

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Norma Machado da Silva

Investigação da resistência a inseticidas na mosca-da-bicheira *Cochliomyia hominivorax* (Diptera; Calliphoridae)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) NORMA MACHADO DA SILVA e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.


Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Si38i	<p>Silva, Norma Machado da Investigação da resistência a inseticidas na mosca-da-bicheira <i>Cochliomyia hominivorax</i> (Díptera: Calliphoridae) / Norma Machado da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Cochliomyia hominivorax</i>. 2. Resistência a inseticidas. 3. Carboxilesterase. 4. Canais de sódio. 5. Acetilcolinesterase. I. Azeredo-Espin, Ana Maria Lima de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Investigation of insecticide resistance in the New World Screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Díptera: Calliphoridae).

Palavras-chave em inglês: *Cochliomyia hominivorax*; Insecticide resistance; Carboxylesterase; Sodium channels; Acetylcholinesterase.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Louis Bernard Klaczko, Márcia Cristina Mendes, Teresinha Tizu Sato Schumaker.

Data da defesa: 01/10/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 01 de outubro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Maria L. de Azeredo Espin (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira


Assinatura

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko


Assinatura

Profa. Dra. Márcia Cristina Mendes


Assinatura

Profa. Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker


Assinatura

Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Assinatura

Dr. Gustavo Adolfo Sabatini

Assinatura

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

Assinatura

Carrego seu coração comigo
Eu o carrego no meu coração
Nunca estou sem ele
Onde quer que vá, você vai comigo
E o que quer que eu faça
Eu faço por você
Eis o grande segredo que ninguém sabe
Aqui está a raiz da raiz
O broto do broto
E o céu do céu
De uma árvore chamada vida
Que cresce mais que a alma pode esperar
Ou a mente pode esconder
E esse é o prodígio
Que mantém as estrelas à distância
Eu carrego seu coração comigo
Eu o carrego no meu coração.

(Poema de E.E. Cummings)

**À memória dos meus pais Nemo (o “meu capitão Nemo”) e Maria de Lourdes
pelo apoio, pela confiança que sempre tiveram
em mim e dedicação para me proporcionar uma boa formação.**

Agradecimentos

Agradeço à professora Ana Maria que mesmo sem me conhecer muito bem apostou em mim e me deu a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e de trabalhar numa nova área que estava iniciando no laboratório. Obrigada pela orientação, estímulo, carinho e confiança. Por me apresentar o mundo da mosca da bicheira, por me acompanhar nesta trajetória e principalmente por ter apostado em mim. Obrigada por todo o carinho e apoio que recebi, serei sempre muito grata.

Aos amigos do Laboratório de Genética Animal os meus mais sinceros agradecimentos.

À Rosângela (ou Rosa, Rose ou simplesmente Ro), Lê e Saete muito obrigada pela ajuda em muitos momentos. Obrigada não só pelo apoio técnico que muito contribuiu para a realização deste trabalho, mas principalmente pela parceria e amizade.

Aos grandes companheiros Marco Antonio (conhecido também como “tia velha” ou Palocci), Pablo, Renato e Mariana muito obrigada pelos momentos de terapia de bar. Muito obrigada pelas discussões sobre genética, evolução, biologia de *C. hominivorax*, resistência e outros assuntos aleatórios. Foi muito bom conviver com vocês.

Ao Renato agradeço por toda a ajuda que recebi desde o meu início no laboratório e principalmente pela grande ajuda e apoio que ele me deu nesta reta final.

À Mariana, minha amiga e irmã de coração, obrigada pela ajuda incondicional e imediata em todos os momentos. Serei sempre grata pelos passeios na Serra da Bocaina, pelo carinho que sempre recebi dela e de seus pais Cristiano e Sonia, que abriram as portas da sua casa e sempre me receberam com um grande sorriso.

À Karina, uma grande amiga, obrigada pelas discussões científicas, sugestões, parceria durante o Congresso de Entomologia na África do Sul e amizade dentro e fora do laboratório.

A Tatiana, Ana Carolina, Gisele e aos amigos que já saíram do laboratório e foram trilhar outros caminhos, Aline, Gustavo (o Johnny), Joan, Túlio, Lissiene, Mari Loira, Jaú, Sofia, Pedro, Claudia, Priscila e Bárbara obrigada pela parceria no dia a dia e por contribuírem para a existência de muitos momentos de alegria e descontração no laboratório.

À Aline obrigada pela ajuda na coleta das amostras de Estiva, em Minas Gerais.

Às gurias da secretaria do CBMEG, Tânia e Sandra, e à Lurdes, secretária da pós-graduação da Genética, obrigada pela ajuda indispensável em muitos momentos.

Aos professores desta Universidade com quem tive aulas agradeço pela contribuição na minha formação.

Aos amigos de Porto Alegre, que mesmo de longe, sempre me apoiaram, ouviram meus desabafos, torceram e torcem por mim.

Aos amigos da “casa do Edge” muito obrigada pela parceria, churrascos, cinemas, o período que morei com vocês foi muito bom e será sempre lembrado com muito carinho e saudades.

Aos amigos que fiz aqui em Campinas por tornar esse período que vivi aqui muito melhor do que eu poderia imaginar.

Ao meu irmão mais novo André, que apesar de nunca ter entendido porque eu decidi trabalhar logo com moscas, sempre me apoiou e acreditou em mim.

À toda minha família pelo apoio, especialmente meus pais, que sempre priorizaram a minha formação e sempre se dedicaram para que ela fosse a melhor possível. Eles sempre foram e serão meu maior exemplo de honestidade e responsabilidade. À minha mãe, minha companheira, minha cúmplice, fonte das minhas forças e da minha coragem, sem seu apoio eu não teria chegado até aqui. Vou sentir saudades.

Aos professores membros da pré-banca e banca final agradeço pela participação, críticas e sugestões.

À FAPESP pelo financiamento nos projetos do laboratório e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

Cochliomyia hominivorax é considerada uma importante praga por causar perdas econômicas para a pecuária na região Neotropical. Este ectoparasita tem sido controlado principalmente por inseticidas, entretanto, este método normalmente resulta na seleção de indivíduos resistentes. Nesta tese foram investigados mecanismos associados com resistência a inseticidas organofosforados e piretróides. Os resultados apresentados nesta tese estão divididos em dois artigos. No artigo 1 foram investigados dois mecanismos de resistência a piretróides, um conhecido como kdr (knockdown resistance), associado à mutações no canal de sódio, e a mutação W251S no gene da carboxilesterase E3, a qual têm sido associada à hidrólise de piretróides. Foram investigadas populações da atual distribuição geográfica de *C. hominivorax* através de PCR-RFLP. Para a mutação kdr (L1014F) nenhum indivíduo mutante foi encontrado. Entretanto, a mutação W251S foi encontrada em todas as populações, com as mais altas freqüências nas amostras da Venezuela (100%) e Colômbia (93.75%). Em algumas populações amostradas, apesar da freqüência do alelo mutante ter sido relativamente baixa, o número de indivíduos portadores de pelo menos um alelo mutante foi alto. No bioensaio com cipermetrina (piretróide tipo II), utilizando amostras de Estiva (MG), os resultados analisados através do teste exato de Fisher indicaram que para a mais baixa concentração ($p=0.0003$) e para uma concentração intermediária ($p= 0.024$), a presença da mutação W251S está correlacionada com as chances de sobrevivência. Entretanto, na mais alta concentração ($p= 0.221$) a presença desta mutação não foi correlacionada com a sobrevivência, o que possivelmente indica dificuldade em hidrolisar este tipo de piretróide em concentrações maiores. No Artigo 2, as mutações G137D no gene da carboxilesterase E3, e as mutações I298V, G401A e F466Y no gene da acetilcolinesterase, associadas com resistência a organofosforados, foram investigadas nas mesmas populações do artigo 1, através de PCR-RFLP e sequenciamento direto de PCR. A região codificante completa da acetilcolinesterase também foi caracterizada e proposto um modelo para a estrutura tridimensional desta proteína com base na estrutura da

acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster*. Possíveis alterações na proteína causadas pelas mutações associadas com resistência a organofosforados foram discutidas. No gene da acetilcolinesterase somente 2 de 135 indivíduos analisados apresentaram uma das mutações investigadas, a F466Y, o que pode estar associado ao alto custo no valor adaptativo do indivíduo, causado por algumas mutações neste gene ou inexistência dos demais alelos mutantes nestas populações. Entretanto, para a mutação G137D no gene da E3 foi encontrado um alto número de indivíduos portadores de pelo menos um alelo mutante na maioria das populações brasileiras e no Uruguai. Em Cuba, Venezuela e Colômbia nenhum indivíduo mutante para G137D foi encontrado, o que pode estar relacionado com os inseticidas usados no controle de *C. hominivorax* nestas regiões ou com a inexistência do alelo mutante nestas localidades. Os resultados de ambos os trabalhos indicam que mutações no gene da carboxilesterase E3 são um dos principais mecanismos de resistência selecionados nesta espécie, dentre os investigados até o momento. Este estudo representa um importante avanço no entendimento da base molecular da resistência a inseticidas em um importante ectoparasita.

PALAVRAS-CHAVE: *Cochliomyia hominivorax*; resistência a inseticidas; carboxilesterase; canal de sódio; acetilcolinesterase

ABSTRACT

Cochliomyia hominivorax is an important ectoparasite, causing considerable economic losses to livestock sector in Neotropical region. This ectoparasite has been controlled mainly by applying insecticides, however, this method usually results in the selection of resistant individuals. In this thesis, mechanisms associated with organophosphate and pyrethroid insecticide resistance were investigated. The results presented in this thesis are divided in two articles. In the Article 1 two mechanisms associated with pyrethroid resistance were investigated, the *kdr* (knockdown resistance), a generic term for mutations in the sodium channel, and a mutation in the residue 251 of the carboxylesterase E3 gene, which have been associated with pyrethroid hydrolysis. Populations of actual geographical distribution of *C. hominivorax* were investigated through PCR-RFLP. For the *kdr* mutation, no mutant individuals were found. However, the W251S mutation was found in all populations investigated, with the highest frequencies in the samples from Colombia (100%) and Venezuela (93.75%). In some populations, despite relatively low mutant allele frequency, the number of individuals having at least one mutant allele was high. A bioassay with cypermethrin (pyrethroid type II) was also performed, using samples from Estiva (MG). The results of the Fisher's exact test for the lowest concentration ($p=0.0003$, $\alpha= 0.05$) and for an intermediate concentration ($p= 0.024$, $\alpha= 0.05$) indicated that the presence of W251S mutation are correlated with the survival. However, at the highest concentration, Fisher's exact test ($p= 0.221$, $\alpha= 0.05$) indicated that the presence of this mutation was not correlated with survival. These results indicate that the W251S mutation in *C. hominivorax* probably presents difficulties in hydrolyzing of this kind of pyrethroid, in high concentrations. In the Article 2, the G137D mutation, in the carboxylesterase E3 gene, and the I298V, G401A and F466Y mutations in the acetylcholinesterase gene, associated with organophosphate resistance, were investigated. The same populations of article 1 were analyzed using PCR-RFLP and PCR direct sequencing. The complete coding region of acetylcholinesterase also was characterized and a putative model for the three-dimensional structure of this protein was proposed, based on solved structure of *Drosophila melanogaster*.

Possible alterations in the protein, caused by mutations associated with organophosphate resistance, were discussed. For the acetylcholinesterase gene, only 2 of 135 individuals analyzed presented one of the mutations investigated, the F466Y. This fact may be related with the fitness cost of some mutations in this gene, or the inexistence of mutant alleles in these populations. For the G137D mutation, a high number of individuals having at least one mutant allele were found in most of the Brazilian populations and in Uruguay. In Cuba, Venezuela and Colombia no G137D mutant was found, a finding that may be related to the insecticides used for *C. hominivorax* control in these regions. The results of these two works indicate that mutations in the carboxylesterase E3 gene are one of the main insecticide resistance mechanisms selected in this species, so far investigated. This study represents a significant advance in the understanding of the molecular basis of insecticide resistance in an important livestock ectoparasite.

Key Words: *Cochliomyia hominivorax*; insecticide resistance; carboxylesterase E3; sodium-channel; acetylcholinesterase

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	XIV
ABREVIACES E TERMOS EM INGLS	XVII

PARTE I – CONTEXTO DO TRABALHO

Introdução

1.1 Miíase e a família Calliphoridae	19
1.2 <i>Cochliomyia hominivorax</i> : a mosca-da-bicheira	20
1.3 Estratégias de controle	24
1.4 Classes de Inseticidas	26
1.4.1 Organofosforados	27
1.4.2 Carbamatos	27
1.4.3 Piretróides	28
1.5 Mecanismos de resistência a Inseticidas	28
1.5.1 Carboxilesterase E3	31
1.5.2 Canal de sódio	32
1.5.3 Acetilcolinesterase	34
1.6 Pecuária brasileira	35
2. Objetivos	36

PARTE II – ARTIGOS PRODUZIDOS

3. Artigo 1: “Investigation of mutations associated with pyrethroid resistance in populations of the New World screwworm fly, <i>Cochliomyia hominivorax</i> (Diptera: Calliphoridae)” ----	38
---	----

4. Artigo 2: “Geographical distribution of mutations associated with organophosphate resistance in <i>Cochliomyia hominivorax</i> (Diptera; Calliphoridae).”---	50
--	-----------

PARTE III – DISCUSSÃO, CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

5. Discussão	70
6. Conclusões Gerais	86
7. Perspectivas	87

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
---	-----------

ANEXOS

Anexo 2. Lista e quantidade dos compostos encontrados nos mata-bicheiras utilizados no Brasil, registrados no SINDAN (Compêndio de Produtos Veterinários. http://www.cpv.com.br/cpv/index.html)	101
Anexo 1. Informações adicionais sobre as coletas das amostras	102

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Introdução:

Figura 1. À esquerda, indivíduo adulto de *Cochliomyia hominivorax*. À direita, ferida já contendo larvas e nova postura de ovos na borda.

Figura 2. Representação do ciclo de vida de *Cochliomyia hominivorax*.

Figura 3. Estrutura da proteína canal de sódio mostrando os quatro domínios com as hélices transmembrana e os “loops”, e a localização das mutações kdr e super kdr. Figura retirada do trabalho de Martinez-Torres *et al.*, 1997.

Artigo 1:

Figure 1. Schematic view of allele-specific PCR strategy with the L1014F kdr mutation site designated as K. Primers are shown as arrows with their directions indicating the direction of primer extension. The intron is amplified in the control and diagnostic fragments, and the length of fragments is indicated.

Figure 2. A. PCR-RFLP result to detect the L1014F kdr mutation in *Cochliomyia hominivorax* samples. All individuals are wild-type (genotype is deduced by absence of a fragment of 72 bp). L10bp= 10 bp DNA Ladder.

B. Allele-specific PCR result for *Cochliomyia hominivorax* samples. For each sample two reactions were performed, where W is the reaction to detect the wild-type allele, and M is the reaction to detect the mutant allele. C- = negative control. L1Kb= 1Kb DNA Plus Ladder.

The lengths of control and diagnostic fragments are respectively 303 and 249 bp, as shown in Figure 1.

Figure 3. PCR-RFLP to detect the W251S mutation in the E3 gene of *Cochliomyia hominivorax* individuals. M= mutant; W= wild-type; H= heterozygote. L1Kb= 1Kb DNA Plus Ladder.

Artigo 2:

Figure 1. Schematic view of AChE cDNA from *C. hominivorax* showing the mutation positions (I298V, G401A, F466Y), associated with organophosphate resistance, and the hybridization position of the primers.

Figure 2. Multiple sequence alignment of AChE protein sequences for *C. hominivorax*, *L. cuprina* (AAC02779), *H. irritans* (AAS45645), *M. domestica* (CAC39209) and *D. melanogaster* (NP_476953). Positions of the three disulfide bond linkages are indicated by numbers above participating cysteine pairs. The members of the catalytic triad (S374, E503, H616) are indicated by arrows, the sites characterized for conferring insecticide resistance (I298, G401, F466) are indicated by stars and the main component of choline binding site (W222) is indicated by a circle. The N- and C-terminal sequences, which are cleaved of protein, are shaded.

Figure 3. Fig. 3. (a) Schematic view to show the internal contacts established by residues of the catalytic triad and (b) by resistance mutation found in the field samples, for wild and mutant AChE protein. The traces indicate a hydrophobic interaction and dotted lines indicate a charge attractive interaction. The number de traces or dotted lines indicate the number of interactions established. The residues in bold face indicate new interactions established in the mutant protein.

Discussão Geral:

Figura 1. Mapa com a frequência genotípica dos indivíduos de *C. hominivorax* nas populações analisadas para a presença da mutação W251S.

Figura 2. Mapa com a frequência genotípica dos indivíduos de *C. hominivorax* nas populações analisadas para presença da mutação G137D.

TABELAS

Artigo 1:

Table 1. Genotypes of individuals, from ten *Cochliomyia hominivorax* populations, for the L1014F kdr and W251S mutations.

Table 2. Susceptibility of *Cochliomyia hominivorax* larvae to cypermethrin for each concentration tested (with three replicates, and with 50 larvae each, totaling 150 larvae per concentration).

Table 3. Number of mutant and wild alleles found in dead and alive larvae *Cochliomyia hominivorax* for the three cypermethrin concentrations analyzed from the bioassay.

Artigo2:

Table 1. Genotypes and mutant allele frequency for the G137D mutation, from *Cochliomyia hominivorax* populations.

Discussão Geral:

Tabela 1. Porcentagem de alelos mutantes e selvagens encontrados em indivíduos vivos e mortos analisados a partir de três concentrações do bioensaio com cipermetrina, apresentado no artigo 1.

ABREVIACOES E TERMOS EM INGLES

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
AChE	Acetilcolinesterase
ASPCR	Termo em inglês para a técnica de PCR alelo-específico
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
cDNA	DNA complementar
DNA	cido desoxirribonucléico
dNTP	Qualquer um dos quatro possíveis desoxirribonucleotídeos trifosfatos
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GenBank	Banco de dados de seqncias do NIH (National Institutes of Health)
G137D	Substituição de glicina por aspartato no resíduo 137 da seqncia de aminoácidos
IAEA	International Atomic Energy Agency
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KCl	Cloreto de potássio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
OP	Inseticida organofosforado
pb	Pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism
Primer	Termo em inglês para oligonucleotídeo iniciador
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
SIT	Sterile Insect Technique
W251S	Substituição do triptofano por serina no resíduo 251 da seqncia de aminoácidos

PARTE I

CONTEXTO DO TRABALHO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Miíase e a família Calliphoridae

A família Calliphoridae é uma família que compreende aproximadamente 1000 espécies de ampla distribuição geográfica em diferentes ambientes, apresentando espécies de grande importância econômica, médica, sanitária e forense (Baumgartner & Greenberg, 1984; Guimarães & Papavero, 1999). A espécie praga da pecuária *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) é um importante ectoparasita causador de miíase primária na Região Neotropical, infestando animais domésticos e provocando graves prejuízos à pecuária, podendo infestar até mesmo humanos (Guimarães et al., 1983). A miíase primária é um parasitismo caracterizado pela habilidade de larvas de dípteros desenvolverem-se nos tecidos vivos de animais vertebrados, incluindo humanos, podendo causar diferentes tipos de infecções dependendo da localização da larva no corpo do hospedeiro, isto é, dermal, subdermal, nasofaringeal, urogenital ou em órgãos internos (Hall & Wall, 1995). Dentro da família Calliphoridae as espécies *Chrysomya bezziana* e *C. hominivorax*, parasitas obrigatórios e causadoras de miíase primária, estão associadas a prejuízos na pecuária no Velho Mundo e na região Neotropical, respectivamente (Guimarães & Papavero, 1999). O califorídeo *Lucilia cuprina*, classificado como parasita facultativo, é a principal responsável pela incidência de miíases em ovelhas na Austrália, Tasmânia e Nova Zelândia, causando grandes perdas econômicas para a indústria local de lã (Levot, 1995; Tellam & Bowles, 1997).

A família Calliphoridae também contém espécies causadoras de miíases secundárias, que se caracterizam pelo hábito da alimentação de tecido morto e material em decomposição, destacando-se neste grupo as espécies do gênero *Chrysomya* (*C. putoria*, *C. megacephala*, *C. albiceps* e *C. rufifascies*) e a *Cochliomyia macellaria*. Estas moscas são consideradas de importância médica e sanitária por promoverem a disseminação mecânica de patógenos e também são importantes para a entomologia forense, por serem os primeiros animais a detectarem um cadáver. O gênero *Chrysomya* era restrito aos trópicos do Velho

Mundo, entretanto, em meados da década de 70 detectou-se a presença de três espécies deste gênero no Brasil, *C. putoria*, *C. megacephala* e *C. albiceps* (Baumgartner & Greenberg, 1984; Guimarães & Papavero, 1999).

O parasitismo obrigatório e a habilidade de iniciar miíase primária em vertebrados teriam múltiplas origens na família Calliphoridae (Stevens, 2003). Entretanto, a origem evolutiva do hábito de miíase presente nesta família ainda permanece não esclarecida. Espécies associadas ao hábito ectoparasítico geralmente podem ser divididas em três grandes grupos baseado no hábito alimentar das larvas: saprófagos, normalmente vivendo em material orgânico em decomposição; ectoparasitas facultativos, os quais podem viver como saprófagos ou como ectoparasitas; ectoparasitas obrigatórios, os quais se alimentam somente dos tecidos de hospedeiros vivos. Tem sido proposto que esta divisão funcional pode refletir a evolução progressiva do parasitismo em Calliphoridae. As espécies de hábito saprófago teriam dado origem às ectoparasitas facultativas e estas por sua vez às ectoparasitas obrigatórias (Zumpt, 1965). Em uma revisão Stevens & Wallman (2006) comentam que os diferentes hábitos de vida larval das espécies de Calliphoridae indicam que o estado ancestral de desenvolvimento larval teria sido a alimentação a partir de carcaças e miíase oportunística, uma conclusão que estaria de acordo com a origem saprófaga proposta por Zumpt (1965) and Erzinçlioglu (1989).

1.2 *Cochliomyia hominivorax*: a mosca-da-bicheira

Cochliomyia hominivorax é considerada uma importante praga da pecuária nas áreas de sua ocorrência. No Brasil é conhecida popularmente como mosca da bicheira. Com relação à morfologia desta espécie, as moscas adultas medem de 8 a 10 mm de comprimento, sendo de coloração metálica de tonalidade verde-azulada. Os machos cruzam muitas vezes, começando 24h após emergirem da pupa. Entretanto, as fêmeas cruzam uma única vez com idade entre 3 a 5 dias. Uma fêmea pode ovipor entre 3 a 4 vezes, com uma média de 200 ovos por oviposição (Thomas & Mangan, 1989). Os ovos são depositados como “massas de ovos agrupados” com posturas de diferentes

fêmeas, usualmente na borda da ferida ou em aberturas do corpo como olhos, boca, vagina, e eclodem em torno de 24 horas após a postura (Figura 1). A fase de larva tem 3 estágios e em torno de 7 dias após os ovos terem sido depositados as larvas deixam a ferida, caindo no solo onde enterram-se (2-5cm de profundidade) para transformarem-se em pupas. Também em torno de 7 dias após entrar no estágio de pupa emerge o adulto (Figura 2). Os estágios imaturos (larva e pupa) são muito influenciados pela temperatura, portanto o tempo de duração de cada estágio pode variar (Guimarães & Papavero, 1999; Marcondes, 2001).

