

ELEONOR ADEGA CASTRO JANER

**RESISTÊNCIA DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* (ACARI:
IXODIDAE) A FIPRONIL: PADRONIZAÇÃO DE BIOENSAIOS *IN VITRO*,
DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA EM POPULAÇÕES DE CAMPO E AVALIAÇÃO
SOBRE RESISTÊNCIA CRUZADA COM OUTRAS DROGAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker

**São Paulo
2010**

RESUMO

Castro Janer EA. Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE) a Fipronil: Padronização de bioensaios *in vitro*, detecção de resistência em populações de campo e avaliação sobre resistência cruzada com outras drogas. [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Rhipicephalus (Boophilus) microplus é uma das principais pragas que atacam os bovinos. As perdas causadas por este carrapato podem ser minimizadas pela utilização de acaricidas. O artrópode, entretanto, tem desenvolvido resistência à maioria deles, constituindo sério problema nos programas de controle. Para o sucesso nas estratégias de manejo é necessário usar testes práticos, econômicos, rápidos e confiáveis que possam detectar a presença de fenótipos resistentes nas populações alvo. O fipronil é um acaricida de uso relativamente recente nos bovinos, não se dispondo de testes *in vitro* padronizados para o diagnóstico da resistência do carrapato. O presente trabalho teve como objetivo a padronização de bioensaios *in vitro* para diagnóstico de resistência ao fipronil, visando sua aplicação na detecção da resistência em populações de campo (Brasil e Uruguai), em estudos sobre participação de enzimas detoxificadoras no mecanismo de resistência e sobre ocorrência de resistência cruzada com outras drogas (ivermectina, lindano). Foram realizados ensaios em triplicada para padronização dos Teste de Imersão de Adultas (TIA; n=26), Teste de Imersão de Larvas (TIL; n=71) e Teste de Pacote com Larvas (TPL; n=41), empregando-se as cepas susceptível (Mozo) e resistente a fipronil. No TIA foram analisadas quatro variáveis: mortalidade, peso dos ovos aos 7 e 14 dias, índice de fertilidade e índice de fecundidade e todas elas discriminaram as populações. Para os testes de larvas foram analisadas as curvas dose-mortalidade. O TIA e o TIL foram mais sensíveis que o TPL, com maiores fatores de resistência (FR). As concentrações discriminatórias (CD) ($2 \times CL_{99,9}$) para mortalidade nos ensaios usando TIA, TIL e TPL foram, respectivamente: 4,98; 7,64 e 2365,8 ppm com a cepa Mozo. Os FR da população resistente foram 202,4; 5,36 e 1,52. Os ensaios foram validados com populações de campo do Brasil (38) e Uruguai (28) oriundas, respectivamente, de propriedades de produção de leite e de gado de corte. O uso do TIL, permitiu os primeiros diagnósticos de resistência a fipronil *in vitro* ($FR \geq 2$) em populações de carrapatos bovinos do Brasil (19) e Uruguai (5), além de outras com resistência incipiente. No Uruguai, as populações resistentes estão

limitadas a uma região principalmente agrícola onde a utilização de endosulfan e fipronil nas culturas foi intensa. Carrapatos de propriedades brasileiras que nunca usaram fipronil nos animais, mas que o aplicavam no controle de cupins, foram resistentes (TIL). Embora as evidências sejam indiretas, infere-se que o controle de pragas agrícolas pode interferir no controle do carrapato. A CD presentemente determinada foi eficiente, já que em seu emprego, todas as populações resistentes testadas apresentaram sobreviventes. Foi estudada a resistência metabólica mediante uso de inibidores enzimáticos: butóxido de piperonila (BPO), Trifenilfosfato (TPP) e Dietilmaleato (DEM). Não foi detectado importante sinergismo da droga com BPO e TPP. Possivelmente o mecanismo de resistência seja por insensibilidade do sítio de ação, determinada por uma mutação do tipo *Rdl*, já que das 17 populações resistentes a fipronil, 14 foram resistentes a lindano. Não foi observada resistência cruzada com IVM (n=29). A resistência a IVM no Uruguai ainda é incipiente.

Palavras-chave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Resistência a carrapaticidas. Diagnóstico. Bioensaios. Mecanismos de resistência. Fipronil. Lindano. Ivermectina

ABSTRACT

Castro Janer EA. Resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE) to fipronil: standardization of *in vitro* bioassays, detection of resistance in field populations and evaluation of cross-resistance with other drugs. [Ph.D. thesis (Philosophic Doctor in Sciences)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Rhipicephalus (Boophilus) microplus is one of the main pests of cattle. The losses caused by this tick can be minimized by the use of acaricides. The arthropod, however, has developed resistance to most of them, constituting serious problem in control programs. For the success of management strategies is necessary to use practical tests, economical, fast and reliable that can detect the presence of resistant phenotypes in a population. Fipronil is a relatively new acaricide for use in cattle and there have been no standardized *in vitro* tests for the diagnosis of tick resistance. This study aimed to standardize *in vitro* bioassays for diagnosis of resistance to fipronil for their application in the detection of resistance in field populations (Brazil and Uruguay), in studies involving detoxification enzymes in the mechanism of resistance and on the occurrence of cross-resistance to other drugs (ivermectin, lindane). Assays were performed in triplicate for standardization of Adult Immersion Test (AIT, n = 26), Larval Immersion Test (LIT, n = 71) and Larval Packet Test (LPT, n = 41), using the strains susceptible (Mozo) and resistant to fipronil. AIT discriminated the populations in four variables: mortality, egg weight at 7 and 14 days, fertility index and fecundity index. For the tests with larvae the concentration-mortality curves were analyzed. The AIT and LIT were more sensitive than LPT, with higher resistance ratios (RR). The discriminating concentrations (DC) ($2 \times CL_{99,9}$) for mortality in trials using AIT, LIT and LPT were: 4.98, 7.64 and 2365.8 ppm with strain Mozo. The RR of the resistant population were 202.4, 5.36 and 1.52. The tests were validated with field populations of Brazil (38) and Uruguay (28) derived, respectively, from ranches of milk and beef cattle. The use of LIT, allowed the early diagnosis of *in vitro* resistance to fipronil ($RR \geq 2$) in populations of cattle ticks in Brazil (19) and Uruguay (5), beside others with incipient resistance. In Uruguay, the resistant populations are limited to a mainly agricultural region where the use of endosulfan and fipronil in the cultures was intense. Ticks from Brazilian ranches that never used fipronil in animals, but

that applied it to control termites, were resistant (LIT). Although the evidence is indirect, it appears that the control of agricultural pests can interfere in tick control. The DC currently stipulated was effective because in its use, all the resistant populations tested presented survivors. Metabolic resistance was assessed by use of enzymatic inhibitors: piperonyl butoxide (PBO), triphenylphosphate (TPP) and diethylmaleate (DEM). It was not detected significant drug synergism with PBO and TPP. Possibly the mechanism of resistance could be the target-site insensitivity determined by a mutation *Rdl*-type since, from 17 populations resistant to fipronil, 14 were resistant to lindane. It was not observed cross-resistance with IVM (n = 29). Resistance to IVM in Uruguay is still incipient.

