale do Paraíba em São Paulo. Este constituiu o primeiro relato de resistência à LM comprovado por testes *in vitro* no Brasil e primeiro registro de resistência à ivermectina no mundo (KLAFKE et al., 2006).

A resistência à ivermectina tem sido mais estudada em helmintos e outros artrópodes. Entre os helmintos estão *Caenorhabditis elegans* (DENT et al., 2000) e *Haemonchus contortus* (ECHEVARRIA et al. 1991; TYRRELL et al. 2002; BLACKHALL et al. 2003). E, entre os artrópodes : *Drosophila melanogaster* (KANE et al., 2000), *Sarcoptes scabiei* (ACARI: SARCOPTIDAE) (CURRIE et al., 2004) e *Lucilia cuprina* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) (RUGG et al., 1998).

A resistência à abamectina, molécula análoga da ivermectina, já foi descrita em outros artrópodes como *Musca domestica* (DIPTERA: MUSCIDAE) (SCOTT, 1989; SCOTT et al., 1991), *Blattella germanica* (DICTYOPTERA: BLATTELLIDAE) (SCOTT, 1991), *Plutella xylostella* (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) (ABRO et al., 1988) e *Leptinotarsa decemlineata*

(COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE) (ARGENTINE et al., 1990; ARGENTINE et al., 1992).

1.5 SELEÇÃO DE CEPAS RESISTENTES A ANTIPARASITÁRIOS

O desenvolvimento de populações resistentes a antiparasitários no mundo é objeto de debate. No entanto, uma vez instalada a resistência em uma região, não há dúvidas quanto aos efeitos econômicos para aqueles cuja sobrevivência depende da saúde animal. O desenvolvimento de isolados resistentes com a finalidade de possibilitar pesquisas por novos compostos é um passo importante (SHOOP et al., 1990).

Os inúmeros relatos de resistência a diversos tipos de acaricidas, inclusive aos mais modernos, incitam à necessidade de pesquisa sobre novas classes de drogas com novos mecanismos de ação. Essas pesquisas podem ser conduzidas analisando-se esses novos acaricidas diretamente contra isolados resistentes (SHOOP et al., 1990), para avaliação de resistência cruzada, por exemplo. Como exemplo de cepas isoladas, importantes no desenvolvimento de novas drogas, podemos citar um estudo na Austrália, onde um isolado de *Trichostrongylus colubriformis*, primeiro isolado benzimidazol-resistente, foi utilizado para ajudar a identificar a mais potente classe de anti-helmínticos, as avermectinas (EGERTON et al., 1979). E outro estudo, onde um sub-isolado de *Trichostrongylus colubriformis* resistente à ivermectina e ao benzimidazol foi utilizado para identificar o *paraherquamide*, metabólito de *Penicillium paraherquei* com propriedades anti-helmínticas em roedores (OSTLIND et al., 1990), como o primeiro candidato de amplo espectro, que parece ter um novo mecanismo de ação, desde as avermectinas (SHOOP et al., 1990).

Em outro estudo, a seleção de uma cepa de *Lucilia cuprina* foi conduzido a fim de avaliar seu potencial de resistência à ivermectina (RUGG et al., 1998).

No Brasil, uma cepa de campo de *R. (B.) microplus* foi avaliada quanto à sua resposta toxicológica contra o amitraz e outros carrapaticidas, com o intuito de fornecer subsídios para implementação de estratégias de manejo que pudessem retardar o estabelecimento e a dispersão de cepas de

carrapatos *R. (B.) microplus* resistentes ao amitraz (VARGAS et al., 2003). A partir deste estudo, com a purificação da cepa, foi possível validar um método de diagnóstico de resistência ao amitraz no México, mediante a técnica de imersão larval (VARGAS et al., 2003).

O United States Department of Agriculture (USDA) também mantém cepas resistentes para estudos relacionados à manutenção do programa de erradicação de *R. (B.) microplus* (DAVEY et al., 2006).

Com o recente diagnóstico de carrapatos resistentes a lactonas macrocíclicas (MARTINS e FURLONG, 2001 e KLAFKE et al, 2006), torna-se recomendável a obtenção de um isolado resistente que possa constituir uma cepa referência, ainda inexistente no mundo. Estes carrapatos poderão ser utilizados, para que novas pesquisas sobre os mecanismos de ação destas drogas, validação e desenvolvimento de testes para diagnóstico de resistência, avaliação de resistência cruzada, estudos genéticos e de manejo da resistência possam ser realizados.

1.6 OBJETIVO

Objetivo geral

Obter cepa de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistente à ivermectina, a partir de uma população de carrapatos suspeita de resistência, submetida a diferentes tratamentos de pressão de seleção.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARRAPATOS

Os carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizados são provenientes de uma propriedade de produção leiteira do município de Piquete (22° 33' 45'' S, 45° 11' 15'' W). Piquete está localizado no estado de São Paulo, na porção central do Vale médio do rio Paraíba do Sul, nas encostas da Serra da Mantiqueira e grande parte de seu território está dentro da Área de Preservação Ambiental (www.explorevale.com.br, 2007) (Figura 3). Situa-se a uma altitude média de 640 metros, com temperatura média anual 21,3°C e precipitação média de 1672,5 mm/ano (www.cpa.unicamp.br, 2007).

Figura 3 – Localização dos municípios de Piquete e Valinhos. Estado de São Paulo, 2007. Piquete (22° 33' 45'' S, 45° 11' 15'' W), município de origem dos carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; Valinhos (22° 58' 14'' S, 46° 59' 45'' W), município onde as infestações experimentais foram realizadas.

A propriedade selecionada apresentava histórico de uso de lactonas macrocíclicas há mais de dez anos e a população de carrapatos, considerada suspeita de resistência à ivermectina de acordo com entrevista realizada com o responsável pela propriedade, englobando o sistema de produção, frequência de tratamento carrapaticida e classes de produtos utilizados nos últimos doze meses anteriores à coleta. Estes carrapatos foram previamente submetidos a testes *in vitro* realizados de acordo com Sabatini et al. (2001) e mostraram-se 3,78 vezes mais resistente a ivermectina do que a cepa controle (KLAFKE et al., 2006).

Como controle susceptível foi utilizado *R. (B) microplus* cepa Porto Alegre (POA), cedida pelo Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr., do Núcleo de Biotecnologia da UFRGS.

2.2 HOSPEDEIROS

Bezerros da raça holandesa (Figura 4), recebidos três dias após o nascimento, foram infestados somente após o desmame precoce. Durante os três primeiros dias de vida, o animal ingeriu colostro de forma natural e, a partir do 4º dia foi tratado com três litros de leite servidos no balde, duas vezes ao dia, no início da manhã e no fim da tarde, de acordo com as normas da Sociedade Nacional de Agricultura (SNA). O bezerro também teve à sua disposição, durante as 24 horas do dia, ração concentrada, volumoso (capim picado, feno) e água. Cada bezerro foi tratado previamente aos experimentos com carrapaticida a base de clorpirifós (organofosforado), associado à cipermetrina (piretróide) e óleo de citronela (Colosso® Pour-On; Ouro Fino Produtos Veterinários) e sofreu no máximo três infestações sucessivas a partir dos quatro meses de idade, visando evitar possível interferência do desenvolvimento de imunidade natural à fixação dos carrapatos.

Figura 4 – Bezerro *Bos taurus*, raça holandesa, utilizado nas infestações experimentais com larvas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, população Piquete. Estado de São Paulo, 2006.

2.3 LOCAL DAS INFESTAÇÕES

As infestações experimentais foram realizadas em uma propriedade no município de Valinhos (22° 58' 14" S, 46° 59' 45" W), no sudoeste do estado de São Paulo (www.explorevale.com.br, 2007) (Figura 3), situado a uma altitude média de 660 metros, temperatura média anual de 21 °C e precipitação média de 1425,1 mm / ano (www.cpa.unicamp.br/, 2007). Os hospedeiros foram acomodados de forma isolada, em duas instalações individuais de alvenaria, cobertas, com cocho para água e alimentação e um espaço externo para pastejo (Figura 5).

Figura 5 – Instalação utilizada para acomodação de hospedeiro das infestações experimentais de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, população Piquete. Estado de São Paulo, 2006.

2.4 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS)* MICROPLUS À IVERMECTINA

2.4.1 Preparação dos carrapatos

Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* da população experimental Piquete foram coletadas manualmente três vezes ao dia (início da manhã, ao meio dia e no final da tarde), após queda natural dos animais experimentais e levadas para o Laboratório de Parasitologia Experimental e Aplicada do Departamento de Parasitologia do ICB/USP. Após lavagem (água) e secagem (papel toalha), os carrapatos foram pesados e acondicionados individualmente em tubos plásticos de 1,5 mL, com abertura para circulação de ar e umidade. Esta prática permite que os ovos resultantes da postura de cada uma das fêmeas mantenham-se separados e devidamente acondicionados para eclosão, facilitando também a pesagem dos mesmos. As fêmeas foram mantidas em estufa B.O.D. sob temperatura entre 27 e 28 °C e umidade relativa do ar entre 85 e 90 % (FAO, 2004). Os ovos e larvas gerados por estas fêmeas foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura e umidade. As larvas utilizadas em todos os experimentos do presente trabalho tinham entre 14 e 21 dias de idade. A cada geração este procedimento era repetido.