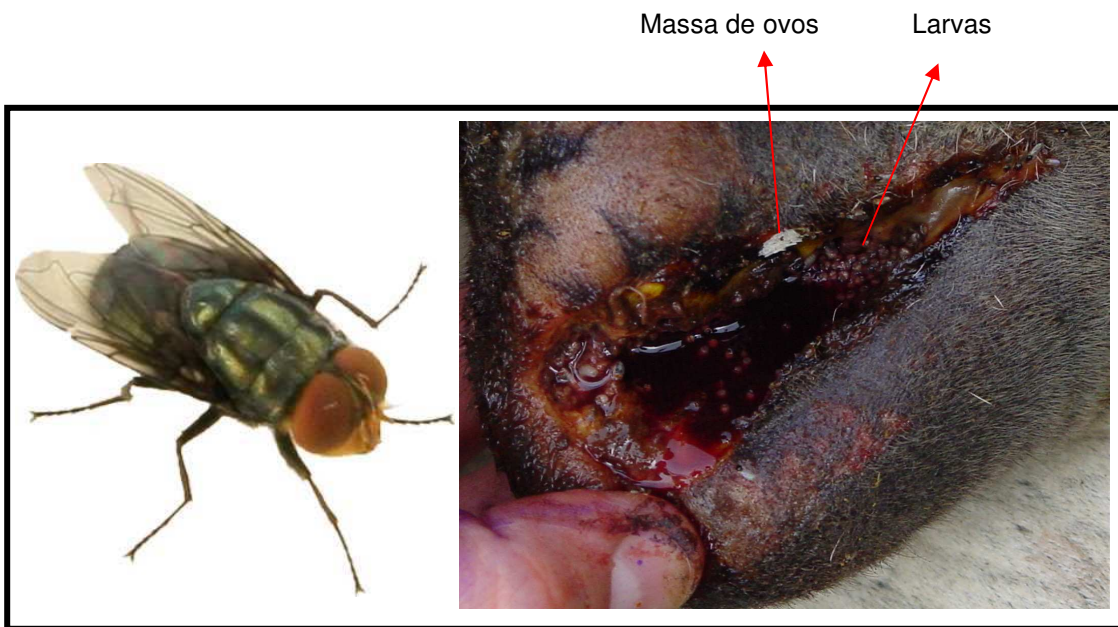


Figura 1. À esquerda, indivíduo adulto de *Cochliomyia hominivorax*. À direita, ferida no testículo de um bovino já contendo larvas e nova postura de ovos na borda.

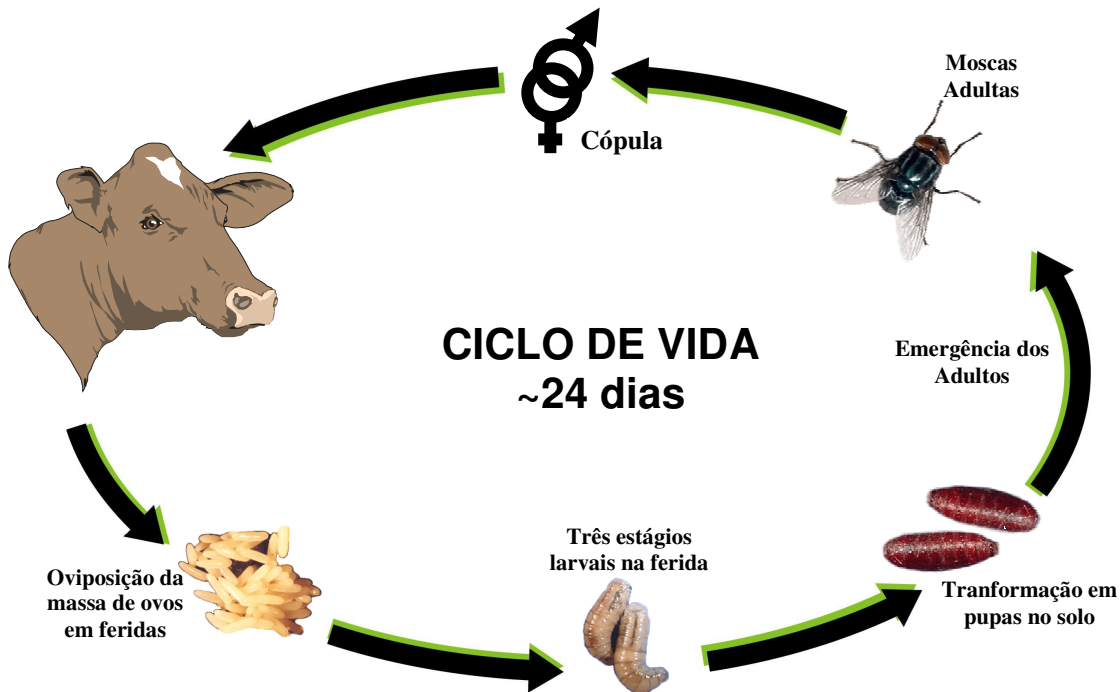


Figura 2. Representação do ciclo de vida de *Cochliomyia hominivorax*.

As larvas de *C. hominivorax* se alimentam exclusivamente de tecidos vivos agravando as lesões, as quais servem de porta de entrada para miíases secundárias (infestação do tecido necrosado) e infecções bacterianas, podendo levar à morte do animal infestado. As perdas decorrentes de suas infestações incluem danos ao couro, diminuição da produção de leite e peso, morte de bezerros decorrentes de miíases umbilicais, além dos gastos com prevenção e tratamento (Grisi et al., 2002). Condições locais tais como a distribuição e densidade de animais domésticos (principalmente bovinos e ovinos) e animais silvestres, práticas da pecuária e agricultura, movimento dos animais, densidade da população humana, condições sócio-econômica, serviços de saúde pública, fatores climáticos e geográficos influenciam a severidade das infestações e a magnitude do problema (Robinson et al., 2009).

Historicamente a distribuição desta espécie estendia-se desde o sul dos Estados Unidos, ao longo da América Central e algumas ilhas do Caribe, até a

América do Sul, exceto o Chile onde ela ocorria somente ao norte do país (Guimarães & Papavero, 1999). Através de um programa de controle utilizando a técnica do inseto estéril (SIT, sterile insect technique) *C. hominivorax* foi erradicada dos Estados Unidos, América Central, Curaçao e Ilhas Virgens (U.S.A.). Atualmente, ela é encontrada em algumas ilhas do Caribe e América do Sul (Matlock & Skoda, 2009). Fora das Américas, sua ocorrência foi registrada em 1988 na Líbia, onde após o uso de um programa de erradicação utilizando a técnica SIT foi eliminada em 1991 (Lindquist et al., 1992).

Uma grande dificuldade enfrentada em estudos populacionais com esta espécie é a obtenção de amostras suficientes do campo para as análises genéticas, pois as iscas atrativas para os adultos nem sempre são efetivas para obter uma boa amostragem. Normalmente as amostras são larvas provenientes de animais infestados, e consideráveis recursos e organização para coletas são necessários para obter tais amostras (Robinson et al., 2009). A genética de populações de *C. hominivorax* tem sido abordada por diferentes técnicas e marcadores genético-moleculares, o que tem originado algumas hipóteses conflitantes sobre a estrutura populacional e diversidade genética e seus efeitos nas estratégias de controle (revisão em Azeredo-Espin & Lessinger, 2006; Torres, 2006; Lyra et al., 2009).

Em um estudo com 34 populações de *C. hominivorax* da sua atual distribuição geográfica, usando a técnica de PCR-RFLP em sequências mitocondriais de COI/COII, foi verificado que a distribuição da variação genética não é uniforme. Altos níveis de diferenciação foram encontrados entre populações da região Caribenha e entre estas e populações continentais, contrastando com a baixa variação encontrada entre as populações continentais. As populações Caribenhas constituem entidades independentes conectadas por um restrito fluxo gênico. Em geral, as populações analisadas apresentaram um complexo padrão de variação genética, com poucas populações isoladas e algumas populações panmíticas (Lyra et al., 2009). A mesma estruturação nas populações Caribenhas também foi encontrada utilizando marcadores microssatélites (Torres & Azeredo-Espin, 2009). Ainda com relação à genética

desta espécie sabe-se que a mesma possui um número diplóide de 12 cromossomos ($2n=12$), com cinco pares de autossomos e um par de cromossomos sexuais, os quais não politenizam e normalmente aparecem nas preparações citológicas como pedaços de cromatina não condensada (Dev et al., 1986). Recentemente um novo fotomapa, de maior resolução, com a caracterização dos cromossomos politênicos de *C. hominivorax* foi realizado (Batista et al., 2009).

1.3 Estratégias de controle

Devido a sua importância econômica, esforços internacionais têm sido feitos na elaboração de programas de controle e eventualmente erradicação de *C. hominivorax* nas áreas de sua atual distribuição, através da aplicação da técnica do inseto estéril. Esta técnica baseia-se na esterilização das pupas com radiação e posterior soltura das mesmas no ambiente, para que os machos estéreis acasalem com as fêmeas no campo. Devido ao fato da fêmea de *C. hominivorax* acasalar somente uma vez em sua vida, o acasalamento com um macho estéril acaba ocasionando uma diminuição na densidade populacional (Klassen & Curtis, 2005). Entretanto, para aumentar o sucesso da técnica do SIT, e também diminuir os gastos envolvidos na produção e liberação das pupas estéreis, é necessário que antes da liberação seja feita uma supressão na densidade populacional. Esta supressão pode ser feita através do uso de armadilhas, mas o método mais comumente usado é a aplicação de inseticidas (Mangan, 2005). Portanto, para o sucesso de programas como este é de grande importância o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência a inseticidas na espécie alvo para que medidas mais eficazes de controle possam ser aplicadas. Além disso, um fator igualmente importante na elaboração de estratégias eficientes de manejo de pragas, principalmente quando visam grandes áreas de distribuição, é o conhecimento da diversidade genética e estrutura das populações. A análise genética de populações permite identificar similaridades e diferenças entre populações de diferentes regiões

geográficas, verificar o nível de troca genética entre populações e o grau de isolamento entre elas (revisão em Robinson et al., 2009).

Atualmente pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento de novas moléculas com ação inseticida. O desenvolvimento destas novas moléculas baseia-se na utilização de toxinas naturais com ação inseticida na produção de novos produtos ou desenvolvimento de plantas transgênicas. Toxinas produzidas por escorpiões, aranhas e anêmonas do mar têm despertado muito interesse devido a grande diversidade de toxinas que são expressas nas glândulas de veneno destes animais (Nicholson, 2007).

Estratégias de desenvolvimento de vacinas para controle desta e outras espécies causadoras de miíase primária têm sido investigadas. O desenvolvimento de vacinas em moscas causadoras de miíase tem se concentrado em *Lucilia cuprina* e *Hypoderma lineatum* (Oestridae), entretanto, tem sido difícil obter um produto imunologicamente ativo que ofereça altos níveis de proteção no campo e que possa ser produzido em grandes quantidades. Peritrofinas e proteases, encontradas em extratos de larvas têm apresentado considerável potencial para o desenvolvimento de vacinas (Nisbet & Huntley, 2006).

Uma outra estratégia que tem sido investigada recentemente é a manipulação de mecanismos regulatórios intracelulares, como a fosforilação e defosforilação de receptores de membrana e canais de íons que são alvos da ação de inseticidas, tornando-os mais sensíveis a estes compostos. A super-expressão de fosfatases e/ou quinases em insetos, com a ajuda de vírus recombinantes, pode permitir o aumento na sensibilidade a inseticidas convencionais em insetos alvo. Esta estratégia poderia resultar numa diminuição nas concentrações necessárias para efetividade do inseticida, o que também ajudaria a diminuir a contaminação ambiental e riscos para a saúde humana (Lapied et al., 2009).

Novas tecnologias de acesso a dados genômicos também estão contribuindo para revelar os diferentes mecanismos envolvidos na resistência. O acesso às seqüências genômicas de diferentes insetos tem permitido investigar

a homologia, origem e a organização de características que conferem resistência em nível molecular, e também comparar estas características entre várias taxa (Denholm et al., 2002; Kaufman et al., 2002). Apesar de existirem pesquisas e mesmo a prática de algumas estratégias alternativas de controle da miíase primária o método mais usado ainda são inseticidas químicos cuja aplicação pode propiciar o desenvolvimento de resistência genética a estes produtos (Otranto & Stevens, 2002)

1.4 Classes de inseticidas

Antes da década de 40 muitos inseticidas eram baseados em substâncias inorgânicas tais como arsênico, cobre, enxofre, derivados de produtos naturais como nicotina e piretrina (extraída do crisântemo). Durante a década de 30 muitas companhias químicas começaram a investigar vários tipos de compostos orgânicos sintéticos, sendo o famoso Diclorodifenil Tricloroetano (DDT), um organoclorado, um dos primeiros inseticidas a surgir em 1939 (revisão em Ceccati, 2004). A partir daí diferentes classes de inseticidas sintéticos passaram a ser desenvolvidas. Atualmente no Brasil muitos inseticidas utilizados no combate a miíase, conhecidos como mata-bicheiras, apresentam misturas de compostos pertencendo a diferentes classes, como por exemplo, misturas de organofosforados e piretróides (SINDAN–Compêndio de Produtos Veterinários. <http://www.cpvvs.com.br/cpvvs/index.html>). Além disso, alguns também apresentam na sua formulação compostos, como piperonil butóxido (PBO), que atuam como sinergistas, aumentando a eficácia do inseticida. Estes compostos chamados de sinergistas são adicionados nas formulações pois inibem a ação de enzimas envolvidas no processo de desintoxicação metabólica (Bernard & Philogène, 1993). Abaixo estão descritas características de algumas classes de inseticidas relacionadas aos mecanismos de resistência abordados neste trabalho.

1.4.1 Organofosforados

Desenvolvidos na década de 40, foram os primeiros a substituírem os representantes do grupo dos organoclorados, aos quais os insetos já apresentavam resistência. Os organofosforados possuem um amplo número de produtos agrícolas e sanitários, desde os extremamente tóxicos até aqueles com baixa toxicidade, como o temefos. É um grupo químico formado apenas por ésteres de ácido fosfórico e outros ácidos à base de fósforo contendo várias combinações de carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e nitrogênio. Os organofosforados possuem vários grupos segundo sua estrutura, estando entre os mais numerosos os fosfatos (diclorvos), fosforotioatos (fenitrothion, temefos) e fosforoditioatos (malation, dimetoato). Em relação aos agrotóxicos clorados e carbamatos, os organofosforados são mais tóxicos (em termos de toxicidade aguda), mas se degradam rapidamente e não se acumulam nos tecidos gordurosos. São biodegradáveis, sendo, portanto sua persistência curta no solo, 1 a 3 meses. O principal meio de degradação no ambiente parece ser a hidrólise sob condições de alcalinidade. Atua inibindo a ação da enzima colinesterase na transmissão dos impulsos nervosos (Kumar, 1984; Storm et al., 2000; Sogorb & Vilanova, 2002).

1.4.2 Carbamatos

Os primeiros carbamatos foram comercializados por volta de 1950. Apresentam um pequeno espectro de atividade inseticida. Grupo químico de agrotóxicos compostos por ésteres de ácido metilcarbônico ou dimetilcarbônico. Em relação aos pesticidas organoclorados e organofosforados, os carbamatos são considerados de toxicidade aguda média, sendo degradados rapidamente e não se acumulando nos tecidos gordurosos. Em geral, são compostos instáveis. Muitos fatores influenciam a degradação dos carbamatos, como a umidade, temperatura, luz, volatilidade. Carbamatos são metabolizados por microrganismos, plantas e animais ou degradados na água e no solo, especialmente em meio alcalino. Os carbamatos também atuam inibindo a ação da colinesterase na transmissão dos impulsos nervosos cerebrais. Muitos

desses produtos foram proibidos em diversos países também em virtude de seu efeito altamente cancerígeno (Kumar, 1984; Sogorb & Vilanova, 2002).

1.4.3 Piretróides

Os piretróides são derivados sintéticos baseados na estrutura química e atividade biológica das piretrinas (ésteres ácidos), extraídas das flores de crisântemo (*Tanacetum cinerariaefolium*). Derivados sintéticos foram criados devido ao fato das piretrinas serem facilmente degradadas na presença da luz. No final da década de 60 foram produzidos compostos sintéticos que eram estáveis sob luz e temperatura ambiente, tinham alta atividade inseticida, baixa toxicidade a mamíferos e limitada permanência no solo. São os compostos de mais rápida ação na interferência da transmissão de impulsos nervosos, atuando sobre os canais de sódio. Os piretróides são classificados em tipo I e II de acordo com sua estrutura química. Os do tipo II possuem um grupo α -ciano ligado ao fenilbenzil ou outro álcool, tornando-os mais tóxicos. Os do grupo I não possuem este grupamento químico. Atualmente existem em torno de 1000 estruturas, com algumas delas muito diferentes da estrutura original das piretrinas. Degradam-se por hidrólise e oxidação, sendo caracterizados também pela rápida degradação por microrganismos do ambiente, não se registrando acumulação de resíduos, ou estes alcançam níveis não detectáveis. Piretróides também podem sofrer hidrólise em condições alcalinas, não se acumulam em tecidos gordurosos, mas são considerados tóxicos para peixes (Kumar, 1984; Sogorb & Vilanova, 2002; Davies et al., 2007).

1.5 Mecanismos de resistência a inseticidas

A evolução de insetos resistentes a inseticidas fornece para biólogos evolutivos sistemas modelo para investigar como novas adaptações são rapidamente adquiridas (Denholm et al., 2002). O fenótipo de resistência é caracterizado pelo fato do inseto sobreviver a uma dose de inseticida que seria letal para a maioria dos indivíduos da mesma espécie (Hemingway et al., 2002).

DDT foi o primeiro inseticida usado em escala global e os primeiros casos de resistência a este inseticida foram registrados em 1946 (Ceccati, 2004). A partir deste registro o número de casos de espécies de artrópodes resistentes aumentou rapidamente em resposta ao desenvolvimento e uso de novos inseticidas, com muitas espécies atualmente resistindo a diferentes classes de inseticidas. Atualmente existem mais de 500 espécies de artrópodes resistentes a diferentes tipos de inseticidas (Arthropod Pesticide Resistance Database. <http://www.pesticideresistance.org/>).

A resistência a inseticidas pode ser causada por um ou mais dos seguintes mecanismos: insensibilidade no sítio alvo, aumento na desintoxicação ou excreção, diminuição na capacidade de penetração do inseticida ou resistência comportamental (Pasteur & Raymond, 1996). Atualmente sabe-se que existem três famílias de proteínas que são em grande parte responsáveis pelo metabolismo de inseticidas e, conseqüentemente, envolvidas nos mecanismos de resistência: as citocromo P450, carboxilesterases (COEs) e glutathione transferases (GSTs). As proteínas destas famílias estão também envolvidas na síntese e quebra de um grande número de compostos metabólicos endógenos, na proteção contra stress oxidativo, na transmissão de sinais nervosos e no transporte de compostos através da célula (Ranson et al., 2002). Estas famílias possuem enzimas altamente especializadas, que atuam em substratos específicos e também com perfis de expressão específicos, assim como enzimas generalistas em termos de substratos e perfis de expressão. As citocromo P450 têm sido envolvidas no metabolismo de um grande número de compostos como piretróides, DDT, organofosforados e toxinas de plantas; as carboxilesterases têm sido envolvidas no metabolismo de organofosforados, carbamatos e piretróides; e as glutathione transferases no metabolismo de organoclorados, piretróides e organofosforados (Li et al., 2007).

Mecanismos de resistência metabólicos podem ser devido à super-expressão de uma ou mais enzimas, modificação nas propriedades catalíticas da enzima, ou por ambos. Alguns casos de super-expressão de enzimas envolve a duplicação de genes (Pasteur & Raymond, 1996). Uma das enzimas relatadas

envolvidas no processo de desintoxicação do inseticida é a carboxilesterase E3, a qual possui mutações em seu gene causando substituições de aminoácidos relacionadas com o desenvolvimento da resistência a inseticidas organofosforados (Newcomb *et al.*, 1997^a; Campbell *et al.*, 1998). Na Esterase E3 de *Lucilia cuprina* Campbell *et al.* 1998 encontraram duas substituições de aminoácidos, uma na posição 137 (Glycina para Asparagina) e a outra na posição 251 (Triptofano para Leucina), associadas com resistência a organofosforados (OP), e mais recentemente esta última mutação também tem sido associada com a hidrólise de piretróides (Heidari *et al.*, 2005; Devonshire *et al.*, 2007).

A resistência a inseticidas também pode resultar de mudanças em proteínas que normalmente se ligam a inseticidas (são o sitio alvo de ação), como por exemplo, mutações em acetilcolinesterases (gene AChE, alvo para organofosforados e carbamatos) e em canais de sódio (alvo para piretróides e DDT), as quais têm sido bem documentada em muitas espécies de insetos (Villatte *et al.*, 2000; Soderlund & Knipple, 2003). “Knockdown resistance” (kdr) foi primeiramente documentada em *Musca domestica*, no começo da década de 50 (Busvine, 1951). O fenótipo de “knockdown resistance” em insetos foi posteriormente associado a mutações no gene para subunidade alfa do canal de sódio. A enzima acetilcolinesterase (AChE) é o alvo primário da ação de inseticidas organofosforados e carbamatos. Entretanto, algumas mutações em diferentes pontos desta enzima têm sido associadas ao fenótipo de resistência. A localização e a combinação desses diferentes pontos de mutação já foram encontrados em muitos alelos onde causaram altos níveis de resistência aos seus portadores (Mutero *et al.*, 1994). A ocorrência de mutações idênticas em diferentes espécies sugere que um número reduzido de substituições em “genes chave” são alvos para seleção da resistência (French-Constant *et al.*, 1998).

Além dos mecanismos citados anteriormente a resistência também pode ser resultante de uma mudança em um único gene regulador e pode causar complexas cascatas de expressão de genes não relacionados (Hemingway *et al.*, 2002). Múltiplos mecanismos também podem ser selecionados numa

espécie, e podem causar resistência a diferentes classes de inseticidas, como registrado em populações de *Bemisia tabaci* do Arizona que desenvolveram resistência a todos os inseticidas utilizados no seu controle (Anthony et al., 1998; Morin et al., 2002).

1.5.1 Carboxilesterase E3

O gene para a enzima carboxilesterase E3 faz parte de um cluster de genes carboxilesterase, cerca de 10 genes em *Drosophila melanogaster*, chamados cluster α -esterase (Russel et al., 1996). Embora menos caracterizado, o cluster α -esterase também existe no califorídeo *Lucilia cuprina* (Newcomb et al., 1996). Mudanças qualitativas e quantitativas em carboxilesterases têm sido associadas com resistência a inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides em algumas espécies de artrópodes. Um dos mecanismos envolve um aumento na atividade de carboxilesterase resultante da amplificação de seus genes. Neste tipo de resistência a super-produção da enzima atua hidrolizando o inseticida, impedindo que o mesmo alcance seu sitio alvo de ação (Devonshire & Moores, 1982; Campbell et al., 1997; Hemingway & Karunaratne, 1998).