Keywords: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Acaricide resistance. Diagnose. Bioassays. Mechanisms of resistance. Fipronil. Lindane. Ivermectin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (carrapato bovino): controle no Brasil e Uruguai

Tanto para o Brasil quanto para o Uruguai, a produção pecuária é de fundamental importância para o ingresso de divisas ao país. O Brasil é o principal exportador mundial de carne bovina com um rebanho que cresceu, aproximadamente, 30% na última década e com quase 200 milhões de cabeças (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne, 2010). O Uruguai destaca-se por ter um rebanho bovino de quase 12 milhões de cabeças (2009), com crescimento aproximado de 10% na última década; e cujo abate tem aumentado 20% (cerca de 2 milhões de cabeças) (Instituto Nacional de Carne, 2010). Em 2009, o Brasil exportou 2 milhões de toneladas de carne e o Uruguai, aproximadamente, 500 mil toneladas (ABIEC, 2010).

O consumo de carne e leite está aumentando, tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento com renda/per capita em crescimento. Este fato constitui uma motivação para incrementar e melhorar a eficiência produtiva da produção pecuária do ponto de vista tanto qualitativo quanto quantitativo, através da implementação de programas de saúde e manejo, em permanente adequação às exigências crescentes do mercado mundial, principalmente, em relação a resíduos em carne, leite e meio ambiente. As doenças parasitárias constituem uma das limitantes produtivas mais importantes pois o controle dos agentes se faz principalmente através de produtos químicos. Cada vez mais o mercado mundial aumenta as suas exigências quanto ao nível de resíduos permitidos nos alimentos, constituindo mais um desafio para o controle das parasitoses.

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (ACARI: IXODIDAE), carrapato de um só hospedeiro, parasito obrigatório principalmente de bovinos, apresenta uma distribuição mundial entre os paralelos 32° latitude norte e 34° latitude sul. Este carrapato constitui um importante flagelo para a indústria pecuária tanto pela sua ação patogênica direta (hematofagia, injeção de toxinas) como pela transmissão de patógenos (*Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*) responsáveis pela tristeza parasitária bovina (Thullner, 1997). Em média, cada fêmea ingurgitada é responsável pela perda de 1,37 g e 1,18 g de peso vivo, respectivamente, em bovinos *Bos taurus* e a sua cruzada com *Bos indicus*,

(Jonsson, 2006). As perdas na produtividade, seja por diminuição do ganho de peso, da produção de leite, somadas aos custos pelo controle do carrapato (tratamentos acaricidas e mão de obra) são responsáveis por uma perda mundial estimada em sete bilhões de dólares/ano (Food and Agriculture Organization, 2004). No entanto o impacto do parasita depende do sistema de produção, manejo e condições geo-climáticas. Para o Brasil essas perdas foram estimadas em dois bilhões de dólares ao ano (Grisi et al., 2002) e para o Uruguai, em 45 milhões de dólares ao ano (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, 2005).

As perdas causadas pelo carrapato podem ser minimizadas pelo tratamento dos bovinos com acaricidas, no entanto a resistência à maioria deles tem emergido nas populações de *R.(B.) microplus* (Kunz e Kemp, 1994). Embora a mutação gênica para conferir resistência ocorra antes da exposição do inseticida, a resistência acaba sendo uma consequência inevitável dos tratamentos acaricidas. Segundo definição da FAO (2004) “a resistência é a capacidade que tem alguns indivíduos de uma população de uma espécie de parasito de sobreviverem (ou tolerarem) as doses de droga que tem sido provadas como letais para a maioria dos indivíduos da mesma população”. É a expressão fenotípica da população, que sempre está expressa em ao menos alguns indivíduos da população antes da exposição ao tóxico e é transmitida de forma hereditária (Scott, 1995).

Durante as últimas décadas, a resistência a praguicidas tem sido, e ainda é, o principal problema técnico nos programas de controle de pestes e vetores na agricultura, na produção pecuária e na saúde pública (Shidrawi, 1990). Além disto, muitas vezes, o tratamento contra uma praga tem efeito em populações não alvo, alterando os níveis de susceptibilidade dos parasitos (Roush e Daly, 1990), trazendo complicações para o controle e prevenção de doenças do homem e colocando em risco a biodiversidade dos artrópodes na natureza.

A resistência às várias classes de carrapaticidas vem aumentando rapidamente como resultado da excessiva pressão de seleção determinada pelo uso intensivo de drogas por longo período de tempo (Nari e Hansen, 1999). Em muitas regiões do mundo o problema da resistência do carrapato para a maioria das drogas é gravíssimo, havendo sido detectada a organofosforados (OFs), piretróides sintéticos (PS) e, mais recentemente, para amitraz e ivermectina (IVM) em várias regiões do mundo. Atualmente são usadas com sucesso no controle, moléculas novas como, por exemplo, o fipronil e fluazuron, que apresentam elevado poder residual no controle de *R. (B.) microplus* (Bull et al., 1996; Cuore et al., 2007) mas, devido ao seu alto custo em relação aos outros produtos, sua utilização tem sido limitada.

No Brasil, o carrapato bovino apresenta resistência a todos os grupos químicos com exceção do fipronil e fluazuron, havendo sido registrada resistência principalmente para OFs, PS e amitraz na região sul do país (Vieira et al., 1998; Farias, 1999) e na região sudeste (Arantes et al., 1995; Furlong, 1999). Como alternativa para o controle dessas populações resistentes, e pela facilidade de aplicação, a partir de meados da década do 90 foi intensificado o uso das Lactonas Macrocíclicas (LMs), compostos de amplo espectro e com ação endectocida (Campbell, 1985). Como era previsível, a aparição de resistência a LMs não tardou em se manifestar no campo (Martins e Furlong, 2001; Martins, 2008). Entre 2002 e 2006, a venda de endectocidas no país cresceu 48,88%, atingindo a marca de cerca de 500 milhões de doses vendidas (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal, 2007), indicando sua intensa utilização. Recentemente foi diagnosticada resistência a IVM em populações de São Paulo (Klafke et al., 2006). Atualmente, suspeita-se, também, a ocorrência de resistência a fipronil nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e São Paulo (Furlong, 2007 (comunicação pessoal)¹; Martins, 2007 (comunicação pessoal)²). Inicialmente a utilização do fipronil de uso veterinário foi limitada pelo seu alto custo em relação aos outros produtos: em algumas ocasiões, alguns produtores o substituem por fipronil de uso agrícola o que contribui para o aumento da pressão de seleção de cepas resistentes.