2.4.2 Teste de imersão de larvas (TIL)

A toxicidade da ivermectina sobre a população de *R. (B.) microplus*, Piquete, foi monitorada pelo Teste de Imersão de Larvas (TIL) (SHAW, 1966) adaptado por Sabatini et al. (2001), em todas as gerações obtidas experimentalmente e utilizando-se a cepa Porto Alegre (POA) como controle susceptível. Os princípios ativos utilizados foram a ivermectina formulação comercial a 1% (IVOMEC® - Merial Saúde Animal Ltda., lote número 195/03, data de validade 08/2007) e a ivermectina técnica (22,23 – Dihidroavermectina B1a) – Fabricante: North China Pharma, grau técnico 99,9%.

A ivermectina grau técnico foi dissolvida em solução de etanol 100% e Triton-X100 a 2% (ETH-TX 2%) para obtenção de solução a 1% (0,1g em 10mL de ETH-TX 2%).

A ivermectina 1% (técnica ou comercial) foi diluída em solução de água e ETH-TX 2% de modo que a solução final de imersão apresentasse 1% de Etanol e 0,02% de Triton-X 100. Foram preparadas soluções (volume final 1,0 mL) em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL com as seguintes concentrações finais de ivermectina: 100, 50, 25, 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,625 ppm. A solução controle foi obtida adicionando ETH-TX 2% à água destilada.

Aproximadamente 500 larvas foram adicionadas em cada solução com ajuda de um pincel. Imediatamente após a adição das larvas, os tubos foram fechados e agitados manualmente por 10 minutos. Após este período os tubos foram abertos e aproximadamente 100 larvas de cada solução foram secadas e transferidas para um papel filtro dobrado ao meio e fechado com fita adesiva, formando um pacote. Os pacotes foram incubados por 24 horas em estufa BOD, sob temperatura de 27 a 28°C e umidade relativa do ar de 85 a 90 %. Após este período, os pacotes foram abertos e as larvas vivas e mortas contadas para avaliar a mortalidade. Foram consideradas vivas somente as larvas dotadas de locomoção (FAO, 2004). Os testes foram realizados em triplicatas. (Figura 6)

a) Retirada das larvas do tubo de incubação

b) Imersão das larvas nas soluções do acaricida

c) Cuidadosa agitação dos tubos

d) Secagem das larvas retiradas das soluções

e) Colocação das larvas nos papéis filtro

f) Pacotes fechados para incubação das larvas

Figura 6 - Sequência de procedimentos adotados para realização do Teste de Imersão de Larvas (TIL)

Os dados de mortalidade percentual foram submetidos a uma análise de probitos através do programa POLO PLUS (LEORA SOFTWARE, 2003) e foram calculadas as concentrações letais para 50% e 99% (CL_{50} , CL_{99}) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%). O programa também foi utilizado para determinar a inclinação da regressão de dose-mortalidade (*slope*). Os Fatores de Resistência de cada uma das populações testadas foram calculados dividindo-se a CL_{50} (IC95%) das gerações experimentais pela CL_{50} (IC95%) da cepa Porto Alegre (POA). A diferença entre a resposta de cada geração frente ao tratamento foi considerada significativa somente se os intervalos de confiança de 95% não se sobrepusessem (RUGG et al., 1998).

2.5 PRESSÃO DE SELEÇÃO NA OBTENÇÃO DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* À IVERMECTINA

2.5.1 Pressão de seleção segundo tratamento das larvas

Cerca de 40.000 larvas F2 foram tratadas por imersão em solução de ivermectina comercial na concentração de 7,28 ppm, valor da CL_{50} desta geração de larvas, determinada através do TIL (item 3.4.2.). As larvas sobreviventes 24 horas após o tratamento, foram utilizadas para a infestação do hospedeiro. Este experimento foi repetido três vezes. Como controle para as infestações, igual experimento foi conduzido utilizando-se larvas tratadas com a solução (água e ETH-TX) sem o princípio ativo.

2.5.2 Pressão de seleção segundo tratamento das adultas

Fêmeas ingurgitadas obtidas experimentalmente foram recolhidas no dia do desprendimento natural, lavadas e separadas em lotes homogêneos e a seguir submetidas ao Teste de Imersão de Adultas (TIA), de acordo com o protocolo proposto por Sabatini (Sabatini et al., 2001). As teleóginas foram tratadas por imersão em solução de ivermectina comercial, em concentrações de 10 a 100 ppm, conforme o número de exemplares obtidos (menor número de adultas ingurgitadas implicavam no uso de uma menor concentração para evitar a perda da cepa). As larvas (F3 e F4) originárias das teleóginas tratadas

com as maiores concentrações de ivermectina foram utilizadas nas infestações realizadas em bezerros não tratados. Alíquotas de larvas F3 e F4 foram submetidas ao TIL para avaliação da resistência.

2.5.3 Pressão de seleção segundo tratamento das adultas e do hospedeiro

Cerca de 20.000 larvas de cada uma das gerações (F5, F6 e F7), oriundas de teleóginas tratadas por imersão, foram utilizadas para infestar bezerros tratados com ivermectina comercial 1% , na dose indicada em bula (200 µg/kg de peso) visando a obtenção de novas teleóginas.

2.5.4 Pressão de seleção segundo taxa de eclodibilidade das larvas

Posturas de teleóginas alimentadas em bezerro tratado com ivermectina e não tratadas por imersão foram separadas em dois grupos segundo porcentagem de eclodibilidade de larvas (F8): um grupo constituído de posturas de alta eclodibilidade e outro de posturas de baixa eclodibilidade, mensuradas por estimativa visual. Foram consideradas de alta eclodibilidade aquelas posturas que apresentaram acima de 80% de eclosão das larvas e de baixa, aquelas com porcentagem inferior a 30%. Um terceiro grupo foi constituído por alíquotas de larvas oriundas de todas as posturas, independentemente da taxa de eclodibilidade apresentada. De cada grupo, foram retiradas três amostras de larvas que foram submetidas ao TIL, em ensaios em triplicata para avaliação da resistência.

O grupo de posturas que originou larvas com maior fator de resistência foi utilizado para seleção das larvas infestantes. Como hospedeiros foram empregados bezerros não tratados com ivermectina. Alíquotas de larvas F9 e F10 também foram submetidas ao TIL para avaliação da resistência.

2.6 GERAÇÕES DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*, CEPA PIQUETE: ÍNDICE DE FERTILIDADE E RESISTÊNCIA À DROGAS

2.6.1 Índice de Fertilidade

Os Índices de Fertilidade (IF) das gerações F2, F6, F7, F8 e F9 de *R. (B.) microplus*, população Piquete, obtidas experimentalmente, foram calculados através da fórmula: $IF = (\text{Peso Fêmea} / \text{Peso dos ovos}) \times \text{Eclosão Estimada (\%)}$. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística pelo teste t.

2.6.2 Resistência à ivermectina

Para cada uma das gerações *R. (B.) microplus*, cepa Piquete, obtidas experimentalmente, foi calculado o valor do fator de resistência, através do TIL, conforme descrito no item 2.4.2.

Para as gerações F9 e F10, a resistência à ivermectina também foi avaliada pelo Teste do Pacote com Larvas (TPL), constituído de três ensaios em triplicatas, segundo recomendações da FAO (FAO, 2004) resumidas a seguir.

O papel impregnado com ivermectina grau técnico foi preparado da seguinte maneira: a droga foi diluída em uma parte de óleo de oliva (esterilizado a 110°C por 75 minutos com 0,02 % de antioxidante Ionol) e duas partes de tricloroetileno (TCE) para obtenção de uma solução de ivermectina a 1%. A partir desta concentração inicial, foi realizada uma diluição em série: 1%; 0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,0625%; 0,0312%; 0,0156%; 0,0078% e 0,0039%. Cada papel foi impregnado com 0,67mL da mistura. Como controle, foram utilizados papéis impregnados com a mistura de óleo de oliva e TCE. Os papéis foram pendurados para secagem por 1 hora, para evaporação do TCE e em seguida dobrados formando pacotes fechados com auxílio de cliques de metal.

Aproximadamente 100 larvas com 14 a 21 dias de vida foram transferidas para cada pacote impregnado por droga, com o auxílio de um pincel. Os pacotes foram incubados a temperatura de 27 a 28°C e umidade relativa de 85 a 90% por 24 horas em estufa B.O.D.

As mortalidades percentuais de cada concentração foram determinadas através de contagem de larvas mortas e vivas e computadas pelo programa POLO PLUS (LEORA SOFTWARE, 2003) para a determinação das concentrações letais para 50% e 99% (CL₅₀, CL₉₉) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%).

2.6.3 Resistência à moxidectina

Para avaliação da resistência das larvas da população Piquete à moxidectina (Cydectin Injetável 1%, lote 018/04, validade set/08, Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) foram utilizadas larvas das gerações F9 e F10 empregando o Teste de Imersão de Larvas (TIL) de acordo com o protocolo descrito no item 2.4.2. Foram realizados três ensaios em triplicatas e, como controle, foram empregados carrapatos susceptíveis da cepa POA. As concentrações utilizadas foram diluídas em série a partir de 10 ppm.

3 RESULTADOS

3.1 PRESSÃO DE SELEÇÃO NA OBTENÇÃO DE CEPA DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* RESISTENTE À IVERMECTINA

3.1.1 Pressão de seleção segundo tratamento das larvas

As três infestações realizadas com larvas das gerações F2 e F3, sobreviventes 24 horas após tratamento por imersão em ivermectina, em bezerros não tratados com a mesma droga, não resultaram em fêmeas ingurgitadas. A infestação com larvas tratadas com a solução sem princípio ativo alcançou resultado positivo (Figura 7).