O outro mecanismo envolve mutações estruturais na enzima resultando em uma redução na habilidade de hidrolisar ésteres alifáticos, tais como metil butirato e naftil acetato, mas confere a habilidade de hidrolisar substratos organofosforados (Campbell et al., 1998). Uma das mutações envolvidas neste mecanismo é a substituição de glicina para aspartato no resíduo 137 (G137D) em *Lucilia cuprina*, a qual confere à enzima uma maior capacidade de hidrolisar principalmente compostos do tipo dietil-organofosforados. A outra mutação na posição 251 (W251L), com substituição de um triptofano por uma leucina, também em *Lucilia cuprina*, está associada a altos níveis de resistência a dimetil-organofosforados, especialmente malation (Campbell et al., 1998). Em alguns estudos mais recentes tem sido verificado que algumas substituições no resíduo 251 desta carboxilesterase também podem estar relacionadas à

hidrólise de piretróides. Diferentes substituições neste resíduo (L,S,T,G,A) na carboxilesterase E3 de *Lucilia cuprina* foram introduzidas por mutagênese *in vitro* e foi verificado que todas as substituições aumentaram a hidrólise de piretróides, sendo a substituição para leucina a que apresentou maior efeito (Heidari et al., 2005; Devonshire et al., 2007).

1.5.2 Canal de Sódio

A proteína canal de sódio é uma proteína transmembrana que consiste de quatro domínios homólogos, com cada domínio possuindo seis hélices transmembrana e “loops” (intra e extracelulares) ligando as hélices e os domínios entre si (Figura 3). Piretróides modificam a função normal do canal de sódio, prolongando as correntes de Na⁺ (para dentro da célula) associadas à despolarização da membrana, causando exaustão nervosa e morte do inseto (Dong, 2006). Compostos piretróides têm uma alta afinidade pela conformação aberta do canal de sódio de insetos, o que provavelmente causa o aumento no influxo de íons Na⁺ para dentro da célula. Piretróides do tipo II são considerados mais tóxicos, pois mantêm o canal de sódio numa conformação aberta por mais tempo, prolongando o influxo de sódio, comparado com os piretróides do tipo I, além de serem mais difíceis de serem hidrolisados por enzimas metabólicas (Heidari et al., 2005). Piretróides são frequentemente usados no controle de insetos praga para a agricultura e saúde humana. Entretanto, o fenótipo de “knockdown resistance” (kdr) limita a efetividade de todos os piretróides conhecidos (piretróides do tipo I e II) e DDT, ocasionando sérias conseqüências para o uso eficaz destes inseticidas no controle de pragas e pestes (Soderlund & Knipple 2003).

Kdr é um termo genérico para mutações no canal de sódio de insetos associadas com resistência a piretróides e DDT. Uma dessas mutações causa a substituição de uma leucina por fenilalanina, L1014F, posição baseada na sequência de aminoácidos de *M. domestica*. Esta mutação ocorre no segmento transmembrana S6 do domínio dois (Soderlund & Knipple 2003) (Figura 3). A mutação kdr L1014F tem sido amplamente registrada em populações resistentes

de diferentes espécies de insetos de importância econômica e vetores de doenças como: *Haematobia irritans* (Jamroz et al., 1998), *Plutella xylostella* (Schuler et al., 1998), *Myzus persicae* (Martinez-Torres et al., 1999^b), *Leptinotarsa decemlineata* (Lee et al., 1999^a), *Blattella germanica* (Miyazaki et al., 1996), *Anopheles gambiae* (Martinez-Torres et al., 1998) e *Culex pipiens* (Martinez-Torres et al., 1999^a). Este ponto de mutação não faz parte de um domínio de ligação do inseticida, mas mutações neste ponto são responsáveis por uma mudança conformacional na proteína que afeta sua cinética e por consequência afeta a ligação e ação do inseticida (Davies et al., 2007).

No gene para canal de sódio ocorre uma segunda mutação, também no domínio II da proteína, chamada super kdr, sendo que para esta há menos registros (Figura 3). A mutação super kdr é relatada somente em linhagens altamente resistentes de *M. domestica* (Williamson et al., 1996), *H. irritans* (Guerrero et al., 1997), *Myzus persicae* (Anstead et al., 2007) e *Bemisia tabaci* (Morin et al., 2002). Nas três primeiras espécies, indivíduos portadores da mutação kdr (L1014F) e super kdr (M918T) apresentam níveis muito maiores de resistência à piretróides do que aqueles que apresentam somente a mutação kdr. Isto ocorre não por efeito aditivo ou sinergismo, mas sim ao fato da mutação super kdr providenciar um nível de resistência que se sobrepõe ao efeito causado pela kdr, provavelmente devido ao fato deste ponto fazer parte de um sítio de ligação para o inseticida (Davies et al., 2007). Em *M. domestica*, *H. irritans* e *M. persicae* a mutação super kdr sozinha nunca foi encontrada, ou seja, sua ocorrência sempre está associada à presença da mutação kdr. Nestas espécies a mutação super kdr envolve a substituição de uma metionina por treonina (M918T), e em *B. tabaci* a substituição é de uma metionina para valina (M918V), sendo que nesta última espécie a presença desta mutação não é descrita em associação com outra.

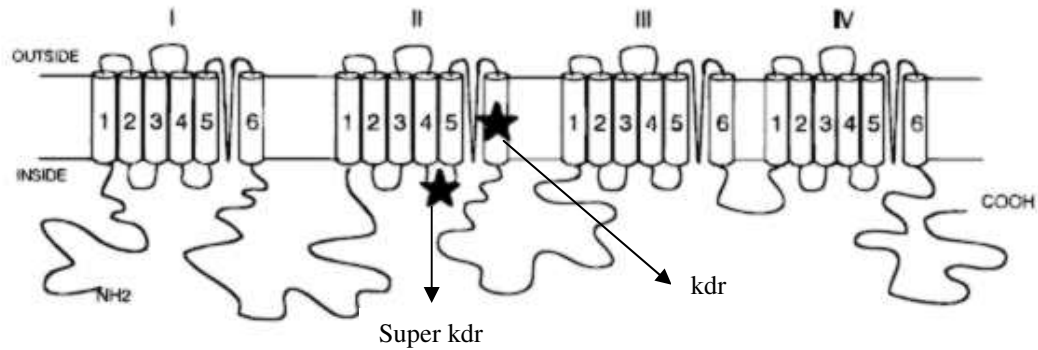


Figura 3. Estrutura da proteína canal de sódio mostrando os quatro domínios com as hélices transmembrana e os “loops”, e a localização das mutações kdr e super kdr. Figura retirada do trabalho de Martinez-Torres *et al.*, 1997.

1.5.3 Acetilcolinesterase

A enzima acetilcolinesterase (AChE; EC number 3.1.1.7) é altamente conservada em muitos organismos pois ela atua na transmissão do impulso nervoso através da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (Toutant, 1989). O número de genes codificantes para AChE varia entre organismos, desde um gene, como ocorre em platelmintos (Bentley *et al.*, 2003) e algumas espécies de dípteros (Huchard *et al.*, 2006), até quatro genes em nematódeos (Grauso *et al.*, 1998). Em algumas espécies de diferentes grupos de artrópodes (como Diptera, Hemiptera, Himenoptera, Lepidoptera e Acari) dois genes têm sido identificados, os genes ace-1 e ace-2. No genoma de *Anopheles gambiae* existem os dois genes ace, sendo que ace-1 codifica a principal enzima que atua na hidrólise da acetilcolina, e o ace-2 cuja função ainda não é conhecida nestes artrópodes. Entretanto, em membros do grupo Cyclorrhapha, conhecido como grupo das “moscas-verdadeiras”, como *Drosophila melanogaster*, *Bactrocera oleae*, *Musca domestica* e *Lucilia cuprina*, somente um gene, o gene ace-2, tem sido encontrado (Huchard *et al.*, 2006). Uma análise filogenética destes genes sugere que eles divergiram antes da diversificação do filo Arthropoda, e a presença de um único gene em Cyclorrhapha foi o resultado de uma perda secundária neste grupo. Portanto, dentro de Diptera tanto o gene ace-1 (em mosquitos) como ace-2 (em moscas) codificam a enzima acetilcolinesterase que atua na transmissão

sináptica, implicando que o gene *ace-2* assumiu a função de *ace-1* durante a evolução (Huchard et al., 2006).

A enzima acetilcolinesterase é o alvo da ação de inseticidas do tipo organofosforados e carbamatos que podem inibir sua atividade através da fosforilação ou carbamilação do grupo hidroxila da serina catalítica, um dos membros da tríade catalítica, presentes no sítio ativo desta enzima (Fournier & Mutero 1994). Porém, mutações no respectivo gene, resultando na produção de uma enzima alterada, têm sido registradas como um importante mecanismo de resistência a organofosforados e carbamatos em espécies de insetos de importância econômica ou para saúde humana. Algumas destas espécies são: *Haematobia irritans*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Bactrocera oleae*, *Culex pipiens* e *Musca domestica* (revisão em Menozzi et al., 2004). Tanto em *Drosophila melanogaster* como em *Lucilia cuprina* a combinação de diferentes pontos de mutação conferiu altos níveis de resistência a um espectro maior de compostos, do que mutações isoladas. Em *Lucilia cuprina*, o triplo mutante (I199V+G303A+F368Y) conferiu um nível de resistência de 34.6 vezes a paraoxon (um OP), e de 14.6 vezes a malaoxon (um OP), quando comparado com a proteína selvagem (Chen et al., 2001). Em *Drosophila melanogaster* e *Aedes aegypti*, os mesmos pontos de mutação combinados, também causaram altos níveis de resistência a organofosforados (Mutero et al., 1994; Vaughan et al., 1997).

1.6 Pecuária brasileira

Tendo em vista o hábito de parasitismo em animais domésticos por *C. hominivorax*, assumindo o status de praga devido aos prejuízos para a pecuária, é pertinente ressaltar algumas informações sobre a produção agropecuária no Brasil. O Brasil tem cerca de 190 milhões de cabeças de rebanho bovino e 16 milhões de ovinos, em contínuo crescimento, e a bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio brasileiro, gerando faturamento de mais de R\$ 50 bilhões/ano. O rebanho bovino brasileiro é o maior rebanho comercial

do mundo, superando o indiano e o chinês. Em 2008 o Brasil liderou o ranking dos maiores exportadores de carne bovina no mundo, somando o volume de 2,2 milhões de toneladas e receita cambial de US\$ 5,3 bilhões. Estes valores representaram uma participação de 28% do comércio internacional, exportando para mais de 170 países (Fontes: IBGE. www.ibge.gov.br/home/; ABIEC. www.abiec.com.br). Há uma estimativa de perda para o Brasil, embora não atualizada, de 150 milhões de dólares/ano em decorrência de miíases em bovinos, principalmente por diminuição de peso, depreciação do couro e tratamento dos animais (Grisi et al., 2002).

2. OBJETIVOS

Considerando a importância médico-veterinária e econômica que *Cochliomyia hominivorax* representa para a pecuária, o presente trabalho tem como objetivo investigar os possíveis mecanismos de resistência que podem estar sendo selecionados nas populações de sua atual distribuição geográfica, as quais apresentam diferentes históricos de uso de inseticidas. Este trabalho visa contribuir com informações que poderão ser utilizadas nos programas de controle deste ectoparasita, possibilitando a detecção e conseqüente monitoramento da resistência. Estas informações também poderão contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos de resistência em outros insetos considerados pragas ou pestes.

PARTE II

ARTIGOS PRODUZIDOS

Investigation of mutations associated with pyrethroid resistance in populations of the New World Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae)

N.M. da Silva^{1,2} and A.M.L. de Azeredo-Espin^{1,2}

¹Laboratório de Genética Animal,
Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética,
Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

²Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

Corresponding author: N.M. da Silva

E-mail: normams@unicamp.br/normamsilva@yahoo.com.br

Genet. Mol. Res. 8 (3): 1067-1078 (2009)

Received May 10, 2009

Accepted June 23, 2009

Published September 1, 2009

ABSTRACT. *Cochliomyia hominivorax* larvae are known for their parasitic habit in living vertebrates, causing considerable economic losses to livestock industry. This ectoparasite has been controlled mainly by applying insecticides, but this method usually results in the selection of resistant individuals. The resistance mechanism known as knockdown resistance (*kdr*) is a generic term for amino acid substitutions in the sodium channel associated with pyrethroid resistance, and substitutions in residue 251 of the carboxylesterase E3 have been associated with organophosphate and pyrethroid hydrolysis. We looked for L1014F *kdr* and W251S mutations in the sodium channel and E3 genes, respectively, in *C. hominivorax* populations. Ten populations obtained from its current distribution were investigated using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique. No mutant individuals were found for the *kdr* mutation. However, the W251S mutation was found in all populations investigated. Results from

a bioassay with cypermethrin (a pyrethroid) indicated that the survival at the lowest concentration (Fisher exact test, $P=0.0003$) and an intermediate concentration ($P=0.024$) were associated with the W251S mutation. This correlation was not significant at the highest concentration tested ($P=0.221$). We suggest that the W251S mutation in the *C. hominivorax* carboxylesterase E3 is also associated with pyrethroid hydrolysis. This information may contribute to the elaboration of improved management programs for this ectoparasite.

Key words: *Cochliomyia hominivorax*; Insecticide resistance; kdr; Carboxylesterase

INTRODUCTION

The New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), is one of the most important myiasis-causing flies in Neotropical regions. *C. hominivorax* myiasis is caused by the larval stage infesting tissues of warm-blooded vertebrates (Hall and Wall, 1995). This species represents a serious threat to the livestock industry throughout its current distribution, which includes some Caribbean islands and South America (except for Chile) (Vargas-Terán et al., 2005). The sterile insect technique was used to eradicate *C. hominivorax* from both North and Central America (Wyss, 2000), and after an outbreak in Libya, North Africa (Lindquist et al., 1992).

In some South American countries, such as Brazil and Venezuela, this fly has been controlled by applying insecticides, mainly organophosphate (OP) compounds (SINDAN, 2009; Coronado and Kowalski, 2009). In Brazil, some insecticides are currently being applied as a combination of OP and pyrethroid compounds, using increasingly greater concentrations of pyrethroids. This has probably been carried out as an alternative for the more efficient control of this ectoparasite, since OP insecticides have been used for decades, and a mutation in the carboxylesterase E3 gene (G137D) associated with OP resistance has been found in several regions (de Carvalho et al., 2006). In Uruguay, where there is intense use of insecticides for myiasis control in sheep, pyrethroid compounds are used extensively (Veterinary Products Control Department of DILAVE, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca del Uruguay).

The continuous and improper use of insecticides can result in the selection of resistant individuals, but little is known about insecticide resistance in the New World screwworm fly. One of the major mechanisms of insecticide resistance involves metabolic detoxification of the insecticide before it reaches its target site. The three major enzyme families implicated in this mechanism are cytochrome P450s, carboxylesterases and glutathione-S-transferases (Ranson et al., 2002). Structural mutations in specific carboxylesterases have been found in the active degradation mechanism, which convert the enzymatic activity to an OP hydrolase (Newcomb et al., 1997). Carboxylesterase E3 variants from resistant strains of the sheep blowfly *Lucilia cuprina* (Calliphoridae) have shown a substitution of glycine to aspartate at residue 137 (G137D), which enhances OP hydrolase activity, mainly for diethyl-OP. Substitution of tryptophan by leucine or serine at residue 251 (W251L or W251S) also confers resistance to OP, mainly dimethyl-OP (Campbell et al., 1998). Furthermore, it has been demonstrated recently that substitutions at residue 251 of the E3 protein of *L. cuprina* and *Drosophila me-*

lanogaster, produced by *in vitro* mutagenesis, also confer pyrethroid-hydrolyzing capacity (Heidari et al., 2005).

Another important resistance mechanism is the alteration of the target molecule in such a way that it becomes insensitive to the insecticides (Oakeshott et al., 2003). Insecticide target-site genes have been cloned from a range of pest insects and the resistance-associated mutations compared. These studies have shown that despite the wide range of insects studied and differences in the modes of insecticide selection, the same amino acid residues are consistently replaced in the same receptors and/or enzymes, demonstrating the existence of a limited number of possible substitutions (French-Constant et al., 1998; Davies et al., 2007).

The “knockdown resistance” (kdr) mechanism is a generic term that is associated with resistance to pyrethroids, which involves amino acid substitutions in the voltage-sensitive sodium channel, causing a reduction in the sensitivity of the insect nervous system to pyrethroids (Soderlund and Knipple, 2003). The most common mutation involves a substitution of leucine by phenylalanine (L1014F, position according to sequence of amino acids in *Musca domestica*; Williamson et al., 1996), and it is found in different insect species (Davies et al., 2007). In pyrethroid-susceptible strains of different insect species, the CTT triplet determines the amino acid leucine in the equivalent position 1014 of the sodium channel protein. In pyrethroid-resistant strains of *M. domestica*, *Haematobia irritans* and other insect species, the substitution occurs in the first position of the triplet (TTT) causing a change to phenylalanine. The occurrence of the kdr phenotype is likely to be strongly influenced by codon constraints. Amino acid substitutions that can be brought about by a single-step mutation are much more likely to occur (review in Davies et al., 2007).

Considering this scenario and the economic importance of this fly to the livestock industry, two molecular mechanisms of pyrethroid resistance were investigated in *C. hominivorax*. The mutations in the sodium channel and carboxylesterase E3 genes were analyzed in individuals obtained from its current geographic distribution. The aim of this study was to verify the resistance mechanisms that are being selected from different regions where this species occurs. The determination of occurrence and frequency of these mechanisms in the different regions may contribute to the understanding of resistance evolution in this ectoparasite and, consequently, to future area-wide integrated pest management programs.

MATERIAL AND METHODS

Populations sampled and DNA extraction

Cochliomyia hominivorax samples were collected as larvae in infested animals and preserved in absolute ethanol until DNA extraction. Only one population (Estiva, Minas Gerais, Brazil) was brought to the laboratory and maintained to perform the bioassay. The localities sampled were Pinheiro Machado (Rio Grande do Sul, Brazil); Carambei (Paraná, Brazil), Estiva (Minas Gerais, Brazil); Caiapônia (Goiás, Brazil); Santa Maria das Barreiras (Pará, Brazil); Bañados de Medina (Uruguay); Ybytymi (Paraguay); Encontrados (Venezuela); Turbo (Colombia), and Ciego de Ávila (Cuba). For each population, 15-17 individuals, from at least 10 wounds, were analyzed to determine the presence of mutations. DNA from larvae was extracted using the phenol-chloroform method, according to Vargas and Espin (1995).

PCR-RFLP and allele-specific PCR techniques to investigate the *kdr* mutation

Primers were designed based on sequences of the sodium channel gene of *D. melanogaster* (M32078), *M. domestica* (X96668) and *H. irritans* (U83872), obtained from GenBank. The primers R1N (5' TCCATGTGGGACTGCATGT 3') and R2N (5' ACTGATCTGGTTGATCCTCTCA 3') were used to amplify a fragment of 383 bp in *C. hominivorax*, including the region of the L1014F mutation (data not shown). The amplified fragment, from individuals from different regions, was purified on a 1% agarose gel using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) and cloned using the TA Cloning Kit (Invitrogen). Sequencing was performed with the Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Kit, version 3.0 (ABI Prism™, Perkin Elmer) and the ABI 3700 automatic sequencer (Perkin Elmer Applied Biosystems). For each individual, three clones were sequenced, and the sequences were submitted to Blastn search to confirm the identity of the amplicon. The sequence of the *C. hominivorax* sodium channel was submitted to GenBank (EU350483).

Using the sequence obtained, *C. hominivorax*-specific primers R1N2 (5' TCCATGTGGGATTGTATGTATG 3') and R2N2 (5' CGGCAATATTACGTTTCACC 3') were designed to amplify an internal region (303 bp) to be used in the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique. The amplifications were conducted in a final reaction volume of 15 µL under the following conditions: 25-100 ng genomic DNA, 0.3 µM of the primers, 1.3 mM MgCl₂, 1 unit *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1.5 µL 10X buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 0.1 mM of each dNTP and 0.5 mg/mL BSA. PCR was performed in a PTC 200 MJ Research thermal cycler. After an initial denaturing step of 2 min at 94°C, 35 cycles were performed, each one consisting of 50 s at 94°C, 50 s at 56°C and 30 s at 72°C, with a final extension step of 20 min at 72°C.

Since the L1014F mutation causes a new enzyme restriction site, the endonuclease *Tsp509I* (New England BioLabs) was used to digest the PCR products, according to manufacturer instructions, allowing the visualization of a diagnostic fragment for the presence of mutation. The digested products were visualized on a 10% acrylamide gel, after staining with silver nitrate (AgNO₃), to better separate and visualize the diagnostic fragment for the presence of mutation.

Alternatively, allele-specific PCR (ASPCR), a faster method to screen individuals, was also standardized in *C. hominivorax*. The *kdr*W (5' GCCACAGTAGTTATCGGCAATC 3') and *kdr*M (5' GCCACAGTAGTTATCGGCAATT 3') primers were designed based on previous sequences obtained from *C. hominivorax*. These primers differ from each other only in their last nucleotide (underlined). For the ASPCR, each complete assay required two amplification reactions, one reaction to detect the wild-type allele (*kdr*W/R2N2), and a second to detect the mutant allele (*kdr*M/R2N2). In both reactions, the R1N2/R2N2 combination primers amplify a control fragment for PCR (Figure 1). The amplifications were conducted in a final reaction volume of 15 µL under the following conditions: 25-100 ng genomic DNA, 0.25 µM R1N2 primer and 0.3 µM R2N2, *kdr*W or *kdr*M primers, 1.3 mM MgCl₂, 1 unit *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1.5 µL 10X buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 0.1 mM of each dNTP and 0.5 mg/mL

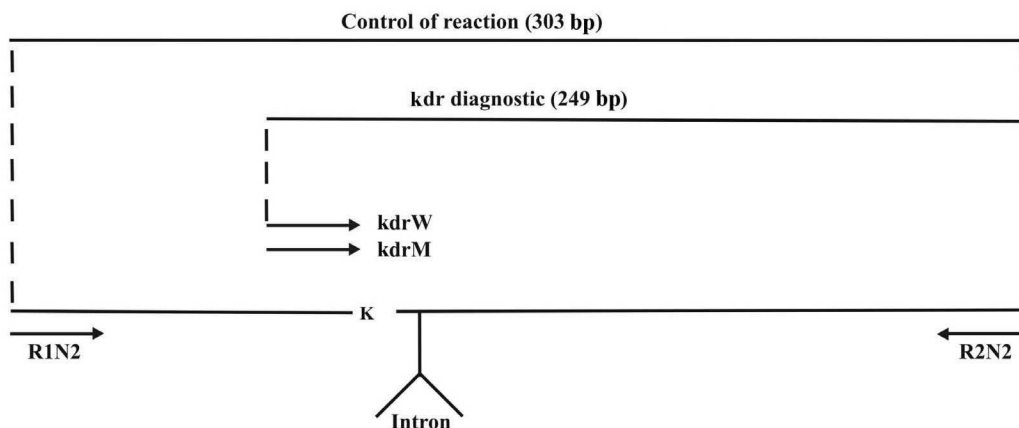


Figure 1. Schematic view of allele-specific polymerase chain reaction strategy with the L1014F *kdr* mutation site designated as K. Primers are shown as arrows with their directions indicating the direction of primer extension. The intron is amplified in the control and diagnostic fragments, and the length of fragments is indicated.

BSA. PCR was performed in a PTC 200 MJ Research thermal cycler. After an initial denaturing step of 2 min at 94°C, 35 cycles were performed, each one consisting of 50 s at 94°C, 50 s at 56°C and 30 s at 72°C, with a final extension step of 20 min at 72°C.