No Uruguai, o controle do carrapato bovino está regulamentado. Em 1956 foi aprovada uma Lei (12.293) para a sua erradicação, onde o carrapato é declarado praga nacional. O controle baseia-se principalmente no uso de acaricidas cujos intervalos de aplicações para a erradicação são propostos de acordo com sua capacidade residual (Cuore et al., 2008). Um levantamento sobre as formas de aplicação dos tratamentos acaricidas, realizado no ano 2006, mostrou que 62% das fazendas usam banhos de imersão com uma média de seis tratamentos/ano. O número médio de tratamentos por ano quando a aplicação é realizada por forma de aspersão, derrame dorsal e por via injetável é de cinco, três e três vezes respectivamente (Gil e Piaggio, 2007). Em um estudo retrospectivo, realizado sobre 64 acaricidas aprovados para o controle do carrapato desde 1973 até 2007, levando em conta as características de eficácia, poder residual e risco epidemiológico, conclui-se que os banhos de imersão oferecem menos risco epidemiológico que as aplicações por derrame dorsal ou injetável (Cuore et al., 2008). A eficiência dessa campanha tem sido irregular ao longo dos anos, parte pelo uso inadequado de acaricidas (MGAP, 2005) e pela falta de técnicas de

¹ FURLONG, J. MG, 2007.

² MARTINS J.R. Eldorado do Sul, RS, 2007.

diagnóstico que acompanhem os estudos de eficácia de drogas de uso relativamente recente. Tem se diagnosticado resistência aos arsenicais (1960), OFs (final da década do 70) e PS e suas mesclas (início dos anos 90) (Cardozo et al., 1994). O fipronil e a IVM começaram a ser usados no final da década de 90, mas só recentemente foi diagnosticada resistência ao fipronil através de provas de estábulo (Cuore et al., 2007). Por razões econômicas o amitraz começou a ser usado em substituição dos PS quando os carrapatos mostravam resistência a este pesticida e só, recentemente foi diagnosticada resistência a ele (Cuore, 2009, (comunicação pessoal)³).

Com a diminuição da exposição a um princípio ativo em particular evita-se que a seleção de carrapatos resistentes continue (Kemp et al., 1999), sendo recomendável o monitoramento regular do comportamento das populações frente aos acaricidas para evitar a disseminação de carrapatos resistentes, possibilitar a escolha do produto mais eficaz para essa fazenda ou estabelecer alternativas de controle de maior eficiência. Mas para isso, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas diagnósticas de resistência que permitam, inclusive, elucidar os mecanismos de resistência envolvidos.

1.2 Molécula Fipronil: características, atividade acaricida e resistência

O fipronil, inseticida fenilpirazólico, é uma molécula com alta seletividade para os insetos em relação aos mamíferos (Narahashi et al., 2007). Foi usado inicialmente para o controle de pragas agrícolas e de importância na saúde pública (Colliot et al., 1992) e posteriormente na área veterinária para o controle de parasitas externos (Hainzl e Casida, 1996). Seu uso no controle do *R. (B.) microplus*, começou a meados dos anos 90.

A aplicação de fipronil é eficaz para o controle de grande variedade de insetos foliares em culturas de arroz e cana de açúcar (Balança e De Visscher, 1997), verduras e frutas (Colliot et al., 1992; Zhao et al., 1995; Stevens et al., 1998). No entanto, já foram reportados casos de resistência tanto na área agrícola quanto na saúde pública (Holbrook et al., 2003; Bass et al., 2004; MingZhang et al., 2004) e ocorrência de resistência cruzada com ciclodienos (Scott e Zhi Mou, 1997; Brooke et al., 2000).

A molécula se degrada lentamente na vegetação e de forma relativamente lenta no solo e na água (Tingle et al., 2003). O destino e a biodisponibilidade do fipronil no solo depende da variabilidade dos processos de sorção, diferindo de um solo para outro (Spomer e Kamble,

³ CUORE, U. Montevideú, 2009.

2010). Sob condições aeróbicas, a vida média do fipronil em solo arenoso é de 122-128 dias e quando aplicado no solo por incorporação varia entre 3- a 7,3 meses. Tem baixa mobilidade. Os resíduos no solo permanecem nos primeiros 10 cm de profundidade. No entanto, pode se adsorver a partículas do solo o que lhe conferem potencial de contaminação de água; pode-se ligar a material particulado em suspensão, depositar-se no sedimento ou ser absorvido por organismos que o degrada ou acumula. Em algumas espécies de animais aquáticas, o fipronil pode se bioacumular (Gunasekara et al., 2007).

A degradação do fipronil ocorre tanto em condições oxidativas quanto de redução, produzindo diferentes metabólitos. No solo, fipronil sulfona é produto de sua oxidação e fipronil sulfide de redução (Bobe et al., 1997), ambos com ação inseticida. Também, metabólitos do fipronil podem ser resultado de sua hidrólise (ex. amida, produto de hidrólise em água ou solo) ou de sua fotodegradação (*desulfinyl*). Os metabólitos do fipronil são considerados mais tóxicos e mais persistentes que o fipronil. Com o intuito de diminuir a extensão de terra contaminada, outras formas de aplicação do inseticida nas culturas estão sendo estudadas. Raveton et al. (2007) estudaram a taxa de acúmulo dos metabólitos no solo e em sementes de girassol tratadas com fipronil, a través da análise do solo em 3 zonas delimitadas ao redor do ponto de plantio da semente (1,8; 5 e 11 cm). Observaram que a taxa de acúmulo diminuía sensivelmente a partir dos 5 cm e que os principais metabólitos acumulados no solo foram fipronil sulfona e fipronil-sulfide. Neste estudo a contaminação detectável no solo foi limitada a 11 cm ao redor da semente tratada. Depois de 6 meses de ter sido cultivada, cerca de 50% de fipronil foi encontrado no solo.

O mecanismo de ação do fipronil é atribuído ao bloqueio dos canais de íons cloreto controlados pelo ácido gama aminobutírico (GABA) (GABA-Cl) presentes nos neurônios do sistema nervoso central de insetos (Cole et al., 1993; Durham et al., 2001; Bloomquist, 2003). O sistema receptor do GABA é responsável pela inibição da atividade neural normal. Quando as funções regulares do sistema são bloqueadas, o resultado é a excitação neuronal e a morte do inseto. O glutamato é um transmissor do impulso nervoso na sinapse que, nos insetos, tem uma função excitatória ou inibitória, existindo dois tipos de canais de cloro ligados ao glutamato com características electrofisiológicas e farmacológicas diferentes. O fipronil também é bloqueador dos canais de íons cloreto ativados pelo glutamato (Narahashi et al., 2007) e esta característica pode ser em parte, responsável pela maior toxicidade seletiva para os insetos, já que os mamíferos não tem esse tipo de canal.

Algumas classes de inseticidas com estruturas químicas diversas podem apresentar o mesmo sítio alvo, resultando em resistência cruzada a diferentes classes caso haja alteração desse sítio (Casida, 2009). O modo de ação da IVM é atribuído à ligação de alta afinidade do fármaco aos canais de cloro controlados pelo glutamato e GABA presentes nas células musculares e nervosas dos invertebrados (Cully et al., 1994; Mckellar e Benchaoui, 1996; Geary et al., 1993). Outra possibilidade é a resistência cruzada com ciclodienos (dieltrin), que atuam no GABA bloqueando também o ingresso dos íons cloreto. Resistência cruzada entre ciclodienos e inseticidas fenlpirazoles (fipronil e outros) tem sido bem demonstrada em outros estudos (Colliot et al., 1992; Cole et al., 1993, 1995; Bloomquist, 1994; Scott e ZhiMou, 1997; Brooke et al., 2000). O conhecimento e compreensão dos mecanismos de resistência envolvidos são necessários para monitorar a resistência cruzada a novos compostos ainda em desenvolvimento que tem como alvo o GABA (Hope et al., 2010), podendo prover informações valiosas para o seu manejo.

