

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

RENATO ASSIS DE CARVALHO

BASES MOLECULARES DA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS

ORGANOFOSFORADOS EM *Cochliomyia hominivorax*

(DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Renato Assis de Carvalho
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 e
Evolução Animal.

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

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C253b

Carvalho, Renato Assis de
Bases moleculares da resistência a inseticidas organofosforados em *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) / Renato Assis de Carvalho. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Miíase. 2. Resistência a inseticidas. 3. Compostos organofosforados. 4. *Cochliomyia hominivorax*. I. Azeredo-Espin, Ana Maria Lima de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Molecular basis of resistance to organophosphate insecticides in *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae).

Palavras-chave em inglês: Myiasis; Insecticide resistance; Organophosphorus compounds; *Cochliomyia hominivorax*.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, Paulo Arruda, Gustavo Adolfo Sabatini, Antônio Thadeu Medeiros de Barros, Teresinha Tizu Sato Schumaker.

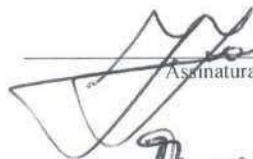
Data da defesa: 15/07/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 15 de Julho de 2010

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin
(Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Arruda



Assinatura

Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sabatini



Assinatura

Prof. Dr. Antônio Thadeu Medeiros de Barros



Assinatura

Profª. Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Teixeira Menossi

Assinatura

Prof. Dr. Celso Omoto

Assinatura

Prof. Dr. Arício Xavier Linhares

Assinatura

DEDICATÓRIA

A toda minha família e especialmente aos meus pais, Antônio José e Arlinda, que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida e contribuíram com todo suor e dedicação à minha formação pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Ana Maria pela oportunidade de iniciar e desenvolver minha carreira científica em seu laboratório, oferecendo toda estrutura e suporte para que os resultados fossem alcançados. Por ter apoiado e incentivado nos primeiros estudos relacionados com resistência a inseticidas na mosca-da-bicheira, despertando em mim um enorme interesse nessa área aplicada do conhecimento. Além disso, agradeço também pela experiência de participar por diversas vezes como monitor da disciplina de Genética Fisiológica e Molecular, o que contribuiu muito para minha formação. Agradeço à Tatiana, que sempre colaborou nos projetos que desenvolvi no laboratório, principalmente na etapa final do doutorado, quando sua participação foi fundamental na caracterização do transcriptoma da espécie em estudo e nas análises de bioinformática. E pelas sugestões na elaboração dessa tese.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Genética e Evolução Animal, que mesmo indiretamente participou desse trabalho, promovendo discussões dos resultados e dificuldades obtidas. À Rosângela e Alessandra, pela dedicação e comprometimento com toda a parte operacional do laboratório, facilitando enormemente nosso trabalho de bancada. Ao Pablo, Paloci, Mariana e Norma, por tornar o ambiente de trabalho um lugar mais prazeroso e pelos momentos de descontração nas mesas de bares. À Salete, que sempre se dedicou à criação dessas larvas exigentes, que foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho. E a todos que contribuíram enviando amostras de diversas localidades.

Agradeço aos membros da pré-banca Prof. Dr. Marcelo Brocchi e Profa. Dra. Márcia Cristina Mendes, pelas sugestões para a melhoria da tese. E aos membros da banca Dr. Antônio Thadeu Medeiros de Barros, Prof. Dr. Paulo Arruda, Dr. Gustavo Sabatini e Profa. Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker, que certamente vão contribuir para uma discussão de alto nível na defesa.

Agradeço ao instituto de pesquisa britânico Rothamsted Research, particularmente ao Biological Chemistry Department e ao Dr. Martin Williamson e Dr. Chris Bass, que me supervisionaram durante o estágio de doutoramento no exterior.

Agradeço enormemente aos amigos que fiz aqui em Campinas e que contribuíram para que todos estes anos longe da terra natal valessem a pena. Especialmente aos amigos da turma Bio01 Unicamp, que fizeram da graduação e pós-graduação momentos de muita satisfação. Aos amigos que dividiram repúblicas, pensionatos e kitnets ao longo dos 10 anos de Campinas, especialmente à Ilezi, que foi minha mãe campineira desde o início. E não pode ficar de fora dos agradecimentos os velhos amigos goianos, que sempre estiveram presentes nos momentos de retorno à terra natal e me davam força pra continuar trilhando o caminho escolhido.

Agradeço à toda minha família, por ter me apoiado em todas as decisões que eu tomei e por ter confiado em mim nessa aventura em busca do conhecimento. Aos meus irmãos Júnior, Adriana, Andreia e Angela por botarem fé no irmão caçula e sempre desejarem o melhor pra mim. Aos meus pais, Antônio José e Arlinda, pelo exemplo a ser seguido e pelo esforço em sempre dar a melhor educação aos filhos, seja em casa ou nas melhores escolas. Aos tios e primos e avós, pelo incentivo dado em todos os momentos.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa e projetos de auxílio à pesquisa durante todo o projeto e pelo apoio financeiro nas empreitadas em terras estrangeiras, tanto em congressos quanto no período sanduíche do doutorado. Ao CNPq e Capes, pelo financiamento dos projetos do laboratório, que garantiram a execução desse e de outros trabalhos.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	ii
BANCA EXAMINADORA	iii
DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
ÍNDICE	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
ORGANIZAÇÃO DA TESE	xiii

PARTE I – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 ECTOPARASITAS E A PECUÁRIA NACIONAL	2
1.2 A MOSCA-DA-BICHEIRA E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	4
1.3 RESISTÊNCIA A INSETICIDAS	9
1.4 BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DA RESISTÊNCIA	14
1.5 OBJETIVO	21

PARTE II – BASES MOLECULARES DA RESISTÊNCIA

2.1 RESISTÊNCIA METABÓLICA BASEADA NA ALTERAÇÃO DA CARBOXILESTERASE E3.....	24
2.2 RESISTÊNCIA BASEADA NA ALTERAÇÃO DO SÍTIO ALVO – ACETILCOLINESTERASE	39
2.3 CARACTERIZAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA E IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM INDIVÍDUOS RESISTENTES	55

PARTE III – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....

3.1 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES ASSOCIADOS AO FENÓTIPO RESISTENTE....	89
3.2 INFLUÊNCIA DOS MECANISMOS NA EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA.....	96
3.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

RESUMO

A mosca-da-bicheira, *Cochliomyia hominivorax*, é uma das principais moscas causadoras de miíases da América do Sul, sendo responsável por severos prejuízos à pecuária através da mortalidade e redução da produtividade dos animais infestados. No Brasil, o seu controle tem sido realizado principalmente através da aplicação de inseticidas organofosforados (OF). Porém, o uso indevido e/ou prolongado desses agentes químicos pode provocar seleção de indivíduos resistentes, devido à alteração do sítio alvo ou à desintoxicação metabólica do inseticida antes de atingir o sítio alvo. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi investigar as bases moleculares da resistência a inseticidas OF na mosca da bicheira, através da caracterização da carboxilesterase E3, do sítio alvo acetilcolinesterase (AChE) e da expressão diferencial de enzimas metabólicas (carboxilesterases, P450 e GST) em indivíduos resistentes.

A sequência predita da enzima carboxilesterase E3 em *C. hominivorax* apresentou domínios altamente conservados dentre as carboxil/colinesterases que contribuem para o mecanismo catalítico do sítio ativo. Duas mutações, já descritas em outras espécies, foram encontradas, a G137D, associada com resistência principalmente aos dietil-OPs, e a W251S, associada com resistência aos dietil-OPs e piretróides. A frequência dessas mutações foi investigada em períodos distintos de diferentes populações do Uruguai, indicando uma correlação da frequência de cada mutação com a classe de inseticida utilizada no controle da espécie.

A região codificante da acetilcolinesterase foi sequenciada em *C. hominivorax* possibilitando a investigação, em populações naturais, de mutações já caracterizadas por conferir resistência a OF em outras espécies (I298V, G401A, F466Y). Apenas 2/135 indivíduos apresentaram uma das mutações (F466Y). Em contraste, a mutação G137D na carboxilesterase E3, que confere resistência metabólica aos inseticidas OF, foi encontrada em mais de 50% dos indivíduos na maioria dessas populações, indicando ser um dos principais mecanismos de resistência nessa espécie.

Para a identificação de genes diferencialmente expressos em indivíduos resistentes foi gerado um banco de dados através da caracterização do transcriptoma utilizando uma das técnicas de sequenciamento de nova geração (Roche 454). Ao todo, foram obtidas 548.940

seqüências, resultando em 36.650 “contigs” e 782 “singlets”. Após a anotação desses transcritos, foram selecionados genes candidatos pertencentes às famílias de enzimas de detoxificação metabólica (carboxilesterases, monooxigenases P450 e GSTs) para terem sua expressão comparada entre os indivíduos que sobreviveram ao tratamento (CL90) com o inseticida diclorvos (dimetil-OF) e um grupo controle (sem tratamento). Apenas um gene foi diferencialmente expresso, ortólogo ao *CYP6G1*, e estudos futuros serão necessários para determinar a associação da expressão dessa P450 e resistência ao inseticida OF. Em ambos os grupos, o gene da AChE não se encontrou alterado. Já o gene da carboxilesterase E3 apresentou a mutação W251S em todos os indivíduos do grupo resistente (n=44), enquanto que no grupo controle (n=40) 13 indivíduos apresentaram a mutação, confirmando a associação dessa mutação com resistência aos dimetil-OP. Assim, a identificação das mutações nesse gene em populações naturais da mosca-da-bicheira pode ser uma ferramenta importante de monitoramento da resistência ao longo da atual distribuição geográfica da espécie, contribuindo para a implementação de estratégias mais efetivas de controle por meio da escolha apropriada dos produtos químicos.

ABSTRACT

The New World Screwworm (NWS) fly *Cochliomyia hominivorax* is one of most important myiasis-causing flies in the Neotropics. It is responsible for severe losses to the livestock industry through both mortality and loss of productivity of infested animals. In Brazil, it has been controlled by the application of chemical insecticides, mainly the organophosphate (OP) compounds. However, the intensive use of these compounds over many years may select resistant individuals which have the potential to compromise the efficacy of current control strategies. Major mechanisms of insecticide resistance in insects involve either mutation in the target site of the insecticide, or an alteration in the rate of insecticide detoxification. Therefore, the aim of this study was to investigate the molecular basis of resistance to organophosphate insecticides in NWS throughout characterization of the carboxylesterase and acetylcholinesterase genes and expression evaluation of detoxification enzymes.

The predicted amino sequence of the E3 gene showed highly conserved domains within carboxyl/cholinesterases involved in the catalytic mechanism of active site. Two mutations previously described in other dipteran species were found, G137D, associated mainly with diethyl-OP hydrolysis, and W251S, associated with dimethyl-OP and pyrethroid hydrolysis. The frequency of these mutations was analyzed in different Uruguayan regions in 2003 and 2009, indicating a correlation between each mutation and the insecticide class used for NWS control.

The entire coding sequence of acetylcholinesterase was sequenced allowing surveying of mutations previously known for conferring insecticide resistance (I298V, G401A, F466Y). Only 2/135 individuals from NWS natural populations showed one of these mutations (F466Y). In contrast, G137D mutation in carboxylesterase E3, that also confers resistance to OP insecticides, was found in a high frequency in the same populations, suggesting this is one of the most important resistance mechanisms and that metabolic resistance has been preferentially selected rather altered target site in this species.

Differentially expressed genes in resistant NWS individuals were analyzed throughout candidate gene expression evaluation. For this, NWS transcriptome was sampled by deep

sequencing of polyadenilated transcripts using 454 sequencing technology, which generated a total of 548,940 sequences resulting in 37,432 unigenes (36,650 contigs and 782 singlets). Following functional annotation, gene expression of candidate genes belonging to detoxification enzyme families (carboxylesterases, monooxygenases P450 and GSTs) were evaluated in NWS resistant individuals surviving bioassays (LC90) with the active ingredient dichlorvos (dimethyl-OP) and from a control group (without treatment). No genes over expressed were found in the resistant group, and the ortholog to *CYP6G1* was down-regulated in this group, requiring further studies to determine the association between reduced expression of a P450 gene and OP resistance.

In both groups the target site was not altered. In contrast, E3 gene showed W251S mutation in all resistant individuals (44), while 13 individuals showed such mutation in the control group (40). This result corroborates the association between this mutation and the dimethyl-OP resistance in this species. Therefore, identification of mutations in carboxylesterase gene in NWS natural populations can be an important tool in monitoring insecticide resistance. The selection of appropriate chemicals for NWS control may contribute to implement more effective control strategies.

ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta tese está organizada em três partes. A primeira parte é constituída de uma introdução geral, contendo uma revisão bibliográfica sobre os aspectos biológicos e prejuízos provocados pela mosca-da-bicheira na atividade pecuária. Além disso, apresenta os principais mecanismos de resistência a inseticidas já descritos e algumas ferramentas de biologia molecular que podem ser utilizadas na investigação de tais mecanismos. A segunda parte está dividida em três capítulos que abrangem as bases moleculares da resistência a inseticidas organofosforados em *Cochliomyia hominivorax*. Os resultados de todos os capítulos estão apresentados na forma de artigos científicos já publicados ou manuscritos.

O primeiro capítulo aborda o mecanismo de resistência metabólica causado pela alteração estrutural da carboxilesterase E3 (alteração qualitativa), no qual está descrita toda a região codificante e as mutações envolvidas na resistência (artigo 1). A frequência dessas mutações foi analisada em períodos distintos mostrando uma correlação entre as mutações e as classes de inseticidas utilizadas no controle da espécie (artigo 2).

O segundo capítulo aborda o mecanismo de resistência baseado na alteração do sítio alvo do inseticida, no qual está descrita a caracterização do gene que codifica a acetilcolinesterase, sítio alvo de inseticidas organofosforados e carbamatos. Além do seqüenciamento de toda a região codificante do gene, mutações já caracterizadas por conferir resistência a inseticidas em outras espécies foram investigadas em diversas populações naturais de *C. hominivorax* (artigo 3).

O terceiro capítulo aborda o mecanismo de resistência baseado na super-expressão de enzimas metabólicas (alteração quantitativa), no qual está descrita a caracterização do transcriptoma da *C. hominivorax* e a avaliação da expressão gênica de genes candidatos em indivíduos resistentes selecionados em um bioensaio (artigo 4). Além da super-expressão, os mecanismos de resistência descritos nos capítulos anteriores também foram analisados nos indivíduos resistentes. A terceira parte da tese aborda uma discussão geral a respeito dos resultados encontrados, apresentando as implicações destes em estratégias de controle da mosca-da-bicheira.

PARTE I

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 ECTOPARASITAS E A PECUÁRIA NACIONAL

A pecuária bovina tem significativa importância no contexto sócio-econômico para o país, sendo responsável pela produção, em 2009, de aproximadamente 9 milhões de toneladas de carne, o que representa 16% da produção mundial. Em 2009, as receitas com exportação de carne bovina atingiram mais de US\$ 4,1 bilhões (ABIEC, 2010). Esses números podem ser ainda maiores, impulsionados pelo crescimento da população mundial e pelo aumento da renda dos países emergentes.

O Brasil possui um rebanho bovino de cerca de 202 milhões de cabeças (IBGE, 2008), e tem apresentado avanços nos índices de produtividade. O custo de produção do bovino brasileiro se situa dentre os mais baixos do mundo, o que traz uma grande vantagem competitiva. Mas apesar do presente sucesso, o Brasil ainda possui um grande potencial para aumentar a produtividade pecuária, à medida que aumentar a eficiência da ocupação das pastagens e investir em programas de sanidade animal, afim de aumentar o valor agregado dos produtos e atingir novos mercados para exportação.

A redução de custos de produção e o aumento de produtividade são fundamentais para atingir maior eficiência no setor agropecuário. Esses fatores estão intrinsecamente associados ao controle sanitário dos animais que, além de prover redução no custo e aumento na produtividade, proporciona uma melhoria da qualidade sanitária, que é uma das principais exigências dos mercados externos. Dentro desse contexto, os prejuízos econômicos provocados por ecto e endoparasitas estão entre os principais fatores limitantes da produção animal, afetando a produção de carne e leite, e a qualidade do couro produzido.