Detection of W251S mutation in E3 gene

The F1aN (5' GGCTCCAGAAACTAAACG3') and R3a (5' ATCCTTATCATTATTTTCACCC 3') primers were designed using the sequence of carboxylesterase E3 gene of *C. hominivorax* (Carvalho et al., 2009), and used to amplify a fragment that contains position 251. The conditions of the 15- μ L reaction mix were: 25-100 ng genomic DNA, 0.2 μ M of each primer, 2.5 mM MgCl₂, 2 units *Taq* Polymerase (Invitrogen), 1.5 μ L 10X buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 0.2 mM of each dNTP and 0.5 mg/mL BSA. PCR was performed in a PTC 200 MJ Research thermal cycler. After an initial denaturing step of 2 min at 94°C, 35 cycles were performed, each one consisting of 50 s at 94°C, 50 s at 53°C and 1 min at 72°C, with a final extension step of 20 min at 72°C. To apply the PCR-RFLP technique, the endonuclease *SpyI* (New England BioLabs) was used to digest the PCR products according to manufacturer instructions. This enzyme cleaves the wild-type sequence. The digested fragments were visualized on a 1.5% agarose gel, after staining with ethidium bromide.

Bioassay

The bioassay was conducted with the F7 laboratory generation of a *C. hominivorax* population from Estiva (Minas Gerais, Brazil), a region of extensive cattle breeding for milk production. The aim of this exploratory bioassay was to identify any relation between the presence of mutant alleles, for one or both mutations investigated, and pyrethroid resistance. Second-instar larvae were exposed to four cypermethrin concentrations: 37.5×10^{-12} , 7.5×10^{-12} , 3.7×10^{-12} , and 1.8×10^{-12} μ g/mL. The insecticide was mixed in the larval rearing medium, consisting of 60 g ground meat and 20 mL blood (bovine). Three replicates of 50 larvae were used

for each concentration, and for control samples without insecticide. Mortality was assessed immediately after exposure to the insecticide to check for any early mortality caused by larval manipulation, and after 12-h exposure. The criterion established for death was the inability of the larvae to move after being prodded. In order to verify the presence of the L1014F mutation in the sodium channel and the W251S mutation in carboxylesterase E3, samples of individuals of three of the four cypermethrin concentrations tested were analyzed. Five alive and five dead individuals of each replicate were analyzed, totaling thirty individuals per concentration (fifteen alive and fifteen dead), except for the highest concentration, where twenty individuals (five alive and fifteen dead) were analyzed. Results were analyzed by the Fisher exact test, using the Statistica 6.0 software (Statsoft, 2001).

RESULTS AND DISCUSSION

As reported for other insect species, the same CTT triplet determines the amino acid leucine in the equivalent position 1014 of the sodium channel protein in the *C. hominivorax* (data not shown), and a single-step mutation would allow the substitution to a phenylalanine, which may be selected by the use of pyrethroids. The frequencies of L1014F and W251S mutations in the *C. hominivorax* populations are presented in Table 1. For the kdr mutation (L1014F), no mutant individuals were found in any of the populations investigated (note in Figure 2A the absence of a 72-bp fragment that is diagnostic for the presence of mutation). Although the L1014F kdr mutation appears to be a common mechanism associated with pyrethroid resistance in other species, the absence of this mutation in our analysis may mean that this variation did not arise in *C. hominivorax* populations, or that with our sampling we were unable to detect this mutation.

Table 1. Genotypes of individuals from ten *Cochliomyia hominivorax* populations, for the L1014F kdr and W251S mutations.

Populations	N	Latitude/Longitude	kdr mutation frequency (%)	W251S mutation			Mutant allele frequency (%)
				Frequency of genotypes			
				MM	WW	MW	
Pinheiro Machado (Brazil)	16	31° 34S/53° 23W	0	0	11	5	15.62
Carambei (Brazil)	16	24° 55S/50° 05W	0	0	4	12	37.50
Estiva (Brazil)	15	22° 27S/46° 01W	0	3	4	8	46.67
Caiapônia (Brazil)	15	16° 57S/51° 48W	0	2	6	7	36.67
Santa Maria das Barreiras (Brazil)	17	08° 52S/49° 42W	0	1	5	11	38.23
Bañados de Medina (Uruguay)	16	32° 23S/54° 21W	0	1	8	7	28.12
Ybytymi (Paraguay)	15	25° 46S/56° 41W	0	2	3	10	46.67
Encontrados (Venezuela)	16	09° 03N/72° 14W	0	16	0	0	100
Turbo (Colombia)	16	08° 05N/76° 43W	0	14	0	2	93.75
Ciego de Ávila (Cuba)	15	21° 50N/78° 46W	0	0	10	5	16.67

MM = mutant homozygote; WW = wild-type homozygote; MW = heterozygote; N = total number of individuals analyzed.

Besides PCR-RFLP, ASPCR was also standardized in *C. hominivorax* as an alternative technique to screen individuals rapidly (Figure 2B). Since kdr mutant individuals were not found, the ASPCR was applied in a mutant strain of *M. domestica* (kdr-579, mutant homozygous for kdr; Farnham et al., 1987) to test this method in detecting the mutant allele

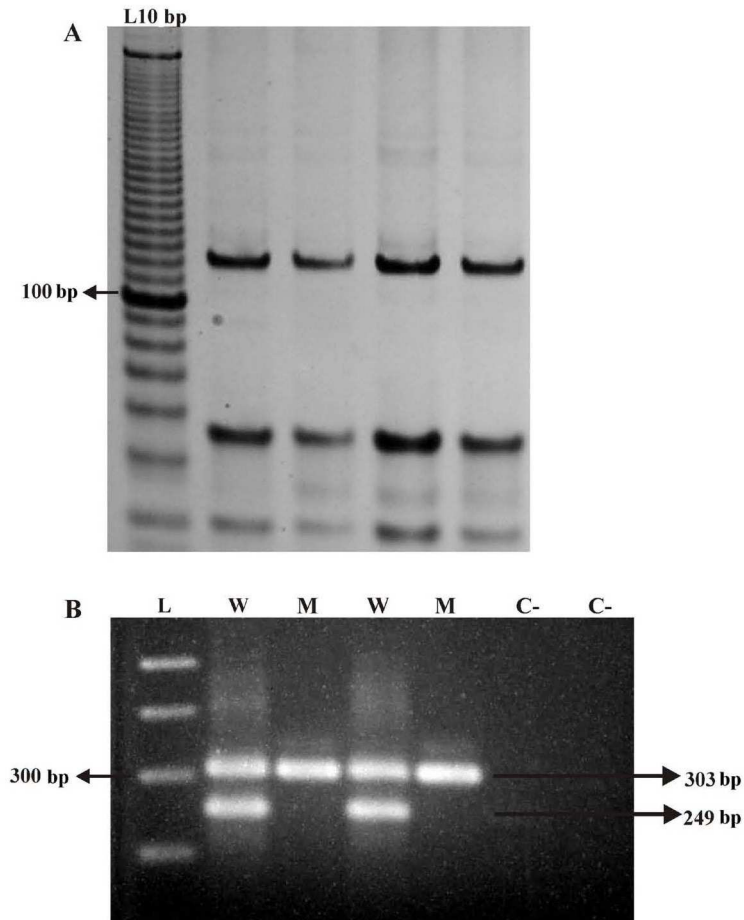


Figure 2. A. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism result to detect the L1014F *kdr* mutation in *Cochliomyia hominivorax* samples. All individuals are wild-type (genotype is deduced by the absence of a fragment of 72 bp). L10 bp = 10-bp DNA ladder. B. Allele-specific polymerase chain reaction result for *Cochliomyia hominivorax* samples. For each sample two reactions were performed, where W is the reaction to detect the wild-type allele, and M is the reaction to detect the mutant allele. C- = negative control. L = 1-kb DNA plus ladder. The lengths of control and diagnostic fragments are 303 and 249 bp, respectively, as shown in Figure 1.

(data not shown). Despite using DNA from *M. domestica*, the conditions of amplification for the ASPCR were the same used for *C. hominivorax*, demonstrating that ASPCR, used under standardized conditions, is also able to identify the mutant allele.

In contrast to the *kdr* mutation, the W251S mutation in the E3 gene of *C. hominivorax* was found in different frequencies in the populations analyzed (Table 1). The amplified fragment of 531 bp, digested with the endonuclease *StyI*, showed three different band patterns, representing the three different genotypes, mutant and wild-type homozygotes and heterozygotes (Figure 3). All mutant individuals showed the same substitution (guanine to cytosine in the second position), causing a change of tryptophan (W) to serine (S) in the respective codon.

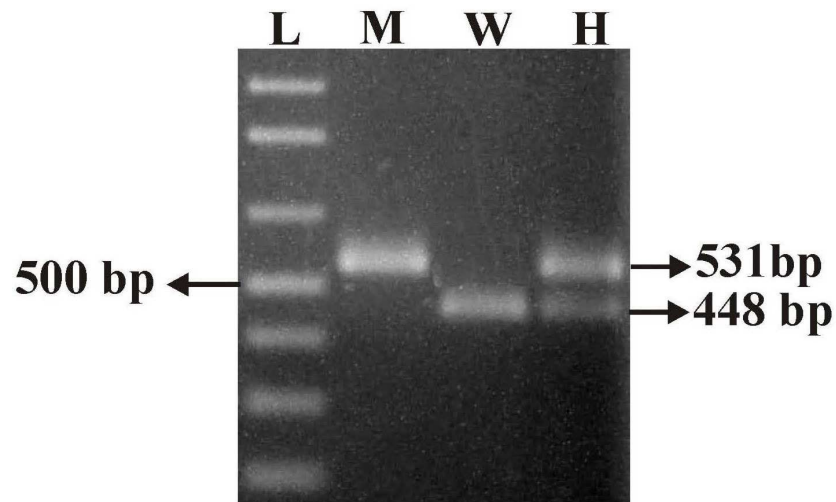


Figure 3. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism to detect the W251S mutation in the E3 gene of *Cochliomyia hominivorax* individuals. M = mutant; W = wild-type; H = heterozygote. L = 1-kb DNA plus ladder.

Mutations of tryptophan to leucine or serine in this residue, related to OP resistance, especially malathion, are well characterized in *L. cuprina* (Campbell et al., 1998) and *M. domestica* (Taskin and Kence, 2004), respectively.

However, recent studies, using *in vitro* site-directed mutagenesis in *L. cuprina*, showed that different substitutions in the residue W251 (S,T,G,A) increased pyrethroid hydrolysis, with W251L having the greatest effect (Heidari et al., 2005; Devonshire et al., 2007). This residue is localized in a region that is considered to be a subsite (acyl-binding pocket) of the active site of E3 enzyme, and all these substitutions are to smaller residues, which make the acyl-binding pocket larger and therefore more able to accommodate the bulky acyl groups of the synthetic pyrethroids and their analogs (Devonshire et al., 2007). The W251L substitution in the *D. melanogaster* orthologue gene also increased pyrethroid hydrolysis (Heidari et al., 2005). Some studies have demonstrated that the role of carboxylesterases in resistance, including cross-resistance, may originate from over-expression and point mutations in esterase-coding genes (Brogdon and Barber, 1990; Chen and Sun, 1994; Bisset et al., 1997; Baffi et al., 2007).

In Brazilian *C. hominivorax* populations, the highest allelic frequency (46.67%) found for the W251S mutation was in the sample from Estiva (Minas Gerais), and the lowest frequency (15.62%) was found for the samples from Pinheiro Machado (Rio Grande do Sul) (Table 1). In addition to the selection pressure by the use of OP insecticides, this mutation could be selected by the use of pyrethroid compounds.

In Uruguay, the use of pyrethroids to control myiasis-causing flies seems to be more common, but the frequency found for the mutant allele was noted to be 28.12% (Table 1). However, no information could be found regarding how long pyrethroid insecticides have been used. Populations from Venezuela and Colombia displayed the highest

frequencies of W251S mutation, 100 and 93.75%, respectively (Table 1). A curious result obtained was the heterozygote deficit observed for the W251S mutation in these countries (Table 1). Based on our data, we were unable to formulate a conclusive explanation for this, but naturally, we cannot ignore the possible Wahlund effect, because of sampling strategy in these countries (the samples of these two localities were obtained from veterinary clinics). Therefore, it is possible that two different subpopulations were evaluated, instead of one, in these localities. In Cuba, the official register for the presence of *C. hominivorax* was carried out only in 1995, and until recently, lindane (a GABA inhibitor) was used to control this fly (FAO, 1999). These facts and the probable recent use of OP or pyrethroid compounds to control myiasis-causing flies may explain the low frequency of W251S mutation in that country (Table 1). Except for Brazil, only one population of each country was investigated as a preliminary survey. An analysis of other populations may contribute to obtaining a more exact profile of insecticide resistance in this ectoparasite in the South America and Caribbean region.

The development of different mechanisms of insecticide resistance depends on biological, genetic and ecological factors, besides the management tactics used in each region (Guerrero and Barros, 2006). The results found for the populations analyzed are related to management tactics for livestock in different regions, which include the class of insecticide used, time of use, and method and frequency of the applications, as well as the frequent use of suboptimal doses and concentrations. Unfortunately, it is very difficult to obtain information from government agencies regarding the management tactics to control this ectoparasite in the different regions analyzed. However, the monitoring of common mechanisms for different species may provide interesting information for the investigation of the evolution and spread of well-characterized resistance genes.

Considering the association of W251S with pyrethroid hydrolysis (Heidari et al., 2005; Devonshire et al., 2007), its presence in all populations investigated and the absence of L1014F kdr mutation, a bioassay was conducted to investigate if the presence of this mutation in the E3 gene of *C. hominivorax* really confers a greater chance of survival in the presence of a pyrethroid insecticide. The percentage of survival for each concentration is presented in Table 2. No difference among replicates was observed, and the highest concentration killed the majority of individuals (96.7% mortality). Despite the 2-fold difference between the two lowest concentrations, the survival was similar for both (Table 2). None of the individuals analyzed showed the L1014F kdr mutation, but the presence of W251S mutation was found in individuals from the three concentrations analyzed (Table 3). The Fisher exact test was applied to determine if the presence of mutant allele was significantly correlated with survival in the presence of insecticide. For that, the number

Table 2. Susceptibility of *Cochliomyia hominivorax* larvae to cypermethrin for each concentration tested (with three replicates, and with 50 larvae each, totaling 150 larvae per concentration).

Cypermethrin ($\mu\text{g/mL}$)	% alive individuals
37.5×10^{-12}	3.3
7.5×10^{-12}	38.0
3.7×10^{-12}	58.7
1.8×10^{-12}	64.7
Control	99.3

Table 3. Number of mutant and wild alleles found in dead and alive *Cochliomyia hominivorax* larvae for the three cypermethrin concentrations analyzed from the bioassay.

Cypermethrin ($\mu\text{g/mL}$)	Number of mutant alleles		Number of wild alleles		N
	Alive	Dead	Alive	Dead	
^a 37.5×10^{-12}	6	14	4	16	20
^b 7.5×10^{-12}	22	14	8	16	30
^c 1.8×10^{-12}	16	3	14	27	30

^aFisher exact test: $P = 0.221$, $\alpha = 0.05$; $P = 0.024$, $\alpha = 0.05$; $P = 0.0003$, $\alpha = 0.05$ from the highest concentration to the lowest concentration, respectively. N = total number of individuals analyzed.

of mutant and wild alleles found in dead and alive individuals for each concentration was considered (Table 3).

At the lowest and intermediate concentrations, the Fisher exact test ($P = 0.0003$, $\alpha = 0.05$, and $P = 0.024$, $\alpha = 0.05$, respectively) indicated that the presence of alleles with the W251S mutation is indeed correlated with the chance of survival in the presence of insecticide. This probably occurs because this mutation confers to the enzyme a higher capacity for metabolizing the insecticide (cypermethrin) before it reaches the target site. However, at the highest concentration, the analysis was impaired since only five individuals survived in the three replicates ($P = 0.221$, $\alpha = 0.05$; Fisher exact test). This concentration was probably too high, making it impossible for the insecticide to be completely metabolized, even by mutant individuals. Besides, type II pyrethroids (those having an α -cyano group), like cypermethrin, are generally more hard to hydrolysis by invertebrate esterases (review in Heidari et al., 2005).

Considering the use of pyrethroid and/or OP compounds to control myiasis-causing flies in the different regions investigated, the absence of the L1014F kdr mutation, the presence of the W251S mutation in all populations, and the bioassay results, this mutation possibly confers cross-resistance to OP and pyrethroid compounds in *C. hominivorax*. Additionally, mutations (W251S and G137D) in the E3 gene appear to be one of the main resistance mechanisms selected for *C. hominivorax*. This latter conclusion is reinforced by two facts: the presence, in *C. hominivorax* samples from South America, of another mutation in the E3 esterase (G137D) (de Carvalho et al., 2006), also associated with OP resistance, and the absence of mutations, associated with OP resistance, in the acetylcholinesterase gene in almost all samples of the same localities investigated herein, with only two mutant individuals found in Pinheiro Machado (Brazil) (Silva NM, Carvalho RA, Azeredo-Espin AML, unpublished results). Since these same amino acid substitutions are also found in the E3 orthologous genes of *L. cuprina* and *M. domestica* (Campbell et al., 1998; Taskin and Kence, 2004), this indicates that these mutations may be a common mechanism of resistance, at least, in the order Diptera.

Although the W251S mutation was found in *C. hominivorax* populations and even though a significant correlation was seen between this mutation and survival in the bioassay, other bioassays (with different populations and pyrethroid compounds) need to be conducted for a better understanding of the role of the W251S mutation in pyrethroid hydrolysis in this species. In further studies, other metabolic mechanisms not investigated herein, such as over-production of enzymes involved in detoxification processes (Vulule

et al., 1999; Kasai and Scott, 2000; Strode et al., 2008), will be investigated because they may also be acting together to confer some resistance. Another possibility that needs to be investigated is an alternative target site insensitivity mechanism that is mediated by a sodium channel mutation other than the L1014F mutation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank R.A. Rodrigues, S.M. Couto and A.S. Oliveira for their valuable technical assistance and A.C. da Rosa for help in the collection of samples from Estiva (Minas Gerais State, Brazil). We are also grateful to M.L. Lyra and R.A. Carvalho for valuable suggestions regarding the manuscript and data analyses, and the International Atomic Energy Agency (IAEA) for providing the samples from the Caribbean region. Research supported by a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) to A.M.L.A.E. (grants #03/01458-9 and #07/54431-1), and N.M.S. was supported by a fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant #141277/2005-0).

REFERENCES

- Baffi MA, de Souza GR, Vieira CU, de Sousa CS, et al. (2007). Identification of point mutations in a putative carboxylesterase and their association with acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 148: 301-309.
- Bisset J, Rodriguez M, Soca A, Pasteur N, et al. (1997). Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides in the southern house mosquito (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J. Med. Entomol.* 34: 244-246.
- Brogdon WG and Barber AM (1990). Fenitrothion-deltamethrin cross-resistance conferred by esterases in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 37: 130-139.
- Campbell PM, Newcomb RD, Russel RJ and Oakeshott JG (1998). Two different amino acid substitutions in the esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 139-150.
- Carvalho RA, Torres TT, Paniago MG and Azeredo-Espin AM (2009). Molecular characterization of esterase E3 gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Med. Vet. Entomol.* 23 (Suppl 1): 86-91.
- Chen WL and Sun CN (1994). Purification and characterization of carboxylesterases of a rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24: 347-355.
- Coronado A and Kowalski A (2009). Current status of the New World screwworm *Cochliomyia hominivorax* in Venezuela. *Med. Vet. Entomol.* 23 (Suppl 1): 106-110.
- Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR and Williamson MS (2007). A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Mol. Biol.* 16: 361-375.
- de Carvalho RA, Torres TT and de Azeredo-Espin AM (2006). A survey of mutations in the *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) esterase E3 gene associated with organophosphate resistance and the molecular identification of mutant alleles. *Vet. Parasitol.* 140: 344-351.
- Devonshire AL, Heidari R, Huang HZ, Hammock BD, et al. (2007). Hydrolysis of individual isomers of fluorogenic pyrethroid analogs by mutant carboxylesterases from *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37: 891-902.
- FAO (Food and Agriculture Organization) (1999). Programa de cooperación técnica. Control del gusano barrenador del ganado para apoyar el desarrollo agropecuario. Cuba. Relación final TCP/CUB/6613. FAO, Rome.
- Farnham AW, Murray AWA, Sawicki RM, Denholm I, et al. (1987). Characterization of the structure-activity relationship of kdr and two variants of super-kdr to pyrethroids in the housefly (*Musca domestica* L.). *Pest. Manag. Sci.* 19: 209-220.
- French-Constant RH, Pittendrigh B, Vaughan A and Anthony N (1998). Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 353: 1685-1693.
- Guerrero FD and Barros AT (2006). Role of kdr and esterase-mediated metabolism in pyrethroid-resistant populations of *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae) in Brazil. *J. Med. Entomol.* 43: 896-901.

- Hall M and Wall R (1995). Myiasis of humans and domestic animals. *Adv. Parasitol.* 35: 257-334.
- Heidari R, Devonshire AL, Campbell BE, Dorrian SJ, et al. (2005). Hydrolysis of pyrethroids by carboxylesterases from *Lucilia cuprina* and *Drosophila melanogaster* with active sites modified by *in vitro* mutagenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 597-609.
- Kasai S and Scott JG (2000). Overexpression of cytochrome P450 CYP6D1 is associated with monooxygenase-mediated pyrethroid resistance in house flies from Georgia. *Pestic. Biochem. Physiol.* 68: 34-41.
- Lindquist DA, Abusowa M and Hall MJ (1992). The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Med. Vet. Entomol.* 6: 2-8.
- Newcomb RD, Campbell PM, Ollis DL, Cheah E, et al. (1997). A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 7464-7468.
- Oakeshott JG, Home I, Sutherland TD and Russell RJ (2003). The genomics of insecticide resistance. *Genome Biol.* 4: 202.
- Ranson H, Claudianos C, Ortelli F, Abgrall C, et al. (2002). Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298: 179-181.
- SINDAN (2009). Compêndio de Produtos Veterinários. Available at [<http://www.cpvs.com.br/cpvs/index.html>]. Accessed June 2, 2009
- Soderlund DM and Knipple DC (2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 563-577.
- StatSoft, Inc. (2001). Statistica for windows v. 6.0. StatSoft, Tulsa.
- Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, et al. (2008). Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 113-123.
- Taskin V and Kence M (2004). The genetic basis of malathion resistance in housefly (*Musca domestica* L.) strains from Turkey. *Genetika* 40: 1475-1482.
- Vargas ME and Espin AM (1995). Genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochem. Genet.* 33: 237-256.
- Vargas-Terán M, Hofmann HC and Tweddle NE (2005). Impact of Screwworm Eradication Programmes Using the Sterile Insect Technique. In: Sterile Insect Technique - Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management (Dick VA, Hendrichs J and Robinson AS, eds.). Springer, Netherlands, 629-650.
- Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, McAllister JC, et al. (1999). Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Med. Vet. Entomol.* 13: 239-244.
- Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA and Devonshire AL (1996). Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 252: 51-60.
- Wyss JH (2000). Screwworm eradication in the Americas. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916: 186-193.

4. Artigo 2

Submetido para Pest Management Science

Geographical distribution of mutations associated with organophosphate resistance in *Cochliomyia hominivorax* (Diptera; Calliphoridae).

Norma Machado da Silva^{1,2}; Renato Assis de Carvalho^{1,2}; Ana Maria Lima de Azeredo-Espin^{1,2}

1.Laboratório de Genética Animal, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6010, 13083-875 Campinas, SP, Brazil.

2.Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brazil.