O desenvolvimento da resistência foi descrito por Sutherst e Commins (1979). No início do processo, ocorre uma mutação em algum alelo na população que independe da pressão de seleção de resistência (**estabelecimento**). Esta última só começa com a utilização dos tratamentos que mata os indivíduos susceptíveis, tornando mais freqüente o alelo que determina resistência nessa população (**desenvolvimento**). Finalmente, a freqüência do alelo de resistência é suficiente para reduzir notavelmente a eficácia do tratamento (**emergência**).

Há três tipos de mutação que podem resultar em resistência de um inseto a um praguicida (Scott, 1995): amplificação gênica, regulação gênica alterada e alteração estrutural de um gene. Na “amplificação gênica”, ao invés de existir uma cópia do gene, várias cópias deste gene estão presentes no DNA do inseto. Como conseqüência, a quantidade de produto produzido por esse gene vai ser maior. No caso de um gene codificador de uma enzima detoxificante o inseto poderá metabolizar muito mais inseticida que outro não mutante. No segundo tipo de mutação, o sistema de regulação do gene é alterado de maneira que o gene, depois da mutação passa a produzir em maior ou menor quantidade o produto de sua codificação. No terceiro tipo de mutação, a alteração estrutural do gene leva a uma mudança em seu produto. Por exemplo, a troca de um nucleotídeo na região codificadora do gene pode gerar uma mudança na codificação de um aminoácido, e conseqüentemente, uma alteração na seqüência da proteína, resultando ou não em resistência. Essa mutação pode levar a uma alteração estrutural no sítio de ação do inseticida, reduzindo ou bloqueando a capacidade do inseticida em se ligar ao sítio de ação, ou aumentar ou diminuir a habilidade do produto do

gene em metabolizar o inseticida. Uma mudança estrutural não altera a quantidade de produto, mas sim a qualidade do produto codificado pelo gene. Essas mutações estão associadas a três tipos de mecanismo de resistência: metabólica (Citocromo P450 monoxigenases, esterases e S-transferase), insensibilidade do sítio de ação (acetilcolinesterase, GABA, canal de sódio) e outros (redução de penetração do praguicida e mudança de comportamento) (Scott, 1995). Estes mecanismos, seja individualmente ou em combinação, conferem resistência a todas as classes de inseticidas disponíveis, sendo que os dois primeiros tipos de mecanismos produzem altos níveis de resistência. Basicamente, três sistemas enzimáticos podem estar envolvidos no metabolismo de inseticidas: Citocromo P450 monoxigenases (P450s), esterases e glutathione S-transferases (GSTs) (Li et al., 2007). As proteínas destas famílias também participam na proteção contra o estresse oxidativo, na transmissão de sinais nervosos e no transporte celular (Hemingway et al., 2002). As P450s são enzimas capazes de oxidar compostos endógenos e exógenos por oxidação ou reações relacionadas tornando os compostos tóxicos mais solúveis e, portanto, mais fáceis de serem excretados. São responsáveis pela detoxificação de piretroides e organofosforados em artrópodes. As esterases são enzimas capazes de hidrolisar compostos contendo pontes tipo éster, estando envolvidas na detoxificação de organofosforados e piretróides sintéticos. Já, as enzimas GSTs são capazes de conjugar a glutathione reduzida aos centros eletrofilicos de compostos exógenos e endógenos, para formar um composto solúvel e mais fácil de ser excretado. São responsáveis pela detoxificação de organoclorados (DDT), OFs e PS (Li et al., 2007) e de IVM (Stumpf e Nauen, 2002). Uma mutação que produz alteração em alguma destas enzimas na função detoxificante do praguicida produzira resistência metabólica, e, ainda, resistência cruzada considerando a ampla versatilidade de substratos específicos (Li et al., 2007). Por exemplo, em uma população resistente o aumento da atividade enzimática detoxificadora para um determinado praguicida pode ser a origem de resistência cruzada com outro praguicida. Este tipo de mecanismo pode explicar a aparição rápida de resistência a grupos químicos diferentes. Na Austrália, Nolan et al. (1977) demonstraram que populações de carrapatos bovinos resistentes a DDT eram resistentes a PS experimentais (mesmo previamente à sua introdução comercial), devido a um incremento na atividade esterase, mecanismo que fora demonstrado posteriormente por Schnitzerling et al. (1983). Este fato pode explicar a aparição rápida da resistência a PS na Austrália (Jonsson et al., 2008).

O entendimento sobre os mecanismos de resistência pode prover informações valiosas para o seu manejo. A utilização de inibidores enzimáticos em bioensaios pode auxiliar na

determinação dos possíveis mecanismos metabólicos envolvidos na resistência a um produto. Os testes são realizados utilizando-se inibidores enzimáticos tais como o TPP (trifenilfosfato), o BPO (butóxido de piperonila) e o DEM (dietilmaleato), que atuam sobre as principais enzimas envolvidas com a resistência metabólica, respectivamente, esterases, P450s e GSTs. Estes inibidores têm sido estudados em insetos para a elucidação de mecanismos metabólicos de resistência a organofosforados, piretróides sintéticos, avermectinas e o fipronil (Scott et al., 1997; Liu e Yue, 2000; Kristensen et al., 2004; Wu et al., 2004), existindo poucos trabalhos com *R. (B.) microplus* e são referentes à resistência a piretróides, organofosforados e amitraz (Miller et al., 1999; Villarino et al., 2002, 2003; Li et al., 2003; Chevillon et al., 2007). A importância prática do estudo dos inibidores enzimáticos consiste em identificar algum sinergista da droga em estudo, constituindo uma alternativa útil no controle de populações resistentes. Miller et al. (1999) demonstraram o sinergismo para permetrina com TPP e BPO e Li et al. (2004) encontram sinergismo para o amitraz utilizando os mesmos inibidores. De modo geral, a identificação do sinergismo com BPO é a mais provável pois constitui o único sistema metabólico que pode mediar para todas as classes de inseticidas. Isto se deve ao fato de que as P450s têm diversidade genética, ampla especificidade de substrato e grande versatilidade catalítica (Li et al., 2007). Esta e a menor toxicidade para os animais são razões para que o BPO seja considerado nas formulações de drogas para o controle de populações resistentes.