Embora não exista uma avaliação conclusiva sobre perdas econômicas na produção animal causadas por infestações de ectoparasitas, algumas estimativas podem chegar a US\$ 2 bilhões anuais no Brasil (Grisi et al., 2002). Sendo assim, o controle de ectoparasitas é de grande importância devido aos seus efeitos negativos na produção e saúde animal, e seu conseqüente impacto econômico. Dentre os principais desafios do controle destas pragas por meio de produtos químicos estão a necessidade de limitar os resíduos químicos na carne, no leite e no ambiente, e retardar a seleção da resistência por parte dos insetos

(Nolan e Schnitzerling, 1986). Os produtos utilizados para o controle de ectoparasitas de importância veterinária podem agir sistemicamente, após absorção e distribuição do composto nos tecidos do hospedeiro, ou pelo contato direto com o produto após aplicação tópica. Esse mercado de produtos veterinários antiparasitários no Brasil girou em torno de R\$ 960 milhões em 2009 (Sindan, 2010), sendo grande parte deste total destinado aos ectoparasitas.

Alguns ectoparasitas merecem especial atenção devido à redução da produtividade, aos gastos com controle, prevenção e manejo das infestações. Dentre eles está o carrapato bovino (*Rhipicephalus microplus*), e três espécies de dípteros: mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*), mosca da bicheira (*Cochliomyia hominivorax*) e mosca-do-berne (*Dermatobia hominis*), responsáveis por enormes prejuízos à pecuária nacional. O carrapato bovino, *R. microplus* (Acari: Ixodidae), causa grandes prejuízos ao rebanho devido à hematofagia e inoculação de substâncias tóxicas, o que causa irritação ao animal e, invariavelmente, acarreta na interrupção da alimentação e perda de peso. Indiretamente, há perdas na produção devido à transmissão de patógenos, como protozoários do gênero *Babesia* e pela rickettsia do gênero *Anaplasma*, responsáveis pela Tristeza Parasitária Bovina (Young e Morzaria, 1986).

Dentre as espécies de dípteros, a *H. irritans* (Diptera: Muscidae) causa estresse e redução nas taxas de ganho de peso, eficiência alimentar e produção de leite devido a seu hábito hematófago e sua ocorrência em alta densidade (Byford et al., 1999). O parasitismo por esta espécie pode causar grande incômodo aos bovinos, ocasionando significativas perdas à produção de carne e leite, além de expressivos gastos com controle. A *D. hominis* (Diptera: Cuterebridae), por sua vez, causa miíase furuncular provocando desvalorização do couro, além de redução no ganho de peso dos animais (Guimarães et al., 1983). Já a *C. hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), é considerada uma das mais importantes moscas causadoras de miíases primárias na região Neotropical, causando consideráveis prejuízos à atividade pecuária (Hall e Wall, 1995). A biologia dessa espécie e suas formas de controle são descritas a seguir com mais detalhes.

1.2 A MOSCA DA BICHEIRA E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), conhecida no Brasil como mosca-da-bicheira, é considerada um dos mais importantes ectoparasitas da pecuária nacional. Esta espécie causa severos prejuízos à produção pecuária principalmente devido à mortalidade e a redução na produtividade dos animais infestados. Algumas práticas de manejo rotineiramente realizadas em bovinos, como castração e descorna, e alguns ferimentos, como os produzidos com arame farpado, predispõem ao aparecimento das bicheiras. Os bezerros recém-nascidos podem apresentar elevada prevalência de infestação e mortalidade caso o cordão umbilical não seja devidamente tratado (Serenio et al., 1996; Barros e Vasquez, 2004). Já os ovinos são ainda mais sensíveis às miíases, com grande ocorrência na região ocular, patas e vulva. Além disso, um estudo recente mostrou que a prevalência de miíases em ovinos é de 5,7% (1,25% de mortalidade), dados superiores aos encontrados em bovinos (prevalência de 3,4% e mortalidade de 0,06%; Gil et al., 2009).

O ciclo de vida dessa espécie compreende aproximadamente 21 dias. A fêmea fecundada deposita seus ovos normalmente nas bordas de feridas pré-existentes ou em orifícios do corpo, como olhos, ouvidos e narinas. Metabólitos resultantes do processamento do tecido animal por outras larvas podem aumentar a atratividade das feridas como sítios de oviposição (Hammack et al., 1987; Chaudhury et al., 2002). Após 12 horas, os ovos eclodem e as larvas passam a se alimentar dos tecidos vivos do hospedeiro por aproximadamente 4 a 8 dias passando por três estágios larvais (L1, L2 e L3) e caem no solo para empupar. O período de pupa dura em média 7 dias mas pode chegar até 2 meses dependendo da temperatura, seguido pela emergência dos adultos. Após 5 dias, as fêmeas já estão prontas para serem fecundadas e realizar a oviposição, fechando o ciclo de vida da espécie (Figura 1).

A distribuição geográfica da mosca-da-bicheira se estendia do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina e Uruguai (Hall e Wall, 1995). No entanto, já na década de 1930 esta praga foi responsabilizada por causar um enorme impacto econômico na produção pecuária dos Estados Unidos, motivando iniciativas envolvendo a esterilização de machos e a implementação de um programa de erradicação através da liberação de insetos estéreis (IAEA, 1998; Bowman, 2006). A técnica do inseto estéril SIT (*Sterile Insect Technique*)

consiste na criação em massa de indivíduos da espécie em questão, na esterilização sexual destes, normalmente com radiação gama, e conseqüente liberação dos indivíduos estéreis em determinada região, onde os machos estéreis irão competir com os machos selvagens pelo acasalamento. Essa estratégia está fundamentada no fato de que as fêmeas dessa espécie copulam uma única vez durante o seu período de vida, e a cópula com um macho estéril leva ao desenvolvimento de embriões inviáveis, resultando em uma rápida redução do tamanho da população (Baumhover, 2002).

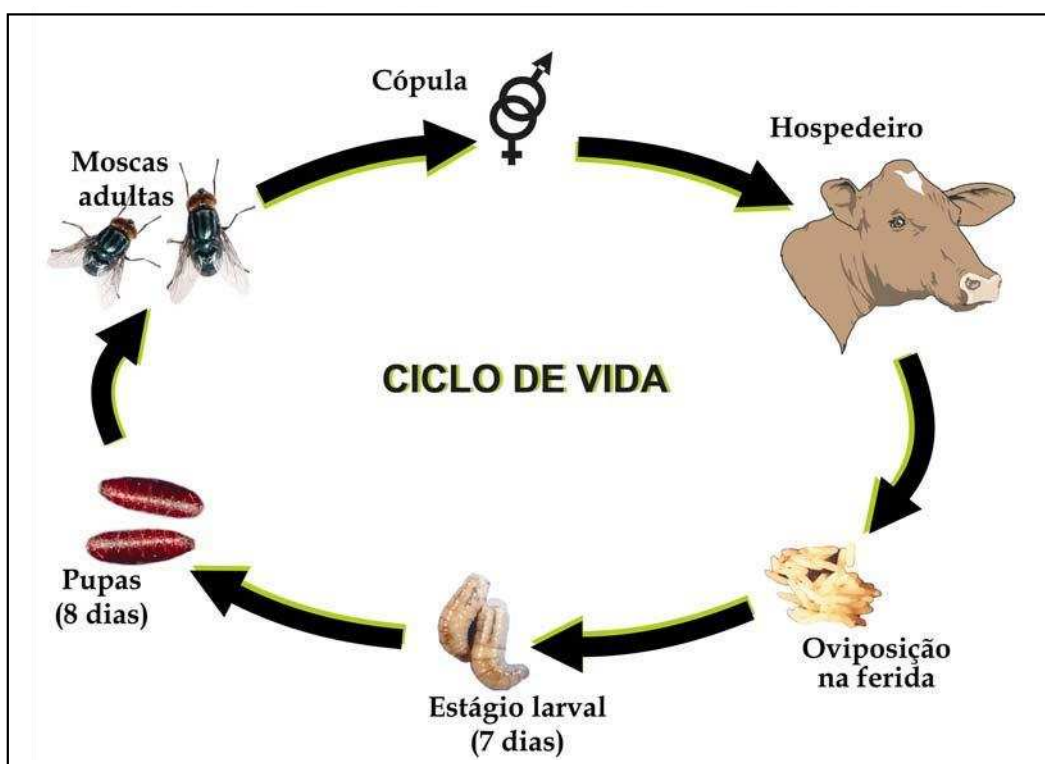


Figura 1. Ciclo de vida da *Cochliomyia hominivorax*.

Em 1958 foi iniciado o programa de erradicação de *C. hominivorax* nos Estados Unidos, sendo declarado livre de casos de infestação em 1966. Depois disso, foram estabelecidos outros programas de erradicação através do SIT no México (erradicação declarada em 1991), Belize e Guatemala (1994), El Salvador (1995), Honduras (1996), Nicarágua (1999), Costa Rica (2000) e Panamá (2001). Neste último está sendo mantida uma barreira permanente através da liberação de insetos estéreis na divisa com a Colômbia

para impedir a recolonização por moscas vindas da América do Sul (Wyss, 2000). A distribuição atual de *C. hominivorax* compreende uma parte da região do Caribe (Cuba, República Dominicana, Haiti, Jamaica, Trinidad e Tobago) e toda a América do Sul, com exceção do Chile.

Os prejuízos gerados pelo parasitismo por larvas de *C. hominivorax* nos rebanhos bovinos brasileiros foram estimados em cerca de U\$ 150 milhões ao ano (Grisi et al., 2002). As perdas são resultantes principalmente da redução na produtividade, mortalidade de animais (principalmente bezerros) e custo de tratamento. Com a realização de um plano piloto de erradicação da mosca-da-bicheira através de SIT no sul do Brasil e Uruguai em 2009 (Pontes et al., 2009), foi elaborado um questionário para avaliar as perdas causadas por essa espécie na região, chegando a um valor estimado de U\$ 0,51 por animal (Serviço de Sanidade Agropecuária do MAPA/RS, comunicação pessoal). Extrapolando esses dados para 200 milhões de cabeças no Brasil, essa espécie estaria causando um prejuízo de aproximadamente U\$ 100 milhões ao ano, valor próximo ao estimado anteriormente.

Apesar do sucesso na erradicação desta espécie através do SIT em alguns locais, o uso da técnica de insetos estéreis na América do Sul apresenta algumas limitações. Além da extensa área territorial com presença de florestas onde se abrigam animais selvagens (reserva natural) que poderiam atuar como reservatórios naturais para reinfestações após períodos de supressão, há escassez de parâmetros biológicos relevantes, como ausência de dados concretos sobre o problema da bicheira e de informações a respeito da ecologia das populações dessa espécie. Entender como as populações de *C. hominivorax* se comportam na América do Sul e Caribe é um pré-requisito para qualquer programa futuro de erradicação. Nesse sentido, o estudo da genética de populações pode identificar similaridades e diferenças em populações de diferentes regiões, possibilitando inferir sobre o fluxo gênico entre as populações e o possível grau de isolamento entre elas, e contribuindo para a implementação de maneiras mais efetivas de um programa de erradicação (Robinson et al., 2009). Uma vez obtidas essas informações que corroborem a viabilidade biológica da erradicação na América do Sul, ainda será necessário analisar a viabilidade econômica do projeto, uma vez que um projeto de erradicação demanda enormes quantidades de esforço e dinheiro por um longo período.

Devido à dificuldade de implementação de um plano de erradicação na sua atual distribuição geográfica, a principal forma de controle de *C. hominivorax* nessa região tem sido feita através da aplicação de produtos químicos. No caso de bezerros recém-nascidos e de algumas práticas de manejo como a castração, alguns produtos sistêmicos têm sido utilizados visando à prevenção da infestação por larvas de *C. hominivorax*. Esses produtos são compostos principalmente pelas lactonas macrocíclicas, como as abamectinas, ivermectinas, moxidectinas e doramectinas, que possuem um amplo espectro de ação no controle de diversas parasitoses. Apesar do sucesso demonstrado pelas lactonas macrocíclicas no início de sua utilização para controle da bicheira (Moya-Borja et al., 1993; Anziani et al., 1996; Benitez Usher et al., 1997; Anziani et al., 2000), esses produtos já não vêm apresentando a mesma eficácia em algumas regiões (JR Martins, comunicação pessoal). Mecanismos moleculares conferindo resistência às lactonas macrocíclicas já foram verificados em diversos outros organismos (revisado em Wolstenholme e Rogers, 2005; Gilleard, 2006), e estudos devem ser conduzidos em *C. hominivorax* uma vez que populações dessas espécies podem estar sendo selecionadas no campo.

Uma vez que já tenha ocorrido a infestação por larvas de *C. hominivorax*, o tratamento da ferida é realizado pela aplicação de produtos larvicidas conhecidos por matabicheiras, principalmente da classe dos organofosforados (OF). Os organofosforados podem ser divididos em dois sub-grupos, dietil-OPs e dimetil-OPs, de acordo com o grupamento químico que se liga ao carbono principal. Alguns mecanismos moleculares que causam resistência aos inseticidas OPs têm sido associados especificamente a cada um desses sub-grupos. De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (Sindan, 2010), em 2009, do total de 59 produtos registrados junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para tratamento de miíases causadas por *C. hominivorax*, 42 apresentam princípios ativos da classe dos organofosforados, sozinhos ou em combinação com outros princípios (Gráfico 1).

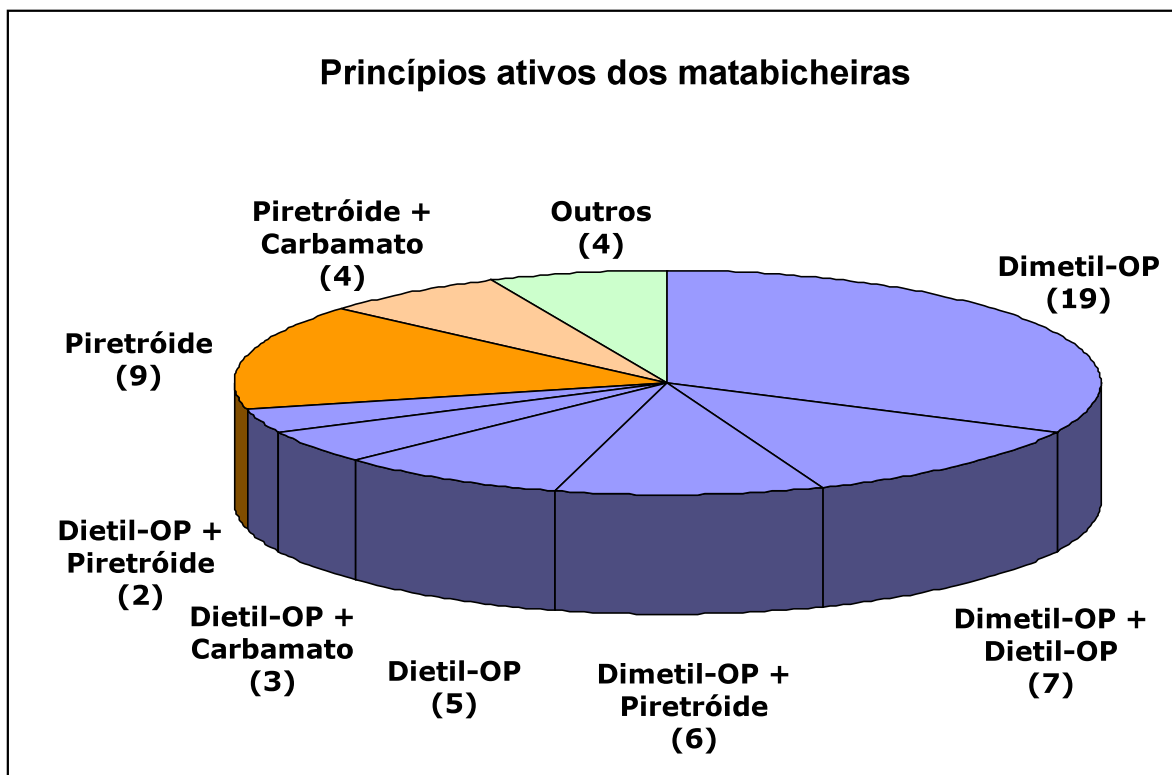


Gráfico 1. Classificação dos matabicheiras comercialmente disponíveis de acordo com as classes dos princípios ativos (Sindan, 2010). Em parênteses está descrito o número de produtos registrados para cada um dos grupos.