3.1.2 Pressão de seleção segundo tratamento das adultas

As infestações realizadas com larvas F3 e F4, originárias de adultas tratadas com ivermectina resultaram em fêmeas ingurgitadas. Os valores dos fatores de resistência (FR_{50}) determinados através do TIL não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$) entre eles: 1,25 e 1,3, respectivamente para F3 e F4 (Figura 8).

3.1.3 Pressão de seleção segundo tratamento das adultas e do hospedeiro

As infestações realizadas com larvas, a partir da geração F4, em animais tratados com ivermectina comercial 1% resultaram em fêmeas ingurgitadas e os valores dos fatores de resistência (FR_{50}) obtidos através do TIL não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$) entre eles: 3,33, 3,43 e 2,82 respectivamente para as gerações de larvas F5, F6 e F7 (Figura 9).

Figura 7 – Experimento sobre seleção de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, cepa Piquete, resistente à ivermectina segundo tratamento das larvas.

Figura 8 – Experimento sobre seleção de *R. (B.) microplus*, cepa Piquete, resistente à ivermectina segundo tratamento das adultas.

Figura 9 – Experimento sobre seleção de *R. (B.) microplus*, cepa Piquete, resistente à ivermectina segundo tratamento das adultas e do hospedeiro.

3.1.4 Pressão de seleção segundo taxa de eclodibilidade das larvas

Os valores de concentração letal (CL_{50} e CL_{99}), fator de resistência (FR_{50} e FR_{99}) e inclinação da reta, obtidos para larvas de *R. (B.) microplus*, população Piquete, da geração F8, originárias de diferentes grupos de posturas (de alta e baixa eclodibilidade e do conjunto das posturas), encontram-se ilustrados nas Figura 10 e 11 e resumidos na Tabela 1.

Os fatores de resistência (FR_{50}) obtidos através do TIL para os grupos de posturas de alta e baixa eclodibilidade apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre si (3,98 e 1,46, respectivamente). O valor do fator de resistência do terceiro grupo, constituído por alíquotas de larvas oriundas de todas as posturas (3,17), apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) daquele registrado para o grupo de posturas de baixa eclodibilidade.

Figura 10 – Experimento sobre seleção de *R. (B.) microplus*, cepa Piquete, resistente à ivermectina segundo a taxa de eclodibilidade das larvas.

Tabela 1 - Concentrações letais e fatores de resistência obtidos para larvas agrupadas segundo taxa de eclodibilidade das posturas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* população Piquete e para larvas da cepa POA.

População	CL* ₅₀ (IC 95%)		CL* ₉₉ (IC 95%)		Inclinação	FR** ₅₀ (95%)		FR** ₉₉ (95%)	
POA	5,31 a	(5,14-5,49)	18,22	(16,84-19,86)	4,34 (± 0,11)	-	-	-	-
F8 Baixa	7,80 b	(5,61-10,73)	244,96	(130,70-607,60)	1,55 (± 0,09)	1,46 a	(1,09-1,95)	13,44	(7,76-30,60)
F8 Geral	16,83 c	(12,68-22,18)	2072,90	(1132,29-4493,22)	1,11 (± 0,03)	3,17 b	(2,47-4,04)	113,77	(67,24-226,24)
F8 Alta	21,16 c	(16,82-26,64)	1776,30	(1083,03-3256,64)	1,21 (± 0,04)	3,98 b	(3,27-4,85)	97,49	(64,31-163,98)

Teste de Imersão de Larvas (TIL): três ensaios realizados em triplicata. Cepa Piquete larvas da geração F8 (Alta: posturas de alta eclodibilidade; Baixa: posturas de baixa eclodibilidade; Geral: todas as posturas) e cepa controle susceptível Porto Alegre (POA). *CL - concentração letal, **FR – Fator de resistência. Letras diferentes (a, b, c) na mesma coluna remetem a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). Diferenças entre os valores de CL₅₀ e FR₅₀ foram consideradas pela não sobreposição dos intervalos de confiança de 95%.

Figura 11 - Gráfico de dose-mortalidade obtido para os diferentes grupos de postura da geração F8 de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* da população Piquete

3.2 GERAÇÕES DE *RHIPICEPHALUS (B.) MICROPLUS*, POPULAÇÃO PIQUETE: ÍNDICE DE FERTILIDADE E RESISTÊNCIA A DROGAS

3.2.1 Índice de Fertilidade

Os valores dos índices de fertilidade obtidos para *R. (B.) microplus* cepa POA e das diferentes gerações da cepa Piquete não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$). A Tabela 2 reúne os dados registrados para os pesos médios das fêmeas e de suas posturas, taxa de eclosão e índice de fertilidade de cada uma das gerações analisadas.

Tabela 2 – Médias dos pesos das fêmeas ingurgitadas, posturas, eclodibilidades e índices de fertilidade ($\pm$ DP) da cepa de *Rhipicephalus (B.) microplus* POA e de diferentes gerações da população Piquete.

Teleóginas	<i>n</i>	Peso das Fêmeas (mg)	Peso das Posturas (mg)	Eclodibilidade (%)	Índices de Fertilidade
POA	51	260 $\pm$ 56	140 $\pm$ 114	70 $\pm$ 30	0,37 $\pm$ 0,17 a
F2	374	290 $\pm$ 73	120 $\pm$ 52	80 $\pm$ 10	0,34 $\pm$ 0,12 a
F6	91	310 $\pm$ 40	150 $\pm$ 52	51 $\pm$ 29	0,27 $\pm$ 0,18 bcd
F6*	197	130 $\pm$ 70	60 $\pm$ 42	59 $\pm$ 32	0,29 $\pm$ 0,17 c
F7*	129	145 $\pm$ 53	63 $\pm$ 31	51 $\pm$ 34	0,24 $\pm$ 0,18 d
F8	39	250 $\pm$ 76	131 $\pm$ 53	59 $\pm$ 36	0,31 $\pm$ 0,20 a
F9	74	257 $\pm$ 68	132 $\pm$ 46	67 $\pm$ 32	0,34 $\pm$ 0,18 a

Cepa Piquete (fêmeas F2 a F9); cepa controle susceptível Porto Alegre (POA), DP – desvio padrão; IF – índice de fertilidade; *n* - nº de fêmeas observadas; *hospedeiro tratado com ivermectina comercial. Letras diferentes (a,b, c, d) na mesma coluna remetem a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) avaliadas pelo teste t.

Tabela 3 - Médias dos pesos das fêmeas ingurgitadas, posturas, eclodibilidades e índices de fertilidade ($\pm$ DP) da cepa de *Rhipicephalus (B.) microplus* POA e da geração F7 da população Piquete.

ADULTAS	<i>n</i>	Peso das Fêmeas (mg)	Peso das Posturas (mg)	Eclodibilidade (%)	Índices de Fertilidade	CL ₅₀ (IC 95%) larvas F8	FR ₅₀ larvas F8
POA	51	260 $\pm$ 56	140 $\pm$ 114	70 $\pm$ 30	0,37 $\pm$ 0,17 a	5,31 (5,14-5,49) a	-
F7* baixa	28	137 $\pm$ 61	53 $\pm$ 30	16 $\pm$ 11	0,06 $\pm$ 0,05 b	7,80 (5,61-10,73) a	1,46 (1,09-1,95) a
F7*geral	126	145 $\pm$ 53	63 $\pm$ 31	51 $\pm$ 34	0,24 $\pm$ 0,18 c	16,83 (12,68-22,18) b	3,17 (2,47-4,04) b
F7*alta	33	134 $\pm$ 55	64 $\pm$ 33	84 $\pm$ 10	0,39 $\pm$ 0,09 a	21,16 (16,82-26,64) b	3,98 (3,27-4,85) b

Cepa Piquete (adultas F7, reunidas em grupos de posturas de baixa eclodibilidade e de alta eclodibilidade e geral); cepa controle susceptível Porto Alegre (POA), DP – desvio padrão; IF – índice de fertilidade *hospedeiro tratado com ivermectina comercial, *n* - n° de fêmeas observadas. Letras diferentes (a,b, c) na mesma coluna remetem a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) avaliadas pelo teste t para o índice de fertilidade e diferenças entre os valores de CL₅₀ e FR₅₀ foram consideradas pela não sobreposição dos intervalos de confiança de 95%.

3.2.2 Resistência à ivermectina

A Tabela 4 reúne os dados sobre os valores de concentração letal (CL_{50} e CL_{99}) e de inclinação da reta, obtidos para a população susceptível POA e para todas as gerações de *R. (B.) microplus*, população Piquete analisadas. A Tabela 4 também apresenta os valores de fator de resistência (FR_{50} e FR_{99}) (IC95%) determinados para população Piquete a partir da cepa controle POA. A Figura 12, obtida pelo programa POLO PLUS, apresenta o gráfico de curva dose-mortalidade para os diferentes tratamentos de pressão de seleção. Os valores dos fatores de resistência (FR_{50}) obtidos através do TIL para as larvas das gerações F1 e F10 de *R. (B.) microplus*, cepa Piquete, respectivamente 1,37 e 5,39, apresentaram diferenças estatisticamente significantes. ($p < 0,05$).

A Tabela 5 reúne os dados sobre os valores de concentração letal (CL_{50} e CL_{99}) e de inclinação da reta, obtidos para a população susceptível POA e das geração F10 de *R. (B.) microplus*, população Piquete analisadas pelo TPL, quanto à toxicidade à ivermectina. A Figura 13 apresenta o gráfico de curva dose-mortalidade para a cepa POA e da população Piquete F10 obtida pelo programa POLO PLUS. Os valores dos fatores de resistência (FR_{50} e FR_{99}) obtidos através do TPL para as larvas de *R. (B.) microplus*, cepa Piquete da geração F10 foram respectivamente 1,58 e 2,81.