Os principais alvos dos inseticidas convencionais são: 1. Receptor GABA contendo subunidades RDL codificadas pelo gene “*Resistance to dieldrin*” ou *Rdl* (inseticidas ciclodienos, fipronil); 2. Canais de sódio (PARA) codificados pelo gene *para* (DDT e OS); 3. Acetilcolinesterase de insetos (ACHE) codificada pelo gene *Ace* (OFs e carbamatos). Apesar da complexidade dos receptores ou enzimas, foram detectadas muito poucas e conservadas substituições de aminoácidos nos insetos resistentes (uma com RDL, dois com PARA e três ou mais com AChE) (French-Constant et al., 1998). Este fato talvez se deva a que suas funções sejam vitais ao organismo e, assim, poucas alterações podem diminuir a sensibilidade ao praguicida sem produzir nenhuma perda das funções normais. Isto se diferencia com o que acontece com os genes associados a resistência metabólica que mediam funções de respostas ao ambiente com poucas restrições intrínsecas e tendem a ser mais tolerantes às modificações genômicas alterando a sua função, expressão ou ambas (Li et al., 2007).

Segundo Scott (1995), o método ideal de diagnóstico tem que ser de fácil uso, baixo custo, que diagnostique todos os tipos de resistência e seja capaz de detectá-la em seu estágio

inicial de seu desenvolvimento, quando a frequência dos alelos que conferem o fenótipo de resistência for ainda inferior a 1%, ou seja, insuficiente para determinar uma diminuição na eficácia do produto. Existem várias metodologias para o diagnóstico de resistência que podem ser divididas em bioensaios *in vivo*, técnicas moleculares e bioensaios *in vitro*.

Os bioensaios *in vivo*, consistem na realização de infestações controladas de carrapato onde um grupo de animais é tratado com a droga suspeita e o outro não e é determinada a eficácia do produto através da medição de várias variáveis (número e peso dos carrapatos, postura e eclodibilidade). São provas demoradas, extremamente dispendiosas, usadas para a confirmação da resistência e consideradas como provas de referência. Em geral, estão limitadas a centros de referência de resistência a acaricidas.

Os métodos de detecção por técnicas moleculares se caracterizam por serem rápidos e por distinguir diferentes genótipos de resistência diferentemente dos tradicionais (bioensaios) que são mais demorados e diferenciam fenótipos (viva/morta). No entanto, têm a desvantagem de que a detecção da resistência está limitada ao gene conhecido, devendo-se realizar ensaios específicos para cada gene. Atualmente, os testes moleculares disponíveis para *R. (B.) microplus* não detectam os diferentes tipos de resistência já que se conhecem muito poucas mutações associadas à resistência. Deste modo, uma população de carrapatos com mecanismo de resistência conferido por uma mutação diferente daquela detectável por um marcador molecular já descrito pode apresentar indivíduos genotipados como susceptíveis, levando a um diagnóstico errôneo de susceptibilidade da população. Populações mexicanas de carrapatos resistentes a PS tem apresentado uma mutação no domínio IIS6 *para* do canal de sódio (He et al., 1999) que, não foi encontrada em populações de carrapatos resistentes na Austrália usando a mesma técnica. No entanto, entre estas últimas foi encontrada uma outra mutação no domínio IIS4-5 que também está associada a resistência a PS (Jonsson et al., 2008). Recentemente foi descrita uma mutação na região RDL que confere resistência a dieldrin (Hope et al., 2010). Segundo Jonsson et al. (2008), as técnicas moleculares não deveriam ser consideradas como um substituto dos bioensaios tradicionais.

Os bioensaios *in vitro* são relativamente simples, de baixo custo e requerem pouco equipamento (Scott, 1995). Baseiam-se na utilização dos estádios de vida livre do carrapato como fêmeas ingurgitadas prontas para a oviposição ou larvas. O modo de aplicação do produto nos carrapatos adultos pode ser via Aplicação Tópica em Adultos (ATA), Injeção em adultos (IA) ou Imersão de Adultos (TIA). No caso de ATA, a penetração do pesticida no carrapato é difícil, por isso a acetona é utilizada em pequenos volumes para auxiliar na

absorção. A IA exige precisão por parte do operador, já que o acaricida tem que ser injetado sempre da mesma maneira e no mesmo local do carrapato e, embora esta técnica não envolva problemas na absorção, uma vez que o carrapaticida fica em contato com o tecido interno do carrapato, o equipamento necessário é caro. O TIA utiliza fêmeas ingurgitadas que são imersas em acaricidas técnicos ou comerciais. Este teste foi adotado por muitos autores (Whitnall e Bradford, 1947; Hitchcock, 1953), contudo, o protocolo descrito por Drummond et al. (1973) é o mais comumente utilizado.

O TIA se baseia na comparação da taxa de oviposição entre as fêmeas de dois grupos: tratado e controle. Os ovos podem ser analisados por peso e viabilidade. Também pode ser avaliada a mortalidade, considerando fêmeas que ovipõem ou não, o que diminui o tempo de obtenção dos resultados (1-2 semanas), em comparação ao tempo de determinação da eclodibilidade (5-6 semanas). Por sua praticidade, o protocolo mais utilizado é o de Drummond et al. (1973) que utiliza a concentração discriminatória (CD) para diferenciar carrapatos resistentes dos susceptíveis. O fator limitante para o uso do TIA é o número de fêmeas ingurgitadas utilizadas, que nem sempre é suficiente para se obter resultados confiáveis (Sabatini et al., 2001; Jonsson et al., 2007). O Teste de Imersão com Larvas (TIL) é uma alternativa, pois o número de indivíduos que podem ser obtidos em laboratório é muito maior favorecendo a repetição do ensaio, inclusive com emprego de uma grande amplitude de concentrações de diferentes acaricidas. Foi desenvolvido por Shaw (1966) e consiste na imersão das larvas em soluções ou suspensões do acaricida técnico ou comercial. A resposta é avaliada em porcentagem de larvas que morrem frente ao tratamento e o resultado é obtido em 5-6 semanas após a coleta dos adultos. No Teste de Pacotes com Larvas (TPL) desenvolvido por Stone e Haydock (1962), as larvas são incubadas em pacotes de papel filtro (Whatman N°1) impregnados com o soluções de acaricida técnico, comparando-se a taxa de mortalidade 24 horas após incubação. Este teste é recomendado pela FAO (2004) para diagnóstico de resistência. Entretanto dados preliminares sobre resistência a lactonas macrocíclicas sugerem o TIL por ser muito mais sensível que o TPL (FAO, 2004).

Os programas de monitoramento de resistência devem testar populações frente a todas as classes de drogas disponíveis, permitindo a detecção precoce de populações resistentes e a rápida divulgação da informação obtida. Com relação a detecção de resistência a drogas de uso recente, há poucos protocolos disponíveis. Para ivermectina, há apenas um protocolo utilizando TIL foi sugerido até o momento (Klafke et al., 2006) mostrando ser eficiente no diagnóstico de populações de campo (Pérez-Cogollo et al., 2010).

No entanto, ainda não há protocolos para bioensaios *in vitro* que possibilitem a detecção de resistência ao fipronil para *R. (B.) microplus*. Com a normatização dos testes se logrará um máximo de precisão e segurança com relação aos resultados obtidos, fato que permitirá a comparação entre os dados determinados por pesquisadores em várias regiões do mundo e elaborar sugestões para o controle deste ectoparasito de grande importância na medicina veterinária.