Correspondence: Norma Machado da Silva
Laboratório de Genética e Evolução Animal
CBMEG,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
P.O. Box 6010
13083-875
Campinas, SP, Brazil

E-mail: normamsilva@yahoo.com.br

Phone: +55-19-3521-1141

Fax: +55-19-3521-1089

Running title: Organophosphate resistance in *C. hominivorax*

Abstract

BACKGROUND: *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) is one of the most important myiasis-causing flies in the Neotropics, however little is known about insecticide resistance in this species. Based on previous studies, G137D mutation frequency in carboxylesterase E3 gene, associated with organophosphate (OP) resistance, was analyzed throughout its geographical distribution. Besides, the acetylcholinesterase (AChE) gene, target site of OP insecticides, was characterized in order to investigate the frequency of mutations (I298V, G401A, F466Y) also involved in resistance. A putative model for the AChE three-dimensional structure and possible alterations caused by resistance mutations are discussed.

RESULTS: A high frequency of E3 mutants (G137D) was found in some localities in Brazil and Uruguay. In Cuba, Venezuela and Colombia no G137D mutant was found, a finding that may be related to the insecticides used for *C. hominivorax* control or non existence of mutant allele in these localities. In contrast with the high frequency of E3 mutants in some localities, only 2/135 AChE mutant individuals (F466Y) were found from field samples.

CONCLUSION: These results indicate that mutations in the E3 gene may be one of the main resistance mechanisms selected in this livestock ectoparasite.

Keywords: *Cochliomyia hominivorax*, acetylcholinesterase, carboxylesterase E3, insecticide resistance.

1. INTRODUCTION

The New World screwworm (NWS) *Cochliomyia hominivorax* is one of the most important myiasis-causing flies in the Neotropics. These flies are important ectoparasites, characterized by the ability of their larvae to develop in the flesh of vertebrates. Infestations by these flies may cause severe economic losses, especially due to mortality in new born calves, reduced milk production, losses in weight and fertility and poor hide quality.¹

Although the Sterile Insect Technique (SIT) was successful for NWS eradication in North and Central America², this fly has been controlled mainly by applying insecticides throughout its current geographical distribution. The intensive use of insecticides has led to the selection of resistant individuals in many species. The main resistance mechanisms developed by insects are the modification of the insecticide target protein and alteration in the levels or activities of detoxification proteins.³

The organophosphate-based compounds, the main insecticides used for NWS control, have the acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) enzyme as the primary target site of action. They phosphorylate or carbamylate the active site serine to block the hydrolysis of acetylcholine, leading to the death of the insect.⁴ Point mutations in the AChE gene, resulting in an altered enzyme, have been described for resistant strains of different insect species, such as *Drosophila melanogaster*,⁵ *Musca domestica*,⁶ *Bactrocera oleae*⁷ and *Haematobia irritans*,⁸ and frequently involve changes in the enzyme rendering it less sensitive to insecticides. Most of these mutations are conserved in these species and combinations of several point mutations in this enzyme have already been found in several alleles, where they induced higher levels of resistance.⁵

Although insecticide pressure has been applied intensively for decades for NWS control, little is known about the mechanisms and genes associated with insecticide resistance in this fly. Based on previous studies in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Calliphoridae), a recent investigation in NWS reported two mutations in the carboxylesterase E3 gene that may be responsible for the acquisition of OP hydrolase activity.⁹ Considering the intensive and wide use of

OP insecticide for NWS control, the frequency of G137D mutation in the E3 (metabolic mechanism) gene was analyzed throughout its current geographic distribution. In addition, the entire coding region of AChE (target site) gene was characterized and the frequency of substitutions in this gene, involved in OP resistance, also was investigated at the same populations.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Samples and DNA/RNA extraction

Cochliomyia hominivorax larvae samples were collected between 2003 and 2006 in natural populations from several regions throughout Brazil (Caiapônia/Goiás, Estiva/Minas Gerais, Santa Maria das Barreiras/Pará, Carambeí/Paraná and Pinheiro Machado/Rio Grande do Sul), Venezuela (Encontrados), Uruguay (Bañado de Medina), Colombia (Turbo), Cuba (Ciego de Ávila) and from the ARS-USDA Laboratory, in Fargo (North Dakota, USA). The Fargo strains used were Cañas (Cañas, Costa Rica), OW87 (Orange Walk, Belize), FC96 (Chiapas, México), V81 (Vera Cruz, México) and Jam3b (Jamaica). These Fargo strains, which were field sampled in the 1980's, were obtained from the USDA Laboratory in 1993. Ten individuals from each locality (one per wound) were used in order to analyze the frequency of E3 mutants, whereas for the AChE gene, 15 individuals from each locality were analyzed (from at least 10 wounds).

DNA from larvae was extracted using the phenol-chloroform method,¹⁰ to perform the frequency analyses of mutations in the E3 and AChE genes. To AChE characterization, total RNAs were extracted from a pool of five fresh *C. hominivorax* larvae using Trizol (Invitrogen) and the cDNA was synthesized using the SMART cDNA PCR synthesis kit (Clontech Laboratories), according to the manufacturer's instructions.

2.2 PCR-RFLP of E3 gene

The amplification conditions of the fragment of E3 gene containing the position of G137D substitution, related to OP resistance, were used according to Carvalho *et al.*, 2006.⁹ The mutation was identified by cleaving the PCR products with the endonuclease *Tsp45 I* (New England BioLabs), according to manufacturer's instructions.

2.3 Characterization of entire AChE cDNA

The primers used for the amplification of the entire AChE coding region, Ache5 (5' CGTCTACTATTATGGCTCG 3'), Ache3 (5' TTGAAAATGCATGTGACC 3'), Achef2 (5' CGATCCTGATCATTTAATCC 3') and Acher2 (5' CCTCATCCTTGACATTTCC 3') (Fig. 1) were designed based on the *L. cuprina* acetylcholinesterase nucleotide sequence.¹¹ The complete sequence was obtained through the amplification of two fragments using the Ache5/Acher2 and Achef2/Ache3 primer combinations. The 50µl PCR mix contained approximately 100ng of double strand cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1 unit of *Taq* polymerase (Invitrogen), 70 µM of each dNTP, 3.5 mM MgCl₂, 0.5mg/ml BSA and 0.5 µM of each primer. The PCRs were carried out in a Perkin-Elmer 9600 Thermal Cycler. After an initial denaturing step of 3 min at 96°C, 35 cycles were performed, each one consisting of 1 min at 95°C, 1 min at 52°C and 2 min at 72°C, with a final step of 10 min at 72°C to fully extend all amplicons.

2.4 Amplification of AChE gene fragments for frequency analysis of mutations

Based on the AChE sequence obtained, a new pair of *C. hominivorax*-specific primers, Achef3 (5' AATCCCCAATCGGTTATG 3') and Acher3 (5'

TTGCAATCATTTATCAAAGC 3') were designed (Fig. 1) in order to analyze the occurrence of point mutations associated with OP resistance and to avoid the amplification of one intron. The conditions obtained for the new combinations of primers, Achef2/Acher3 and Achef3/Acher2, in a reaction mix of 50 μ l were: 25-100 η g of genomic DNA, 2.5 mM MgCl₂, 2 unit of *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 100 μ M each dNTP, 0.5mg/ml of BSA and 0.25 μ M of each primer. The PCR was performed in a PTC 200 MJ Research thermal cycler. After an initial denaturing step of 2 min at 94 $^{\circ}$ C, 35 cycles were performed, each one consisting of 50 seconds at 94 $^{\circ}$ C, 50 seconds at 53 $^{\circ}$ C and 50 seconds at 72 $^{\circ}$ C, with a final extension step of 20 min at 72 $^{\circ}$ C.

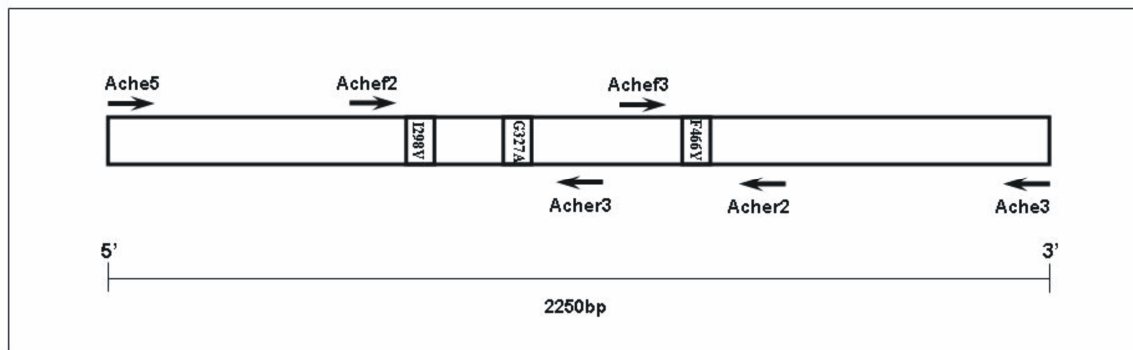


Figure 1. Schematic view of AChE cDNA from *Cochliomyia hominivorax* showing the mutation positions (I298V, G401A, F466Y), associated with organophosphate resistance, and the hybridization position of primers.

2.5 Cloning and Sequencing

The PCR products used in frequency analysis of mutations in the AChE gene were purified using the QIAquick[®] PCR purification Kit (Qiagen) and directly sequenced. The nucleotide sequence with a double peak in chromatogram to frequency analysis and the fragments obtained in AChE cDNA amplification were cloned into the pGEM-T plasmid vector (Promega) and sequenced (six for AChE frequency analysis and three for each fragment for AChE characterization).¹² Sequencing was performed with the Big Dye[™]

Terminator Cycle Sequencing Ready Kit, version 3.0 (ABI Prism™, Perkin Elmer) and an ABI 3700 Applied Biosystems Model automated DNA sequencer. The nucleotide sequences of NWS were submitted to BLASTN¹³ to search for similarities, and sequence alignments were carried out using ClustalX.¹⁴

2.6 Bioinformatic analyses

The prediction of signal peptide was performed using Signal P v.3.0.¹⁵ The deduced AChE amino acid sequence (wild and mutant) was modeled using the default settings and parameters of the two automated homology modeling programs, Swiss Model server¹⁶ and Modeller server.¹⁷ The three-dimensional structure of *D. melanogaster*¹⁸ (Protein Data Bank accession number 1qo9) was used as template. The mutations were introduced manually in the sequence and the structures modeled were viewed and analyzed using the web-based program BlueStar STING.¹⁹ The root mean square deviation (RMSD) between the matched structures of *D. melanogaster* and *C. hominivorax* was calculated using the Combinatorial Extension (CE) Method,²⁰ using default settings.

3. RESULTS

3.1 Frequency of E3 mutants

The PCR product corresponds to an amplified DNA fragment of 536 bp (data not shown) of E3 gene, which contains the amino acid position (G137) responsible for conferring OP resistance.²¹ PCR-RFLP permitted identify a high frequency of mutant individuals (G137D) in Uruguay and in almost all Brazilian States analyzed, with the exception of Pará (Table 1). However in Cuba, Venezuela, Colombia and strains from Laboratory of ARS-USDA in Fargo (North Dakota, USA) no G137D mutant was found.

Table 1. Genotypes and mutant allele frequency for the G137D mutation, from *Cochliomyia hominivorax* populations.

Populations	Lat/Long	Frequency of genotypes			Mutant allele frequency (%)
		MM	WW	MW	
Pinheiro Machado (Brazil)	31° 34S/ 53° 23W	3	2	5	55
Carambeí (Brazil)	24° 55S/ 50° 05W	5	0	5	75
Estiva (Brazil)	22° 27S/46° 01W	4	4	2	50
Caiapônia (Brazil)	16° 57S/51° 48W	4	2	4	60
Santa Maria das Barreiras (Brazil)	08° 52S/49° 42W	1	7	2	20
Bañados de Medina (Uruguay)	32° 23S/54° 21W	5	0	5	75
Encontrados (Venezuela)	09° 03N/72° 14W	0	10	0	0
Turbo (Colômbia)	8° 05N/76° 43W	0	10	0	0
Ciego de Ávila (Cuba)	21° 50N/78° 46W	0	10	0	0

MM: mutant homozygote; WW: wild homozygote; MW: heterozygote; Lat/Long: Latitude/Longitude

3.2 Characterization of AChE sequence

Besides E3 mutant frequency, the OP target site (AChE) was characterized in order to investigate other mutations involved in resistance. The nucleotide sequence of NWS AChE showed 11 non-synonymous substitutions among the clones sequenced. Three differences were localized in the signal peptide (N-terminal) and one in the C-terminal region, which are cleaved of protein, and seven substitutions in the mature protein not described yet to be involved in insecticide resistance. Due to non existence of a NWS susceptible strain to be compared with the field samples this work investigated only the conserved sites characterized for conferring OP resistance in other species. Analyses of protein were performed in a consensus sequence obtained from three clones of each part of the gene (two fragments were amplified to obtain the complete coding region).

The sequence for cDNA ORF of NWS AChE is comprised of 2250 nucleotides (GenBank accession number FJ830868), which presents significant nucleotide identity (88%) with the AChE of *L. cuprina*. The deduced amino acid sequence of NWS AChE was compared to the AChE amino acid sequences from other fly species, showing a high identity with: *L. cuprina* (93%), *H. irritans* (90%),

M. domestica (90%) and *D. melanogaster* (88%) (Fig. 2). The W222 residue (position according to sequence of *C. hominivorax*), the main component of the choline binding site, is conserved among the species. The predicted members of the catalytic triad correspond to residues in the positions Serine374, Glutamate503 and Histidine616 (S200, E327, H440 in *Torpedo californica*²²).

The highly divergent regions between the AChE sequences are the signal peptide (N-terminal), cleaved from the mature protein during secretion,²³ and the C-terminal region, replaced by a glycolipid anchor (GPI-anchor) during post-translation modifications.²⁴ Despite of divergence in these regions (Fig. 2), the primers designed based on *L. cuprina* sequence worked to NWS. Based on the alignment and description of the signal peptide for other species,^{11,25,26} the potential signal peptide in NWS has a length of 139 amino acids and is serine-rich (34.53% in *C. hominivorax*). The GPI Prediction Server, version 3.0,²⁷ indicated the S721 residue as a potential GPI modification site in the C-terminal region.

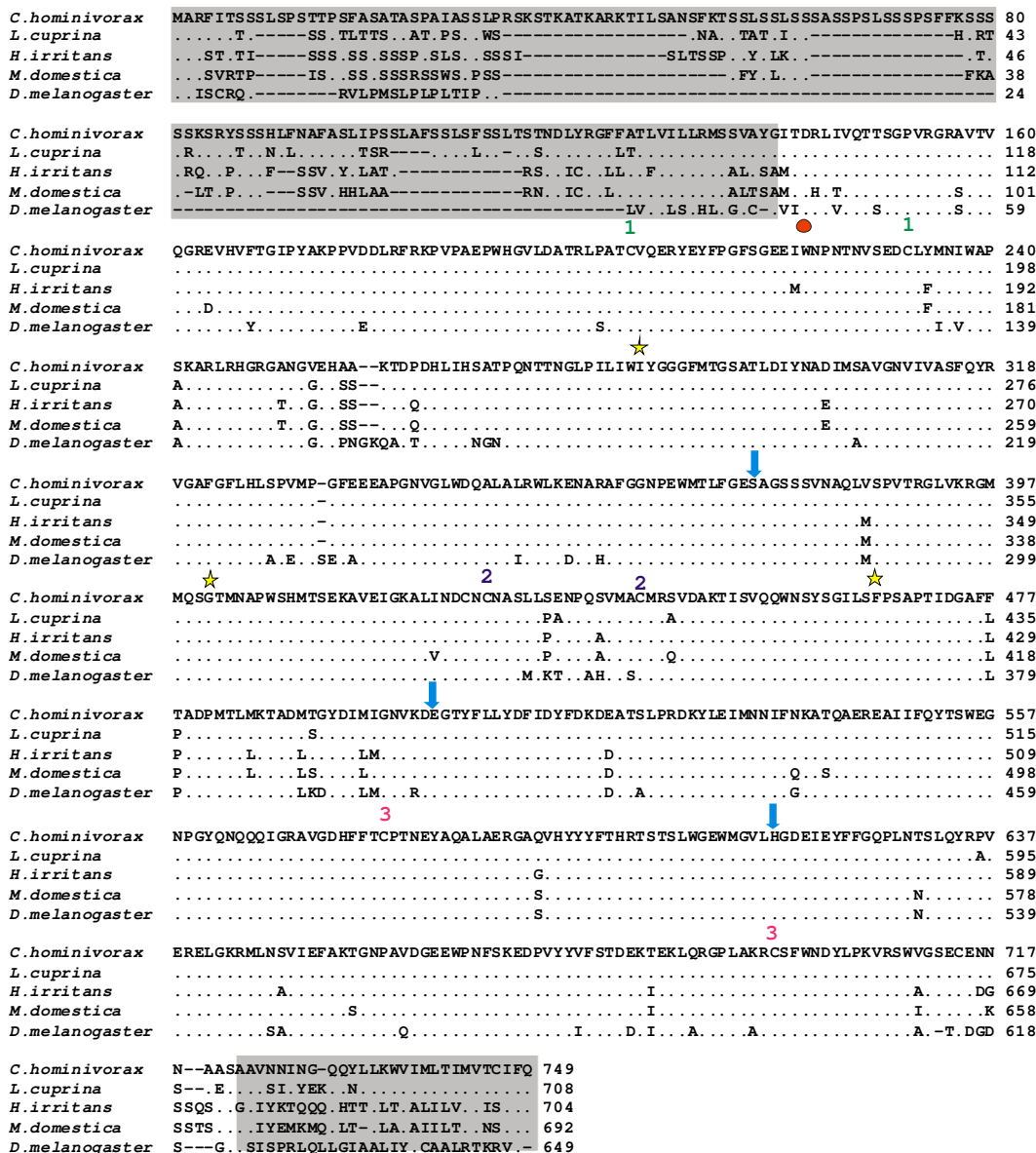


Figure 2. Multiple sequence alignment of AChE protein sequences for *C. hominivorax*, *L. cuprina* (AAC02779), *H. irritans* (AAS45645), *M. domestica* (CAC39209) and *D. melanogaster* (NP_476953). Positions of the three disulfide bond linkages are indicated by numbers above participating cysteine pairs. The members of the catalytic triad (S374, E503, H616) are indicated by arrows, the sites characterized for conferring insecticide resistance (I298, G401, F466) are indicated by stars and the main component of choline binding site (W222) is indicated by a circle. The N- and C-terminal sequences, which are cleaved of protein, are shaded.

3.3 Frequency of AChE mutants

In several *D. melanogaster* resistant strains the presence of four point mutations were detected in the AChE gene. The G265A mutation and the triple mutant I161V/G265A/F330Y were the most frequent.⁴ These three point mutations, also analyzed by *in vitro* site-directed mutagenesis in *L. cuprina* AChE cause, singly and in combination, considerable insensitivity levels to OP.¹¹ Based on these findings, these point mutations were investigated in natural populations and in the modeling of protein.

The amplifications using the combinations of primers Achef2/Acher3 and Achef3/Acher2 (Fig. 1) produced fragments of 500bp and 206bp, respectively (data not shown), which contain the point mutations associated with insecticide resistance described in resistant strains of *D. melanogaster* and *M. domestica*.^{5,6} These point mutations correspond to the I298V, G401A and F466Y positions in the NWS sequence. For these points, no mutant individuals were found in most of the populations analyzed. Only two F466Y mutant individuals were found in Pinheiro Machado (RS, Brazil), one homozygote and one heterozygote. However these individuals may be sibling samples, since they were obtained from the same wound.

3.4 Molecular Modeling

The aim of this *in silico* analysis was to compare the interactions established by the catalytic triad, in the wild and mutant protein, and possible alterations in the protein structure caused by resistance mutations. This type of analysis may contribute to understand the molecular mechanism associated with these alterations. For this, a three-dimensional structure of wild and mutant AChE was modeled. The three mutations investigated were introduced in the protein sequence for this analysis, although only the F466Y mutation was found in the field. According to the analysis of the Ramachandran plot, the structures modeled using the Modeller program presented a better quality. Based on this

model, the analyses of root mean square deviation (RMSD) value between the α -carbons of the matched structures is 0.7Å, indicating high similarity among the template and the modeled structures. The catalytic triad residues (S374, E503, H616) establish different types of interactions among themselves. In the wild protein, the residues S374 and E503 establish contact with H616 through one hydrophobic and three attractive charge interactions, respectively. However, in the mutant protein the contact between S374 and H616 is lost and, interestingly, the S374 establishes two hydrophobic interactions with the point mutation A401 (alanine), associated with insecticide resistance (Fig. 3A). F466Y mutation found in the field establishes a new hydrophobic interaction (Fig. 3B).



Figure 3. (A) Schematic view to show the internal contacts established by residues of the catalytic triad and (B) by resistance mutation found in the field, in the wild and mutant AChE protein. The traces indicate a hydrophobic interaction and dotted lines indicate a charge attractive interaction. The number of traces or dotted lines indicate the number of interactions established. The residues in bold face indicate new interactions established in the mutant protein.

4. DISCUSSION

Based on intense and wide use of OP insecticides for NWS control, two of the main mechanisms associated with OP resistance, alteration in the target site (AChE) and in a metabolic enzyme (E3), were investigated. In a previous study, a fragment of the carboxylesterase E3 gene of *C. hominivorax* was sequenced and the G137D mutation, responsible for conferring organophosphate resistance

in *L. cuprina*, was found.⁹ The high conservation of mutations in these genes suggests that the same resistance mechanisms could have evolved in *C. hominivorax*.

The survey of geographical distribution of mutations in these genes in *C. hominivorax* revealed only a high frequency of mutants for G137D in the E3 gene in some Brazilian populations and Uruguay (Table 1). Considered as a general form of OP resistance, the G137D mutation has been found in all Brazilian regions analyzed, where OP insecticides have been used intensively for NWS control. The low frequency in Pará (Brazil) could be related to the recent livestock activity in this region, whereas the lack of mutants in Colombia, Venezuela and Cuba may be related to either absence of mutant allele (D137) in these populations or the low insecticide pressure. The samples from Fargo in the USA, a field sampled in the 1980's and maintained without insecticides for many years, did not present the mutation.

A recent investigation of the W251S mutation in the NWS E3 gene, also involved with insecticide resistance, showed considerable mutant individuals frequency in the most of Brazilian populations. In this study, high mutant individuals frequency was found in Venezuela, Colombia, Paraguay and Uruguay.²⁸ In addition to the selection by dimethyl OP, this mutation could be undergoing selection by the use of pyrethroid insecticides, since this mutation has also been associated with pyrethroid hydrolysis,²⁹ and at least for the Brazil and Uruguay pyrethroid insecticides have been used to control this species.