No Brasil, além da intensa utilização atual de matabicheiras a base de organofosforados, esses produtos vêm sendo utilizados há décadas para tratamento de miíases. Estes dois fatores podem estar contribuindo para a seleção de indivíduos resistentes, reduzindo a eficiência do controle dessa espécie e aumentando os prejuízos causados à atividade pecuária. Há suspeita de que a mosca *C. hominivorax* esteja se tornando resistente aos produtos à base de organofosforados utilizados em seu controle, já que estes produtos não mais impedem o desenvolvimento das larvas provenientes de novas posturas realizadas no local tratado, como anteriormente se verificava (Veríssimo, 2003). Nesse sentido, torna-se fundamental a realização de pesquisas que investiguem os mecanismos moleculares de resistência a tais produtos, visando à implementação de estratégias eficientes de controle.

1.3 RESISTÊNCIA A INSETICIDAS

No Brasil, o controle de ectoparasitas é realizado quase exclusivamente através da aplicação de produtos químicos. Uma grande preocupação decorrente do uso dos inseticidas é a seleção de linhagens de ectoparasitas resistentes. Ao longo dos anos, a prática indiscriminada do controle químico tem levado a uma rápida seleção de genótipos resistentes em diversas espécies. A consequência deste processo é a redução da eficácia dos produtos e, conseqüentemente, o aumento dos custos de controle, sendo a resistência um dos principais fatores limitantes ao uso de produtos químicos para controle de pragas. A maioria dos inseticidas causa uma rápida interrupção na neurotransmissão dos insetos, alterando o comportamento ou sobrevivência destes. A rápida ação é normalmente requerida uma vez que os insetos podem causar sérias perdas econômicas em poucas horas ou dias. Apesar de grande parte das classes de inseticidas possuírem um sítio alvo específico, algumas classes com estruturas químicas distintas podem apresentar o mesmo sítio alvo, resultando em resistência cruzada a diferentes classes caso haja alteração desse sítio (Casida, 2009).

A resistência a inseticidas pode ser definida como uma mudança herdável na sensibilidade a um produto que é refletida na falha em atingir o nível esperado de controle quando este produto é usado de acordo com as recomendações para aquela espécie (*Insecticide Resistance Action Committee*, www.irac-online.org). Ela pode ser conferida por diversos mecanismos como redução da penetração do inseticida, comportamento de fuga, insensibilidade ao produto e/ou desintoxicação metabólica (McKenzie e Batterham, 1998). Desta maneira, do ponto de vista genético, a resistência pode ser afetada por muitos genes, mas a contribuição de cada gene para o fenótipo resistente não é uniforme. Em alguns casos, um ou poucos genes podem ter um efeito predominante na resistência observada. Nestes casos, uma vez que esse gene seja localizado e estudado, torna-se possível elucidar os mecanismos da resistência e, conseqüentemente, retardar o progresso da resistência (Groeters e Tabashnik, 2000).

A análise dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência em diferentes organismos tem mostrado o limitado número de substituições de aminoácidos que pode ser tolerado em importantes receptores e enzimas. Esses mecanismos envolvem

predominantemente a alteração da sensibilidade do sítio alvo para que não seja suscetível à inibição do inseticida, ou a desintoxicação metabólica do inseticida antes de atingir o sítio alvo. Sozinhos ou em combinação, esses mecanismos conferem resistência, algumas vezes em níveis extremamente elevados, a todas as classes de inseticidas disponíveis (Hemingway et al., 2004).

No caso de inseticidas OF e carbamatos, o sítio alvo é a enzima acetilcolinesterase (AChE), que tem a função de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina após a sinapse química. Estes inseticidas fosforilam uma serina no sítio ativo da AChE, inibindo-a irreversivelmente. A perda de função desta enzima leva ao acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, provocando a desensibilização dos receptores de acetilcolina, que leva ao bloqueio da transmissão do sinal e, conseqüentemente, à morte do inseto (Sultatos, 2007). Análises bioquímicas e genéticas têm mostrado que diversos insetos e ácaros se tornaram resistentes a OPs e carbamatos através da modificação do sítio de ligação da AChE (Alon et al., 2008; Alout et al., 2009; Djogbénou et al., 2007; Fan et al., 2009; Mutero et al., 1994; Jiang et al., 2009; Kakani et al., 2008; Khajehali et al., 2010; Temeyer et al., 2008).

A maioria das mutações no gene da AChE que conferem resistência a inseticidas são conservadas dentre as espécies já descritas, e combinações de vários pontos de mutação levam a níveis maiores de resistência (Mutero et al., 1994). Em diversas linhagens resistentes de *Drosophila melanogaster* foi detectada a presença de quatro pontos de mutação no gene da AChE, sendo que a mutação G265A e o triplo mutante I161V/G265A/F330Y foram os mais freqüentes (Menozzi et al., 2004). Estes três pontos de mutação, analisados por mutagênese *in vitro* sítio-dirigida na mosca causadora de miíases na Austrália *Lucilia cuprina* (Calliphoridae), causaram, sozinhos ou em combinação, níveis consideráveis de insensibilidade a OF (Chen et al., 2001). Apesar de distantes filogeneticamente, a alta similaridade entre as seqüências de ambas as espécies e o grau de conservação dos sítios catalíticos indica que a AChE de *L. cuprina* tenha uma estrutura similar à AChE de *D. melanogaster* (Harel et al., 2000) e que as mutações podem alterar da mesma maneira a atividade da enzima. Assim, a caracterização da seqüência do gene da AChE em *C. hominivorax* e a verificação das mutações já caracterizadas por conferir

resistência em outras espécies pode fornecer informações sobre a resistência a inseticidas OF e carbamatos por alteração de sítio alvo nessa espécie.

As poucas e conservadas substituições de aminoácidos encontradas nos sítios alvos dos inseticidas se deve provavelmente ao fato de que suas funções são tão vitais ao organismo de tal maneira que somente poucas alterações podem diminuir a sensibilidade ao pesticida sem causar nenhuma perda das funções normais (French-Constant et al., 1998). Em contraste, genes associados com resistência metabólica normalmente estão envolvidos em funções de respostas ao ambiente, que tem relativamente poucas restrições intrínsecas e tendem a ser mais tolerantes às alterações genômica (Li et al., 2006a). Amplificação gênica, regulação transcricional e mutações em genes codificando as enzimas carboxilesterases, citocromo P450 monooxigenases (P450) e glutathione S-transferases (GST) têm sido identificados como mecanismos de resistência em diversas espécies (revisado em Li et al., 2006a).

Mudanças na atividade das carboxilesterases têm sido associadas com resistências a inseticidas OF em algumas espécies de artrópodes. Em *L. cuprina* e *Musca domestica*, uma mutação estrutural na carboxilesterase E3 reduz a habilidade de hidrolisar substratos carboxilésteres e confere a habilidade de hidrolisar substratos OPs (Newcomb et al., 1997; Claudianos et al., 1999). A substituição de uma glicina para aspartato na posição 137 (G137D) da proteína E3 confere um largo espectro de resistência a OPs, principalmente aos dietil-OPs (Campbell et al., 1998). Já a substituição do aminoácido triptofano na posição 251 por leucina ou serina (W251L e W251S) tem sido associada a um baixo nível de resistência aos dietil-OPs e alto nível de resistência a outro grupo de inseticidas organofosforados, os dimetil-OPs, e pode estar relacionada com resistência cruzada a inseticidas piretróides (Heidari et al., 2005; Zhang et al., 2010a). Em *C. hominivorax*, foram encontradas as mesmas mutações em um gene homólogo ao da carboxilesterase E3, indicando que o mesmo mecanismo de resistência pode ter evoluído nessa espécie (Carvalho et al., 2006). Nesses casos, houve uma alteração qualitativa nas enzimas carboxilesterases, alterando sua especificidade ao substrato. Assim, a determinação da frequência dessas mutações pode indicar o nível de suscetibilidade de uma população a determinada classe de inseticida, auxiliando na determinação de estratégias de controle.

Além disso, a caracterização de toda a sequência codificante da carboxilesterase E3 pode revelar novas mutações associadas ao fenótipo resistente.

Já em muitas espécies de artrópodes, como mosquitos, carrapatos, afídeos, baratas, gafanhotos e algumas mariposas, a super-expressão de carboxilesterases (alteração quantitativa) foi documentada como uma resposta evolutiva à pressão de seleção de inseticidas OF e carbamatos (Field et al., 1999; Karunaratne et al., 1998; Lee et al., 2000; Melo-Santos et al., 2010; Small e Hemingway, 2000; Srigiriraju et al., 2009; Teese et al., 2010; Villarino et al., 2003). Neste tipo de resistência, as carboxilesterases atuam como um ligante de alta afinidade que sequestram e, muito vagarosamente, hidrolisam OPs, prevenindo a inibição do sítio alvo acetilcolinesterase. A causa da síntese excessiva dessas enzimas pode ser a amplificação de genes no genoma (Mouches et al., 1986; Vaughan e Hemingway, 1995), assim como a regulação positiva da transcrição, sem o evento da amplificação gênica (Rooker et al., 1996; Raymond et al., 1998).

Outra importante família de enzimas envolvida no processo de resistência metabólica são as glutathione S-transferases (GST). As GST são uma grande família de enzimas multifuncionais envolvidas diretamente na detoxificação de compostos endógenos e xenobióticos, incluindo inseticidas (Enayati et al., 2005; Le Goff et al., 2006; Huang et al., 1998; Kristensen, 2005; Lumjuan et al., 2005; Ranson e Hemingway, 2005; Salinas e Wong, 1999; Vontas et al., 2007; Wei et al., 2001; Yu et al., 2008), e no metabolismo secundário de diversos compostos oxidados pelas enzimas monooxigenases P450. Mais do que pelas mudanças qualitativas nas enzimas, a associação da resistência com as GST tem sido atribuída ao aumento na quantidade de uma ou mais GSTs, como resultado da amplificação gênica ou, mais comumente, através do aumento nas taxas transcricionais (Grant e Hammock, 1992; Ranson et al., 2001). Essas enzimas têm o potencial de causar resistência às principais classes de inseticidas (Ortelli et al., 2003).

E o terceiro grupo de enzimas já reconhecido como de grande importância na degradação de inseticidas são as monooxigenases P450 (Berge et al., 1998; Djouaka et al., 2008; Guerrero et al., 2007; Karunker et al., 2008; Müller et al., 2008; Scott, 1999; Vontas et al., 2005; Wondji et al., 2009; Yang et al., 2006; Zhu et al., 2008). Elas compõem uma diversa família de enzimas hidrofóbicas extremamente importantes nos insetos devido ao

seu envolvimento na regulação de compostos endógenos como hormônios, e no metabolismo de xenobióticos, como pesticidas e toxinas de plantas (Scott, 1999). Sua elevada atividade em mosquitos resistentes a inseticidas já foi demonstrada, frequentemente em associação com atividades alteradas de outras enzimas. Assim como em *Anopheles gambiae* (Vulule et al., 1999), a maioria dos casos de resistência mediada por monooxigenases P450 resulta de um aumento na detoxificação dos inseticidas por ativação destas enzimas. Mas em casos nos quais o princípio ativo do inseticida deve se submeter à bioativação mediada por P450, como ocorre com muitos OF, é também possível que a resistência seja atingida através da diminuição da ativação destas enzimas (Konno et al., 1989; Li et al., 2003; Scott, 1999; Willoughby et al., 2007).

A identificação dos genes codificantes dessas três principais famílias de enzimas envolvidas no processo de resistência em três dípteros com genomas completamente sequenciados, *D. melanogaster*, *A. gambiae* e *Aedes aegypti*, permitiu a comparação do número de genes codificantes para as três famílias, sendo 149, 173 e 235 genes, respectivamente (Strode et al., 2008). A diferença entre a quantidade e o tipo de enzima encontrada em cada espécie pode ser devido ao fato delas ocuparem nichos diferentes e estarem, então, expostas a diferentes escalas de compostos exógenos, favorecendo a radiação independente das enzimas envolvidas na detoxificação xenobiótica. Exemplo disso é o conteúdo gênico da abelha *Apis mellifera*, que possui apenas 80 genes codificantes dessas três famílias enzimáticas (carboxilesterases, P450 e GST), o que pode diminuir sua capacidade de detoxificação de pesticidas (Claudianos et al., 2006).

À medida que os genomas completos vão sendo sequenciados e os genes de detoxificação metabólica identificados, verifica-se que estas famílias gênicas estão evoluindo rapidamente e cada inseto tem um conjunto único de genes de detoxificação, com alguns tendo ortólogos em outras espécies, indicando uma ancestralidade comum desses genes (Ranson et al., 2002). A rápida expansão e diversificação dos genes de detoxificação provavelmente facilitaram a adaptação dos insetos aos nichos ecológicos particulares e, em uma escala de tempo mais recente, tem permitido sobreviver aos diversos xenobióticos produzidos pelo homem, incluindo os inseticidas (Strode et al., 2008).

Como já descrito, são inúmeros os mecanismos pelos quais um inseto pode se tornar resistente aos produtos químicos, tais como a insensibilidade ao sítio alvo e/ou resistência metabólica causada por alteração estrutural ou da expressão de genes que codificam enzimas de detoxificação. Considerando esses diversos mecanismos possíveis de desenvolvimento da resistência a inseticidas em *C. hominivorax*, torna-se fundamental uma abordagem molecular mais abrangente visando à identificação do maior número possível desses mecanismos. Portanto, para elucidar as bases moleculares da resistência a inseticidas organofosforados nesta espécie, nesse projeto foram utilizadas diversas ferramentas de biologia molecular, desde as já bem caracterizadas como o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), até as mais recentes metodologias como os seqüenciamentos de nova geração. O funcionamento e a finalidade de cada uma dessas técnicas são discutidos a seguir.

1.4 BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DA RESISTÊNCIA

A resistência a inseticidas é um dos casos mais bem documentados de evolução adaptativa a mudanças ambientais. Embora somente um número limitado de mecanismos de resistência tenha sido demonstrado, é provável que a diversidade dentro das famílias das enzimas envolvidas na resistência metabólica possa contribuir substancialmente para a resistência a diversas classes de inseticidas. Dessa maneira, técnicas avançadas de biologia molecular têm sido utilizadas com o intuito de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência.

A identificação de genes diferencialmente expressos em um tecido ou organismo em uma determinada condição e estágio de desenvolvimento, em relação à outra condição com a qual se deseja comparar, pode permitir a compreensão dos fatores necessários ou responsáveis por determinado fenótipo diferencial. Essa identificação se dá pela quantificação dos transcritos, os quais podem indicar alteração na quantidade das proteínas correspondentes. Abordagens genômicas globais como os microarranjos de DNA (*microarrays*) têm sido bastante utilizadas para análise do perfil de expressão gênica em linhagens resistentes a inseticidas de alguns organismos (David et al., 2005; Djouaka et al., 2008; Ghanim e Kontsedalov, 2007; Liu et al., 2007; Marcombe et al., 2009; Müller et al.,

2007; Poupardin et al., 2008; Strode et al., 2008; Vontas et al., 2005 e 2007; Willoughby et al., 2006 e 2007). Esta metodologia tem a vantagem de permitir a análise simultânea da expressão de centenas a milhares de genes, definindo conjuntos de genes relacionados a funções estruturais, fisiológicas ou metabólicas. Porém, as análises baseadas em hibridização, como os *microarrays*, geralmente dependem do conhecimento prévio de quais genes serão avaliados, sendo realizadas principalmente nas espécies com genomas já seqüenciados.

Com os avanços obtidos nas plataformas de seqüenciamento de nova geração, essas novas metodologias são alternativas ao uso das técnicas baseadas em hibridização para análise transcriptômica comparativa, especialmente para espécies não-modelos, para as quais há pouca informação genômica disponível. A transcriptômica, também chamada de análise global da expressão gênica, é uma das ferramentas usadas para medir o conjunto de todas as moléculas de RNAm produzidas em uma célula ou conjunto de células. Diferentemente do seqüenciamento de genomas e da genômica comparativa, que gera uma informação estática baseada no DNA, a transcriptômica permite uma caracterização do conjunto das moléculas de RNAm e sua variação entre diferentes estados em uma escala global, refletindo os genes que estão ativamente expressos em um dado momento (Zhang et al., 2010b). O seqüenciamento do transcriptoma (*RNA-seq*) através destas novas tecnologias apresenta diversas vantagens, como a identificação de genes não previamente caracterizados por participar de determinada via metabólica. Além disso, técnicas como o *RNA-seq* provêm um perfil completo do transcriptoma e permitem a quantificação de transcritos (Marguerat e Bahler, 2010; Wang et al., 2009; Wilhelm e Landry, 2009), particularmente para os organismos não-modelos.