6 CONCLUSÕES

- Os bioensaios padronizados para fipronil (TIA, TPL e TIL) no presente trabalho constituem uma ferramenta válida no diagnóstico e no monitoramento de resistência a esta droga em *R. (B.) microplus*.
- O TIL mostrou-se mais sensível do que o TPL no diagnóstico de resistência para fipronil.
- A participação de esterases, citocromo-oxidases e glutathione-S-transferases, determinada pelos bioensaios com inibidores enzimáticos, não parece ser o principal mecanismo de resistência ao fipronil tanto na população resistente de referência (RFSan) quanto nas populações de campo resistentes a fipronil estudadas, pelo qual, a resistência determinada por insensibilidade no sítio de ação deve ser considerada.
-
- Não há resistência cruzada entre fipronil e IVM demonstrável fenotipicamente.
- Há resistência cruzada entre fipronil e lindano demonstrável fenotipicamente.
- A resistência a fipronil foi diagnosticada pela primeira vez no mundo, em populações de *R. (B.) microplus* do Brasil e do Uruguai, por bioensaios *in vitro*.
- O controle de pragas agrícolas com produtos à base de fipronil pode interferir no controle de *R. (B.) microplus* com esta droga.
- A utilização de fipronil e ivermectina é uma prática comum entre produtores do Estado de São Paulo, embora não recomendada para o tratamento de bovinos de produção de leite.

REFERÊNCIAS*

Arantes GJ, Marques AO, Honer MRO. O carrapato bovino, *Boophilus microplus*, no município de Uberlândia, MG: análise da sua resistência contra carrapaticidas comerciais. Rev Bras Parasitol Vet. 1995;4(2):89-93.

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. [homepage]. São Paulo; ABIEC. 2009. Disponível em: http://www.abiec.com.br/download/fluxo_por.pdf [2010 Set 7].

Balança G, De Visscher M. Impacts on non-target insects of a new insecticide compound used against the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forsk. 1775). Arch Environ Contam Toxicol. 1997;32:58-62.

Bass C, Schroeder I, Turberg A, Field LM, Williamson, MS. Identification of the Rdl mutation in laboratory and field strains of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). Pest Managem Sci. 2004;60(12):1157-1162.

Bloomquist JR. Cyclo-diene resistance at the insect GABA receptor/chloride channel complex confers broad cross resistance to convulsants and experimental phenylpyrazole insecticides. Arch Insect Biochem Physiol. 1994;26:69-79.

Bloomquist JR. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. Arch Insect Biochem Physiol. 2003;54(4):145-156.

Bobe A, Coste CM, Cooper J. Factors influencing the adsorption of fipronil on soil. J Agric Food Chem. 1997;45:4861-4865.

Brooke BD, Hunt RH, Coetzee M. Resistance to dieldrin+fipronil assort with chromosome inversion 2La in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Med Vet Entomol. 2000;14:190-194.

Bull MS, Swindale S, Overend, D, Hess, EA. Suppression of *Boophilus microplus* populations with fluazuron - an acarine growth regulator. Aust Vet J. 1996;74:468-470.
Campbell WC. Ivermectin: an update. Parasitol Today. 1985;1 (1):10-15.

Cardozo H, Franchi M. Garrapata: epidemiología y control de *Boophilus microplus*. In: Nari A, Fiel C, editors. Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en bovinos. Bases

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

epidemiológicas para su prevención y control en Argentina y Uruguay. Montevideo, Uruguay: Hemisferio Sur; 1994. p. 369-407

Casida JE. Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. Chem Research Toxicol. 2009;22:609-619.

Castro-Janer E, Rifran L, Piaggio J, Gil A, Miller RJ, Schumaker TTS. *In vitro* tests to establish LC₅₀ and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. Vet Parasitol. 2009;162:120-128.

Castro-Janer E, Rifran L, González P, Piaggio J, Gil A, Schumaker TTS. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by *in vitro* bioassays. Vet Parasitol. 2010a;169:172-177.

Castro-Janer E, Martins JR, Mendes MC, Namindome A, Klafke GM, Schumaker TTS. Diagnose of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using *in vitro* larval bioassays. Vet Parasitol. (2010b). In press. doi:10.1016/j.vetpar.2010.06.036

Chevillon C, Ducornez S, De Meeûs T, Koffi BB, Gaïa H, Delathière J.M, Barré, N. Accumulation of acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) populations from New Caledonia Island. Vet Parasitol. 2007;147:272-288.

Cole LM, Nicholson RA, Casida JE. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. Pestic. Biochem. Physiol. 1993;46:47-54.

Cole LM, Roush RT, Casida JE. Drosophila GABA-gated chloride channel: modified [3H]EBOB binding site associated with ALA->SER of GLY mutants of Rdl subunit. Life Sci. 1995;56:757-765.

Colliot F, Kukorowski KA, Hawkins DW, Roberts DA. A new soil and foliar broad spectrum insecticide. Brighton Crop Protection Conference Pests and Diseases. 1992;1:29-34.

Cully DF, Vassilatis DK, Liu KK, Pares PS, Van Der Ploeg, LHT, Schaeffer JM, Arena JP.. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channels from *Caenorhabditis elegans*. Nature. 1994;371:707-711.

Cuore U, Trelles A, Sanchís J, Gayo V, Solari MA. Primer diagnóstico de resistencia al Fipronil en la garrapata común del ganado *Boophilus microplus*. Veterinaria (Montevideo). 2007;42:35-41.

Cuore U, Cardozo H, Trelles A, Nari A, Solari MA. Características de los garrapaticidas utilizados en Uruguay. Eficacia y poder residual. Veterinaria (Montevideo). 2008;43(169): 13-24.

Drummond RO, Ernst SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory test of insecticides. J Econ Entomol. 1973;66:130-133.

Du W, Awolola TS, Howell P, Koekemoer LL, Brooke BD, Benedict MQ, Coetzee M, Zheng L. Independent mutations in the Rdl locus confer dieldrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. Insect Mol Biol. 2005;14(2):179–183.

Durham EW, Scharf ME, Siegfried BD. Toxicity and neurophysiological effects of fipronil and its oxidative sulfone metabolite on European corn borer larvae (Lepidoptera: Crambidae). Pestic Biochem Physiol. 2001;71:97-106.

Farias NA. Situación de la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* en la región sur de Rio Grande del Sur, Brazil. In: 4 Seminario Internacional de Parasitología; 1999; Puerto Vallarta. Mexico: Conasag;1999. p. 25-31.

French-Constant RH, Roush RT. Resistance detection and documentation. In: Roush RT, Tabashnik BE, editors. Pesticide resistance in arthropods. London: Chapman and Hall; 1990. p. 4

French-Constant RH, Pittendrigh B, Vaughan A, Anthony N. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? Phil Trans R Soc Lond B. 1998;353:1685-1693.

French-Constant RH, Daborn PJ, Le Goff G. The genetics and genomics of insecticide resistance. Trends Genet. 2004;20:163-170.

Food and Agricultural Organization. Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants: Guidelines. [homepage]. Local: FAO. 2004. Available from: <http://www.fao.org/ag/aga.html> [2006 Mar 10].