Some insect species of the Orthorrhapha group present more than one AChE gene, denominated Ace1 and Ace2. However, no species of Cyclorrhapha group ("true flies") analyzed, including *D. melanogaster* and *L. cuprina*, presented the Ace1 gene.³⁰ The existence of another ace gene was not investigated in *C. hominivorax*. However, the high similarities found between this AChE and the other dipteran AChEs suggest that this gene is an ortholog of the AChEs of *D. melanogaster*, *M. domestica*, *H. irritans* and *L. cuprina* and, therefore, a member of the Ace2 group.³¹

Only two *C. hominivorax* individuals presented a mutated AChE allele

(F466Y). This mutation reduces the size of the acyl pocket and decreases the activity and stability of protein,³² which may be due to the new hydrophobic interaction established by mutant residue, verified in the *in silico* analysis (Fig. 3B). The low frequency of AChE mutants is curious since there is a high OP pressure in this species. As in *L. cuprina*, the mutant forms of NWS E3, rather than AChE variants, may confer OP resistance in this species. This observation could be explained in NWS by the fact that E3 may possess a higher affinity for OPs than the AChE target site itself, which may serve to protect AChE.^{33,34}

Despite G401A mutation in AChE gene was not found, this site is positioned behind the catalytic S374, and change to alanine would increase the activity of the enzyme, probably by modifying the orientation of S374, resulting in an improved efficiency of synapse cleaning.³² The two hydrophobic interactions established between the mutated residue A401 and S374 may be related to this changed orientation of S374 (Fig. 3A).

Although the level of resistance is unknown in this species, resistance detection efforts should be initiated when resistance is still rare, thus providing an early warning or some indication of the genetic potential for resistance to occur³⁵. The present report, demonstrating the high frequency of E3 mutants in *C. hominivorax*, indicates that this may be one of the main resistance mechanisms selected in this species. Further studies are underway to investigate other possible resistance mechanisms, such as the over-expression of metabolic enzymes monooxygenases, carboxylesterases and glutathione S-transferases, in order to contribute to possible control plans. The present report, demonstrating the high frequency of E3 mutants in *C. hominivorax*, indicates that this may be one of the main resistance mechanisms selected in this species. Further studies are underway to investigate other possible resistance mechanisms, such as the over-expression of metabolic enzymes monooxygenases, carboxylesterases and glutathione S-transferases, in order to contribute to possible control plans.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank R.A. Rodrigues, S. M. Couto and A.S. Oliveira for valuable technical assistance and the International Atomic Energy Agency (IAEA) for providing the samples from the Caribbean region. Samples from Fargo (USA) were provided by R. L. Roehrdanz. We are also grateful to G. Neshich and I. Mazoni for help in the analysis of protein structure. This work was supported by a grant from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant 578231/2008-5) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) to A.M.L.A.E. (grant nos. 03/01458-9 and 07/54431-1) and R.A.C. (grant no. 04/12532-8), and N.M.S. was supported by a fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant no. 141277/2005-0).

REFERENCES

- 1 Hall M and Wall R, Myiasis of human and domestic animals. *Adv Parasitol* **35**: 257-334 (1995).
- 2 Galvin TJ and Wyss JH, Screwworm Eradication Program in Central America. Vector-borne pathogens: international trade and tropical animal diseases. *Ann NY Acad Sci* **791**: 33-240 (1996).
- 3 Hemingway J, Field L and Vontas J, An overview of insecticide resistance. *Science* **298**: 96-97 (2002).
- 4 Menozzi P, Shi MA, Lougarre A, Tang ZH and Fournier D, Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *BMC Evol Biol* **4**: 4 (2004).
- 5 Mutero A, Pralavorio M, Bride JM and Fournier D, Resistance-associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5922-5926 (1994).

- 6 Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, Kristensen M, Lewis T, Devonshire AL and Williamson MS (2001) Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem J* **359**: 175-181.
- 7 Vontas JG, Hejazi MJ, Hawkes NJ, Cosmidis N, Loukas M and Hemingway J, Resistance-associated point mutations or organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Mol Biol* **11**: 329-336 (2002).
- 8 Temeyer KB, Li AY, Lohmeyer KH, Chen AC, Olafson PU, Sanson DW and Foil LD, Acetylcholinesterase mutation in diazinon-resistant *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Vet Parasitol* **154**: 300-310 (2008).
- 9 Carvalho RA, Torres TT and Azeredo-Espin AML, A survey of mutations in the *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) esterase E3 gene associated with organophosphate resistance and the molecular identification of mutant alleles. *Vet Parasitol* **140**: 344-351 (2006).
- 10 Infante-Vargas ME and Azeredo-Espin AML, Genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochem Genet* **33**: 237-256 (1995).
- 11 Chen Z, Newcomb R, Forbes E, McKenzie J and Batterham P, The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* **31**: 805-816 (2001).
- 12 Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1 (1989).
- 13 Altschul SF, Maden TL, Schäffer AA, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402 (1997).
- 14 Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG, The CustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **24**: 4876-4882 (1997).

- 15 Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G and Brunak S, Improved prediction of signal peptides: Signal P 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783-795 (2004).
- 16 Schwede T, Kopp J, Guex N and Peitsch MC, Swiss Model: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* **31**: 3381-3385 (2003).
- 17 Sali A and Blundell TL, Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**: 779-815 (1993).
- 18 Harel M, Kryger G, Rosenberry TL, Mallender WD, Lewis T, Fletcher RJ, Guss JM, Silman I and Sussman JL, Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci* **9**: 1063-1072 (2000).
- 19 Neshich G, Borro LC, Higa RH, Kuser PR, Yamagishi ME, Franco EH, Krauchenco JN, Fileto R, Ribeiro AA, Bezerra GB, Velludo TM, Jimenez TS, Furukawa N, Teshima H, Kitajima K, Bava A, Sarai A, Togawa RC and Mancini AL, The Diamond STING server. *Nucleic Acids Res* **33** (web server issue): W29-35 (2005).
- 20 Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E. (1998) Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path. *Protein Eng* **11**: 739-747.
- 21 Carvalho RA, Torres TT, Paniago MG and Azeredo-Espin AML, Molecular characterization of esterase E3 gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Med Vet Entomol* **23**: 86-91 (2009).
- 22 Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L and Silman I, Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253**: 872-879 (1991).
- 23 Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S and von Heijne G, Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**: 1-6 (1997).
- 24 Haas T, Marshall TL and Rosenberry TL, *Drosophila* acetylcholinesterase: demonstration of a glycoinositol phospholipids anchor and an endogenous proteolytic cleavage. *Biochemistry* **27**: 6453-6457 (1988).

- 25 Kim CS, Kim WT, Boo KS and Kim SI, Cloning, mutagenesis, and expression of the acetylcholinesterase gene from a strain of *Musca domestica*; the change from a drug-resistant to a sensitive enzyme. *Mol Cells* **15**: 208-215 (2003).
- 26 Temeyer KB and Chen AC, Identification and characterization of a cDNA encoding the acetylcholinesterase of *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). *DNA Seq* **18**: 85-9 (2007).
- 27 Sunyaev SR, Eisenhaber F, Rodchenkov IB, Eisenhaber B, Tumanyan VG and Kuznetsov EN, Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. *Protein Eng* **12**: 387-394 (1999).
- 28 Silva NM and Azeredo-Espin AML, Investigation of mutations associated with pyrethroid resistance in populations of the New World Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Genet Mol Res* **8**: 1067-1078 (2009).
- 29 Heidari R, Devonshire AL, Campbell BE, Dorrian SJ, Oakeshott JG and Russell RJ, Hydrolysis of pyrethroids by carboxylesterases from *Lucilia cuprina* and *Drosophila melanogaster* with active sites modified by in vitro mutagenesis. *Insect Biochem Mol Biol* **35**: 597-609 (2005).
- 30 Huchard E, Martinez M, Alout H, Douzery EJP, Lutfalla G, Berthomieu A, Berticat C, Raymond M and Weill M, Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies. *Proc R Soc London B* **273**: 2595-2604 (2006).
- 31 Weill M, Fort P and Berthomieu A, A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc R Soc London B* **269**: 2007-2016 (2002).
- 32 Shi MA, Lougarre A, Alies C, Frémaux I, Tang ZH, Stojan J and Fournier D, Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BMC Evol Biol* **4**: 5 (2004).
- 33 Campbell PM, Trott JF, Claudianos C, Smyth KA, Russell RJ and Oakeshott JG, Biochemistry of esterases associated with organophosphate resistance in

Lucilia cuprina with comparisons to putative orthologues in other Diptera. *Biochem Genet* **35**: 17-40 (1997).

34 Newcomb RD, Campbell PM, Russell RJ and Oakeshott JG, cDNA Cloning baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase E3, involved in organophosphorus resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* **27**: 15-25 (1997).

35 French-Constant RH and Roush RT, Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays, in Pesticide resistance in arthropods, ed. by Roush RT and Tabashnik BE, Chapman and Hall Publishers, New York, pp. 4-38 (1990).

PARTE III

DISCUSSÃO, CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

5. DISCUSSÃO

A adaptação de populações de diferentes espécies de artrópodes ao uso de pesticidas tem evoluído via substituição de alelos selvagens por alelos que conferem resistência a estes pesticidas através de uma forte seleção direcional. Entretanto, alguns mecanismos selecionados apresentam um custo no valor adaptativo do indivíduo. Este custo no valor adaptativo relacionado com mecanismos de resistência a pesticidas exerce uma grande influência na distribuição de alelos de resistência devido ao seu impacto na adaptação relativa de seus portadores. Todas as alterações que podem causar altos ou baixos níveis de resistência são selecionadas conforme a pressão de seleção, pelos inseticidas, e pelo possível custo no valor adaptativo que elas podem causar aos seus portadores (Pasteur & Raymond, 1996). Efeitos pleiotrópicos deletérios têm sido registrados como afetando a reprodução, desenvolvimento ou comportamento em diferentes espécies de insetos. Seleção contra alelos que causam resistência tem sido verificada em populações do campo através de uma diminuição nas freqüências dos alelos resistentes na ausência do pesticida (Mckenzie & Batterham, 1994; Boivin et al., 2003). A herança da resistência pode variar de recessiva a completamente dominante, mas é frequentemente semi-dominante. A base genética da resistência depende da variação genética existente nas populações e de como ocorre a seleção de fenótipos resistentes pela pressão dos inseticidas (Mckenzie, 2000).

No afídeo *Myzus persicae* (Hemíptera; Aphididae) a presença da mutação kdr (L1014F) no canal de sódio está associada a uma diminuição na resposta a um feromônio de alarme, tornando-os mais suscetíveis a predação ou parasitismo. As mutações L1014F e M918V além de diminuir a sensibilidade do canal de sódio à ação de alguns inseticidas também alteram as propriedades de abertura e fechamento do canal. Esta alteração causa uma elevação no potencial de ação que, *in vivo*, poderia causar mudanças na forma com que indivíduos mutantes respondem a estímulos externos (Foster et al., 2003). Em *Heliothis virescens* (Lepidoptera; Noctuidae) a mutação kdr (L1014H) também está associada a um custo no valor adaptativo na ausência de inseticidas

piretróides devido a alterações causadas na atividade neural (Lee et al., 1999^b). Linhagens resistentes do mosquito *Culex quinquefasciatus* também apresentaram efeitos deletérios associados com a mutação kdr (L1014F) e com uma mutação na enzima acetilcolinesterase (AChE) em um ambiente livre de inseticidas (Berticat et al., 2008).

A ausência da mutação kdr nas populações de *C. hominivorax* que foram investigadas pode estar relacionada a uma seleção contra os portadores desta mutação, devido aos efeitos deletérios que ela pode causar. É provável que a seleção desta variante nas diferentes espécies ocorra quando estas estejam expostas a uma forte pressão seletiva por piretróides. Em mosquitos a presença desta mutação, com alta frequência em algumas populações, também é devida ao prévio uso do inseticida DDT, que também tem como alvo de ação os canais de sódio. O uso de DDT e posteriormente de piretróides durante décadas e em altas concentrações favoreceu a seleção desta mutação em mosquitos, apesar do possível custo no valor adaptativo que ela possa causar em seus portadores (revisão em Ranson et al., 2000; Hemingway et al., 2004) O uso de inseticidas piretróides para controle de *C. hominivorax*, pelo menos em populações brasileiras, têm sido usados em misturas com organofosforados. A pressão seletiva pode não ter sido suficiente, até o momento, para selecionar tal variante. Entretanto, também não pode ser descartada a possibilidade de que nas populações de *C. hominivorax* investigadas não há a variante 1014F no canal de sódio para ser selecionada, ou ainda, a existência de uma outra mutação nesta proteína que possa estar relacionada à resistência.

Uma abordagem comumente utilizada para verificar a associação de substituições de aminoácidos em proteínas alvo de inseticidas com a resistência é a comparação entre uma linhagem “suscetível” e amostras que apresentam resistência. Uma dificuldade enfrentada por este e outros trabalhos que venham a ser feitos sobre resistência a inseticidas em *C. hominivorax* é a obtenção de uma linhagem que possa ser usada como “suscetível”, seja para inseticidas organofosforados ou para piretróides. Essa dificuldade reside no fato de não haver a manutenção de uma linhagem que não tenha contato com inseticidas

por muitas gerações. Tal linhagem poderia ser usada como referência para comparar as diferenças de aminoácidos de proteínas alvo entre esta linhagem e outras populações do campo que estão sob pressão dos inseticidas, e dessa forma identificar novos pontos de mutação nesta espécie que possam estar relacionados à resistência.

Além da mutação L1014F alguns indivíduos (20) de *C. hominivorax* também foram analisados com relação à ocorrência da mutação super kdr (M918T), e nenhum mutante para este resíduo foi encontrado (dados não publicados). Na ausência da mutação kdr (L1014F) não era esperado que fossem encontrados indivíduos portadores da mutação super kdr pois, nas espécies onde já foi descrita, sua ocorrência estava sempre associada com a presença da mutação kdr. É sugerido que de alguma forma a presença da mutação kdr compensa o déficit funcional causado pela mutação super kdr (Soderlund & Knipple, 2003). Partindo-se dessa premissa de associação a presença da mutação super kdr seria mais amplamente investigada nas populações caso fossem encontrados indivíduos portadores da kdr.

Com relação às mutações investigadas na carboxilesterase E3, nestas mesmas populações, que apresentam diferentes históricos de uso de inseticidas organofosforados e piretróides, a mutação W251S, relacionada com resistência principalmente a dimetil-OP e recentemente com piretróides, foi amplamente encontrada. Uma alta frequência alélica desta mutação foi encontrada nas amostras da Venezuela (100%) e Colômbia (93.75%). Em algumas populações amostradas, apesar da frequência do alelo mutante ser relativamente baixa, o número de indivíduos portadores de pelo menos um alelo mutante é alto, proporcional a amostra de indivíduos analisados (de 15 a 17) (Figura 1). Na população de Estiva (MG, Brasil), por exemplo, foram encontrados 11 indivíduos mutantes, e em Santa Maria das Barreiras (PA, Brasil), Carambeí (PR, Brasil) e Ybytymi (Paraguai) 12 indivíduos em cada localidade (Tabela 1, Artigo 1, página 43). Os resultados demonstram que esta mutação está amplamente distribuída nas populações ao longo da atual distribuição geográfica de *C. hominivorax*, e a alta frequência de indivíduos mutantes em algumas populações brasileiras

provavelmente está relacionada com o intensivo uso de inseticidas a base de dimetil-OP, compostos muito comuns nos mata-bicheiras utilizados no Brasil (Anexo 1, página 101). O uso cada vez maior de piretróides nestes compostos também deve estar contribuindo para a seleção de indivíduos portadores desta mutação na carboxilesterase E3 (Anexo 2, página 101). Para maiores informações sobre a obtenção das amostras das populações geográficas analisadas nesta tese encontra-se no Anexo 2, página 102.

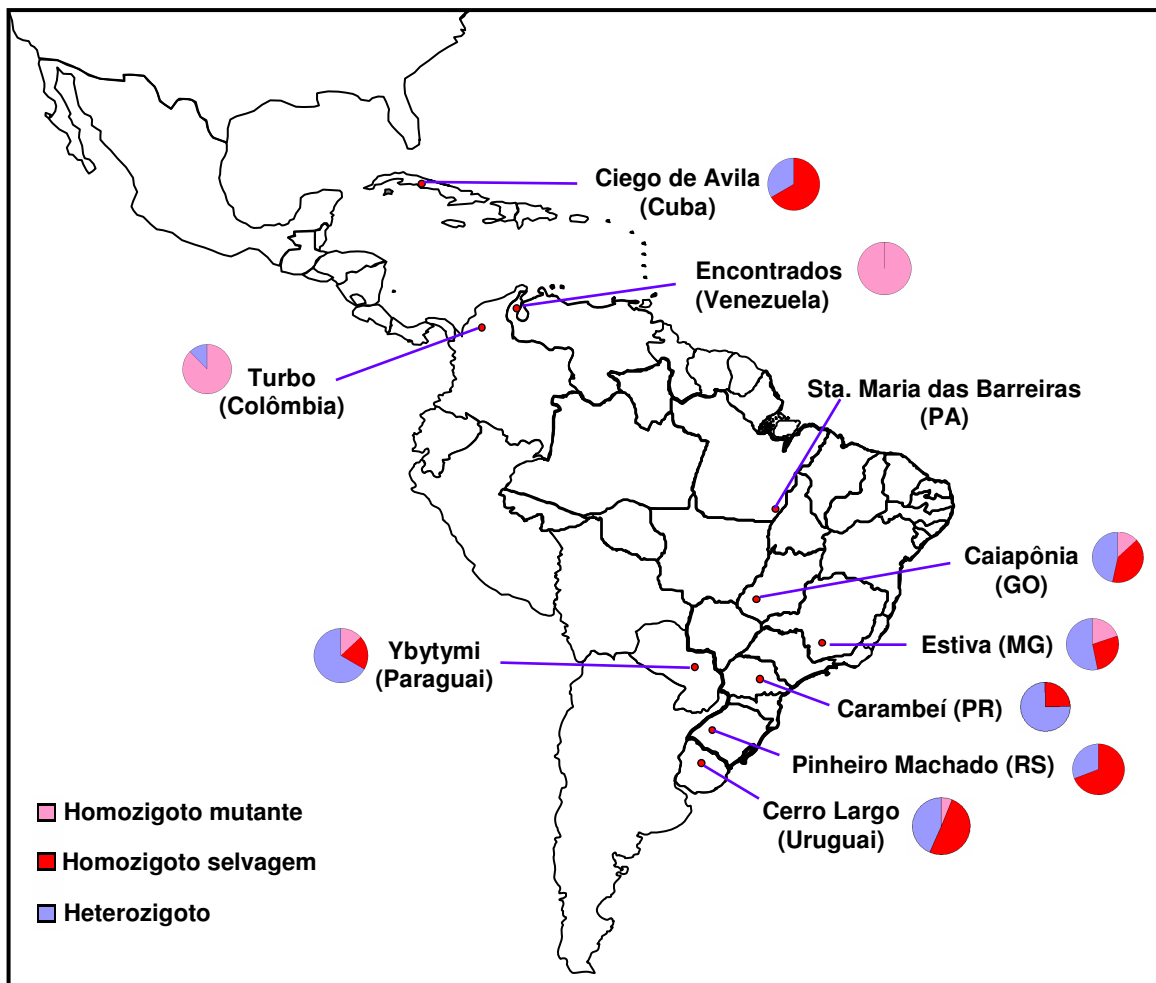


Figura 1. Mapa com a frequência genotípica dos indivíduos de *C. hominivorax* nas populações analisadas para a presença da mutação W251S.

A mutação G137D está relacionada com resistência a organofosforados em geral, mas principalmente a dietil-OP. A presença desta mutação foi investigada nas mesmas populações onde foi realizada a análise da mutação W251S (Artigo 1), e igualmente foi encontrado um alto número de indivíduos portadores de pelo menos um alelo mutado na maioria das populações brasileiras e no Uruguai (Figura 2). Uma exceção foi a população de Santa Maria das Barreiras (PA) onde foram encontrados somente dois indivíduos heterozigotos e um homozigoto mutante.

As linhagens analisadas provenientes de Fargo (Dakota do Norte, USA) não apresentaram tanto a mutação W251S como a G137D na carboxilesterase E3, as quais poderiam não existir nas populações que deram origem a estas linhagens (Costa Rica, Belize, Jamaica, Chiapas e Vera Cruz no México). Estas linhagens foram coletadas no campo na década de 80 e mantidas durante muitos anos no laboratório sem contato com inseticidas. Se tais variantes mutantes existiam nas populações de origem destas linhagens as mesmas podem ter sido perdidas por deriva. Uma outra possibilidade é, se estes alelos mutantes causam alto custo no valor adaptativo de *C. hominivorax*, a seleção, na ausência de pressão seletiva pelos inseticidas, pode ter levado ao desaparecimento de tais alelos.

Nas populações de Cuba, Colômbia e Venezuela não foram encontrados indivíduos mutantes para G137D (Figura 2), o que também pode estar relacionado à inexistência dessa variante nessas populações ou ao tipo de inseticida mais comumente usado. É provável que pelo menos na Colômbia e Venezuela predomine o uso de piretróides e dimetil-OPs, visto que foi nestas populações onde foram encontradas as maiores freqüências da mutação W251S, associada com resistência a estes compostos. Em Cuba, onde foram encontrados apenas cinco indivíduos heterozigotos para W251S, o inseticida lindane (um inibidor dos canais de cloro ativados pelo ácido gama-amino-butírico) foi amplamente usado até recentemente (FAO, 1999). O uso de compostos relacionados com a seleção destes alelos mutantes na

carboxilesterase E3, como organofosforados e piretróides, para o controle de *C. hominivorax* em Cuba é mais recente.

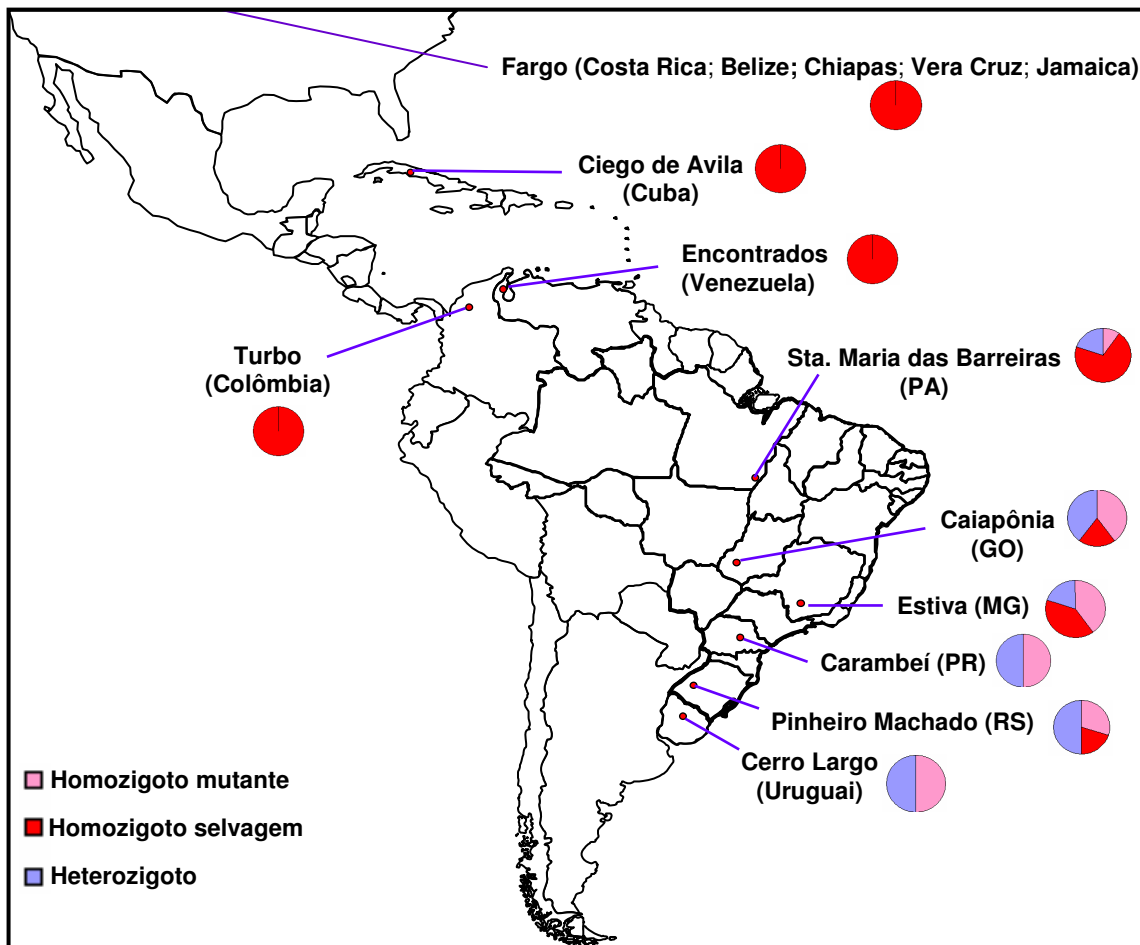


Figura 2. Mapa com a freqüência genotípica dos indivíduos de *C. hominivorax* nas populações analisadas para presença da mutação G137D.