As tecnologias de seqüenciamento de nova geração (NGS, *Next Generation Sequencing*) vêm causando um grande impacto na geração de dados visando responder questões biológicas relacionadas ao genoma (Mardis et al., 2008). Estas tecnologias não estão apenas mudando as estratégias de seqüenciamento, mas estão permitindo ampliar as questões biológicas a serem respondidas. Três plataformas de seqüenciamento massivo em paralelo de DNA têm sido bastante utilizadas: Roche/454, Illumina e Applied Biosystems/SOLiD. Através de diferentes abordagens, cada tecnologia procura amplificar fragmentos únicos utilizando adaptadores que se ligam a esses fragmentos, evitando o

passo da clonagem em bactérias, requerido na abordagem tradicional. A grande quantidade de informação gerada com precisão por essas novas plataformas tem sido utilizada para diversas aplicações como seqüenciamento *de novo* de organismos não modelos e avaliação global do perfil de expressão gênica. As plataformas Illumina e Applied Biosystems/SOLiD possuem tecnologias de seqüenciamento de fragmentos curtos (50 – 100 pb), sendo mais indicadas para análise de expressão, enquanto a Roche/454 gera fragmentos maiores, possibilitando a montagem *de novo* de genomas e transcriptomas (Mardis et al., 2008, Shendure e Hanlee, 2008).

Dentre essas plataformas de seqüenciamento, duas foram utilizadas nesse trabalho visando à caracterização do transcriptoma de *C. hominivorax* e identificação de genes diferencialmente expressos em indivíduos resistentes dessa espécie, a Roche/454 e a Illumina. A tecnologia de seqüenciamento realizada pela Roche/454, descrita por Margulies et al. (2005), foi a primeira disponível comercialmente, e dentre suas aplicações, destaca-se a análise metagenômica, o resseqüenciamento e seqüenciamento *de novo* de genomas de diversas espécies, e em alguns casos a quantificação da expressão (Cantacessi et al., 2010; Chun et al., 2010; Gilardoni et al., 2010; He et al., 2010; Mazé et al., 2010; Torres et al., 2008; Vera et al., 2008). Esta metodologia utiliza uma tecnologia alternativa de seqüenciamento conhecida como piroseqüenciamento. Resumidamente, os fragmentos da biblioteca de DNA (ou cDNA) são misturados com micro-esferas que possuem em sua superfície oligonucleotídeos complementares aos adaptadores dos fragmentos, e estes complexos esfera-fragmento são isolados em micelas, nas quais ocorre a amplificação do fragmento dentro de gotas de uma emulsão. Após a amplificação, as micro-esferas são depositadas em micro-poços em uma lâmina, onde são adicionadas as enzimas requeridas no processo de seqüenciamento. Este processo utiliza uma cascata enzimática que gera luz a partir do pirofosfato inorgânico (PPi), liberado pela incorporação de nucleotídeos a medida que a polimerase replica o DNA. Os nucleotídeos são adicionados separadamente, e o número de fótons gerados pela cascata enzimática é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados (Figura 2).

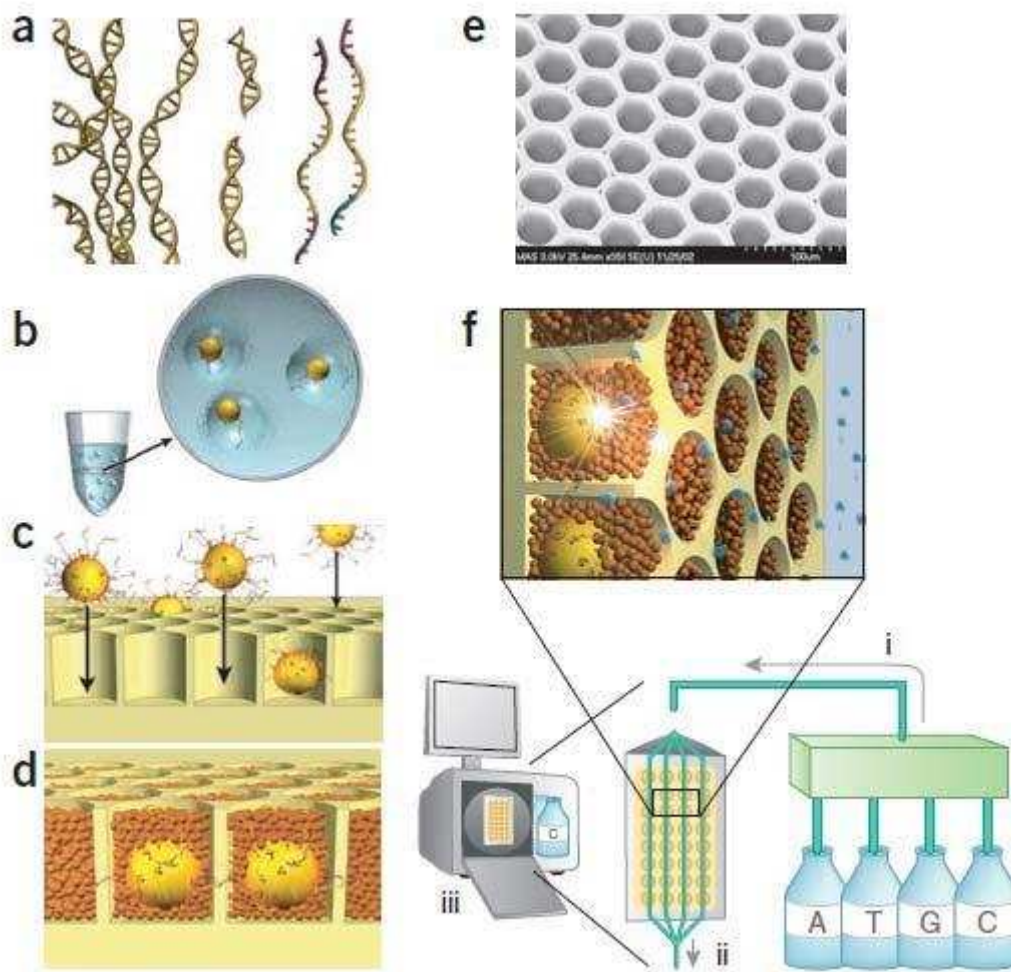


Figura 2. Esquema da tecnologia de sequenciamento 454. (a) DNA genômico é isolado, ligado a adaptadores e separados em simples-fita. (b) Fragmentos são ligados a esferas sob condições que favorecem um fragmento por esfera, que são isoladas e compartimentalizadas em gotas de uma emulsão onde ocorre a amplificação por PCR, resultando em esferas com 10 milhões de cópias de um único fragmento. (c) A emulsão é desfeita e as esferas são depositadas, individualmente, em micro-poços de uma lâmina. (d) Esferas menores contendo as enzimas requeridas para o sequenciamento são depositadas em cada micro-poço. (e) *Scanning* por micrografia eletrônica de uma parte da lâmina mostrando os micro-poços antes da deposição das esferas. (f) Instrumentos requeridos, i – captador dos fluidos, ii – lâmina de fibra ótica com os micro-poços, iii – câmera para captação das imagens acoplada a um computador. Adaptado de Rothberg e Leamon (2008).

Cada rodada de sequenciamento utilizando essa tecnologia resulta em aproximadamente 500 mil seqüências (*reads*) com tamanhos entre 300 e 450 pb. Uma vez que estas seqüências obtidas são montadas (*assembly*), é gerado um banco de dados de seqüências sobrepostas contíguas (*contigs*), representando o genoma ou transcriptoma do organismo seqüenciado. No entanto, deve-se ressaltar que a caracterização do transcriptoma

de uma espécie, no caso *C. hominivorax*, é apenas o primeiro e fundamental passo para uma série de novas investigações visando ampliar os conhecimentos de cunho básico e aplicado. Neste projeto, o banco de dados gerados pelo seqüenciamento do transcriptoma desta espécie serve como base para a seleção de genes candidatos possivelmente envolvidos no processo de resistência que terão sua expressão gênica avaliada por reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa em tempo real (qRT-PCR), além de servir como base para anotação de seqüências curtas provenientes de outras metodologias de seqüenciamento utilizadas para avaliação de expressão gênica.

Diversas enzimas que metabolizam pesticidas mas que não pertencem às principais famílias de genes de metabolização (carboxilesterase, P450 e GST) têm sido encontradas em bactérias de solo e várias delas com homólogos de função ainda não conhecida em insetos (Claudianos et al., 2002). Isso sugere que mecanismos adicionais de resistência podem ser encontrados através das modernas técnicas de biologia molecular (Oakeshott et al., 2003). Nesse contexto, se faz necessária a utilização de ferramentas moleculares que permitam uma comparação global da expressão gênica em indivíduos resistentes e suscetíveis de *C. hominivorax*, possibilitando a identificação de novos genes que possam estar envolvidos no metabolismo de inseticidas. Dessa maneira, a análise global da expressão gênica possibilitará um maior entendimento da resistência e sua complexidade, beneficiando, em longo prazo, a produção animal.

Na geração do perfil global de expressão gênica, a Illumina tem se destacado dentre as plataformas de seqüenciamento de nova geração (Beck et al., 2010; Buck et al., 2010; Libault et al., 2010; Neachev et al., 2010; Otto et al., 2010). Essa tecnologia utiliza uma amplificação conhecida como ‘amplificação em ponte’, uma vez que ambas as extremidades do fragmento de DNA (ou cDNA) ficam presas a uma estrutura sólida devido à complementaridade dos adaptadores aos oligonucleotídeos na superfície da estrutura sólida. Os produtos resultantes da amplificação ficam agrupados em uma única localização, como se fossem colônias. Após a formação desses agrupamentos, é realizado o ‘seqüenciamento por síntese’, no qual os quatro nucleotídeos marcados com fluorescência são adicionados simultaneamente junto aos demais reagentes. Esses nucleotídeos possuem a extremidade 3'-OH bloqueadas quimicamente, de tal forma que cada incorporação é um evento único, permitindo a captação da fluorescência. Após cada captação de imagem, o

bloqueio da extremidade 3' é removido quimicamente permitindo a próxima incorporação de nucleotídeo pela DNA polimerase (Figura 3; Mitra e Church, 1999; Adessi et al., 2000; Bentley, 2006; Fedurco et al., 2006).

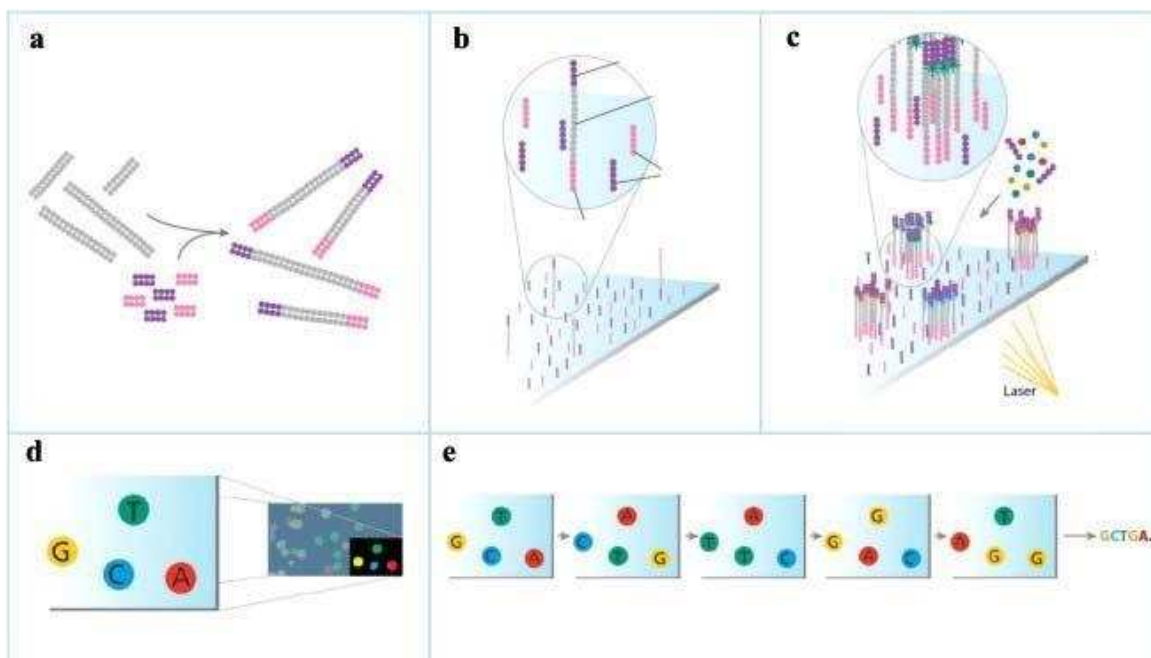


Figura 3. Esquema do sequenciamento Solexa. (a) Fragmentação randômica do DNA e ligação dos adaptadores nas duas extremidades. (b) Ligação dos fragmentos de DNA à superfície sólida através dos oligonucleotídeos complementares aos adaptadores. (c) Após a ‘amplificação por ponte’, os *clusters* de DNA são sequenciados através da incorporação, um a um, dos nucleotídeos fluorescentes com a extremidade 3' bloqueada. (d) Após a excitação por *laser*, é realizada a captura da imagem da fluorescência emitida por cada *cluster*. (e) Ciclos repetidos de sequenciamento determinam a sequência das bases, uma a uma, do fragmento. Adaptado de Mardis et al. (2008).

A utilização dessa recente ferramenta de biologia molecular pode permitir a identificação de genes ou até mesmo redes de genes envolvidas na resistência a inseticidas. Ao analisar a expressão gênica global de indivíduos de *C. hominivorax* que sobreviveram a uma dose letal para a maioria da população e de indivíduos não tratados, será possível identificar quais genes estão tendo seu nível de expressão alterado permitindo que o indivíduo sobreviva na presença do inseticida. A quantidade de informação que pode ser gerada através dessas novas técnicas de biologia molecular evidencia o quão importante elas serão na elucidação de mecanismos moleculares envolvidos na resistência a inseticidas em diversas espécies de interesses das áreas agrícola, pecuária e saúde pública.

Após a análise global do perfil de expressão gênica, seja por *microarrays* ou pelas tecnologias de seqüenciamento de nova geração, o nível de expressão dos genes deve ser validado por uma metodologia mais sensível de detecção, a PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Através desta técnica, a quantidade de produto amplificado é avaliada durante o curso da reação pelo monitoramento da fluorescência de fluoróforos introduzidos na reação que é proporcional à quantidade de produto formado, e o número de ciclos de amplificação requeridos para obter uma determinada quantidade de moléculas de DNA é registrado (revisado em Wong e Medrano, 2005; Kubista et al., 2006). Apesar da técnica qRT-PCR ser amplamente empregada em trabalhos visando a análise da expressão gênica, sua utilização se restringe a genes cujas seqüências, ou parte delas, já foram previamente caracterizadas, uma vez que se faz necessária a utilização de oligonucleotídeos específicos. Para casos como o da *C. hominivorax*, no qual não há informação genômica disponível, a geração desse banco de dados através da caracterização do transcriptoma da espécie se torna fundamental para a seleção de genes candidatos a serem avaliados. Dessa maneira, a utilização de diversas técnicas de biologia molecular pode prover informações valiosas que contribuam para um maior entendimento dos mecanismos moleculares da resistência e, conseqüentemente, para retardar o progresso da mesma através de estratégias de manejo.

OBJETIVO

O objetivo geral do projeto foi investigar as bases moleculares da resistência a inseticidas organofosforados na mosca-da-bicheira *Cochliomyia hominivorax*. Para tal, foram investigados os mecanismos moleculares envolvidos na resistência metabólica, como a alteração da carboxilesterase E3 e o nível de expressão de genes codificantes de enzimas carboxilesterases, P450 e GST. Além disso, foi caracterizado o gene codificante da acetilcolinesterase, visando à identificação de mutações relacionadas com a resistência baseada na alteração do sítio alvo.