Tabela 4 – Concentrações letais e fatores de resistência à ivermectina obtidos para *Rhipicephalus (B.) microplus*, cepa POA e para as diferentes gerações da população Piquete.

	CL* ₅₀ (IC 95%)		CL* ₉₉ (IC 95%)		INCLINAÇÃO	FR** ₅₀ (95%)		FR ₉₉ (95%)	
POA	5,31 a	(5,14-5,49)	18,22	(16,84-19,86)	4,343 (± 0,111)	-	-	-	-
F1 ^{*1}	7,28 b	(5,62-10,90)	36,06	(19,38-170,16)	3,349 (± 0,140)	1,37 a	(1,09-1,98)	1,98	(1,15-8,57)
F2 ^{*1}	7,66 ab	(5,48-10,60)	52,77	(30,94-138,65)	2,776 (± 0,107)	1,44 a	(1,07-1,93)	2,90	(1,84-6,98)
F3 ^{*2}	6,65 ab	(4,51-9,79)	33,74	(19,13-121,04)	3,299 (± 0,094)	1,25 a	(0,88-1,78)	1,85	(1,14-6,09)
F4 ^{*2}	6,91 ab	(4,90-9,64)	57,62	(32,33-165,74)	2,526 (± 0,095)	1,30 a	(0,96-1,76)	3,16	(1,92-8,35)
F5 ^{*3}	17,68 c	(12,83-23,66)	341,41	(202,29-727,90)	1,809 (± 0,047)	3,33 b	(2,50-4,31)	18,74	(12,01-36,65)
F6 ^{*3}	18,22 c	(12,68-26,08)	725,69	(360,73-2010,64)	1,454 (± 0,035)	3,43 b	(2,47-4,75)	39,83	(21,42-101,24)
F7 ^{*3}	14,95 bc	(8,56-24,31)	465,26	(194,55-2290,98)	1,558 (± 0,045)	2,82 ab	(1,67-4,43)	25,54	(11,55-115,36)
F8alta ^{*4}	21,16 c	(16,82-26,64)	1776,30	(1083,03-3256,64)	1,209 (± 0,036)	3,98 b	(3,27-4,85)	97,49	(64,31-136,98)
F9 ^{*4}	43,20 d	(35,35-53,15)	3855,43	(2313,98-7223,75)	1,193 (± 0,027)	8,14 c	(6,88-9,68)	211,60	(137,40-363,73)
F10 ^{*4}	42,84 d	(29,76-62,53)	3716,88	(1500,64-15086,89)	1,200 (± 0,045)	8,06 c	(5,79-11,39)	204,00	(89,11-759,66)

Teste de Imersão de Larvas (TIL): três ensaios realizados em triplicatas com *R. (B.) microplus*, POA: cepa controle susceptível Porto Alegre; F1 a F10: gerações da população Piquete, resistente a ivermectina; F^{*1} – não tratadas; F^{*2} – tratamento das adultas; F^{*3} – tratamento das adultas e do hospedeiro; F^{*4} – infestação por larvas oriundas de posturas de alta eclodibilidade. *CL - concentração letal, **FR – Fator de resistência. Letras diferentes (a, b, c, d) na mesma coluna remetem a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). Diferenças entre os valores de CL₅₀ e FR₅₀ foram consideradas pela não sobreposição dos intervalos de confiança de 95%.

PoloPlus 1.0

Figura 12 – Gráfico das curvas de dose-mortalidade dos diferentes tratamentos com as larvas da cepa POA e das diferentes gerações da cepa Piquete submetidas ao TIL com ivermectina. **POA (preto); Piquete inicial (azul); Tratamento das adultas (verde); Tratamento das adultas e do hospedeiro (amarelo); Tratamento por seleção das larvas originárias de posturas de alta eclodibilidade em animal tratado (rosa); Manutenção da população por infestação com larvas originárias de posturas de alta eclodibilidade em animal não tratado (vermelho)**

Tabela 5 - Toxicidade da ivermectina sobre *R. (B.) microplus* da cepa POA e população Piquete (F10) mensurada através do TPL

	CL* ₅₀ (95%)		CL* ₉₉ (95%)		Inclinação	FR** ₅₀ (95%)		FR** ₉₉ (95%)	
POA	0,026 a	(0,025 - 0,027)	0,07	(0,064 - 0,079)	5,386 (± 0,185)	-	-	-	-
F10	0,041 b	(0,037 - 0,046)	0,197	(0,157 - 0,262)	3,406 (± 0,105)	1,58	(1,48 - 1,70)	2,81	(2,45 - 3,32)

Teste de Pacote com Larvas (TPL) com ivermectina: três ensaios realizados em triplicatas com *R. (B.) microplus*, POA: cepa controle susceptível Porto Alegre; F10: geração da população Piquete, resistente a ivermectina. *CL - concentração letal, **FR – Fator de resistência. Letras diferentes (a, b) na mesma coluna remetem a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) Diferenças entre os valores de CL₅₀ foram consideradas pela não sobreposição dos intervalos de confiança de 95%.

Figura 13 - Gráficos das curvas de dose-mortalidade das larvas da cepa Porto Alegre (POA) e da geração F10 da cepa Piquete submetidas ao TPL com ivermectina. POA em azul e Piquete em vermelho.

3.2.3. Resistência a moxidectina

Os valores de concentração letal (CL_{50} e CL_{99}) e de inclinação da reta obtidos para a população *R. (B.) microplus* susceptível POA e para as gerações F9 e F10 da população Piquete analisadas pelo TIL, quanto à toxicidade à moxidectina, encontram-se resumidos na Tabela 6. Esta tabela também inclui os valores dos fatores de resistência (FR_{50} e FR_{99}) da população Piquete, determinados em relação a cepa POA. A figura obtida pelo programa POLO PLUS, apresenta o gráfico de curva dose-mortalidade para as populações analisadas (Figura 14). Os valores dos fatores de resistência (FR_{50}) obtidos através do TIL para as larvas das gerações F9 e F10 de *R. (B.) microplus* população Piquete, respectivamente 1,73 e 4,24, apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre si.

Tabela 6 – Toxicidade da moxidectina sobre *Rhipicephalus (B.) microplus* mensurada através do TIL

	CL* ₅₀ (95%)			CL* ₉₉ (95%)		Inclinação	FR** ₅₀ (95%)		FR** ₉₉ (95%)	
POA	0,837 a	(0,757-0,923) a	2,179	(1,801-2,897) a	5,597 (± 0,365)	-	-	-	-	-
F9	1,447 b	(0,933 - 2,219) b	26,344	(11,420 - 143,149) b	1,846 (± 0,042)	1,73 a	(1,23-2,40)	12,1	(6,34-49,41)	
F10	3,545 b	(1,852 - 9,921) c	600,856	(76,869 - 745880,095) c	1,044 (± 0,058)	4,24 b	(2,44-10,75)	275,75	(42,68-257200,03)	

Teste de Imersão de Larvas (TIL) com moxidectina: três ensaios realizados em triplicatas com *R. (B.) microplus*, POA: cepa controle susceptível Porto Alegre, susceptível; F9 e F10: gerações da população Piquete, resistente à ivermectina. *CL - concentração letal, **FR – Fator de resistência. Letras diferentes (a, b) na mesma coluna remetem a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). Diferenças entre os valores de CL₅₀ foram consideradas pela não sobreposição dos intervalos de confiança de 95%.

Figura 14 - Gráfico das curvas de dose-mortalidade das larvas *Rhipicephalus (B.) microplus* cepa Porto Alegre (POA) e da população Piquete (F9 e F10) submetidas ao TIL com moxidectina.

4 DISCUSSÃO

Considerando que a ivermectina e seus análogos vêm sendo amplamente utilizados para o controle de endo e ectoparasitoses, a existência de populações de parasitos resistentes disseminadas pelo mundo e às constantes queixas contra a falta de eficácia destes produtos, é possível imaginar que a resistência a estas moléculas possa ser encontrada em muitas populações de carrapatos.

No Brasil, embora a utilização de drogas do grupo das lactonas macrocíclicas (LMs) contra carrapatos seja intensa e a suspeita de ocorrência de populações resistentes esteja difundida, há apenas dois registros sobre este evento (MARTINS e FURLONG, 2001 e KLAFKE et al., 2006). O estudo da resistência à ivermectina, LM mais amplamente utilizada contra carrapatos, constitui ponto fundamental da estratégia de controle destes ectoparasitas. Portanto, este estudo teve por objetivo, selecionar uma cepa resistente ao produto para que estudos avançados, visando a caracterização da resistência, possam ser conduzidos no futuro.

A seleção de cepas de *R. (B.) microplus* resistentes a acaricidas foi realizada com sucesso em modelos utilizando o amitraz (VARGAS et al., 2003), permetrina (DAVEY e GEORGE, 1998) e coumafós (DAVEY et al., 2006). Em todos os experimentos foram utilizadas larvas sobreviventes ao tratamento com a droga pesquisada para infestação de hospedeiros. No presente trabalho, além do tratamento das larvas, foram utilizadas outras estratégias visando selecionar cepa resistente à ivermectina: tratamento das fêmeas, tratamento do hospedeiro ou, ainda, emprego de larvas infestantes escolhidas segundo taxa de eclodibilidade das posturas.