A evolução da resistência também pode levar à seleção de um mecanismo que é capaz de conferir resistência cruzada, ou seja, resistência a mais de um tipo de inseticida. A resistência cruzada a compostos de diferentes classes tem sido associada a mecanismos metabólicos, normalmente associados à super-expressão de uma ou mais enzimas metabólicas que hidrolizam ou sequestram o inseticida antes que este alcance seu sítio alvo

(Brogdon & Barber, 1990; Liu & Yue, 2000; Rodriguez et al., 2002; Reyes et al., 2007). Além de super-expressão, algumas substituições de aminoácidos em determinadas enzimas metabólicas podem alterar sua atividade, causando resistência. Através da aplicação de mutagênese *in vitro*, foi verificado que substituições no resíduo W251 da carboxilesterase E3 de *Lucilia cuprina* (um califorídeo) e no ortólogo de *Drosophila melanogaster* também conferem à enzima a capacidade de hidrolisar compostos piretróides, principalmente os do tipo I, além de organofosforados (OPs) (Heidari et al., 2005). Piretróides são classificados em tipo I ou II devido à presença, somente neste segundo grupo, de um grupamento ciano (CN), que torna estes compostos mais tóxicos. Devido a dificuldades para conseguir o princípio ativo o bioensaio realizado neste trabalho utilizou uma formulação comercial (Flytick da Valée) que contém um piretróide tipo II como princípio ativo. O resultado deste bioensaio com cipermetrina em *C. hominivorax*, embora tenha sido feito com apenas uma população (Estiva, MG), foi a população brasileira que apresentou a maior frequência do alelo mutante para a mutação W251S (46.67%). Este bioensaio indicou uma associação entre a presença desta mutação e a sobrevivência na presença do inseticida piretróide em duas das três concentrações analisadas (Tabela 3, Artigo 1, página 47). A tabela abaixo complementa os resultados apresentados na Tabela 3 do Artigo 1.

Tabela 1. Porcentagem de alelos mutantes e selvagens encontrados em indivíduos vivos e mortos analisados a partir de três concentrações do bioensaio com cipermetrina, apresentado no artigo 1.

Cipermetrina (µg/ml)	% alelos mutantes encontrados em:		% alelos selvagens encontrados em:		N
	Indivíduos vivos	Indivíduos mortos	Indivíduos vivos	Indivíduos mortos	
^a 37.5X10 ⁻¹²	15	35	10	40	40
^a 7.5X10 ⁻¹²	36.67	23.33	13.33	26.67	60
^a 1.9X10 ⁻¹²	26.67	5	23.33	45	60

a: Fisher's exact test: p= 0.221; p= 0.024; p= 0.0003, respectively from the highest concentration to the lowest concentration. N= total number of alleles analyzed.

Esta sobrevivência se deve provavelmente à capacidade da enzima mutante de hidrolisar também compostos do tipo piretróides. Entretanto, de acordo com o que tem sido verificado até o momento, substituições de aminoácidos neste resíduo conferem à enzima a capacidade de hidrolisar mais eficientemente piretróides do tipo I do que os piretróides tipo II, devido à presença do grupo ciano que dificulta a hidrólise da ligação éster dos piretróides tipo II (Heidari et al., 2005; Devonshire et al., 2007). Provavelmente a presença desta mutação permite a sobrevivência de seus portadores somente em concentrações mais baixas deste tipo de inseticida. Porém, outros bioensaios com diferentes tipos de piretróides são necessários para conclusões mais precisas em *C. hominivorax*. Estes primeiros resultados obtidos no bioensaio com *C. hominivorax* e os resultados previamente encontrados para *L. cuprina* e *D. melanogaster* sugerem que este deve ser um mecanismo de resistência conservado, pelo menos em espécies de Diptera, conferindo resistência cruzada a organofosforados e pelo menos, a alguns compostos piretróides. O fato de conferir resistência e provavelmente causar um menor custo no valor adaptativo dos indivíduos, quando comparado ao custo de algumas mutações em proteínas alvo de inseticidas, pode estar favorecendo a ampla ocorrência da mutação W251S na carboxilesterase E3 nas populações de *C. hominivorax*.

Corroborando as interpretações acima, Hernandez et al., 2002 também encontraram a presença de uma mutação em uma carboxilesterase em linhagens do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* do México resistentes a piretróides. Mais recentemente, esta mutação também foi encontrada em linhagens brasileiras de *R. microplus* resistentes a acaricidas organofosforados e piretróides (Baffi et al., 2007).

O uso de um determinado inseticida por um longo período pode selecionar um “modificador” que ameniza os efeitos deletérios do mecanismo de resistência. Em *Lucilia cuprina*, a alta frequência de resistência a OP no campo é devida à evolução de um gene “modificador” que minimizou o efeito negativo no valor adaptativo relativo dos indivíduos portadores de alelos mutantes para a carboxilesterase E3 (G137D e W251S) em ambientes sem a presença do

inseticida. Foi verificado que o custo no valor adaptativo relativo desses indivíduos estava relacionado a um aumento no tempo de desenvolvimento e na assimetria bilateral das cerdas (Mckenzie, 1993). Foi levantada a hipótese que carboxilesterases devem desempenhar algum papel nas interações célula/célula durante a diferenciação das cerdas, as quais são consideradas estruturas terminais do sistema nervoso periférico (Hortsch & Goodman, 1991). A influência de um gene “modificador” no valor adaptativo de indivíduos mutantes para E3 em *L. cuprina* foi verificada na Austrália em 1979, após mais de 20 anos de uso do inseticida diazinon (um OP) (Mckenzie et al., 1982). O gene indicado como sendo o “modificador” é o *Scalloped wings* (Scl), que é considerado homólogo ao gene *Notch* de *D. melanogaster* (Davies et al., 1996), o qual controla o desenvolvimento do sistema nervoso periférico (Lauder, 1993). Scl tem efeito dominante sobre o valor adaptativo, de forma que na ausência de inseticidas indivíduos resistentes e suscetíveis tem o mesmo valor adaptativo (Mckenzie et al., 1982). Em *C. hominivorax* também pode ter ocorrido a seleção de um gene que tenha o efeito de amenizar os possíveis custos no valor adaptativo dos indivíduos mutantes na E3, uma vez que a utilização de inseticidas OPs para o controle deste ectoparasita no Brasil tem ocorrido há muitos anos.

Outro mecanismo que pode diminuir o efeito deletério de mutações de resistência é a duplicação do gene. Para algumas linhagens isogênicas de *L. cuprina*, que apresentaram altos níveis de resistência a diazinon (um dietil-OP) e malation (um dimetil-OP), foi sugerida a existência de uma duplicação do gene que codifica a enzima carboxilesterase E3, com uma das cópias contendo a mutação G137D e a outra cópia a mutação W251L (Smyth et al., 2000; Newcomb et al., 2005). Estas mutações causam uma baixa atividade de aliesterase (atividade de hidrólise de ésteres alifáticos) da enzima, com o alelo mutante D137 afetando mais drasticamente. Além disso, o alelo D137 também afeta a atividade de malation carboxilesterase (hidrólise das ligações carboxilester do inseticida malation) da enzima, a qual é conferida pela presença da mutação W251L (Devonshire et al., 2003). As alterações nas atividades da enzima causadas por estas mutações, levando a um alto custo no valor

adaptativo, justificaria a falta de registro, até o momento, de indivíduos de *L. cuprina* portadores de ambas as mutações no mesmo gene. Em contrapartida, ambas as mutações causam um aumento na atividade de OP hidrolase, caracterizada pela capacidade de hidrolisar ligações fosfo-ésteres (Campbell et al., 1998; Devonshire et al., 2003), muito comuns em OPs. A presença do gene duplicado, com cada um contendo uma das mutações, resulta num fenótipo de resistência superior para o inseto visto que ele tem duas vezes maior quantidade da proteína e com a capacidade de hidrolisar um grande número de diferentes compostos OPs (Newcomb et al., 2005). Em *C. hominivorax* não foi verificado se há uma duplicação no gene da carboxilesterase E3. Entretanto, a duplicação deste gene não parece ser um mecanismo comum, mesmo em *L. cuprina*, visto que apenas algumas linhagens (7 dentre mais de 40 linhagens investigadas) apresentaram resultados que indicam tal duplicação (Smyth et al., 2000; Newcomb et al., 2005). Os indivíduos de *C. hominivorax* classificados como heterozigotos foram assim chamados considerando que há nesta espécie apenas uma cópia do gene da carboxilesterase E3, sendo que já foram encontrados indivíduos heterozigotos para ambas as mutações G137D e W251S (R.A. Carvalho, comunicação pessoal). Indivíduos foram determinados heterozigotos tanto por seqüenciamento direto de PCR (aparecimento de dois picos nos pontos das mutações) como por PCR-RFLP. Estes indivíduos heterozigotos para ambas as mutações teriam a capacidade de hidrolisar uma ampla variedade de compostos organofosforados e, pelo menos, alguns compostos piretróides, provavelmente os do tipo I mais eficientemente que os do tipo II, como em *L. cuprina*. A estratégia de uso alternado de inseticidas organofosforados e alguns piretróides, e mesmo inseticidas com a mistura de ambos, podem selecionar indivíduos do campo portadores de alelos de resistência nesta carboxilesterase.

A estimativa do custo no valor adaptativo em indivíduos heterozigotos tem importantes implicações para estratégias de manejo da resistência, visto que os heterozigotos representam os portadores mais freqüentes dos alelos resistentes no começo do processo de resistência. Dependendo dos efeitos pleiotrópicos

causados pelos alelos resistentes, isto poderá influenciar a taxa na qual a seleção natural atuará sob tais alelos (Roush & Mckenzie, 1987).

Duplicação gênica associada com resistência também foi encontrada no gene da AChE em algumas espécies de artrópodes da ordem Hemíptera, Himenóptera, Lepidóptera, Diptera e Acari, e chamados de ace1 e ace2. Nas espécies onde há dois genes ace, e para as quais foram descritas mutações associadas à resistência, estas têm sido encontradas no gene ace1. Entretanto, em algumas espécies de Díptera, do grupo das chamadas “moscas verdadeiras” (Cyclorrapha), há somente a presença do gene ace2, onde ocorrem as mutações de resistência (Huchard et al., 2006). Embora não tenha sido investigado se em *C. hominivorax* também há dois genes ace, a AChE seqüenciada e analisada aqui (depositada no GenBank com o código FJ830868), apresenta 88%, 84%, 82% e 72% de identidade nucleotídica com as AChEs de *L. cuprina*, *H. irritans*, *M. domestica* e *D. melanogaster*, respectivamente. Essa identidade com a AChE de outras espécies de Diptera que possuem apenas o gene ace2, principalmente com a do califorídeo *L. cuprina*, nos leva a propor que a AChE de *C. hominivorax* é um ortólogo do gene ace2.

Para as mutações investigadas na acetilcolinesterase de *C. hominivorax*, estas parecem afetar a sensibilidade da enzima a organofosforados e carbamatos em insetos. Carbamatos e organofosforados são compostos que se ligam no sitio ativo da enzima e a hidrólise dos mesmos causa uma fosforilação ou carbamilação da serina catalítica, impedindo-a de hidrolisar acetilcolina, que é o substrato natural da ação da acetilcolinesterase. O processo de defosforilação da serina catalítica é demorado, o que faz com que ocorra um acúmulo de acetilcolina e, conseqüentemente, um bloqueio na transmissão sináptica, levando à morte do inseto. Portanto, toda mutação que afeta a ligação dos inseticidas também pode afetar a hidrólise da acetilcolina, o que pode causar um alto custo no valor adaptativo do inseto. Este fato sugere que o efeito de cada mutação no padrão de resistência pode ser importante no processo de seleção (Villatte et al., 2000).

Em amostras populacionais de *D. melanogaster* de diferentes partes do mundo, indivíduos triplo mutante I161V/G265A/F330Y, que corresponde aos pontos de mutação investigados na AChE de *C. hominivorax*, foram os mais frequentemente encontrados (Menozzi et al., 2004; Shi et al., 2004). A ocorrência de algumas mutações que são deletérias, afetando a estabilidade da proteína, por exemplo, podem ser contrabalanceadas pela presença de outras que aumentam sua eficiência catalítica. A combinação de algumas mutações no mesmo alelo parece resultar em um efeito menos drástico na estabilidade e atividade da proteína sem ser letal para o inseto, e também conferem resistência na presença do inseticida (Shi et al., 2004). Em linhagens resistentes de *M. domestica* foram encontrados indivíduos contendo as mutações G342A/F407Y na acetilcolinesterase (Kozaki et al., 2001; Walsh et al., 2001). Em *L. cuprina*, através de mutagênese sítio dirigida, foi verificado que indivíduos contendo duas mutações, G303A/F368Y, ou três mutações, I199V/G303A/F368Y, apresentaram níveis consideráveis de insensibilidade a organofosforados (Chen et al., 2001).

Na AChE de *C. hominivorax* é possível que ainda não tenha ocorrido a seleção de diferentes mutações de resistência no mesmo alelo, pelo menos não das mutações conhecidas e que foram investigadas neste trabalho. A mutação F466Y encontrada em dois indivíduos de Pinheiro Machado (RS, Brasil) parece determinar um custo no valor adaptativo de seus portadores nas outras espécies onde ela foi descrita, uma vez que ela diminui a estabilidade da proteína (Walsh et al., 2001; Shi et al., 2004). Na análise dos contatos internos estabelecidos entre os aminoácidos, realizada no Artigo 2, foi verificado que a troca de uma fenilalanina por uma tirosina na posição 466 causou a ocorrência de uma interação hidrofóbica com o triptofano da posição 457 (W457) na proteína mutante (ver Figura 3, Artigo 2, página 70), a qual era inexistente na proteína selvagem. Esta nova interação pode estar relacionada com a diminuição na estabilidade da proteína. Por outro lado, a substituição F466Y é caracterizada por conferir resistência pois a tirosina, que é um aminoácido um pouco maior, diminui o espaço acessível dentro do sítio ativo para moléculas maiores como organofosforados e carbamatos. Isto impede que estes compostos sejam

hidrolisados pelo sítio catalítico da enzima e que a serina catalítica fique inativada pela sua fosforilação ou carbamilação, resultante do processo de hidrólise destes compostos (Walsh et al., 2001; Shi et al., 2004). Embora não tenha sido feita nenhuma avaliação do possível custo no valor adaptativo que os portadores desta mutação podem ter em *C. hominivorax*, a sua presença em apenas dois indivíduos de uma população, apesar dos muitos anos de uso de inseticidas organofosforados, pode ser um indício de tal custo.

A mutação G265A na AChE de *D. melanogaster* foi a mutação mais freqüente nas populações analisadas, considerando as mutações isoladamente. Dentre as mutações caracterizadas até o momento em *D. melanogaster*, esta é considerada como sendo a que causa o menor custo no valor adaptativo do indivíduo, uma vez que ela diminui a estabilidade da proteína AChE, mas aumenta sua eficiência catalítica (Shi et al., 2004). Na AChE de indivíduos do campo resistentes a diazinon (um OP), em *Haematobia irritans* (Diptera; Muscidae), também foi encontrada uma substituição de glicina para alanina no resíduo 262 (G262A, equivalente a posição G265A de *D. melanogaster*), associada ao fenótipo de resistência (Temeyer et al., 2008). Esta substituição também já foi encontrada em linhagens resistentes de *M. domestica* (Kozaki et al., 2001; Walsh et al., 2001). Apesar da sua ocorrência em amostras resistentes de três espécies de dípteros esta variante não foi encontrada nas populações de *C. hominivorax*. Este resíduo está localizado próximo à tríade catalítica (S374, E503, H616), e em *C. hominivorax* corresponde à posição G401. Na análise das interações estabelecidas entre os aminoácidos nas proteínas selvagem e mutante modeladas no presente trabalho, foi verificado que a troca da glicina para uma alanina nesta posição leva à ocorrência de duas interações hidrofóbicas com a serina catalítica (ver Figura 3, Artigo 2, página 70). A ocorrência destas interações na proteína mutada, pode estar relacionada com o fato da substituição para alanina afetar a orientação da serina catalítica e conseqüentemente causar a insensibilidade a compostos como organofosforados e carbamatos.

Apesar de existirem relatos sobre custo no valor adaptativo associado a mutações no canal de sódio e na AChE, é possível que indivíduos sejam portadores de mutações em ambas proteínas, ao mesmo tempo, ocasionando resistência a inseticidas de diferentes classes, como foi encontrado em *Culex quinquefasciatus*. Neste mosquito a linhagem portadora de mutações em ambas as proteínas apresentou um menor custo no valor adaptativo, na presença dos inseticidas, do que a linhagem que apresentava somente a mutação na AChE (Berticat et al., 2008). Estimativas dos efeitos deletérios de alelos que causam resistência, incluindo potenciais interações entre eles, podem variar de acordo com o “background” genético no qual eles são expressos, e com as condições ambientais nos quais as estimativas são medidas (Berticat et al., 2008). No presente trabalho, mutações no canal de sódio e na acetilcolinesterase de *C. hominivorax* foram investigadas. Para a mutação do canal de sódio nenhum mutante foi encontrado e para as mutações na acetilcolinesterase somente dois indivíduos apresentaram uma das mutações investigadas, a F466Y. Porém estes dois indivíduos não possuíam a mutação *kdr* investigada, descartando a possibilidade de qualquer interação entre elas, como foi sugerido para *C. quinquefasciatus*.

A dinâmica evolutiva da resistência é difícil de ser prevista em populações naturais visto que múltiplos mecanismos podem estar presentes e tais mecanismos podem interagir entre si. No califórideo *L. cuprina* a evolução da resistência parece ter levado preferencialmente à seleção de um mecanismo metabólico, que no caso foi a seleção de mutações que alteram a atividade da enzima carboxilesterase E3. Foi verificado que OPs reagem preferencialmente com a carboxilesterase E3, na presença tanto da AChE como de outras esterases, em homogenados de *L. cuprina* (Parker et al., 1991). A forma suscetível da E3 de *L. cuprina* e *M. domestica* apresenta uma alta afinidade por OPs, em relação à afinidade da AChE por estes compostos, o que foi proposto como um possível mecanismo de proteção para a AChE, visto que estes compostos são inibidores desta enzima. Também foi proposto que as mutações na E3 servem para aumentar sua utilidade através da capacidade conferida de

hidrolisar OPs (Newcomb et al., 1997^b). Os resultados deste trabalho e do trabalho realizado por Carvalho et al., 2006 indicam que, em *C. hominivorax*, o mesmo mecanismo metabólico tem sido selecionado nas populações, o que não descarta a possibilidade de existirem outros mecanismos que também podem estar contribuindo para conferir resistência.

Também deve ser considerado que a estrutura das populações, se isoladas ou se mantêm fluxo com outras, ou se há locais de refúgio sem a presença de inseticidas para os indivíduos suscetíveis, são fatores que podem influenciar a distribuição dos alelos associados à resistência. Estudos com populações geográficas de *C. hominivorax* na América do Sul, utilizando-se marcadores microssatélites (Torres, 2006; Torres et al., 2007) e mitocondriais (Torres et al., 2007; Lyra et al., 2009) não revelaram clara estruturação populacional. Isso pode ser devido à existência de fluxo gênico suficiente para manter a homogeneidade entre quase todas as populações observadas. Como esta espécie está associada à infestação de animais domésticos, o fluxo gênico entre as populações também pode ser influenciado pelo transporte passivo através de animais infestados (Torres, 2006; Torres et al., 2007; Lyra et al., 2009). Este fluxo entre as populações pode contribuir para a distribuição dos alelos mutantes (G137D e W251S) da carboxilesterase E3 nas populações de *C. hominivorax*, os quais acabam sendo posteriormente selecionados pelo uso de inseticidas e aumentando em frequência.

O número de espécies de artrópodes consideradas pragas ou pestes apresentando algum mecanismo de resistência a inseticidas tem aumentado notavelmente. Este fato é um desafio, visto que coloca em teste nossa capacidade de lidar eficientemente com esta situação e suas consequências. Ainda que sejam descobertas ou criadas novas moléculas com ação inseticida, é certo que o desenvolvimento da resistência a estes compostos também ocorrerá, sendo só uma questão de tempo e oportunidade. Portanto, o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência nestas espécies é de fundamental importância para a elaboração e execução de estratégias mais eficientes para seu controle, assim como o conhecimento da

ecologia, comportamento, variabilidade genética e estrutura das suas populações. Neste sentido, este trabalho contribui com informações sobre o desenvolvimento da resistência num importante ectoparasita, informações estas que serão complementadas em trabalhos posteriores. O uso de tais informações contribuirá para a efetividade de qualquer plano de controle ou erradicação de *C. hominivorax* nas áreas de sua atual distribuição.

6. CONCLUSÕES GERAIS

- Considerando os resultados encontrados nos dois trabalhos aqui apresentados e no trabalho de Carvalho et al. (2006), mutações na carboxilesterase E3 são um dos principais mecanismos de resistência selecionados em *C. hominivorax*, dentre os investigados até o momento.
- Mutações na carboxilesterase E3 demonstram ser um mecanismo de resistência conservado, pelo menos em Diptera.
- A mutação W251S na carboxilesterase E3 de *C. hominivorax*, também parece conferir à enzima a capacidade de hidrolisar compostos piretróides, além de organofosforados.
- O uso de piretróides do tipo II pode ser uma alternativa mais eficaz para estratégias de controle desta espécie, considerando que a mutação W251S demonstra estar amplamente distribuída nas suas populações e a enzima mutante parece ter dificuldades na hidrólise destes compostos.
- A acetilcolinesterase de *C. hominivorax*, caracterizada neste trabalho, é um ortólogo do gene *Ace2* encontrado em espécies de Cyclorhapha (*L. cuprina*, *H. irritans*, *M. domestica*, *D. melanogaster*), que possuem somente um gene para esta enzima.
- Mutações associadas com resistência causam alterações nas interações internas entre os aminoácidos na enzima acetilcolinesterase, as quais podem estar associadas tanto à resistência como ao custo no valor adaptativo dos portadores na ausência de inseticidas.