Furlong J. Diagnostico de la susceptibilidad de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* a los acaricidas en el estado de Minas Gerais, Brasil. In: 4 Seminario Internacional de Parasitología; 1999; Puerto Vallarta, Mexico: Conasag; 1999. p. 41-46.

Geary TG, Sims SM, Thomas EM, Vanover L, Davis JP, Winterrowd CA, Klein RD, Ho NF, Thompson DP. *Haemonchus contortus*: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. Exp Parasitol. 1993;77:88-96.

Georghiou GP. The effect of Agrochemicals on Vector populations. In: Roush RT, Tabashnik BE, editors. Pesticide resistance in arthropods. London: Chapman and Hall; 1990. p. 183.

Gil A, Piaggio J. Diagnóstico de situación de la infraestructura de baños acaricidas para bovinos en Uruguay. In: Seminario Regional “Aplicación del control integrado de parásitos (CIP) a la garrapata *Boophilus microplus* en Uruguay”: documento proyecto TCP FAO URU 3003 A; 2007; Montevideo: Departamento de Parasitología. DILAVE Miguel C. Rubino, MGAP; 2007. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/dgsg/DILAVE/Parasitolog%C3%ADa/Documento%20Uruguay%20TCP%20%20URU%203003.pdf>. [2010 Feb 1].

Grisi L, Massard CL, Moya Borja GE et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. A Hora Vet. 2002;21(125):8-10.

Gunasekara AM, Truong T, Goh KS, Spurlock F, Tjeerdema RS Environmental fate and toxicology of fipronil. J Pestic Sci. 2007;32(3):189-199.

Hainzl D, Casida JE. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. Proc Natl Acad Sci. 1996;93:12764-12767.

He H, Chen AC, Davey RB, Ivie GW, George JE. Identification of a point mutation in the para-sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. Biochem Biophys Res Commun. 199;261:558-561.

Hemingway J, Fiel L, Vontas J. An overview of insecticide resistance. Science. 2002;298:96-97.

Hitchcock LF. Resistance of cattle tick (*Boophilus microplus*, Canestrini) to benzene hexachloride. Aust. J. Agr. Res. 1953; 4:360-364.

Holbrook GL, Roebuck J, Moore CB, Waldvogel MG, Schal C. Origin and extent of resistance to fipronil in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.)(Dictyoptera:Blattellidae). *Econ Entomol.* 2003;96(5):1548-1558.

Hope M, Menzies M, Kemp D. Identification of a Dieldrin Resistance-Associated Mutation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) *J Econ Entomol.* 2010;103(4): 1355-1359

Instituto Nacional de Carnes. Informe estadístico año agrícola [homepage]. Montevideo: INAC. Disponible em:
<http://www.inac.gub.uy/innovaportal/file/4458/1/Ejercicio%20Agr%EDcola%202009%20FINAL.pdf> [2010 Set 7].

Janssen D, Derst C, Buckinx R, Van den Eynden J, Rigo JM, Van Kerkhove E. Dorsal Unpaired Median Neurons of *Locusta migratoria* Express Ivermectin- and Fipronil-Sensitive Glutamate-Gated Chloride Channels. *J Neurophysiol.* 2007;97:2642-2650.

Jonsson NN. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet Parasitol.* 2006;137:1-10.

Jonsson NN, Miller RJ, Robertson JL. Critical evaluation of the modified-adult immersion test with discriminating dose bioassay for *Boophilus microplus* using American and Australian isolates. *Vet. Parasitol.* 2007;146:307-315.

Jonsson NN, Corlec SW, Morgan J, Jackson LM, Moolhuijzen P, Lew AE. Nuevos diagnósticos moleculares para detectar Resistencia a piretroides sintéticos y amitraz en *Rhipicephalus microplus* en Australia. In: 6 Seminario Internacional de Parasitología Animal; 2008; Mexico: Boca del Río Veracruz: INIFAP; 2008. 1 CD-ROM

Kasap H, Kasap M, Alptekin D, Lüleyap Ü, Herath PRJ. Insecticide resistance in *Anopheles sacharovi* Favre in southern Turkey. *Bull World Health Org.* 2000;78(5):687-692.

Kemp HD, McKenna VR, Thullner R. et al. Strategies for tick control in a world of acaricide resistance. In: 4 Seminario Internacional de Parasitología; 1999; Puerto Vallarta, Mexico: Conasag;1999. p. 1-10.

Klafke GM, Sabatini GA, Albuquerque TA, Martins JR, Kemp DH, Miller RJ, Schumaker TTS. Larval Immersion Tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus*

(*Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. Vet Parasitol. 2006;142:386-390.

Kristensen M, Jespersen JB, Knorr M. Cross-resistance potential of fipronil in *Musca domestica*. Pest Manag Sci. 2004;60(9):894-900.

Kunz SE, Kemp DH. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. Rev Sci Tech Off Int Epizzot. 1994;13(4):1249-1286.

Le Corronec H, Alix P, Hue B. Differential sensitivity of two insect GABA-gated chloride channels to dieldrin, fipronil and picrotoxinin. J Insect Physiol. 2002;48:419-431

LeOra Software. Polo plus probit and logit analysis: user's guide [CD-ROM]. Berkeley: LeOra Software; 2004. 1 CD-ROM.

Li A, Davey RB, Miller R, George JE Resistance to coumaphos and diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism. J Med Entomol. 2003;40:482-490.

Li AY, Davey RB, Miller RJ, George JE. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae). J Med Entomol. 2004;41:193-200.

Li A, Yang Y, Wu S, Wu Y. Investigation of resistance mechanisms to fipronil in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 2006;99:914-919.

Li X, Schuler MA, Berenbaum MR. Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. Annu Rev Entomol. 2007;52:231-53.

Liu N, Yue X. Insecticide resistance and cross-resistance in the house-fly (Diptera: muscidae). J Econ Entomol. 2000;93:1269-1275.

Martins JR, Furlong J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. Vet Rec. 2001;149(2):64.

Martins JR. Carrapato *Boophilus microplus* (Can. 1887) (ACARI: IXODIDAE) resistente a ivermectina, moxidectina e doramectina Rio Grande do Sul, Brasil. [tese (Doutorado em Ciência Animal)]. Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais; 2008. 74 p.

Mckellar QA, Benchaoui HA. Avermectins and milbemycins. J Vet Pharmacol Ther. 1996;19:331-351.

Mendes MC, Oliveira RO, Vieira Bressan MCR. Determination of minimal immersion times for use in *in vitro* resistance test with *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) engorged females and pyrethroid acaricides. Rev Brasileira Parasitol Vet. 2000;9: 33-39.

Miller RJ, Davey RB, George JE. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. 1999;36:533-538.

Miller RJ, George JE, Guerrero F, Carptenter L, Welch JB. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. J Med Entomol. 2001;38:298-301.

Miller RJ, Almazán-García C, Estrada-Ortiz M, Davey RB, George JE. A survey for fipronil and ivermectin resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected in northern Mexico and the options for the management of acaricide-resistant ticks with pesticides. In: 6 Seminario Internacional de Parasitología Animal; 2008; Mexico: Boca del Río Veracruz: INIFAP; 2008. 1 CD-ROM

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos fitosanitários.[homepage]. Brasília; 2007. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons [2007 Set 7].