As infestações com larvas tratadas por imersão em ivermectina utilizando a CL_{50} determinada para cada geração ($F_2=7,66$ e $F_3=6,65$) não foram bem sucedidas. No momento da execução da infestação, 24 horas pós-tratamento, as larvas estavam ativas, porém, decorrida uma semana, não foi possível observar nenhuma larva fixada ao hospedeiro. Foi avaliada, então, uma possível interferência do Triton-X 100 e do etanol utilizados como veículos das soluções de imersão, mas esta possibilidade foi excluída devido ao sucesso da infestação com larvas tratadas somente com o veículo (dados

não mostrados). Uma outra possível causa da não infestação seria um efeito residual da ivermectina sobre as larvas tratadas. Para avaliar este tipo de efeito, um lote de larvas tratadas com 1,25 ppm e outro com larvas tratadas apenas com o veículo (grupo controle) foram avaliados quanto à mortalidade por um período de 36 dias. A partir do sexto dia foi observada mortalidade no lote das larvas tratadas (aproximadamente 15%) e no trigésimo sexto dia, esta taxa atingiu 100%. Por outro lado, 80% das larvas do grupo controle mantiveram-se vivas até este último dia de observação (36º dia) (dados não mostrados), sugerindo uma ação residual da ivermectina sobre as larvas tratadas por imersão, impedindo sua fixação no hospedeiro. Soluções com concentrações mais baixas de ivermectina merecem ser testadas a fim de se averiguar o sucesso de infestação com larvas por elas tratadas. Se o mecanismo de resistência a LMs em carrapatos for do tipo metabólica, como o encontrado em *Leptinotarsa decemlineata* (ARGENTINE et al., 1990) pode-se supor que houve uma depleção das enzimas responsáveis pela detoxificação da droga ao longo dos 36 dias, levando à mortalidade total das larvas. No entanto para determinar se o mecanismo de resistência à ivermectina em *R. (B.) microplus* é do tipo metabólico, serão necessários estudos utilizando-se sinergistas, como proposto por Miller et al. (1999).

Em ensaios preliminares, foi observado que teleóginas, expostas à concentração de 1000 ppm de ivermectina, foram capazes de originar larvas viáveis, porém em número insuficiente para a condução dos experimentos. Diante disso, foi exercida uma pressão de seleção via tratamento das teleóginas, a 10 e 100 ppm de ivermectina, respectivamente para adultas F2 e F3. Estas concentrações foram escolhidas para execução do experimento porque permitiram a obtenção de pelo menos 20.000 larvas em cada geração, F3 e F4, viáveis para infestações. Embora destas infestações tenham resultado teleóginas férteis, não houve um aumento significativo do valor do fator de resistência (FR) nas gerações subseqüentes (Tabela 4). É possível que um número maior de gerações tenha que ser submetida à mesma estratégia antes que um aumento do valor do FR possa ser detectado, tal como observado em trabalho realizado por Shoop et al., (1990) com *Trichostrongylus colubriformis*. Neste estudo sobre desenvolvimento da resistência à ivermectina por este helminto, foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa

entre os valores dos FR da primeira e da última geração analisada somente após 10 gerações mantidas sob pressão de seleção. O mesmo foi observado por Vargas et al (2003) para *R. (B.) microplus* frente à seleção por amitraz.

Diante das respostas obtidas com o emprego de métodos de seleção por imersão das larvas ou das adultas em ivermectina visando o aumento do valor do FR, procedeu-se à avaliação da toxicidade da droga via ingestão. Deste modo, larvas F4 foram infestadas em um bovino tratado com ivermectina e estas evoluíram com sucesso para teleóginas férteis. As larvas delas oriundas (F5), apresentou FR₅₀ de 3,33 quando avaliadas por TIL. Este resultado indicou ser esta uma estratégia eficiente a ser utilizada como pressão de seleção. Foram realizadas mais duas infestações em bezerros tratados resultando em teleóginas, as quais foram submetidas à imersão em ivermectina. Estas teleóginas, por sua vez, originaram as larvas F6 e F7 que foram submetidas ao TIL. Embora os valores dos FR determinados para estas gerações não tenham diferido entre si, estes foram superiores àqueles obtidos no tipo de tratamento anterior, isto é, exclusivamente por imersão das adultas na droga (Tabela 4).

Como reflexo da seleção em andamento, os valores dos intervalos de confiança das CL₅₀ e CL₉₉ aumentaram significativamente, indicando um aumento do número de indivíduos que sobreviveram a maiores concentrações da droga. O valor de inclinação da curva de dose-resposta (*slope*) decresceu de 3.299 (F3) para 1.454 (F6), representando um incremento na heterogeneidade da população em resposta aos tratamentos, constituindo um indício de uma seleção de indivíduos resistentes (FAO, 2004).

Um dos possíveis efeitos da intoxicação dos carrapatos por drogas é a diminuição do desempenho reprodutivo das teleóginas. Assim, no presente trabalho, levantou-se a hipótese de que larvas resultantes de posturas de elevada eclodibilidade pudessem apresentar maior valor de FR, já que a geração materna resistente foi capaz de produzir um maior número larvas viáveis. Para testar esta hipótese, as posturas de fêmeas alimentadas em bezerro tratado e submetidas a imersão em ivermectina, foram separadas em grupos de altas (acima de 80%) e baixas (menor que 30%) taxas de eclosão. As larvas delas oriundas foram submetidas ao TIL. Foi constatado que o grupo de posturas de alta eclodibilidade apresentou uma CL₅₀ (21,16 ppm) cerca de três vezes maior do que a CL₅₀ do grupo de baixa eclodibilidade. É interessante

notar que o valor de CL_{50} deste último grupo foi muito próximo àquele registrado para a cepa susceptível POA. Assim, é possível inferir que o grupo de baixa eclodibilidade represente a parcela dos indivíduos susceptíveis da população estudada, enquanto que o de alta eclodibilidade, os resistentes. Desta maneira, foram utilizadas larvas oriundas de posturas de alta eclodibilidade para as infestações seguintes. Como consequência, foi verificado um aumento significativo do valor do FR_{50} da geração F7(2,82) para a F9 (8,14) (Tabela 4). É possível que a frequência de indivíduos resistentes da população tenha aumentado ainda mais em relação aos tratamentos anteriores.

Diferenças entre parâmetros biológicos de cepas de *R. (B.) microplus* susceptíveis e resistentes a organofosforados, piretróides e amitraz não foram constatados em um trabalho conduzido por Davey et al. (2006). De maneira semelhante, no presente trabalho, os valores dos índices de fertilidade (IF) das gerações experimentais (Tabela 2), não variaram em relação ao obtido para a cepa POA (susceptível) e tampouco entre si, a despeito do aumento dos valores dos FR. No entanto, foi possível constatar que as fêmeas alimentadas em hospedeiro tratado com ivermectina (F6*) apresentaram, comparativamente, menor peso que aquelas coletadas de hospedeiro não tratado (F6). Porém, em função da redução proporcional no peso de seus ovos, o IF não apresentou variação significativa. É possível que o menor peso das fêmeas possa ser atribuído a um prejuízo na conversão metabólica causado pela ingestão da ivermectina. Foi possível verificar também, na geração F7, que as fêmeas pertencentes ao grupo de postura de alta eclodibilidade apresentaram valor de IF maior do que aquelas do grupo de postura de baixa eclodibilidade (Tabela 3), indicando um melhor desempenho reprodutivo das fêmeas resistentes à ivermectina.

A resistência à ivermectina exibida pela população Piquete aumentou gradativamente, em relação à cepa POA, a partir da geração F1 (FR_{50} =1,37) até a geração F10 (FR_{50} =8,06) (Tabela 4). Constatou-se também, uma diminuição dos valores de inclinação da curva de dose-mortalidade da geração F1 (3,349) para a geração F10 (1,200), refletindo um aumento da heterogeneidade em resposta ao tratamento da população. Esta heterogeneidade também pode ser inferida pelos amplos intervalos de confiança (IC95%). Estes são fortes

indicativos de que esta população foi selecionada com relação ao caráter à ivermectina. As curvas de dose-resposta ilustradas na Figura 12 representam os diferentes tipos de pressão de seleção a que foram submetidas as gerações de carrapatos analisadas. Os resultados obtidos com o emprego da última estratégia utilizada no presente trabalho, isto é, infestação realizada com larvas de posturas de alta eclodibilidade, oriundas de teleóginas não tratadas, sugerem ser esta a responsável pelo aumento significativo do valor do FR verificado nas gerações F9 e F10. Portanto esta estratégia também pode ser empregada para selecionar *R. (B.) microplus* resistentes à ivermectina. O presente trabalho não possibilitou avaliar a eficiência de cada uma das estratégias adotadas para pressão de seleção, uma vez que o valor do FR da última geração analisada é resultante dos sucessivos tratamentos.

O teste de pacote com larvas (TPL) para detectar populações de carrapatos resistentes à ivermectina ainda não está padronizado devido a pouca disponibilidade de cepas comprovadamente resistentes (SABATINI et al., 2001). No presente trabalho, este teste pôde ser realizado paralelamente ao TIL e os resultados foram confrontados. O valor do FR à ivermectina apresentado pela geração F10 da população *R. (B.) microplus* Piquete calculado através do TPL (1,58) foi menor que aquele obtido pelo TIL (8,06) (Tabelas 4 e 5). Esta diferença pode indicar uma menor sensibilidade do TPL para a detecção de populações resistentes à ivermectina, tal como observado por Klafke (2006). É recomendável que um maior número de testes sejam conduzidos, tanto com cepas resistentes quanto com susceptíveis, para validação do TPL no diagnóstico de resistência às lactonas macrocíclicas.