Objetivos específicos:

- 1 . Caracterização do gene codificante da carboxilesterase E3 e análise da frequência das mutações ao longo da distribuição geográfica da espécie, visando à identificação de resistência metabólica baseada na alteração qualitativa de uma enzima de detoxificação.
- 2 . Caracterização do gene codificante da acetilcolinesterase e análise da frequência das mutações ao longo da distribuição geográfica da espécie, visando à identificação do mecanismo de resistência baseado na alteração do sítio alvo do inseticida.
- 3 . Análise da expressão gênica de genes codificantes de carboxilesterases, P450 e GST em indivíduos resistentes a alta concentração de inseticida organofosforado, visando à identificação do mecanismo de resistência baseado na alteração quantitativa de enzimas metabólicas.

PARTE II

BASES MOLECULARES DA RESISTÊNCIA

CAPÍTULO 1

Resistência metabólica baseada na alteração da carboxilesterase E3

Artigo 1: Carvalho, R. A., Torres, T. T., Paniago, M. G., Azeredo-Espin, A. M. L. (2009). Molecular characterization of esterase E3 gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Medical and Veterinary Entomology* **23** (Suppl. 1), 86–91.

“Caracterização molecular do gene da carboxilesterase E3 associado com resistência a inseticidas organofosforados na mosca-da-bicheira *Cochliomyia hominivorax*”

Resumo

A mosca-da-bicheira, *Cochliomyia hominivorax* (Calliphoridae), é uma das principais moscas causadoras de miíases da América do Sul, sendo responsável por severos prejuízos à atividade pecuária através da mortalidade e redução da produtividade dos animais infestados. No Brasil, seu controle tem sido realizado principalmente através da aplicação de inseticidas organofosforados. Porém, o uso indevido e/ou prolongado desses agentes químicos pode provocar seleção de indivíduos resistentes. A resistência é causada principalmente pela alteração do sítio alvo ou pela detoxificação metabólica do inseticida antes de atingir o sítio alvo. Baseado em estudos prévios, o objetivo desse estudo foi a caracterização da região codificante do gene da carboxilesterase E3, o qual pode conter mutações (G137D e W251S) já caracterizadas por conferir resistência a inseticidas em *Lucilia cuprina* e *Musca domestica*. A sequência predita da enzima carboxilesterase E3 em *C. hominivorax* apresentou domínios altamente conservados dentre as carboxil/colinesterases que contribuem para o mecanismo catalítico do sítio ativo. Dentre os indivíduos amostrados, foram seqüenciados alelos que continham a mutação G137D e outros com a mutação W251S. Assim como em *L. cuprina*, as duas mutações não foram encontradas no mesmo alelo. Esse resultado pode ser explicado pela baixa frequência de recombinação entre os dois sítios e pelo fato de que a atividade OP-hidrolase do alelo com a mutação W251S (localizada fora do sítio ativo) requer a manutenção da atividade selvagem da enzima, com a presença da glicina na posição 137 do sítio ativo. A identificação das mutações nesse gene em populações naturais da mosca da bicheira pode ser uma ferramenta importante de monitoramento da resistência a inseticidas ao longo da atual distribuição geográfica da espécie, contribuindo para a implementação de estratégias mais efetivas de controle.

Molecular characterization of esterase E3 gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*

R. A. CARVALHO, T. T. TORRES, M. G. PANIAGO and
A. M. L. AZEREDO-ESPIN

Laboratório de Genética Animal, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

Abstract. The New World screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera: Calliphoridae), is one of the most important myiasis-causing flies in South America. It is responsible for severe economic losses to livestock producers, mainly because it causes mortality in newborn calves and reductions in the quality of leather and in the production of milk and meat. The economic losses caused by myiasis, along with those caused by other internal and external parasites, are the main factors limiting meat production. In Brazil, *C. hominivorax* has been controlled by applying insecticides, particularly organophosphate (OP)-based compounds. However, the improper and continuous use of these chemicals can lead to the selection of OP-resistant strains. This, associated with the fast development of OP resistance in other myiasis-causing flies, shows the importance of investigating resistance in *C. hominivorax*. Based on the findings of previous studies, the objective of the current work was to isolate and sequence the E3 gene in *C. hominivorax*. Mutations at the positions (Gly137 and Trp251) responsible for conferring OP resistance in *Lucilia cuprina* and *Musca domestica* L. (Muscidae) were identified in *C. hominivorax*. In addition, the orthologous region in *C. hominivorax* contained motifs that are highly conserved among carboxyl/cholinesterases and contribute to the catalytic mechanism of the active site. The characterization of this gene in natural populations of New World screwworm can be an important tool for monitoring resistance to insecticides throughout its current geographic distribution. This will provide information for the selection and implementation of more effective pest management programmes.

Key words. Esterase, insecticide resistance, myiasis, organophosphorus, screwworm.

Introduction

Brazil has the largest commercial herd of cattle in the world, numbering approximately 200 million in total (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2005). High levels of meat production require efficient sanitary control of animals in order to reduce costs and increase meat quality. The economic losses caused by internal and external parasites, such as myiasis-causing

flies, are the main factors limiting meat production. The New World screwworm (NWS), *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera: Calliphoridae), is one of the most important myiasis-causing flies in the Neotropics (Hall & Wall, 1995). The female flies lay eggs on fresh wounds and the larvae penetrate the host tissues and create an open, growing lesion (Zumpt, 1965). This occurrence is responsible for severe economic losses to livestock producers, especially through mortality in newborn calves,

Correspondence: Dr R. A. Carvalho, Laboratório de Genética Animal, CBMEG–Unicamp, PO Box 6010, 13083-875 Campinas, São Paulo, Brazil. Tel.: + 55 19 352 11141; Fax: + 55 19 3521 1089; E-mail: rassis@unicamp.br

and reductions in the quality of leather and in milk and meat production.

Eradication of NWS in North America and almost all of Central America has been achieved by using an area-wide integrated approach, including the release of sterile insects (Wyss, 2000). The current distribution of *C. hominivorax* covers part of the Caribbean region and South America, except Chile. In these countries, *C. hominivorax* has been controlled for several decades almost exclusively by insecticides, particularly organophosphate (OP)-based compounds, whose target site is the enzyme acetylcholinesterase. This, associated with the fast development of OP resistance in other myiasis-causing flies (Levot, 1995), shows the importance of investigating genetic resistance in *C. hominivorax*.

Insecticide resistance is assumed to be a pre-adaptive phenomenon because, prior to insecticide exposure, rare individuals that carry an altered genome already exist. This genome predisposes them to the development of different resistance mechanisms and allows them to survive the evolutionary selection pressure of insecticides (World Health Organization, 1957). Thus, resistance of insects to insecticides is an ongoing challenge to pest management, but, at the same time, represents an ideal context in which to study the process of microevolution and environmental adaptation (Li *et al.*, 2007). The major mechanisms of resistance described so far involve either metabolic detoxification of the insecticide before it reaches its target site, or changes in the sensitivity of target sites that abolish the insect's susceptibility to the insecticide. Alone, or in combination, these mechanisms confer resistance to all available classes of insecticide (Hemingway *et al.*, 2004). The most common metabolic resistance mechanisms involve esterases, glutathione S-transferases or monooxygenases.

Esterases have been implicated in both target sites and metabolic resistance to OP insecticides in 49 pest insects (revised in Oakeshott *et al.*, 2005). Several cases of metabolic resistance in the Hemiptera (aphids and whiteflies) and lower Diptera (mosquitoes) involve sequestration, in which an esterase that binds the pesticide with high affinity is over-expressed (in many cases because of gene amplification) to a degree that allows effective sequestration of the toxin. In higher Diptera (blowflies and houseflies), metabolic resistance has been associated with a structural change in the esterase that confers detoxification activity that allows the enzyme to degrade the pesticide.

Structural changes in esterase 3 (E3) have been characterized in some OP-resistant strains of two Calliphoridae, *Lucilia cuprina* (Newcomb *et al.*, 1997a) and *Lucilia sericata* Meigen (Hartley *et al.*, 2006), and one Muscidae, *Musca domestica* L. (Claudianos *et al.*, 1999). Decreased carboxylesterase activity has been observed in resistant individuals. These findings have been explained by a mutant ali-esterase hypothesis in which a structural mutation in a carboxylesterase results in a reduced ability to hydrolyze carboxylesterase substrates, but an acquired ability to hydrolyze OP substrates (Claudianos *et al.*, 1999).

Recently, there have been two single nucleotide changes reported in *C. hominivorax* at the same positions (Gly137 and Trp251) in the E3 gene (*ChαE7*) that confer the two forms of OP resistance

in *L. cuprina* and *M. domestica* (Carvalho *et al.*, 2006). A fragment that included the intron III (63 bp) and the exon region, corresponding to positions 359–831 in the *L. cuprina* *αE7* nucleotide sequence, as well both amino acid positions (137 and 251) related to OP resistance, was amplified and sequenced in *C. hominivorax*.

Based on previous studies, the objective of the current study was to isolate and sequence the entire coding region of the E3 gene in *C. hominivorax*, which is orthologous to that previously described for some Diptera species. The sequencing of the E3 gene in *C. hominivorax* allowed the characterization of mutants and wild alleles in this species. In addition, cDNA isolation will allow biochemical assays to be carried out in order to establish the associations of some mutations with insecticide resistance. The identification of resistant individuals in natural populations can be an important tool for surveying resistance to insecticides throughout a current geographic distribution. This will provide information for the selection and implementation of more effective pest management programmes.

Materials and methods

Samples

Larvae of *C. hominivorax* were obtained from the wounds of infested cattle in Caiapônia, Goiás, Brazil, in 2005. Collected larvae were reared to adults in the laboratory. Total RNA was extracted from larvae and adults using Trizol (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, U.S.A.), according to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized using the ImProm-II™ Reverse Transcription System Kit (Promega Corp., Madison, WI, U.S.A.), according to the manufacturer's instructions.

cDNA amplification

The total coding region of E3 was amplified using six primers (Fig. 1). Two of them had been previously described for *L. cuprina* (Newcomb *et al.*, 1997a): 7F1a (5' – AGC TAA ATC CCG AAA CTA AAC – 3') and 7R4 (5' – CTG TKG ARC CNT ATC AGA C – 3'). The primers 7R3a (5' – ATC CTT ATC ATT ATT TTC ACC C – 3') and 7F4a (5' – CTG TKG ARC CNT ATC AGA C – 3') were designed from sequenced fragments amplified by 7F1a/7R4 in *C. hominivorax* (Carvalho *et al.*, 2006). The primers E3F (5' – ATG AAT TTC AAI GTY AGY YWI ITG GAG – 3') and 7R7 (5' – TTG GTT ACA CTC TAA AAT AAA TC – 3') were designed based on E3 nucleotide sequence alignment of *LcαE7* of *L. cuprina*, *MdαE7* of *M. domestica*, *DmαE7* of *Drosophila melanogaster* Meigen and *HixE7* of *Haematobia irritans* L. obtained from GenBank. The amplification conditions were standardized and the polymerase chain reaction (PCR) procedures were carried out in a Perkin-Elmer 9600 Thermal Cycler (Perkin Elmer, Inc., Waltham, MA, U.S.A.). The 15-μL PCR mix contained 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1 unit of *Taq* polymerase (Invitrogen, Inc.), 200 μM of each dNTP, 1.8 mM MgCl₂, 1 μM of each primer and 10–15 ng of DNA. After an initial denaturing step of 3 min at 96 °C, 35 cycles were performed,

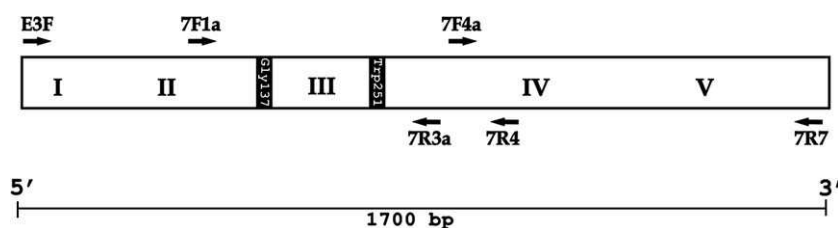


Fig. 1. Schematic view of cDNA from *Lucilia cuprina* (Newcomb *et al.*, 1997a), showing the mutation positions (Gly137 and Trp251) associated with organophosphate resistance. The roman algorithms represent the positions of introns.

each including 1 min at 95 °C, 1 min at 50 °C (or 52 °C, depending on the fragment) and 2 min at 72 °C, with a final step of 10 min at 72 °C to fully extend all amplicons.

Sequencing

Purified PCR products were cloned into pGEM-T plasmid vector (Promega Corp.). These vectors were used to transform *Escherichia coli* cells, which were plated on LB media with ampicillin (50 µg/mL) and X-Gal (0.8 mg in each plate). Plasmid DNA was isolated (Sambrook *et al.*, 1989) and the clones were sequenced using M13 direct and reverse primers. The reactions were run on an ABI 3.700 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, U.S.A.). The nucleotide sequences of *C. hominivorax* were submitted to BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) to search for similarities, and sequence alignments were performed using ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). The predicted amino acid sequences were obtained using BioEdit (Hall, 1999).

Results

Amplification

The 7F1a/7R4 primer pair amplified a fragment of approximately 700bp, the sequence of which was used to design the *C. hominivorax*-specific primers 7F4a and 7R3a. Furthermore, the 7F1a/7R3a primer pair was used for the PCR-restricted fragment length polymorphism (RFLP) technique in order to identify mutant individuals in natural populations of *C. hominivorax* (Carvalho *et al.*, 2006). The characterization of entire coding regions of the E3 gene in *C. hominivorax* was carried out in two steps. First, the E3F/7R3a primer pair amplified a fragment with approximately 840bp, as expected from *L. cuprina* and *M. domestica* sequences (Newcomb *et al.*, 1997a; Claudianos *et al.*, 1999), corresponding to the 5' portion of E3 cDNA in *C. hominivorax*. This region includes both site mutations (Gly137 and Trp251) possibly related to OP resistance in *C. hominivorax*.

The second step of the characterization, amplification of the 3' portion, employed a semi-nested PCR technique. Because the amplification reactions using the primer pairs 7F1a/7R7 and 7F4a/7R7 did not amplify any cDNA fragment that was visible in agarose gel, products from the reaction using 7F1a/7R7 were used as a template for further amplification with the 7F4a/7R7 primer pair. This reaction amplified a frag-

ment with approximately 750bp, as expected. Therefore, the entire coding region of the E3 gene was amplified, allowing for further sequencing.

Sequence analysis

The amplification reaction of the 5' portion of E3 cDNA in *C. hominivorax* resulted in a fragment with 831 bp, corresponding to the nucleotide positions 1–831 reported for the orthologous *L. cuprina* gene. The esterase E3 genes characterized in *L. cuprina* and *M. domestica* contain three introns inserted into the genomic DNA of this sequence. However, only intron III has been sequenced in *C. hominivorax* (Carvalho *et al.*, 2006).

Using semi-nested PCR, a 781-bp fragment was amplified (3' portion), corresponding to positions 940–1721 of the *L. cuprina* nucleotide sequence (Newcomb *et al.*, 1997a). This region is predicted to contain the introns IV and V. The entire coding region of the E3 gene in *C. hominivorax* contains 1713 nucleotides. The cDNA consensus sequence from *C. hominivorax* showed 83% similarity with that from *L. cuprina*. The predicted amino sequence of the E3 gene showed 87.5% similarity with that from *L. cuprina* (U56636), 75.6% with *M. domestica* (AF133341), 73.2% with *H. irritans* (AF139082) and 63.7% with *D. melanogaster* (NM079537). The high identity scores suggest that *ChαE7* is orthologous to the E3 genes from these species.

Discussion

Amino acid substitutions in the active site of the protein have a higher probability of changing its function than changes elsewhere. Primary sequence comparisons between esterase E3 from *C. hominivorax* and acetylcholinesterase (AChE) from *D. melanogaster* (Harel *et al.*, 2000), the crystal structure of which has been elucidated, suggest that secondary and tertiary structural characteristics are well conserved. This conservation of active sites was confirmed by Harel *et al.* (2000), who compared the 3-dimensional structures of vertebrate AChEs and *D. melanogaster* AChE and showed that these 3-D structures are folded similarly and their active sites closely overlap.

The codon GGG at position 409–411 of the wild alleles of the *C. hominivorax* α7 nucleotide sequences translate to glycine. Mutation of this site in some alleles showed the substitution Gly137/Asp in the predicted protein sequence, which is associated with OP hydrolase activity in *L. cuprina* and *M. domestica* (Newcomb *et al.*, 1997b; Claudianos *et al.*, 1999).