7. PERSPECTIVAS

Certamente este trabalho deixa algumas perguntas para serem respondidas em trabalhos futuros que contribuirão para um melhor entendimento sobre a evolução da resistência em *C. hominivorax*. Entre as possibilidades que ficam para serem investigadas estão:

- realização de bioensaios e experimentos de mutagênese *in vitro*, com diferentes piretróides, usando outras populações de *C. hominivorax*, que contribuirão para confirmar a associação da mutação W251S com a hidrólise destes compostos;
- realização de bioensaios com compostos organofosforados, já que os mesmos são usados há muitos anos nos inseticidas mata-bicheiras no Brasil. Esta etapa já encontra-se em andamento no Laboratório de Genética e Evolução Animal do CBMEG.
- investigar a presença de outros mecanismos metabólicos, como a super-expressão de enzimas envolvidas na metabolização de compostos xenobióticos, que podem também estar atuando para conferir resistência, e que também já encontra-se em andamento no Laboratório de Genética e Evolução Animal do CBMEG.
- investigar a possibilidade de ocorrência de outras mutações nos genes para canal de sódio e acetilcolinesterase, além das investigadas aqui, que possam conferir resistência a piretróides e organofosforados, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azeredo-Espin, A.M.L., Lessinger, A.C. (2006) Genetic approaches for studying myiasis causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. *Genética* 126: 111-131.
- Anstead, J.A., Mallet, J., Denholm, I. (2007) Temporal and spatial incidence of alleles conferring knockdown resistance to pyrethroids in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and their association with other insecticide resistance mechanisms. *Bull Entomol Res* 97: 243-252.
- Anthony, N.M., Brown, J.K., Feyereisen, R., French-Constant, R.H. (1998). Diagnosis and characterization of insecticide-insensitive acetylcholinesterase in three populations of the Sweetpotato Whitefly *Bemisia tabaci*. *Pestic Sci* 52: 39-46.
- Baffi, M.A., Souza, G.R.L., Vieira, C.U., Sousa, C.S., Goulart, L.R., Bonetti, A.M. (2007) Identification of point mutations in a putative carboxylesterase and their association with acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Par* 148: 301-309.
- Batista, M.R.D., Ananina, G., Azeredo-Espin, A.M.L., Klaczko, L.B. (2009) Photographic map of the polytene chromosomes of *Cochliomyia hominivorax*. *Med Vet Entomol* 23(Suppl. 1): 92-97.
- Baumgartner, D.L., Greenberg, B. (1984) The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. *J Med Entomol* 21: 105-113.
- Bentley, G.N., Jones, A.K., Agnew, A. (2003) Mapping and sequencing of acetylcholinesterase genes from the platyhelminth blood fluke *Schistosoma*. *Gene* 314: 103-112.
- Bernard, C.B., Philogène, B.J.R. (1993). Insecticide synergists: role, importance, and perspectives. *J Toxicol Environ Health* 38: 199-223.
- Berticat, C., Bonnet, J., Duchon, S., Agnew, P., Weill, M., Corbel, V. (2008) Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC Evol Biol* 8: 104.

- Boivin, T., Bouvier, J.C., Chadoeuf, J., Beslay, D., Sauphanor, B. (2003) Constraints on adaptive mutations in the codling moth *Cydia pomonella* (L.): measuring fitness trade-offs and natural selection. *Heredity* 90: 107-113.
- Brogdon, W.G., Barber, A.M. (1990). Fenitrothion-deltamethrin cross-resistance conferred by esterases in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pestic Biochem Physiol* 37: 130-139.
- Busvine, J.R. (1951) Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature* 168 (4266): 193-195.
- Campbell, P.M., Trott, J.F., Claudianos, C., Smyth, K.A., Russell, R.J., Oakeshott, J.G. (1997) Biochemistry of esterases associated with organophosphate resistance in *Lucilia cuprina* with comparisons to putative orthologues in other Diptera. *Biochem Genet* 35: 17-40.
- Campbell, P.M., Newcomb, R.D., Russel, R.J., Oakeshott, J.G. (1998) Two different amino acid substitutions in the ali-esterase E3 confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* 28: 139-150.
- Carvalho RA, Torres TT and Azeredo-Espin AML (2006). A survey of mutations in the *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) esterase E3 gene associated with organophosphate resistance and the molecular identification of mutant alleles. *Vet Parasitol* 140: 344-351.
- Ceccati, J.S. (2004) Resisting insects: shifting strategies in chemical control. *Endeavour* 28(1): 14-19.
- Chen, Z., Newcomb, R., Forbes, E., Mckenzie J., Batterham, P. (2001) The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 805-816.
- Davies, A.G., Game, A.Y., Chen, Z., Williams, T.J., Goodall, S., Yen, J.L., Mckenzie, J.A., Batterham, P. (1996) Scalloped wings is the *Lucilia cuprina* Notch homologue and a candidate for the modifier of fitness and asymmetry of diazinon resistance. *Genetics* 143: 1321-1337.

- Davies, T.G.E., Field, L.M., Usherwood, P.N.R., Williamson, M.S. (2007) DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels. *IUBMB Life* 59: 151-162.
- Dev, V., Lachance, L.E., Whitten, C.J. (1986) Polytene chromosomes, karyotype correlations, and population cytology of the primary screwworm fly. *J Hered* 77: 427-434.
- Denholm, I., Devine, G.J., Williamson, M.S. (2002) Insecticide Resistance on the Move. *Science* 297: 222-223.
- Devonshire, A.L., Morres, G.D. (1982) A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pestic Biochem Physiol* 18: 235-246.
- Devonshire, A.L., Heidari, R., Bell, K.L., Campbell, P.M., Campbell, B.E., Odgers, W.A., Oakeshott, J.G., Russell, R.J. (2003) Kinetic efficiency of mutant carboxylesterases implicated in organophosphate insecticide resistance. *Pestic Biochem Physiol* 76: 1-13.
- Devonshire, A.L., Heidari, R., Huang, H.Z., Hammock, B.D., Russell, R.J., Oakeshott J.G. (2007) Hydrolysis of individual isomers of fluorogenic pyrethroid analogs by mutant carboxylesterases from *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* 37:891-902.
- Dong, K. (2006) Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci* 7: 17-30.
- Erzinçlioglu, Y.Z. (1989) The origin of parasitism in blowflies. *Brit J Entomol Nat Hist* 2: 125-127.
- FAO - Food and Agriculture Organization of United Nations. (1999) Programa de cooperación técnica. Control del gusano barrenador del ganado para apoyar el desarrollo agropecuario. Cuba. Relación final TCP/CUB/6613. FAO, Rome, Italy.
- French-Constant, R.H., Pittendrigh, B., Vaughan, A., Anthony, N. (1998) Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philos Trans R Soc London, B* 353: 1685-1693.

- Foster, S.P., Young, S., Williamson, M.S., Duce, I., Denholm, I., Devine, G.J. (2003) Analogous pleiotropic effects of insecticide resistance genotypes in peach-potato aphids and houseflies. *Heredity* 91: 98-106.
- Fournier, D., Mutero, A. (1994) Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp Biochem Physiol* 108: 19-31.
- Grauso, M., Culetto, E., Combes, D., Fedon Y., Toutant, J. P., Arpagaus M. (1998) Existence of four acetylcholinesterase genes in the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *FEBS Lett* 424: 279-284.
- Grisi, L., Massard, C.L., Moya-Borja, G.E., Pereira, J.B. (2002) Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária* 125: 8-10.
- Guerrero, F.D., Jamroz, R.C., Kammlah, D., Kunz, S.E. (1997) Toxicological and Molecular Characterization of Pyrethroid-resistant Horn flies, *Haematobia irritans*: Identification of Kdr and Super Kdr Point Mutations. *Insect Biochem Mol Biol* 27 (8/9): 745-755.
- Guimarães, J.H., Papavero, N. (1999) Myiasis in Man and Animals in the Neotropical Region: Bibliographic database, 308 pp. Editora Plêiade.
- Guimarães, J.H., Papavero, N., Prado, A.P. (1983) As miíases na região neotropical (Identificação, Biologia, Bibliografia). *Rev Bras Zool* 1: 239-416.
- Hall, M., Wall, R. (1995) Myiasis of human and domestic animals. *Adv Parasitol* 35: 257-334.
- Heidari, R., Devonshire, A.L., Campbell, B.E., Dorrian, S.J., Oakeshott, J.G., Russell, R.J. (2005) Hydrolysis of pyrethroids by carboxylesterases from *Lucilia cuprina* and *Drosophila melanogaster* with active sites modified by in vitro mutagenesis. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 597-609.
- Hemingway, J., Karunaratne, H.P.P. (1998) Mosquito carboxylesterase: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 12: 1-12.
- Hemingway, J., Field, L., Vontas, J. (2002) An Overview of Insecticides Resistance. *Science* 298: 96-97.

- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., Ranson, H. (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 653-665.
- Hernandez, R., Guerrero, F.D., George, J.E., Wagner, G.G. (2002) Allele frequency and gene expression of a putative carboxyl esterase-encoding gene in a pyrethroid resistance strain of the tick *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1009-1016.
- Hortsch, M., Goodman, C.S. (1991). Cell and substrate adhesion molecules in *Drosophila*. *Annu Rev Cell Biol* 7: 505-557.
- Huchard, E., Martinez, M., Alout, H., Douzery, E.J.P., Lutfalla, G., Berthomieu, A., Berticat, C., Raymond, M., Raymond, M., Weill, M. (2006) Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies. *Proc R Soc Lond B* 273: 2595-2604.
- Jamroz, R.C., Guerrero, F.D., Kammlah, D.M., Kunz, S.E. (1998) Role of the *kdr* and *super kdr* sodium channel mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). *Insect Biochem Mol Biol* 28: 1031-1037.
- Kaufman, T.C., Severson, D.W., Robinson, G.E. (2002) The *Anopheles* Genome and Comparative Insect Genomics. *Science* 298: 97-99.
- Klassen, W. Curtis, C.F. (2005) History of the Sterile Insect Technique. In: *Sterile Insect Technique – Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. V.A. Dick, J. Hendrichs, A.S. Robinson (eds.), Springer, Netherlands. pp 3-36.
- Kozaki, T., Shono, T., Tomita, T., Kono, Y. (2001) Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect Biochem Mol Biol* 31: pp. 991-997.
- Kumar, R. (1984). Chemical Control. In: *Insect Pest Control*. Edward Arnold (ed.), London. pp.166-203.
- Lauder, J.M. (1993) Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci* 16: 233-240.

- Lapied, B., Pennetier, C., Apaire-Marchais, V., Licznar, P., Corbel, V. (2009) Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. *Trends in Biotechnol* 27: 190-198.
- Lee, S.H., Dunn, J.B., Clark, J.M., Soderlund, D.M. (1999^a) Molecular analysis of *kdr*-like resistance in a permethrin-resistant strain of Colorado potato beetle. *Pestic Biochem Physiol* 63: 63-75.
- Lee, S.H., Park Y., Brown, T.M., Adams, M.E. (1999^b) Altered properties of neuronal sodium channels associated with genetic resistance to pyrethroids. *Mol Pharmacol* 55: 584-593.
- Levot, G.W. (1995) Resistance and the control of sheep ectoparasites. *Int J Parasitol* 25: 1355-1362.
- Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R. (2007) Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 52: 231-253.
- Lindquist, D.A., Abusowa, M., Hall, M.J.R. (1992) The New World screwworm fly in Lybia: a review of its introduction and eradication. *Med Vet Entomol* 6: 2-8.
- Liu, N., Yue, X. (2000) Insecticide resistance and cross-resistance in the house fly (Diptera: Muscidae). *J Econ Entomol* 93: 1269-1275.
- Lyra, M.L., Klaczko, L.B., Azeredo-Espin, A.M.L. (2009) Complex patterns of genetic variability in populations of the New World screwworm fly revealed by mitochondrial DNA markers. *Med Vet Entomol* 23 (Suppl. 1): 32-42.
- Mangan, R.L. (2005) Population suppression in support of the Sterile Insect Technique. In: *Sterile Insect Technique—Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. V.A. Dick, J. Hendrichs, A.S. Robinson (eds.), Springer, Netherlands. pp. 407-425.
- Marcondes, C.B. (2001) Moscas. In: *Entomologia Médica e Veterinária*. Editora Atheneu, São Paulo, Brasil. pp. 125-156.
- Martinez-Torres, D., Devonshire, A.L., Williamson, M.S. (1997) Molecular Studies of Knockdown Resistance to Pyrethroids: Cloning of Domain II Sodium Channel Gene Sequences from Insects. *Pestic Sci* 51: 265-270.

- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Bergé, J.B., Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N., Pauron, D. (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 7: 179-184.
- Martinez-Torres, D., Chevillon, D., Brun-Barale, A., Bergé, J.B., Pasteur, N., Pauron, D. (1999^a). Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L. Mosquitoes. *Pestic Sci* 55: 1012-1020.
- Martinez-Torres, D., Foster, S.P., Field, L.M., Devonshire, A.L., Williamson, M.S. (1999^b) A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and purethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Mol Biol* 8: 338-346.
- Matlock, R.B., Skoda, S.R. (2009) Mark-recapture estimates of recruitment, survivorship and population growth rate for the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Med Vet Entomol* 23 (Suppl. 1): 111-125.
- Mckenzie, J.A. (1993) Measuring fitness and intergenic interactions: the evolution of resistance to diazinon in *Lucilia cuprina*. *Genetica* 90: 227-237.
- Mckenzie, J.A. (2000) The character or the variation: the genetic analysis of the insecticide-resistance phenotype. *Bull Entomol Res* 90: 3-7.
- Mckenzie, J.A., Batterham, P. (1994) The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. *Trends Ecol Evol* 9: 166-169.
- Mckenzie, J.A., Whitten, M.J., Adena, M.A. (1982) The effect of genetic background on the fitness of diazinon resistance genotypes of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Heredity* 49: 1-9.
- Menzio, P., Shi, M.A., Lougarre, A., Tang, Z.H., Fournier, D. (2004) Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *BMC Evol Biol* 4:4.
- Miyazaki, M., Ohyama, K., Dunlap, D.Y., Matsumura, F. (1996) Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house-fly (*Musca domestica*). *Mol Gen Genet* 252: 61-68.

- Morin, S., Williamson, M.S., Goodson, S.J., Brown, J.K., Tabasnik, B.E., Dennehy, T.J. (2002) Mutations in the *Bemisia tabaci* para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1781-1791.
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M., Fournier, D. (1994) Resistance-associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5922-5926.
- Newcomb, R.D., East, P.D., Russel, R.J., Oakeshott, J.G. (1996). Isolation of α cluster esterase genes associated with organophosphate resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* 5: 211-216.
- Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Ollis, D.L., Cheah, E., Russel, R.J., Oakeshott, J.G. (1997^a) A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphate hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7464-7468.
- Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Russell, R.J., Oakeshott, J.G. (1997^b) cDNA cloning, baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in organophosphorus resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* 27: 15-25.
- Newcomb, R.D., Gleeson, D.M., Yong, C.G., Russell, R.J., Oakeshott, J.G. (2005) Multiple mutations and gene duplications conferring organophosphorus insecticide resistance have been selected at the Rop-1 Locus of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *J Mol Evol* 60: 207-220.
- Nicholson, G.M. (2007) Fighting the global pest problem: Preface to the special *Toxicon* issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon* 49: 413-422.
- Nisbet, A.J., Huntley, J.F. (2006) Progress and opportunities in the development of vaccines against mites, fleas and myiasis-causing flies of veterinary importance. *Parasite Immunol* 28: 165-172.
- Otranto, D., Stevens, J.R. (2002) Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *Int J Parasitol* 32: 1345-1360.

- Parker, A.G., Russell, R.J., Delves, A.C., Oakeshott, J.G. (1991) Biochemistry and physiology of esterases in organophosphate-susceptible and resistant strains of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Pest Biochem Physiol* 4: 305-318.
- Pasteur, N., Raymond, M. (1996) Insecticide resistance genes in mosquitoes: their mutations, migration, and selection in field populations. *J Hered* 87: 444-449.
- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J., Collins, F.H. (2000) Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol* 9: 491-497.
- Ranson, H., Claudianos, C., Ortell, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M.V., Umger, M.F., Collins, F.H., Feyereisen, R. (2002) Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298: 179-181.
- Reyes, M., Franck, P., Charmillot, P.J., Ioriatti, C., Olivares, J., Pasqualini, E., Sauphanor, B. (2007) Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Manag Sci* 63: 890-902.
- Robinson, A.S., Vreysen, M.J.B., Hendrichs, J., Feldman, U. (2009) Enabling technologies to improve area-wide integrated pest management programmes for the control of screwworms. *Med Vet Entomol* (suppl. 1) 23: 1-7.
- Rodriguez, M.M., Bisset, J., Ruiz, M., Soca, A. (2002) Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) from Cuba. *J Med Entomol* 39: 882-888.
- Roush, R.T., McKenzie, J.A. (1987) Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Ann Rev Entomol* 32: 361-180.
- Russell, R.J., Robin, G.C., Kostakos, P., Newcomb, R.D., Boyce, T.M., Medveczky, K.M., Oakeshott, J.G. (1996) Molecular cloning of an α -esterase

- gene cluster on chromosome 3R of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* 26: 235-247.
- Schuler, T.H., Martinez-Torres, D., Thompson, A.J., Denholm, I., Devonshire, A.L., Duce, I.R., Williamson, M.S. (1998) Toxicological electrophysiological and molecular characterization of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pestic Biochem Physiol* 59: 169-192.
- Shi, M.A., Lougarre, A., Alies, C., Frémaux, I., Tang, Z.H., Stojan, J., Fournier, D. (2004) Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BMC Evol Biol* 4:5.
- Smyth, K.A., Boyce, T.M., Russell, R.J., Oakeshott, J.G. (2000) MCE activities and malathion resistances in field populations of the Australian sheep blowfly (*Lucilia cuprina*). *Heredity* 84: 63-72.
- Soderlund, D.M., Knipple, D.C. (2003) The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 563-577.
- Sogorb, M.A., Vilanova, E. (2002) Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters* 128: 215-228.
- Stevens, J.R. (2003). The evolution of myiasis in blowflies (Calliphoridae). *Int J Parasitol* 33: 1105-1113.
- Stevens, J.R., Wallman, J.F. (2006) The evolution of myiasis in humans and other animals in the Old and New Worlds (part I): phylogenetic analyses. *Trends in Parasitol* 22: 129-136.
- Storm, J.E., Rozman, K.K., Doull, J. (2000) Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red blood cell acetylcholinesterase. *Toxicology* 150: 1-29.
- Tellam, R.L., Bowles, V.M. (1997) Control of Blowfly Strike in Sheep: Current Strategies and Future Prospects. *Int J Parasitol* 27(3): 261-273.
- Temeyer K.B., Li, A.Y., Lohmeyer, K.H., Chen, A.C., Olafson, P.U., Sanson, D.W., Foil, L.D. (2008) Acetylcholinesterase mutation in diazinon-resistant *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Vet Par* 154: 300-310.

- Thomas, D.B., Mangan, R.L. (1989) Oviposition and wound-visiting behavior of the Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Ann Entomol Soc Am* 82: 526-534.
- Torres, T.T. (2006) Variabilidade genética e estrutura de populações de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae): uma nova perspectiva através de marcadores microssatélites. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.
- Torres, T.T., Lyra M.L., Fresia, P., Azeredo-Espin, A.M.L. (2007) Assessing Genetic variation in New World Screwworm *Cochliomyia hominivorax* populations from Uruguay. In: *Area-Wide Control of Insects Pests*. MJB Vreysen, A.S. Robinson, J. Hendrichs (eds), Springer, Netherlands. pp 183-191.
- Torres, T.T., Azeredo-Espin, A.M.L. (2009) Population genetics of New World screwworm from the Caribbean: insights from microsatellite data. *Med Vet Entomol (Suppl. 1)*: 23-31.
- Toutant, J.P. (1989) Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog Neurobiol* 32: 423-446.
- Walsh, S.B., Dolden, T.A., Moores, G.D., Kristensen, M., Lewis, T., Devonshire, A.L. (2001) Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem J* 359: 175-181.
- Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A., Devonshire, A.L. (1996) Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol Gen Genet* 252: 51-60.
- Vaughan, A., Rocheleau, T., French-Constant, R. (1997). Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. *Exp Parasitol* 87:237-244.
- Villatte, F., Ziliani, P., Marcel, V., Menozzi, P., Fournier D. (2000) A high number of mutations in insect acetylcholinesterase may provide insecticide resistance. *Pestic Biochem Physiol* 67: 95-102.

Zumpt, F. (1965) Myiasis in Man and Animals in the Old World. London, Butterworths, 267pp.

ANEXOS

Anexo 1. Lista e quantidade dos compostos encontrados nos mata-bicheiras utilizados no Brasil, registrados no SINDAN (Compêndio de Produtos Veterinários. <http://www.cpvsv.com.br/cpvsv/index.html>)

Principio ativo	quantidade
Dimetil-OP	10
Dietil OP + dimetil-OP	8
Piretróide	5
Dietil-OP	5
Carbamato + piretróide	4
Carbamato + dietil-OP	3
Piretróide + dietil-OP	2
Piretróide + dimetil-OP	2
Fipronil	1

Anexo 2. Informações adicionais sobre as coletas das amostras

As amostras do Brasil das localidades de Caiapônia-GO, Estiva-MG, Carambeí-PR e Pinheiro Machado-RS foram coletadas no campo pela equipe do nosso laboratório (Laboratório de Genética e Evolução Animal – CBMEG - UNICAMP). Para facilitar a obtenção de amostras de outras localidades, foi desenvolvido por Tatiana T. Torres (Laboratório de Genética e Evolução Animal–CBMEG - UNICAMP) um kit de coleta contendo 12 frascos com EtOH 100% rotulados para identificação das amostras, uma pinça descartável, pares de luvas descartáveis, lápis e um manual de informações e instruções de coleta e armazenamento (Torres, 2006). Esse kit foi enviado para colaboradores e através da sua utilização foram obtidas as amostras de Santa Maria das Barreiras-PA entre outras.

As amostras do Uruguai foram coletadas em dois anos consecutivos (2003-2004), sendo que a primeira coleta foi realizada por uma equipe formada por pesquisadores do ‘Centro de Investigaciones Nucleares–CIN’ da ‘Universidad de la República’ do Uruguai e Laboratório de Genética e Evolução Animal-CBMEG-UNICAMP do Brasil, e a segunda coleta foi realizada pelos pesquisadores do CIN e as amostras enviadas para nosso laboratório, fixadas em EtOH 100%. A equipe do CIN também coletou e nos enviou amostras da localidade de Ybytymi no Paraguai.

A Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA- ‘International Atomic Energy Agency’) facilitou a interação e o contato entre pesquisadores da América Central e do Sul para obtenção de mostras de *C. hominivorax*, como parte do projeto de pesquisa coordenado pelo Laboratório de Genética Animal-CBMEG-UNICAMP intitulado ‘Genetic Sexing of New World Screwworm Fly’ (FAO/IAEA-11822/RO). Através desse projeto o pesquisador René Garcia coletou e nos enviou amostras das localidades de Cuba, e Colômbia, e o Dr. Alfredo Coronado (‘Universidad Centro-occidental Lisandro Alvarado’, Barquisimeto-Venezuela), pesquisador participante do projeto, nos enviou as amostras da Venezuela.

As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas entre 2003 e 2006. Todas as amostras foram coletadas diretamente em feridas de animais domésticos (bois, ovelhas, porcos ou cães) como larvas de 2º ou 3º instar. Após coleta, as larvas de cada ferida foram mantidas juntas e devidamente identificadas. Em seguida as larvas foram fixadas em etanol absoluto (EtOH 100%) ou colocadas em serragem para transformarem-se em pupas (quando em 3º instar, já rosadas), ou ainda criadas no laboratório em carne fresca e sangue, até a fase de pupa. As pupas foram congeladas vivas em freezer –70°C, para posterior extração de DNA, ou mantidas até os adultos emergirem.