A resistência cruzada entre moléculas de uma mesma classe acaricida já foi verificada anteriormente em *R. (B.) microplus* representando um grande entrave no controle deste parasito (MILLER et al., 1999). No presente trabalho, larvas de *R. (B.) microplus* da população Piquete resistente à ivermectina (F9 e F10) foram submetidas ao TIL com moxidectina comercial, droga igualmente pertencente à classe das lactonas macrocíclicas. Os resultados mostraram uma diferença estatisticamente significativa entre as CL_{50} da F9 e da F10 em relação à cepa POA susceptível (Tabela 6), constituindo um indicativo de resistência à moxidectina. Mostraram também, um aumento estatisticamente significativo no valor do FR_{50} da geração F10 em relação ao da F9 (Tabela 6 e

Figura 14). É possível que a população Piquete apresente resistência cruzada entre ivermectina e moxidectina. É plausível, ainda, que as estratégias de pressão de seleção visando a obtenção de uma cepa resistente à ivermectina tenham também selecionado indivíduos resistentes à esta outra LM em análise. Este tipo resistência cruzada pode ser explicado pelo fato de serem moléculas análogas e que compartilham dos mesmos receptores para exercer sua ação tóxica. É importante ressaltar que o histórico de uso de acaricidas na propriedade de origem desta população remete a aplicações de ivermectina, abamectina e moxidectina, o que pode ter contribuído para a seleção de indivíduos resistentes a estas diferentes moléculas.

Com o recente diagnóstico de carrapatos resistentes às LMs e à presente obtenção experimental de um isolado resistente à ivermectina, abrem-se novas perspectivas nos estudos sobre resistência do carrapato *R. (B.) microplus* a estas moléculas. Como exemplo, ressaltam-se os estudos de herdabilidade da resistência que são fundamentais para avaliar a velocidade com que esta se estabelece em uma população de carrapatos. Ou, ainda, estudos que comparem os valores dos FR determinados *in vitro* com a resposta ao tratamento *in vivo*, que podem contribuir para a adoção de um manejo de resistência mais eficaz. Por fim, a obtenção de uma cepa resistente é fundamental para viabilizar o conhecimento dos mecanismos envolvidos no fenômeno e para o aprimoramento de bioensaios e técnicas moleculares para o diagnóstico de resistência.

5 CONCLUSÃO

No presente trabalho realizado com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, foi possível:

Constatar, sob diferentes condições de pressão de seleção, um aumento estatisticamente significativo do valor do Fator de Resistência à ivermectina das larvas da última geração analisada (F10) em relação àquelas da população inicial (F2).

Constatar que o valor do Índice de Fertilidade da geração resistente F9 não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação àqueles das gerações anteriores e ao da população susceptível POA.

Estabelecer experimentalmente, pela primeira vez, uma população de *R. (B.) microplus* resistente à uma droga do grupo das lactonas macrocíclica.

REFERÊNCIAS

ABRO, G.H.; DYBAS, R.A.; GREEN, A.; WRIGHT, D.J. Toxicity of avermectin B11 against a susceptible strain and an insecticide-resistant strain of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol., v. 81, p. 1575-1580, 1988.

ALVARADO, R.U.; GONZALES, J.C. A postura e viabilidade do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina, Ixodinae) em condições de laboratório. Rev. Lat-amer. Microbiol., 21: 31-36, 1979.

ARANTES, G.J.; MARQUES, A.O.; HONER, M.R. The cattle tick, *Boophilus microplus*, in the municipality of Uberlandia, MG: analysis of its resistance to commercial acaricides. Rev. Bras. Paras. Vet., v. 4, p. 89-93, 1996.

ARENA, J.P.; LIU, K.K.; PARESS, P.S.; FRAZIER, E.G.; CULLY, D.F.; MROZIK, H.; SCHAEFFER, J.M. The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. J. Parasitol., v. 81, p. 286-294, 1995.

ARGENTINE, J.A.; CLARK, J.M. Selection for abamectin resistance in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). Pestic. Sci., v. 28, p. 17-27, 1990.

ARGENTINE, J.A.; CLARK, J.M.; LIN, H. Genetics and biochemical mechanisms of abamectin resistance in two isogenic strains of Colorado potato beetle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v. 44, p. 191-207, 1992.

ARONSTEIN, K.; ODE, P.; FRENCH-CONSTANT, R.J. Direct comparison of PCR-based monitoring for cyclodiene resistance in *Drosophila* populations with insecticide bioassay. Pestic. Biochem. Physiol., v. 48, p. 229-233, 1994.

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Ent., v. 18 p. 265-267, 1925.

BAKER, J.A.F. Resistance to ixodocides by ticks in Africa south of Equator with some thoughts on tick control in this area. In: WILDE, J.K.H. (Ed.). Tick-borne Diseases and Their Vectors. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press, 1978. p. 101-109.

BALASHOV, Y.S., Bloodsucking ticks (Ixodoidea): vetor of diseases of man and animals. Misc. Pub. Entomol. Soc. Am., 8: 161-376, 1972.

BENAVIDES, E.; ROMERO, A. Preliminary results of a larval resistance test to ivermectins using *Boophilus microplus* reference strains. Ann. NY Acad. Sci., p. 610-612, 2000.

BENZ, G.W.; RONCALLI, R.A.; GROSS, S.J. Use of ivermectin in cattle, sheep, goats, and swine. In: CAMPBELL, W.C. (Ed.). Ivermectin and Abamectin. New York: Springer, 1989. p. 215-229.

BLACKHALL, W.L.; POULIOT, J.; PRICHARD, R.K; BEECH R.N. *Haemonchus contortus*: Selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains. Exp. Parasitol., v. 90, p. 42-48 1998.

BLACKHALL, W.J.; PRICHARD, R.K.; BEECH R.N. Selection at a γ -aminobutyric acid receptor gene in *Haemonchus contortus* resistant to avermectins/milbemycins. Mol. Biochem. Parasitol., v. 131, p. 137-145, 2003.

BLOOMFIELD, G. Endoparasites: The Veterinary Market. Richmond. Reino Unido: PJB Publications, 1988. 160 p.

BRUN, L. O. Resistance to deltamethrin in *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina:Ixodidae) in New Caledonia. J. Aust. Entomol. Soc., v. 31, p. 301-302, 1992.

BURG, R.W.; STAPLEY, E.O. Isolation and characterisation of the producing organism in Ivermectin and Abamectin In: CAMPBELL, W.C. (Ed.). Ivermectin and Abamectin. 1 ed., New York: Springer, 1989. p. 24-32.

BUSO, G. Evolução do mercado de insumos veterinários destinados a bovinocultura no Brasil. In: WORKSHOP BRASILEIRO DE GESTÃO DE SISTEMAS AGROALIMENTARES, 2., 1999, Ribeirão Preto: PENSA/FEA/USP, Anais..., p. 210-220.

CANALES, M.; ENRÍQUEZ, A.; RAMOS, E.; CABRERA, D.; DANDIE, H.; SOTO, A.; FALCÓN, V.; RODRÍGUEZ, M.; DE LA FUENTE, J. Large-scale production in

Pichia pastoris of the recombinant vaccine GavacTM against cattle tick. Vaccine, v. 15, p. 414-422, 1997.

CHEESEMAN, C.L.; DELANY, N.S.; WOODS, D.J.; WOLSTENHOLME, A.J. High-affinity ivermectin binding to recombinant subunits of the *Haemonchus contortus* glutamate-gated chloride channel. Mol. Biochem. Parasitol., v. 114, p. 161-168, 2001.

CLARK, J. K.; SCOTT, J.G.; CAMPOS, F.; BLOOMQUIST, J.R. Resistance to Avermectins: Extent, Mechanisms, and Management Implications. Ann. Rev. Entomol., v. 40, p. 1-30, 1994.

COBON, G.; HUNGERFORD, J.; WOODROW, M.; SMITH, D.; WILLADSEN, P. Vaccination against *Boophilus microplus*, the Australian field experience. In: de la FUENTE, J. (Ed.). Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick. Havana, Cuba: Elfos Scientiae, 1995. p. 163-176.

COBON, G.S.; WILLADSEN, P. Vaccines to prevent cattle tick infestations. In: WOODROW, G.C.; LEVINE, M.M. New generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 901-917.

CULLY, D.F.; VASSILATIS, D.K.; LIU, K.K.; PARESS, P.S.; VAN DER PLOEG, L.H.T.; SCHAEFFER, J.M.; ARENA, J.P. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channels from *Caenorhabditis elegans*. Nature, v. 371, p. 707-711, 1994.

CULLY, D.F.; PARESS, P.S.; LIU, K.K.; SCHAEFFER, J.M.; ARENA, J.P. Identification of a *Drosophila melanogaster* glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent avermectin. J. Biol. Chem., v. 271, p. 20187-20191, 1996.

CURRIE, B.J.; HARUNAL, P.; MCKINNON, M.; WALTON, S.F. First documentation of in vivo and in vitro ivermectin resistance in *Sarcoptes scabiei* Clin. Infect. Dis., v. 39, p. e8-e12, 2004.

DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E. In vitro and in vivo evaluations of a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) selected for resistance to permethrin. J. Med. Entomol., v. 35, p. 1013-1019, 1998.

DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E.; MILLER, R.J. Efficacy of various concentrations of coumaphos to control adult, nymphal, and larval stages of an organophosphate-resistant strain of *Boophilus microplus* on infested cattle. Am. J. Vet. Res., v. 64, p. 684-689, 2003.

DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E.; MILLER, R.J. Comparison of the reproductive biology between acaricide-resistant and acaricide-susceptible *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Vet. Parasitol., v. 139, p. 211-220, 2006.

de la FUENTE, J. Foreword. In: de la FUENTE, J. (Ed.). Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick. Havana, Cuba: Elfos Scientiae, 1995, p. 13-17.

de la FUENTE, J.; GARCÍA-GARCÍA, J.C.; GONZÁLEZ, D.M.; IZQUIERDO, G.; OCHAGAVIA, M.E. Molecular analysis of *Boophilus* spp. (Acari: Ixodidae) tick strains. Vet. Parasitol., v. 92, p. 209-222, 2000.

DELANEY, S.D.; LAUGHTON, D.L.; WOLSTENHOLME, A.J. Cloning and localisation of an avermectin receptor-related subunit from *Haemonchus contortus*. Mol. Bio. Parasit., v. 97, p. 177-178, 1998.

DENT, J.A.; SMITH, M.M.; VASSILATIS, D.K.; AVERY, L. The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 97, p. 2674-2679, 2000.

DRUMMOND, R.O.; CRUST, S.F.; TREVINO, J.L.; GLADNEY, W.J.; GRAHAM, O.H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. J. Econ. Entomol., v. 66, p. 130-133, 1973.

DUCE, I.R.; SCOTT, R.H. Actions of dihydroavermectin B_{1a} on insect muscle. Br. J. Pharmacol., v. 85, p. 395-401, 1985.

ECHEVARRIA, F.A.M.; ARMOUR, J.L.; DUNCAN, J.L. Efficacy of some anthelmintics on an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. Vet. Parasitol., v. 39, p. 279-284, 1991.

EGERTON, J. R.; OSTLIND, D. A.; BLAIR, L. S.; EARY, C. H.; SUHAYDA, D.; CIFELLI, S.; REIK, R. F.; CAMPBELL, W. C. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Efficacy of the B_{1a} component. Antimicrob. Agents Chemoter., v. 15, p. 372-378, 1979.

ESTRADA-PEÑA, A.; BOUATTOR, A.; CAMICAS, J.L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; WALKER A.R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Exp. App. Acarol.*, v. 38, p. 219-235, 2006.

FEYEREISEN, R.; KOENER, J.F.; FARNSWORTH, D.E.; NEBERT, D.W. Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P-450 from an insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca domestica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 86, p. 1465-1469, 1989.

FFRENCH-CONSTANT, R.H.; DEVONSHIRE, A.L.; WHITE R.P. Spontaneous loss and reselection of resistance in extremely resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Pestic. Biochem. Physiol.*, v. 30, p. 1-10, 1988.

FIELD, L.M.; DEVONSHIRE, A.L.; FFRENCH-CONSTANT, R.H.; FORDE, B.G. The combined use of immunoassay and DNA diagnostic technique to identify insecticide-resistant genotypes in the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulz.) *Pestic. Biochem. Physiol.*, v. 34, p. 174-178, 1989.

FINNEY, D.J. Probit Analysis. Cambridge: 3rd Ed. Cambridge University Press,. 1980.

FISHER, M.H.; MROZIK, H. Chemistry in Ivermectin and Abamectin In: CAMPBELL, W.C. (Ed.) Ivermectin and Abamectin. New York: Springer, 1989. p. 1-23.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAO. *FAO Acaricide Resistance Test Kit: Instructions for use*. Alemanha: Institute of Veterinary Medicine, Robert von Ostertag Institute, Federal Health Office, 1984.

FORTES, E. *Boophilus microplus* (Canestrini 1887). In : FORTES, E. *Parasitologia Veterinária*. 3 ed. São Paulo: Ícone, 1997. p. 580-584.

FREIRE, J.J. Arsênio e cloro, resistência e emprego do tiofosfato de dietil parametiofelina (parathion) na luta anticarrapato *Boophilus microplus*. Bol. Dir. Prod. Anim., v. 9, p. 3-31, 1953.

FREIRE, J.J. Carrapato resistente as balneações carrapaticidas no Rio Grande do Sul. Bol. Dir. Prod. Anim., v. 13, p. 62-80, 1956.

FURLONG, J. Diagnosis of the susceptibility of the cattle tick, *Boophilus* spp. to acaricides in Minas Gerais State, Brazil. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, 5., 1999. Puerto Vallarta, México: CONASAGA Proceedings... p.41-46.

GEARY, T.G.; SIMS, S.M.; THOMAS, E.M.; VANOVER, L.; DAVIS, J.P.; WINTERROWD, C.A.; KLEIN, R.D.; HO, N.F.; THOMPSON, D.P. *Haemonchus contortus*: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. Exp. Parasitol., v. 77, p. 88-96, 1993.

GEORGE, J.E.; POUND, J.M.; DAVEY, R.B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. Parasitology, v. 129, p. S353-S366, 2004.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. Hora Vet., v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

GUARAGNA, G.P.; CARVALHO, J.B.P.; FIGUEIREDO, A.L. Efeitos de fatores genéticos e ambientes na infestação natural de carrapatos (*Boophilus microplus*, Canestrini) em bovinos leiteiros. Bol. Ind. Anim., v. 45, p.19-32, 1988.

GUERRERO, F.D.; JAMROZ, R.C.; KAMMLAH, D.; KUNZ, S.E. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: Identification of *kdr* and *super-kdr* point mutations. Insect Biochem. Molec. Biol., v.27, n. 8/9, p. 745-755, 1997.

GUERRERO, F.D.; LI, A.Y.; HERNANDEZ, R. Molecular diagnosis of pyrethroid resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol., v. 39, n. 5, p. 770-776, 2002.

GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. Ectoparasitos de importância veterinária. São Paulo: ed. Plêiade, 2001.

HARWOOD, R. H.; JAMES, M. T. Entomology in human and animal health. 7th ed. Mc Millan, New York, 1979

HEMINGWAY, J.; FIELD, L.; VONTAS, J. An overview of insecticide resistance. Science, v. 298, p. 96-97, 2002.

HENNESY, D.R. Physiology, pharmacology and parasitology. Int. J. Parasitol., v. 27, p.145-52, 1997.

HERNANDEZ, R.; ANDREW, C.C.; DAVEY, R.B.; IVIE, G.W.; WAGNER, G.G.; GEORGE J.E. Comparison of genomic DNA in various strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol., v. 35, n. 5, p. 895-900, 1998.

HODGKIN, J.; HERMAN, R. K. Título disponível em <<http://biosci.umn.edu/CGC/Nomenclature/nomenguid.htm>>. Acesso em: 17 Fev 2006.

HORN, S. Ectoparasites of animals and their impact on the economy of South America. In: WOLRD VETERINARY CONGRESS, 23., 1987, Montreal Proceedings...

KANE, N.S.; HIRSCHBERG, B.; QIAN S. Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are target for the antiparasitic nodulosporic acid and ivermectin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 97, p. 13949-13954, 2000.

KEMP, D. H.; SABATINI, G. A.; HUGHES, S.; HANSEN, J.; NARI, A. Test to determine LC₅₀ and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. FAO Animal Production and Health Division: Rome, 1998.

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

KLAFKE, G. M. Resistência a lactonas macrocíclicas em populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI:IXODIDAE) do Estado de São Paulo, Brasil: Diagnóstico por bioensaios. 65f. Tese (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LEORA SOFTWARE, 2003. Polo Plus Probit and Logit Analysis: User's Guide. Berkeley, 36 p.

MANUAL Merck de Veterinária. 7. ed. São Paulo:Ed. Roca, 1999.

MARTINS, J.R. A situation report on resistance to acaricides by the cattle tick *Boophilus microplus* in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL: RESISTENCIA Y CONTROL EN GARRAPATAS Y MOSCAS DE IMPORTANCIA VETERINARIA, 3., 1995, Acapulco, México. Proceedings... Acapulco: INIFAP, p.1-8. 1995.

MARTINS, J.R.; EDDI, C.; NARI, A.; HANSEN, J.W. Tick resistance in the world: reports of the last decade. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 1999, Salvador, BA. Anais... Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p.80, 1999.

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

MARTINS, J. R. Histórico de uso de carrapaticidas. Eldorado do Sul, RS. Disponível em: <<http://www.carrapatobovino.hpg.ig.com.br/carrapaticidas.htm>>. Acesso em: 12 abr. 2004.

MCCOSKER, P.J. Ticks in a changing world – Comments. Roma, Itália. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/AGInfo/resources/documents/WAR/war/U9550B/u9550b01.htm#ticks%20in%20a%20changing%20world>>. Acesso em: 05 jul. 2006.

MCKELLAR, Q.A.; BENCHAOUI, H.A. Avermectins and milbemycins. J. Vet. Pharmacol. Ther., v. 19, p. 331-351, 1996.

MILLER, R.J.; DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol., v. 36, p. 533-538, 1999.

MONTENEGRO- JAMES, S. Prevalence and control of babesiosis in the Américas Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 87, n. 3, p 27-36, 1992.

MURRELL, A.; CAMPBELL, N.J.H.; BARKER, S.C. A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. Mol. Phylogenet. Evol., v. 21, p. 244-258, 2001.

MURRELL, A.; BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). Syst. Parasitol., v. 56, p. 169-172, 2003.

NOLAN, J. Report of the Workshop on Acaricide resistance in the cattle-tick *Boophilus microplus*. Porto Alegre: FAO/IPVDF, 1984. 23 p.

NOLAN, J.; SCHNITZERLING, H.J. Drug Resistance in Arthropods Parasites. In: CAMPBELL, W.C.; REW, R.S. (Ed.). Chemotherapy of Parasitic Diseases. 1 ed. New York: Springer, 1986, p. 603-620.