In addition, as in *M. domestica*, some alleles that contained Gly137 showed another substitution, Trp251/Ser (data not shown), which is associated mainly with dimethyl OP hydrolase. Dimethyl OP-resistant strains of *L. cuprina* demonstrated the Trp251/Leu substitution (Campbell *et al.*, 1998). These findings are in accordance with those of Heidari *et al.* (2004), who used site-directed mutagenesis at position 251 and obtained synthetic E3 variants with improved OP hydrolase activity. However, no synthetic enzymes were found to have higher diethyl OP turnover rates than the Gly137/Asp enzyme.

The Gly137/Asp substitution in E3 changes the structure of the catalytic centre and converts a carboxylesterase to an OP hydrolase, conferring insecticide resistance. The Asp137 enzyme is more active on diethyl OPs, which is the main OP insecticide used for *C. hominivorax* control. The replacement of Trp251 by a smaller residue, such as Gly, Ser or Leu, confers a lower level of OP hydrolase activity, but has a much smaller effect on carboxylesterase activity (Newcomb *et al.*, 2005). This second mutation has greater OP hydrolase activity for dimethyl OPs and may be the basis of cross-resistance between OPs and pyrethroids (Heidari *et al.*, 2005).

The finding that resistance is conferred by replacement of the same amino acids in different species not only illustrates parallel evolution, but raises questions as to whether a mutation occurs once and then spreads, or whether the same mutation occurs in different geographic locations (Ffrench-Constant, 2007). These questions are not only of academic interest; their answers will also influence strategies for the management of insecticide resistance. The data for these different species constitute evidence for biochemically precise convergent evolution and suggest that the options for evolving esterase-based metabolic resistance to OPs are tightly constrained (Hartley *et al.*, 2006).

The cDNA of *ChαE7* gene encodes a 570-amino acid protein, which contains candidates for all residues required to assemble motifs that are highly conserved among carboxyl/cholinesterases and that contribute to the catalytic mechanism of the active site (Cygler *et al.*, 1993). These include the 'nucleophilic elbow' (VFGESAG, residues 214–220), 'acid turn' (SYEG, residues 349–352) and 'histidine loop' (GVSHADELT, residues 468–476). These, respectively, contain the residues of the catalytic triad (S218, E351 and H471), which protrude into the active site gorge (Claudianos *et al.*, 1999). The 24 residues that Cygler *et al.* (1993) found to be invariant across 29 carboxyl/cholinesterases are conserved in *C. hominivorax* (Fig. 2). In addition, the predicted E3 protein of *C. hominivorax* is not thought to have a signal peptide. It has been suggested that, in the Diptera at least, it may be important for an OP-hydrolyzing enzyme to be distributed in the cytoplasm or a cellular organelle to confer metabolic resistance (Newcomb *et al.*, 1997a).

One strategy to delay or minimize resistance involves alternating use of different compounds. This approach is based on the assumption that frequencies of resistance to each compound will decline fairly rapidly in the absence of the compound (Georghiou, 1983), either because resistance is diluted by the immigration of susceptible individuals or as a result of natural selection against carriers of resistant alleles, or both. However, unless migration is unidirectional, which is unlikely, a decrease in resistance would have to depend on natural

selection against the genotypes with resistant alleles (Roush & McKenzie, 1987). Thus, it is important to determine whether resistant individuals of *C. hominivorax* present selective disadvantages that are sufficiently large to be useful in practical situations.

For *L. cuprina*, it is clear that the malathion-resistant mutations allow the enzyme to retain much of the carboxylesterase activity seen in susceptible forms, whereas the diazinon-resistant mutations abolish it (Heidari *et al.*, 2004). Furthermore, there is a clear fitness cost for the diazinon-resistant mutation in the absence of the insecticide, which is expressed in the form of developmental instability, but no such cost is documented for malathion-resistant mutations at position 251 (Batterham *et al.*, 1996).

This approach to investigating insecticide resistance in *C. hominivorax* has shown the substitution Gly137/Asp in some alleles, which is related mainly to resistance to diethyl OPs. This class of insecticides has been used widely for *C. hominivorax* control in several countries, including Brazil. The second mutation found in *C. hominivorax* (Trp251/Ser) is associated with resistance to dimethyl OPs, which is also used in insecticide formulations. However, this mutation can also confer pyrethroid hydrolase activity and may be the molecular basis of esterase-based cross-resistance between malathion (a dimethyl OP) and pyrethroids found in some species (Heidari *et al.*, 2005). Although pyrethroids have not yet been widely used to control *C. hominivorax*, it may be that the species will show a level of pre-adaptation to them on account of this mutation at site 251, as observed in *L. cuprina* by Hartley *et al.* (2006).

The recent advances in genome technology may contribute to the development of new antiparasitic drugs, using a more empirical approach than was previously possible (Gilleard *et al.*, 2005). Thus, the characterization of mutations in detoxifying enzymes like E3, responsible for conferring OP resistance, can yield information crucial to producing improved versions of existing insecticides used for *C. hominivorax* control. Irrespective of their structures, modes of action or methods of application, it is virtually certain that the chemical pesticides will select for resistance in target site populations and that such resistance will, at least in some cases, involve metabolic enzyme systems (Li *et al.*, 2007). A continuing challenge is to use what is known of molecular mechanisms of metabolic resistance in the design and implementation of environmentally sustainable management programmes to control NWS in its current distribution.

Acknowledgements

The authors thank R. A. Rodrigues for technical assistance and M. S. Couto for maintaining the screwworm colonies. We are also grateful to M. L. Lyra and P. F. Coronel for help with sample collections. This research was supported by a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo to AMLA-E (FAPESP; grant no. 04/09654-4). RAC was supported by fellowships from FAPESP (grant no. 04/12532-8).

Conflicts of interest

All authors declare no conflicts of interests.

<i>C.hominivorax</i>	MNFKVSQVEK	LKWKIKCFEN	KFLNYRLSTN	ETAVAETEGY	KVKGIKRLTV	YDDSYYSFEG	[60]
<i>L.cuprina</i>	...N..LM..	...I..	...T..	...V..	...V..	...	[60]
<i>M.domestica</i>	...M.R..	S..L..MV..	YT..	QIID..	QI..V..M..	...S..	[60]
<i>H.irritans</i>	...N..FL..	R..V..	I..I..	HIVD..	I..V..	...F..	[60]
<i>D.melanogaster</i>	..KNLGF..R	R.RL.TI.H	VQQ..Q..	...V..D..	Q.R..	SL..VP.F..	[60]
<i>C.hominivorax</i>	IPYAPPLGE	LRFKAPQRP	PWDGVRDCN	NKDKSVQVDF	ITGKTCGSED	CLYLSVYTN	[120]
<i>L.cuprina</i>	...V..	...	...	H..	...V..	...	[120]
<i>M.domestica</i>	...K..V..	...V..	E..G	PANR..T..	S..PT..	...N..D	[120]
<i>H.irritans</i>	...K..V..	...V..	K..H	AASR..T..	S.NSS..	...N..	[120]
<i>D.melanogaster</i>	...V..	...I..	ER..SQ	P..A..Q..	VFD.VE..	...N..	[120]
<i>C.hominivorax</i>	LAPETKRPVL	VYIHGGDFVI	GENHREYGP	DYFIKKDVL	ITIQYRLGVL	GFLSLNSEEL	[180]
<i>L.cuprina</i>	..N..	...G.I..	DM..	...	N..A..	...D..	[180]
<i>M.domestica</i>	..N.DK..M	F..IF..	AN.NWF..	..M..P..	V..V..	...K..N	[180]
<i>H.irritans</i>	..NTD..	FF..G.IC	AN.N..A	...	F..V..	...N..	[180]
<i>D.melanogaster</i>	VK.DKA..M	W..G.I..	AN.W..	..M.E..	V..A..	..M.K.P..	[180]
<i>C.hominivorax</i>	NVPGNAGLKD	QVMALRWIKN	NCANFGGND	NITVFGESAG	GASAHYMLT	EQTRGLFHRG	[240]
<i>L.cuprina</i>	...	...	...	...	A..T..	...	[240]
<i>M.domestica</i>	...	...V.S	I..DV..	...	...T..I..	...	[240]
<i>H.irritans</i>	...	...	S..D..	C..L..	A..T..I..	..A..A	[240]
<i>D.melanogaster</i>	...	...L..K..	S..D.N	C..	...T..	D..Q..	[240]
<i>C.hominivorax</i>	IIMSGNAVCP	WAISQNHRA	YAIKLN-GY	KGENDKDV	EFIMKAKAHD	LKLEDKVL	[300]
<i>L.cuprina</i>	...I..	NT.C..	FTL..A..	...D..	...PQ..	...E..	[300]
<i>M.domestica</i>	..M..SM.S	STEC.S..	LTM..RV-	...D.E..I..	...NPY..	...E.PQ..	[300]
<i>H.irritans</i>	V..T.M.I	HT.C..G	T..RI-	...	Y D..NPY..	ARE.H..	[300]
<i>D.melanogaster</i>	..Q..S.I..	YNGDITHN	PYRIAKLV	...D..	...QNV..K..	RV.EN..	[300]
<i>C.hominivorax</i>	PEEHVKNVMF	AFGPTVEPYQ	TADCVLPHK	REVMKTAWN	SIPTMGNTS	YEGLLFTPIV	[360]
<i>L.cuprina</i>	..L..RT..	P..	...	...	...	...F..S.L	[360]
<i>M.domestica</i>	..MQ..	P..	...V..PI	...S..	...LI..	...KS.A	[360]
<i>H.irritans</i>	N..IRD..	...T..E	P..PN	..L..	...LI..	...ISVG	[360]
<i>D.melanogaster</i>	L..RM..I..	SL..FS	PE..IS.P	K..M..S	...MFI..	...WV.E	[360]
<i>C.hominivorax</i>	KQMPALLKEL	ETCANFVPT	LADSERSSAE	TLELGAKIKK	AHVTGETPTN	DNFLDLCSHF	[420]
<i>L.cuprina</i>	...M.V..	...V..S..	A..TAP..	...M..	...M..I	...	[420]
<i>M.domestica</i>	..Y.EVV..	S.V.Y..W	...AP..	RA..IV..	...D..L	ME..Y	[420]
<i>H.irritans</i>	..N.H.I..	FECY..G	VVED..P	S..IASIL..	LY.R..L	ES.TE..D	[420]
<i>D.melanogaster</i>	..L..QV.QQ	DAGTP..I.K	LAT.P.KEK	LDSWS.Q.RD	V.R..SES.P	YM..IY	[420]
<i>C.hominivorax</i>	YFWFPMHRL	QIRFKHTSGT	PVYLYRDFD	SEEIINPYRI	MRHGRGVKGV	SHADELTLYF	[480]
<i>L.cuprina</i>	...	L..N..	...	DL..	S..	...F..	[480]
<i>M.domestica</i>	..L..F..	L..N..A..	I..	...	F..	...	[480]
<i>H.irritans</i>	..Y..F..	L..N..V.S	I..	...	Y..A..	T..	[480]
<i>D.melanogaster</i>	..V..AL.VV	HS.HAYAA.A	...F..Y..	...L.F..	...L..	...D.S.Q	[480]
<i>C.hominivorax</i>	WNALAKRLPK	ESREYKTIER	MVGWTFQFAT	TGNPYSNEID	GLENIIWDPI	KKSDEVYKCL	[540]
<i>L.cuprina</i>	..Q..M..	...	T..I..	...	E..M..VS..	...	[540]
<i>M.domestica</i>	..I.S..	...	E..	K..D.A	M..LT..	...D..	[540]
<i>H.irritans</i>	..TM.S..M..	D..	I..	...	P..N..M..TT..SL	...M	[540]
<i>D.melanogaster</i>	SSL..R..	...RN..	T..A	...EK.N	MDTLTI..V	R..I..	[540]
<i>C.hominivorax</i>	NISDELKIID	VPEMEKIQW	ESLYEKRKDL	-F*			[573]
<i>L.cuprina</i>	...M..	...D..	MF..HR..	-			[573]
<i>M.domestica</i>	..G..VM..	L..D..	A.IFD.K.E	-			[573]
<i>H.irritans</i>	..G..F..	L..L.V	Q.VFN.KRE	-			[573]
<i>D.melanogaster</i>	...D..F..	L..WP.L.V	DDN..L..				[573]

Fig.2. Alignment of inferred amino acid sequences of *ChxE7* with three esterases involved in organophosphate resistance in *Lucilia cuprina* (U56636), *Musca domestica* (AF133341) and *Haematobia irritans* (AF139082), and an esterase from *Drosophila melanogaster* (NM079537). The conserved residues that Cygler *et al.* (1993) described for 29 carboxyl/cholinesterases are shaded. Residues predicted to form the catalytic triad are indicated with asterisk (*) and those contributing to the oxyanion hole are marked with a cross (X) below the sequence.

References

- Altschul, S.F., Maden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3389–3402.
- Batterham, P., Davies, A.G., Game, A.Y. & McKenzie, J.A. (1996) Asymmetry – where evolutionary and developmental genetics meet. *Bioessays*, **18**, 841–845.
- 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 Biochemistry and Molecular Biology*, **28**, 139–150.
- Carvalho, R.A., Torres, T.T. & Azeredo-Espin, A.M.L. (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. *Veterinary Parasitology*, **140**, 344–351.
- Claudianos, C., Russel, R.J. & Oakeshott, J.G. (1999) The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the housefly and a blowfly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **29**, 675–686.
- Cygler, M., Schrag, J.D., Sussman, J.L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M.K. & Doctor, B.P. (1993) Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. *Protein Science*, **2**, 366–382.
- Ffrench-Constant, R.H. (2007) Which came first: insecticides or resistance? *Trends in Genetics*, **23**, 1–4.
- Georghiou, G.P. (1983) Management of resistance in arthropods. *Pest Resistance to Pesticides* (ed. by G. P. Georghiou & T. Saito), pp. 769–792. Plenum, New York.
- Gilleard, J.S., Woods, D.J. & Dow, J.A. (2005) Model organism genomics in veterinary parasite drug discovery. *Trends in Parasitology*, **21**, 302–305.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95–98.
- Hall, M. & Wall, R. (1995) Myiasis of human and domestic animals. *Advances in Parasitology*, **35**, 257–334.
- Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T.L. *et al.* (2000) Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Science*, **9**, 1063–1072.
- Hartley, C.J., Newcomb, R.D., Russel, R.J. *et al.* (2006) Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were pre-adapted for the rapid evolution of insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America*, **103**, 8757–8762.
- Heidari, R., Devonshire, A.L., Campbell, B.E., Bell, K.L., Dorrian, S.J., Oakeshott, J.G. & Russell, R.J. (2004) Hydrolysis of organophosphorus insecticides by *in vitro* modified carboxylesterase E3 from *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**, 353–363.
- Heidari, R., Devonshire, A.L., Campbell, B.E., Bell, K.L., Dorrian, S.J., Oakeshott, J.G. & Russel, R.J. (2005) Hydrolysis of pyrethroids by carboxylesterases from *Lucilia cuprina* and *Drosophila melanogaster* with active sites modified by *in vitro* mutagenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35**, 597–609.
- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L. & Ranson, H. (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**, 653–665.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2005) *Produção da Pecuária Municipal*. Vol. 33. IBGE, Rio de Janeiro, Brazil.
- Levot, G.W. (1995) Resistance and the control of sheep ectoparasites. *International Journal for Parasitology*, **25**, 1355–1362.
- Li, X., Schuler, M.A. & Berenbaum, M.R. (2007) Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, **52**, 231–253.
- Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Russel, R.J. & Oakeshott, J.G. (1997a) CDNA cloning, baculovirus expression and kinetic properties of the esterase E3 involved in organophosphate resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **27**, 15–25.
- Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Ollis, D.L., Cheah, E., Russel, R.J. & Oakeshott, J.G. (1997b) A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphate hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America*, **94**, 7464–7468.
- 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*. *Journal of Molecular Evolution*, **60**, 207–220.
- Oakeshott, J.G., Devonshire, A.L., Claudianos, C. *et al.* (2005) Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases. *Chemico-Biological Interactions*, **157–158**, 269–75.
- Roush, R.T. & McKenzie, J.A. (1987) Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annual Review of Entomology*, **32**, 361–380.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Vol. 1–3, pp. 121–132. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **24**, 4876–4882.
- World Health Organization (1957) *The insecticide-resistance problem. Expert Committee on Insecticides*. 7th Report. WHO Technical Report Service; WHO, Geneva.
- Wyss, J.H. (2000) Screwworm eradication in the Americas. *Annals of the New York Academy of Science*, **916**, 186–193.
- Zumt, F. (1965) *Myiasis in Man and Animals in the Old World*, pp. 1–267. Butterworths, London.