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Jornada-Taller: Programa de Lucha contra la Garrapata. Durazno (Uruguay): MGAP; 2005. 55 p.

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Agrotóxicos [homepage]. Montevideo; Disponível em: <http://www.mgap.gub.uy/dgsa/> [2010 Set 16].

MingZhang C, JinLiang S, JinZhen Z, Mei L, XiaioYu L, WeiJun Z Monitoring of insecticide resistance and inheritance análisis of triazophos resistance in the striped stem borer (Lepidoptera:Pyralidae). Chinese J Rice Sci. 2004;18(1):73-79.

Nari A, Hansen HJ. Resistance of ecto-endoparasites: current and future solutions. In: 67th General Session. International Committee. OIE; 1999; Paris. OIE; 1999. p. 12.

Narahashi T, Zhao X, Ikeda K, Yeh JZ. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Hum Exp Toxicol*. 2007;26(4):361-366.

Nolan J, Roulston WJ, Wharton RH. Resistance to synthetic pyrethroids in a DDT-resistant strain of *Boophilus microplus*. *Pestic Sci*. 1977;8:484-486.

Oliveira RO, Mendes MC, Jensen JR, Vieira Bressan MCR. Determination of the minimum immersion time of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) engorged females for in vitro resistance tests with amitraz at 50% effective concentration (EC50). *Rev Brasileira Parasitol Vet*. 2000; 9:41-43.

Perez-Cogollo LC, Rodriguez-Vivas RI, Ramirez-Cruz GT, Miller RJ First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Vet Parasitol*. 2010;168:165-169.

Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina- RAPAL. [homepage] Montevideo. Disponível em: www.rapaluruaguay.org [2010 Set 7].

Robertson LJ, Russell RM, Presler HK, Savin NE. *Bioassays with arthropods*, CRC Press, editors. Boca Raton; 2007. 199 p.

Raveton M, Aajoud A, Willison J, Cherifi M, Tissut M, Ravanel P Soil distribution of fipronil and its metabolites originating from a seed-coated formulation. *Chemosphere*. 2007;69:1124-1129.

Rifran L, Silveira R, Castro-Janer E. Comportamento reprodutivo de uma população de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* criada sob condições de confinamento sobre hospedeiro. In: 36 Congresso Brasileiro de Veterinária; 2009; Porto Seguro, Bahia: Sociedade de Medicina Veterinária da Bahia; 2009. 1 CD-ROM

Roush RT, Daly JC. The role of population genetics in resistance research and management. In: Roush RT, Tabashnik BE, editors. *Pesticide resistance in arthropods*. London: Chapman and Hall; 1990. p. 297

Sabatini GA, Kemp DH, Hughes S, Nari A, Hansen J. Test to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol*. 2001;95:53-62.

Sayved AH, Wright DL. Fipronil resistance in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae): inheritance and number of genes involved. J Econ Entomol. 2004;97(6):2043-2050.

Scott JA. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. Florida Entomologist. 1995;78:399-414.

Scott JG, ZhiMou W. Toxicity of fipronil to susceptible and resistant strains of German cockroaches (Dictyoptera: Blatellidae) and house flies (Diptera: Muscidae). J Econ Entomol. 1997;90:1152-1156

Schnitzerling HJ, Nolan J, Hughes S. Toxicology and metabolism of some synthetic pyrethroids in larvae of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can). Pestic Sci. 1983;14:64-72.

Servicio Geografico Militar. Mapa [homepage]. Disponível em: <http://www.ejercito.mil.uy/cal/sgm/principal1024.html> [2010 Set 16]

Shaw RD. Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Canestrini) and assesment of its resistance spectrum. Bull Entomol Res. 1966;56(4):398-405.

Shidrawi GR. A WHO global programme for monitoring vector resistance to pesticides. Bull World Health Org. 1990;68:403-408

Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Mercado veterinário por classe terapêutica e espécie animal [homepage]. São Paulo: SINDAN; 2007. Disponível em: <http://www.sindan.org.br> [2007 Ago 5].

Spomer NA, Kamble ST. Sorption and Desorption of Fipronil in Midwestern Soils. Bull. Environ Contam Toxicol. 2010;84:264-268.

StataCorp. Stata Statistical Software: Release 10. [CD-ROM]. College Station, TX: StataCorp LP; 2007. 1 CD-ROM.

Stevens MM, Helliwell SS, Warren GN. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. Field Crops Res. 1998;57:195-207.

Stone BF, Haydock RP. A method for the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) Bull. Entomol. Res. 1962;53:563-578.

Stumpf N, Nauen R. Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Pestic Biochem Physiol. 2002;72:111-121.

Sutherst RW, Comins HN. The management of acaricide resistance in the cattle tick (*Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae), in Australia. Bull Entomol Res. 1979;69:519-540

Thullner F. Impact of pesticide resistance and network for global pesticide resistance management based on a regional structure. WAR- RMZ. 1997;89:41-47.

Tingle CC, Rother JA, Dewhurst CF, Lauer S, King WJ. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. Rev Environ Contam Toxicol. 2003;176:1-66.

Veira MIB, Tuerlinckx SM, Santos AB. Avaliação da sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a carrapaticidas em rebanhos de corte e leite do município de Bagé, RS, Brasil. Rev Cienc Rur. 1998;3(2):68-72.

Villarino MA, Waghela SD, Wagner GG. Histochemical localization of esterases in the integument of the female *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) tick. J Med Entomol. 2001;38(6):780-782.

Villarino MA, Wagner GG, George JE. In vitro detection of acaricide resistance in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Exp Applied Acarology. 2002;28:265-271.

Villarino MA, Waghela SD, Wagner GG. Biochemical detection of esterases in the adult female integument of organophosphate-resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. 2003;40:52-57.

White WH, Plummer PR, Kemper CJ, Miller RJ, Davey RB, Kemp DH, Hughes S, Smith II CK, Gutiérrez JA. An *in vitro* Larval Immersion Microassay for Identifying and Characterizing Candidate Acaricides. J Med Entomol. 2004;41:1034-1042.

Whitnall AB, Bradford B. An arsenic resistant tick and its control with gammexane dips. Bull. Entomol Res. 1947;38:353-372.

Wikimedia. Mapa Estado de São Paulo [homepage]. Disponível em: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/86/SaoPaulo_MesoMicroMunicip.svg [2010 Set 16].

Wu G, Jiang S, Miyata T. Effects of synergists on toxicity of six insecticides in parasitoid *Diaretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae). *J Econ Entomol.* 2004;97:2057-2066.

Zhao JZ, Wu SC, Zhu GR. Bioassays with recommended field concentrations of several insecticides for resistance monitoring in *Plutella Xylostella*. *Res Pest Manag.* 1995;7(1):13-14.

Zhu G, Wu H, Guo J, Kimaro FME. Microbial degradation of fipronil in clay loam soils. *Water Air Soil Pollute.* 2004;153:35-44.