NOLAN, J.; ROULSTON, W. J.; WHARTON, R. H. Resistance to synthetic pyrethroids in a DDT-resistant strain of *Boophilus microplus*. Pest. Sci. v. 8, p. 484-486, 1977.

NOLAN, J.; WILSON, J.T.; GREEN, P.E.; BIRD, P.E. Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick (*Boophilus microplus*). Aust. Vet. J., v. 66, p. 179-182, 1989.

OLIVEIRA, T.C.G.; SALCEDO, J.H.P.; MASSARD, C.L. Susceptibilidade de Amostras de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), do Rio de Janeiro, Brasil, à Carrapaticidas Organofosforados. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot., v. 38, n. 2, p. 205-214, 1986.

OLIVER Jr., J.H. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodina). Annu. Rev. Ecol. Syst., v. 20, p. 397-430, 1989.

OSTLIND, D. A.; MICKLE, W. G.; EWANCIEW, D. V.; ANDRIUI, F. J.; HERNANDEZ, S.; MOCHALES, S.; MOGUIRA, E. Efficacy of paraherquamide against immature *Trichostrongylus colubriformis* in the gerbil (*Meriones unguiculatus*).

Res. Vet. Sci., v. 48, n. 2, p. 260-261. 1990.

RODRÍGUEZ, M.; PENICHET, M.L.; MOURIS, A.E.; LABARTA, V.; LUACES, L.L.; RUBIERA, R.; CORDOVÉS, C.; SÁNCHEZ, P.A.; RAMOS, E.; SOTO, A.; CANALES, M.; PALENZUELA, D.; TRIGUERA, A.; LLEONART, R.; HERRERA, L.; DE LA FUENTE, J. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. Vet. Parasitol., v. 57, p. 339-349, 1995a.

RODRÍGUEZ, M.; MASSARD, C.L.; DA FONSECA, A.H.; RAMOS, N.F.; MACHADO, H.; LABARTA, V.; DE LA FUENTE, J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-breed cattle in Brazil. Vaccine, v. 13, p. 1804-1808, 1995b.

ROULSTON, W.J.; WHARTON, R.H.; NOLAM, J.; KERR, J.D.; WILSON, J.T.; THOMPSON, P.G.; SCHOTS, M. A survey for resistance in cattle ticks to acaricides. Aust. Vet. J., v. 57, p. 362-371, 1981.

ROULSTON, W.J.; WHARTON, R.H. Acaricide tests on the Biarra strain of organophosphorus resistant cattle tick *Boophilus microplus* from southern Queensland. Aust. Vet. J., v. 43, p.129-134, 1967.

ROUSH, R. T.; McKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. Annu. Rev. Entomol., v. 32, p. 361-380, 1987.

RUGG, D.; KOTZE, A.C.; THOMPSON, D.R.; ROSE, H.A. Susceptibility of laboratory-selected and field strains of the *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) to ivermectin. J. Econ. Entomol. v. 91, p. 601-607, 1998.

SABATINI, G.A.; KEMP, D.H.; HUGHES, S.; NARI, A.; HANSEN J. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. Vet. Parasitol., v. 95, p. 53-62, 2001.

SABATINI, G.A.; BARROS, A.T.M.; RIBOLLA, P.E.M.; GONZALEZ, R.; KLAFKE, G.M.; SOUZA, E.R.; SCHUMAKER, T.T.S. Detecção molecular de resistência aos piretróides (kdr) em mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans irritans*) de diferentes regiões do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

**PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE
RICKETTSIOSES, 13, 2004, Ouro Preto Anais... Ouro Preto**

SANGSTER, N.; BATTERHAM, P.; CHAPMAN, H. D.; DURAISINGH, M.; JAMBRE, L. L.; SHIRLEY, M.; UPCROFT, J.; UPCROFT, P. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. *Int. J. Parasitol.*, v. 32, p. 637-653, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SATTLER, P.W.; HILBURN, L.R.; DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E.; AVALOS, J.R. Genetic similarity and variability between natural populations and laboratory colonies of north american *Boophilus* (Acari: Ixodidae). *J. Parasitol.*, v. 72, n. 1, p. 95-100, 1986.

SAWICKI, R.M.; DEVONSHIRE, A.L.; PAYNE, R.W.; PETZING, S.M. Stability of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pestic. Sci.*, v. 11, p. 33-42, 1980.

SCOTT, J.A. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. *Fla. Entomol.*, v. 78, p. 399-414, 1995.

SCOTT, J.G. Cross-resistance to the biological insecticide abamectin in pyrethroid-resistant house flies. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v. 34, p. 27-31, 1989.

SCOTT, J.G. Toxicity of abamectin and hydramethylnon to insecticide-susceptible and resistant strains of German cockroach (Dictyoptera: Blatellidae). *J. Agric. Entomol.*, v. 8, p. 77-82, 1991.

SCOTT, J.G.; ROUSH, R.T.; LIU, N. Selection of high levels of permethrin resistance in the house fly. *Pestic. Sci.*, v. 17, p. 195-206, 1991.

SHAW, R.D. Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Canestrini) and assessment of its resistance spectrum. *Bull. Entomol. Res.*, v. 56, n. 4, p. 398-405, 1966.

SHAW, R. D.; COOK, M.; CARSON Jr, R. E. developments in the resistance status of the southern cattle tick to organophosphorus and carbamate insecticides. J. Econ. Entomol., v. 61, p. 1590-1594, 1968.

SHOOP, W. L.; EGERTON, J.R.; EARY, C. H.; SUHAYDA, D. Laboratory selection of a benzimidazole-resistant isolate of *Trichostrongylus colubriformis* for ivermectin resistance J. Parasitol, v. 76, n. 2, p 186-189, 1990.

SHOOP, W. L. Ivermectin Resistance. Parasitol. Today, v. 9, p. 154-159, 1993.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. Mercado veterinário por classe terapêutica e espécie animal. São Paulo: SINDAN Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/>>. Acesso em: 22 de Mar. 2007.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA Artigos técnicos Rio de Janeiro Disponível em: <<http://www.sna.agr.br/>> Acesso em: 14 de Jan. 2005

SPICKETT, A.M.; FIVAZ, B.H. A survey of cattle tick control practices in the Eastern Cape Province of South Africa. Onderstepoort J. Vet. Res., v. 59, p. 203-210, 1992.

SOLL, M. D. The future of anthelmintic therapy from an industry perspective. In MANAGING ANTHELMINTIC RESISTANCE IN ENDOPARASITES (ed. Van Wyk, J.A. & Van Schalkwyk, P. C.) Workshop held at 16th International Conference of the WAAVP, Sun City, South Africa: 1-4, 1997.

STONE, B.F.; HAYDOCK, K.P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). Bull. Entomol. Res., v. 53, p. 563-578, 1962.

SUTHERST, R.W.; COMINS, H.N. The management of acaricide resistance in the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae), in Australia. Bull. Entomol. Res., v. 69, p. 519-540, 1979.

SUTHERST, R.W.G.; MAYWAD, F.; KERR, G.F.; SIEGMAN, D.A. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* steers Austr. Vet. J. Agric. Res. v. 34, p. 317-327, 1983.

TATCHELL, J. Interactions between ticks and their hosts *Int. J. Parasitol.* v. 17, n. 2, p. 597-605, 1987.

TURNER, M.J.; SCHAEFFER, J.M. Mode of action of ivermectin in Ivermectin and Abamectin In: CAMPBELL, W.C. (Ed.) *Ivermectin and Abamectin*. New York: Springer, 1989. p. 73-88.

TYRRELL, K.L.; DOBSON, R.J.; STEIN, P.A.; WALKDEN-BROWN, S.W. The effects of ivermectin and moxidectin on egg viability and larval development of ivermectin-resistant *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.*, v. 107, p. 85-93, 2002.

VARGAS, S.M.; CÉSPEDES, N.S.; SÁNCHEZ, H.F.; MARTINS, J.R.; CÉSPEDES, C.O.C. Avaliação in vitro de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente à amitraz. *Cienc. Rural*, v. 33, n. 4, p. 737-742, 2003.

WAMBURRA, P. N.; GWAKISA, P. S.; SILAYO, R. S.; RUGAIMUKAMU, E. A. Breed-associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. *Vet. Parasitol.*, v. 77, p. 63-70, 1998.

WHARTON, R.H.; ROULSTON, W.J. Acaricide resistance in *Boophilus microplus* in Australia. In: WORKSHOP ON HEMOPARASITES (ANAPLASMOSIS AND BABESIOSIS). Cali, Colombia, 1975. Proceedings... Bogotá: Centro Internacional de Agricultura Intertropical, Series CE – v. 12, p. 73-92, 1977.

WHARTON, R.H. Tick-born livestock diseases and their vectors. Acaricide resistance and alternative methods of tick control. *World Anim.Rev.* v. 20, p. 8-15, 1976.

WILLADSEN, P.; BIRD, P.E.; COBON, G.S.; HUNGERFORD, J. Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, v. 110, p. 43-50, 1995.

WITTY, M.J. Current strategies in the search for novel antiparasitic agents. *Int. J. Parasitol.* v.29, p. 95-103., 1999.

WOOLEY, T.A. *Acarology. Mites and human welfare*. New York: John Wiley, 1988 484p.

YATES, D.M.; PORTILLO, V.; WOLSTENHOLME, A.J. The avermectin receptors of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans*. Int. J. Parasitol.,v. 33, p. 1183-1193, 2003.