Accepted 15 October 2008

Artigo 2: Carvalho, R. A., Limia, C. E. G., Bass, C., Azeredo-Espin, A. M. L. (2010). Changes in the frequency of the G137D and W251S mutations in the carboxylesterase E3 gene of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) populations from Uruguay. *Veterinary Parasitology* **170**, 297–301.

“Mudanças na frequência das mutações G137D e W251S no gene da carboxilesterase E3 de populações de *Cochliomyia hominivorax* do Uruguai”.

Resumo

A mosca-da-bicheira, *Cochliomyia hominivorax* (Calliphoridae), é uma das principais moscas causadoras de miíases da América do Sul. No Uruguai, país com intensa atividade pecuária, essa espécie causa severos prejuízos através da mortalidade e redução da produtividade dos animais infestados, principalmente dos ovinos, necessitando de um manejo diário para o controle das infestações. O controle tem sido realizado principalmente pela aplicação de inseticidas químicos a base de piretróides e organofosforados (OF). No entanto, o uso intensivo desses compostos ao longo dos anos pode selecionar indivíduos resistentes, comprometendo a eficiência das estratégias atuais de controle. Tem sido verificado na mosca da bicheira um mecanismo de resistência que envolve a alteração da carboxilesterase E3 através de mutações que conferem a essa enzima a habilidade de degradar algumas classes de inseticidas (resistência metabólica). A mutação G137D confere resistência principalmente ao grupo dos dietil-OP, enquanto que a mutação W251S aos dimetil-OF e piretróides. Nesse sentido, a verificação dessas mutações em populações naturais de *C. hominivorax* pode indicar o nível de suscetibilidade da população à determinada classe de inseticida. Nesse estudo, mudanças nas frequências destas mutações foram investigadas em três diferentes regiões do Uruguai nos anos de 2003 e 2009. Todas as regiões analisadas apresentaram uma redução na frequência da mutação G137D e um significativo aumento na frequência da mutação W251S. Estes resultados podem estar associados com a grande quantidade de inseticidas a base de dimetil-OF e piretróides (62 dos 77 produtos registrados no Uruguai em 2009) usados atualmente. Dessa maneira, o monitoramento da frequência dessas mutações pode ajudar na escolha apropriada dos princípios químicos a serem utilizados no controle da mosca-da-bicheira, contribuindo para o retardamento da evolução da resistência nas regiões com atividade pecuária.



Changes in the frequency of the G137D and W251S mutations in the carboxylesterase E3 gene of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) populations from Uruguay

Renato Assis de Carvalho^{a,*}, Cintia Elizabeth Gomez Limia^a, Chris Bass^b, Ana Maria Lima de Azeredo-Espin^a

^a Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Depto de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

^b Centre for Sustainable Pest and Disease Management, Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire AL5 2JQ, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 September 2009

Received in revised form 29 January 2010

Accepted 19 February 2010

Keywords:

Screwworm

Myiasis

Organophosphate

Pyrethroid

Resistance

ABSTRACT

The New World Screwworm (NWS) fly *Cochliomyia hominivorax* is one of most important myiasis-causing flies in the Neotropics. It is responsible for severe losses to the live-stock industry through both mortality and the loss of productivity of infested animals. In Uruguay, NWS represents a significant problem. To date this pest has been controlled by the application of chemical insecticides, mainly the pyrethroid and organophosphate (OP) classes. However, the intensive use of these compounds over many years has led to the evolution of resistance which has the potential to compromise the effectiveness of current control strategies. One mechanism by which resistance has occurred in this and related dipteran species is through two mutations (G137D and W251S) in the carboxylesterase E3 enzyme that have enhanced ability to hydrolyze certain insecticides. In this study changes in the frequency of these mutations in *C. hominivorax* was investigated in three different Uruguayan regions in 2003 and 2009. All three regions analyzed showed a reduction in the frequency of the G137D mutation and a significant increase in frequency of the W251S mutation, and this may be related to the current intense use of dimethyl-OP and pyrethroid insecticides. The findings of this study provide current information on the frequency of these resistance-associated mutations in NWS in Uruguay and may help select appropriate chemicals for NWS control as part of potential pest management strategies.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The New World Screwworm (NWS) fly *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, Diptera: Calliphoridae) is one of most important myiasis-causing flies in the Neotropics (Hall and Wall, 1995). It causes severe economic losses to

the livestock industry through morbidity, mortality and the cost of treating infested animals (Vargas-Terán et al., 2005). In Uruguay, where intense cattle and sheep rearing forms a major part of the country's economy, myiasis is a significant problem for livestock producers (Carballo et al., 1991). Disease prevalence is estimated at 5.7% in all sheep (mortality of 1.25%) and 3.4% of all cattle (mortality of 0.06%) reared. In 2006, a study examining the economic effects of the NWS in Uruguay estimated that this species causes a loss of US\$ 38.5 million per year, including mortality of infested animals, cost of veterinary treatment and insecticides (Gil et al., 2009).

* Corresponding author at: Laboratório de Genética Animal, CBMEG, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6010, 13083-875 Campinas, SP, Brazil. Tel.: +55 19 3521 1141; fax: +55 19 3521 1089.

E-mail addresses: rassis@unicamp.br, rassis@gmail.com (R.A. de Carvalho).

To date, the control of this pest in Uruguay has relied on the application of chemical insecticides, in particular organophosphate (OP) and pyrethroid classes. Of 77 registered products in 2009, 71 are pyrethroids, OPs or a mixture of both (DILAVE – MGAP, 2009). The major pyrethroid currently used is cypermethrin, and in the case of OPs, the dimethyl-OPs (fenitrothion, dichlorvos, trichlorfon) and diethyl-OPs (ethion, diazinon, chlorpyrifos, coumaphos) are principally used. The unfortunate effect of the intensive use of these insecticides is the development of resistance and this has the potential to compromise the effective control of NWS. Recent studies have investigated the molecular mechanisms underlying insecticide resistance in the NWS fly (Carvalho et al., 2006, 2009; Silva and Azeredo-Espin, 2009). To date, amino acid substitutions in the voltage-gated sodium channel which confer resistance to pyrethroid insecticides in many resistant insect species have not been found in NWS fly populations. However, those associated with insensitivity of the acetylcholinesterase enzyme to organophosphate and carbamate insecticides have been found at very low frequency in NWS populations from Brazil (Silva and Azeredo-Espin, 2009; Silva NM personal communication). In contrast, the mutations previously characterized in the gene encoding carboxylesterase E3, which confer OP resistance in the blowfly *Lucilia cuprina* (Newcomb et al., 1997) and in the housefly *Musca domestica* (Claudianos et al., 1999), have been found at moderate to high frequency in NWS fly populations from Brazil, Uruguay, Paraguay, Venezuela, Colombia and Cuba (Silva and Azeredo-Espin, 2009). In the blowfly the G137D substitution in E3 was shown to confer resistance principally to diethyl-OPs, while a second mutation W251S confers resistance to dimethyl-OPs and may be associated with resistance to pyrethroids (Heidari et al., 2005). A recent study of NWS involving bioassays with cypermethrin also indicated a correlation between the W251S mutation and moderate resistance to this pyrethroid (Silva and Azeredo-Espin, 2009).

In this study the frequencies of the two resistance-associated mutations in the carboxylesterase E3 gene were analyzed in NWS fly populations sampled from three regions of Uruguay at two different time points (2003 and 2009) to examine if the frequency of these mutations has changed during this period and to determine the potential implications for control of this pest species in Uruguay.

2. Material and methods

2.1. *C. hominivorax* samples

C. hominivorax samples were collected from wounds of infested animals in 2003 and 2009 from three distinct regions of Uruguay: Dayman and San Antonio (Salto/Paysandu), Bañados de Medina (Cerro Largo) and Cerro Colorado (Florida). From each wound, a maximum of three individuals were analyzed. A total of 84 individuals were analyzed in 2003 and 69 in 2009. DNA from larvae was extracted using the phenol–chloroform based method of Infante and Azeredo-Espin (1995).

2.1.1. PCR-RFLP detection of the G137D and W251S mutations in the gene encoding the carboxylesterase E3 enzyme

To amplify the region of the carboxylesterase E3 gene that encompasses the G137D and W251S mutation sites forward and reverse primers (7F1aN:5' GGCTCCAGAAAC-TAAACG 3' and 7R3a:5' ATCCTTATCATTATTTTCACCC 3') were designed based on the E3 nucleotide sequence described in Carvalho et al. (2006). A post-PCR restriction digest was used to identify the G137D and W251S mutations, using the endonucleases *Tsp45I* and *Eco130I* (New England Biolabs), respectively, according to manufacturer's instructions. The digested fragments were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide.

2.1.2. Statistical analysis

The genotypic frequencies at the G137D and W251S loci were compared to Hardy–Weinberg expectations using the exact test procedures implemented in GenePOP (ver.3.4) software (Raymond and Rousset, 1995). The frequency of the two mutant alleles for both years was compared by chi-squared test.

3. Results

In the total sample set from 2003 the G137D mutant allele was found at high frequency (0.78) and the W251S mutant allele at relatively low frequency (0.13). By district *C. hominivorax* populations from Bañado de Medina carried the G137D allele at a frequency of 0.83 and the W251S mutant at a frequency of 0.17. In Cerro Colorado the G137D allele was observed at a frequency of 0.78 and the W251S allele at a frequency of 0.12. In San Antonio/Dayman, the G137D allele was observed at a frequency of 0.73 and the W251S allele at a frequency of 0.12 (Fig. 1).

In *C. hominivorax* populations sampled in 2009 a significant reduction in the frequency of the G137D allele (falling from 0.78 to 0.52) and a significant increase in the frequency of the W251S allele was observed (rising from 0.13 to 0.41) ($p < 0.001$). This was most pronounced in San Antonio/Dayman where the frequency of the G137D allele fell to 0.39 (from 0.73) and the frequency of the W251S allele rose to 0.52 (from 0.12) but was also observed in Bañado de Medina, where the frequency of the G137D allele had fallen to 0.62 while the frequency of the W251S had risen to 0.37 and in Cerro Colorado where the frequency of the G137D allele had fallen to 0.58 and the frequency of the W251S allele had risen to 0.33. The change in the frequency of the two resistance alleles was reflected in the genotypes of individuals observed from each region in each year (Table 1). In the case of the G137D mutation no homozygous wild type (susceptible) genotypes were observed in 2003 in populations sampled from Bañado de Medina and San Antonio/Dayman and only two individuals of this genotype were recorded in the sample from Cerro Colorado. The reduction in frequency of this mutation in 2009 across all three sites was largely due to a reduction in the number of homozygous mutant (resistant) individuals and an increase in the number of individuals of a homozygous wild type genotype. In the case of the

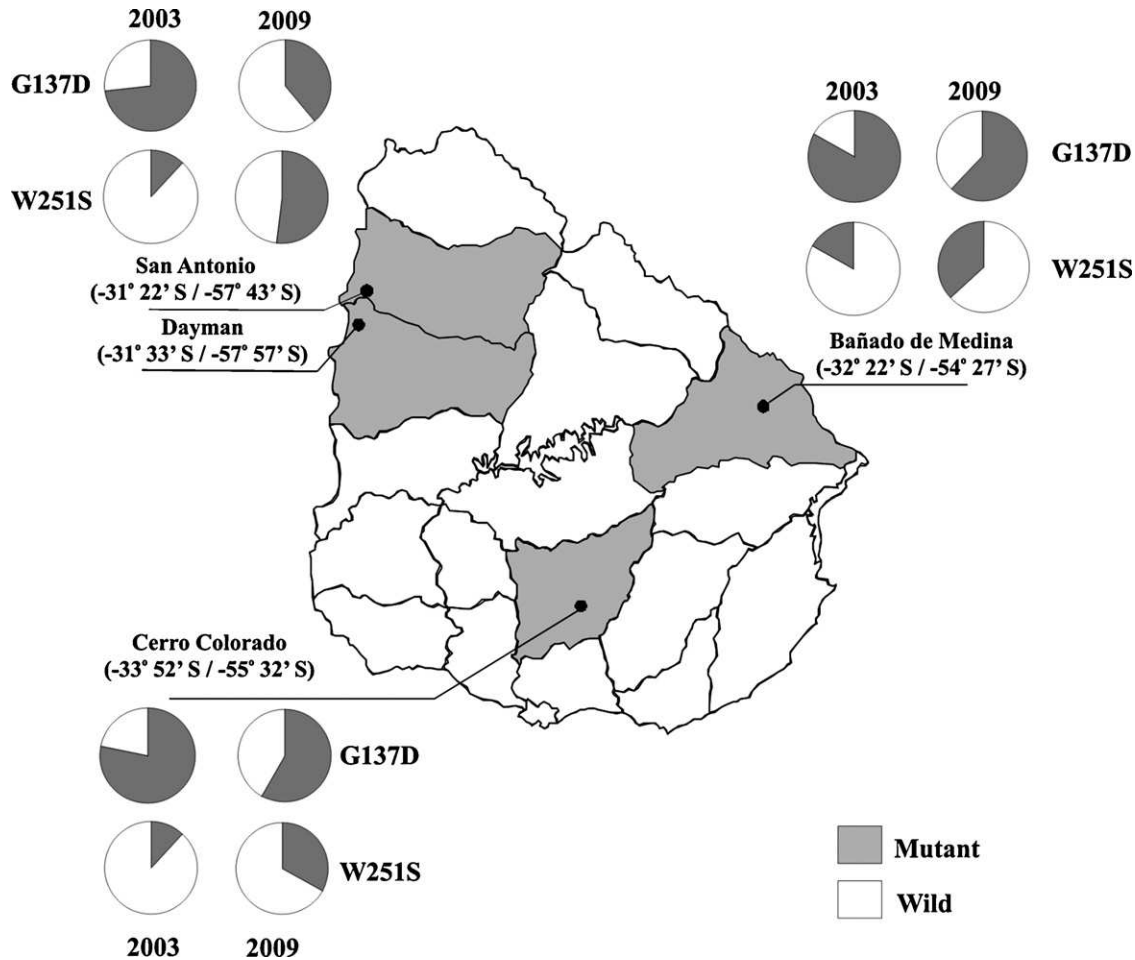


Fig. 1. Map of Uruguay showing the regions where NWS were collected and the frequencies of the G137D and W251S mutations in the carboxylesterase E3 gene in populations sampled in 2003 and 2009.

W251S mutation no homozygous mutant individuals were recorded in populations from any district in 2003 and the increase in frequency of this mutation in 2009 in populations from all three sites was due to the increase in the number of individuals of a homozygous mutant genotype and a reduction in the number of individuals of a homozygous susceptible genotype. Interestingly no individual from any district or year was found that carried both mutations in the homozygous form.

The observed frequencies of the mutations at the two loci were compared with Hardy–Weinberg expectations.

As Uruguay is a small country and the range of *C. hominivorax* wide and to improve statistical power the total sample set from each year was treated as a single population in analyses. In the case of the G137D mutation the observed genotypic frequencies were not significantly different from Hardy–Weinberg expectations in the populations sampled from 2003 or 2009. In the case of the W251S mutation the genotypic frequency observed in the population sampled from 2003 did not deviate from Hardy–Weinberg equilibrium, however, in the population sampled from 2009 genotypic frequencies showed significant deviation from

Table 1

Genotypes of the individuals for the G137D and W251S mutations collected from each region in 2003 and 2009.

137/251	Bañado de Medina		Cerro Colorado		San Antonio/Dayman	
	2003	2009	2003	2009	2003	2009
hom mut/hom wild	16	12	19	6	14	3
het/het	8	7	7	7	7	10
het/hom wild	0	1	2	4	9	2
hom wild/hom mut	0	6	0	3	0	7
hom wild/hom wild	0	0	2	0	0	1
Total	24	26	30	20	30	23

Hardy–Weinberg expectations with a heterozygote deficit ($p = 0.02$).

4. Discussion

The two time points sampled in this study revealed marked change in the frequency of the two mutations in NWS populations from Uruguay with a decline in the frequency of the G137D mutation and a significant increase in the W251S mutation. In 2003 no NWS fly individuals were observed that carried the W251S mutation in the homozygous form but by 2009 23% of the individuals screened carried the W251S mutation as homozygotes. The frequency of this mutation in the population sampled in 2009 also showed significant deviation from Hardy–Weinberg expectations and this was due to a heterozygote deficit. Taken together these results suggest selection pressure acting on this locus and the rapid increase in frequency of the W251S mutations rather than G137D may be associated with the current intense use of pyrethroids and dimethyl-OP compounds (62 of 77 registered products in Uruguay) for NWS control in Uruguay.

The current trend in chemical control may also explain the decrease in frequency of the G137D mutation which is associated with OP resistance, particularly to diethyl-OPs (Campbell et al., 1998). This mutation is located in the active site (oxyanion hole) of the E3 enzyme and may confer a fitness cost on resistant individuals as the native carboxylesterase activity is lost in the acquisition of OP hydrolase activity. If selection pressure is reduced due to the current choice of insecticide chemistry this fitness penalty could explain the decrease in the frequency of the mutation (Mckenzie and Clarke, 1988). In contrast, the W251S mutation may carry a lower fitness penalty because it is located in the acyl pocket of the enzyme rather than in the active site itself (Campbell et al., 1998). In this study no NWS fly individuals from any district or year were found that carried both the W251S and G137D mutations in the homozygous form. This is probably explained by the fact that the W251S mutation produces an enzyme that depends on carboxylesterase activity to confer dimethyl-OP resistance and this would be abolished by the G137D mutation which results in almost complete loss of carboxylesterase activity.

Although resistance is an almost inevitable outcome of intensive insecticide use it is possible to minimise its effect by adopting resistance management strategies which aim to prevent, or more usually slow, the development and spread of resistance. Such strategies include minimising the use of pesticides and rotating the usage of compounds with different target sites. In this regard this study provides contemporary information on the frequency of the W251S and G137D mutations in NWS populations in Uruguay and is useful to policy makers as an aid to decide which insecticide classes to endorse for control. The increasing frequency of the W251S mutation in NWS populations in Uruguay has implications for the potential efficacy of dimethyl-OPs and pyrethroids. Our results suggest that if the frequency of this allele continues to rise then effective control using dimethyl-OPs may be compromised. Although the resistance conferred by W251S mutation to

pyrethroids in the field is thought to be moderate (Silva and Azeredo-Espin, 2009) it is worth noting that substitutions of the W251 residue have stronger activity for older Type 1 pyrethroids with a reduced activity for Type 2 pyrethroids such as deltamethrin due to the α cyano moiety (Heidari et al., 2005; Devonshire et al., 2007). Therefore a strategy that employs Type 2 pyrethroids may be a useful way of circumventing the effects of this mechanism. In addition, the current strategy of simultaneous application of both OP and pyrethroid compounds as combinations or tank mixes may be providing a strong selecting force for the resistance mechanisms described here and should be avoided.

In this study we have looked at a single mechanism of resistance to OPs and pyrethroids, it is entirely possible that other resistance mechanisms are present in the NWS fly populations in Uruguay and may work synergistically with those described here to confer higher levels of resistance. We are currently investigating this possibility using genomic approaches to look at the global expression of metabolic genes and their association with the resistance phenotype.

Acknowledgements

The authors thank R.A. Rodrigues for technical assistance, M.S. Couto for maintaining the screwworm colonies. We are also grateful to M.L. Lyra, M.T. Oliveira and P.F. Coronel for helping with sample collections in Uruguay and P.F. Coronel for statistical analysis. This research was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo to RAC (FAPESP, grants no. 06/60693-6 and 07/54431-1). Rothamsted Research receives grant-aided support from the Biotechnology and Biological Sciences Research Council.

References

- 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.* 28, 139–150.
- Carballo, M., Heizen, T., Colombo, A., Rodríguez, M., 1991. Datos obtenidos a partir de una encuesta relativa a la incidencia de miiasis cutáneas en diferentes zonas del Uruguay. *Veterinaria* 28, 5–15.
- Carvalho, R.A., Torres, T.T., Azeredo-Espin, A.M.L., 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.
- Carvalho, R.A., Torres, T.T., Paniago, M.G., Azeredo-Espin, A.M.L., 2009. Molecular characterization of esterase E3 gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the New World screw-worm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Med. Vet. Entomol.* 23, 86–91.
- Claudianos, C., Russel, R.J., Oakeshott, J.G., 1999. The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the housefly and a blowfly. *Insect Biochem. Mol.* 29, 675–686.
- 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.* 37, 891–902.
- DILAVE – MGAP, 2009. Listado de curabicheras registrados en 2009. Dirección de Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino”, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca Del Uruguay.
- Gil, A., Marques, L., Rama, R.P., Piaggio, J., Altuna, M., Caponi, O., 2009. La bichera: pérdidas y acciones a encarar. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 52–56.
- Hall, M., Wall, R., 1995. Myiasis of human and domestic animals. *Adv. Parasitol.* 35, 257–334.

- Heidari, R., Devonshire, A.L., Campbell, B.E., Bell, K.L., Dorrian, S.J., Oakeshott, J.G., Russel, 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.* 35, 597–609.
- Infante, M.E., Azeredo-Espin, A.M.L., 1995. Genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochem. Genet.* 33, 737–756.
- Mckenzie, J.A., Clarke, G.M., 1988. Diazinon resistance, fluctuating asymmetry and fitness in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Genetics* 120, 213–220.
- Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Russel, R.J., Oakeshott, J.G., 1997. CDNA cloning, baculovirus expression and kinetic properties of the esterase E3 involved in organophosphate resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol.* 27, 15–25.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86, 248–249.
- Silva, N.M., Azeredo-Espin, A.M.L., 2009. Investigation of mutations associated with pyrethroid resistance in populations of the New World Screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Genet. Mol. Res.*, doi:10.4238/vol8-3gmr643.
- Vargas-Terán, M., Hofmann, H.C., Tweddle, N.E., 2005. Impact of screw-worm eradication programmes using the sterile insect technique. In: Dyck, V.A., Hendrichs, J., Robinson, A.S. (Eds.), *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer, Netherlands, pp. 629–650.

CAPÍTULO 2

Resistência baseada na alteração do sítio alvo – acetilcolinesterase

Artigo 3: Silva, N. M., Carvalho, R. A., Azeredo-Espin, A. M. L. Acetylcholinesterase cDNA sequencing and survey of mutations associated to organophosphate resistance in *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae).

“Seqüenciamento da região codificante da acetilcolinesterase e análise de mutações associadas com resistência a organofosforados em *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae)”

Resumo

A mosca-da-bicheira, *Cochliomyia hominivorax*, é uma das principais espécies causadoras de miíases da região Neotropical causando severos prejuízos à atividade pecuária. Esta espécie tem sido controlada principalmente pela aplicação de inseticidas organofosforados (OF). Além da resistência metabólica já investigada nessa espécie através da alteração estrutural de uma carboxilesterase, a alteração do sítio alvo também pode contribuir para o fenótipo resistente. Alterações na enzima acetilcolinesterase (AChE), sítio alvo de compostos OF e carbamatos, têm sido identificadas em diversas espécies de artrópodes resistentes. Baseado nestes estudos, a região codificante da AChE foi seqüenciada em *C. hominivorax* possibilitando a investigação de mutações já caracterizadas por conferir resistência em outras espécies. A presença de três mutações (I298V, G401A, F466Y) responsáveis pela resistência em *Drosophila melanogaster* e por causar insensibilidade à AChE em ensaios bioquímicos *in vitro* em *Lucilia cuprina* foram analisadas em diversas populações naturais de *C. hominivorax*. Apenas 2/135 indivíduos apresentaram uma das mutações (F466Y). Em contraste, a mutação G137D na carboxilesterase E3, que confere resistência metabólica aos inseticidas OF, foi encontrada em mais de 50% dos indivíduos na maioria das populações. Esses resultados indicam que a alteração da carboxilesterase E3 pode ser um dos principais mecanismos de resistência selecionados nessa espécie e que a resistência metabólica tem sido selecionada preferencialmente em relação à alteração do sítio alvo. Isso pode ser explicado pelo provável custo no valor adaptativo dos indivíduos portadores da AChE mutante. Além disso, como em *L. cuprina*, a E3 mutante pode possuir maior afinidade pelo OP que a AChE, protegendo o sítio alvo da inibição. A caracterização da região codificante do gene pode contribuir para estudos futuros de associação de alteração no sítio alvo com o fenótipo resistente na mosca-da-bicheira.

Acetylcholinesterase cDNA sequencing and survey 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}

§ Authors contributed equally to this work.

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: Renato Assis de Carvalho
Laboratório de Genética e Evolução Animal (CBMEG)
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
P.O. Box 6010
Avenida Candido Rondon 400
13083-875
Campinas, SP, Brazil

E-mail: rassis@unicamp.br or rassis@gmail.com

Phone: +55-19-3521-1141

Fax: +55-19-3521-1089

Abstract

Altered acetylcholinesterase (AChE) has been identified in numerous arthropod species resistant to organophosphate (OP) and carbamate insecticides. The New World screwworm (NWS) *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), one of the most important myiasis-causing flies in the Neotropics, has been controlled mainly by the application of OP insecticides in its current geographical distribution. However, few studies have investigated insecticide resistance in this species. Based on previous studies about mutations conferring OP resistance in related dipteran species, AChE cDNA was sequenced allowing the survey of some mutations (I298V, G401A, F466Y) in NWS populations. In addition, G137D mutation in the carboxylesterase E3 gene, also associated with OP resistance, was analyzed in the same NWS populations. Only 2/135 individuals presented an altered AChE gene (F466Y). In contrast, a high frequency of the G137D mutation in E3 gene was found in some localities of Brazil and Uruguay, while no G137D mutant allele was found in Cuba, Venezuela and Colombia. These findings suggest that the alteration in the carboxylesterase E3 gene may be one of the main resistance mechanisms selected in this ectoparasite. The knowledge of the frequency of these resistance-associated mutations in the NWS natural populations may contribute to the selection of appropriate chemicals for control as part of pest management strategies.

Keywords: acetylcholinesterase, carboxylesterase, myiasis, organophosphate, resistance.

1. Introduction

Acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) is a key enzyme in the nervous system, responsible for the rapid hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine at cholinergic synapses (Rosenberry, 1975). Organophosphate compounds (OP) target the AChE enzyme as its primary site of action, phosphorylating the active site serine to block the hydrolysis of acetylcholine, leading to the death of the insect (Menozzi et al., 2004). Point mutations in the AChE gene have been described for resistant strains of different dipteran species (Mutero et al., 1994; Walsh et al., 2001; Vontas et al., 2002; Temeyer et al., 2008). Most of these mutations in the AChE gene 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 organophosphate resistance (Mutero et al., 1994).

The New World screwworm (NWS), *Cochliomyia hominivorax*, is one of the most important myiasis-causing flies in the Neotropics, characterized by the ability of its larvae to develop in the flesh of vertebrates, causing severe economic losses to livestock industry (Hall and Wall, 1995). Although the Sterile Insect Technique (SIT) was successful for NWS eradication in North and Central America (Galvin and Wyss, 1996), the control of this species has relied on the application of chemical insecticides throughout its current geographical distribution, which normally leads to the selection of resistant individuals. Although there is no report regarding resistance in natural populations of NWS, mutations in the carboxylesterase E3 gene are shown to involve a general form of OP resistance in *L. cuprina* (Newcomb et al., 1997) and *M. domestica* (Claudianos et al., 1999) and have been described in NWS (Carvalho et al., 2006; Carvalho et al., 2009; Silva and Azeredo-Espin, 2009), indicating a putative selective pressure by OP compounds.

In *D. melanogaster*-resistant strains, the G265A mutation and the triple mutant I161V/G265A/F330Y in the AChE gene were found to be the most frequently encountered mutations (Menozzi et al., 2004). These three point mutations, also analyzed by *in vitro* site-directed mutagenesis in *L. cuprina* AChE, cause, singly and in combination, considerable insensitivity to OP (Chen et al., 2001). Based on the intensive use of OP insecticide for NWS control and its economic impact in livestock activity, in this study we sequenced a cDNA encoding AChE and we surveyed the presence of these AChE

mutations in NWS populations as a preliminary effort. In addition, we verified the frequency of the G137D mutation in the carboxylesterase E3 gene in the same populations. AChE sequencing will allow further studies associating NWS resistant phenotypes with altered sites in the enzyme, providing important information for NWS control.

2. Materials and methods

2.1 Samples and DNA/RNA extraction

Cochliomyia hominivorax samples were collected from wounds of infested animals between 2003 and 2006 from several regions throughout Brazil, such as Caiapônia/Goiás (BCA, 16° 57 S/51° 48 W), Estiva/Minas Gerais (BES, 22° 27 S/46° 01 W), Santa Maria das Barreiras/Pará (BSM, 08° 52 S/49° 42 W), Carambei/Paraná (BCI, 24° 55 S/50° 05 W) and Pinheiro Machado/Rio Grande do Sul (BPM, 31° 34 S/53° 23 W); Encontrados/Venezuela (VEN, 09° 03 N/72° 14 W); Bañado de Medina/Uruguay (UBM, 32° 23 S/54° 21 W); Turbo/Colombia (COT, 8° 05 N/76° 43 W); Ciego de Ávila/Cuba (CCA, 21° 50 N/78° 46 W). Ten individuals from each locality (one per wound) were used 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 was extracted from NWS larvae using the phenol-chloroform method (Infante-Vargas and Azeredo-Espin, 1995). For AChE cDNA sequencing, total RNA was extracted from NWS 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 AChE cDNA sequencing

Two sets of primers, based on the *L. cuprina* AChE nucleotide sequence (Chen et al., 2001), were used for AChE amplification: Ache5 (5' CGTCTACTATTATGGCTCG 3') and AcheR2 (5' CCTCATCCTTGACATTTCC 3'), Ache3 (5' TTGAAAAATGCATGTGACC 3') and AcheF2 (5' CGATCCTGATCATTTAATCC 3') (Fig. 1). The 50µl PCR mix contained approximately 100ng of double strand cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2 units of *Taq* polymerase (Invitrogen), 70 µM of

each dNTP, 3.5 mM MgCl₂, 0.5mg/ml BSA and 0.5 μM of each primer. 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. PCR products were cloned into the pGEM-T plasmid vector (Promega) and sequenced (three clones for each fragment) using forward and reverse primers. 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. Nucleotide sequences of NWS were submitted to BLASTN (Altschul et al., 1997) to search for similarities, and sequence alignments were carried out using ClustalX (Thompson et al., 1997). The prediction of the signal peptide was performed using Signal P v.3.0 (Bendtsen et al., 2004).

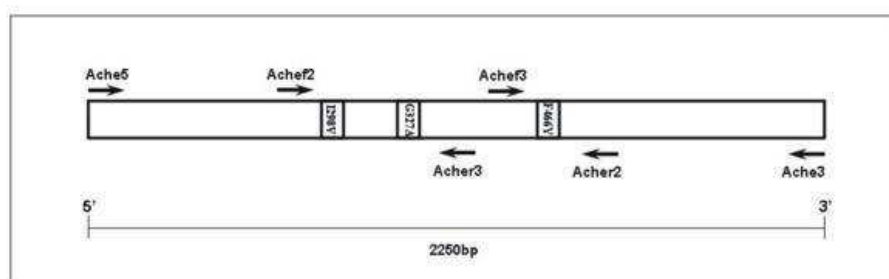


Fig. 1 Schematic view of AChE cDNA from *Cochliomyia hominivorax* showing the mutation positions (I298V, G401A, F466Y) and the hybridization sites of primers.

2.3 E3 and AChE genotyping

To genotype the E3 gene, PCR-RFLP reactions were performed according to Carvalho et al. (2006). Based on the AChE sequence obtained in this work, new primers were designed, Ache3 (5' AATCCCAATCGGTTATG 3') and Acher3 (5' TTGCAATCATTTATCAAAGC 3'), to analyze the occurrence of point mutations associated with OP resistance, avoiding the amplification of one big intron (Fig. 1). PCR conditions were similar to those used for AChE cDNA amplification, with optimization of MgCl₂ concentration (2.5 mM), annealing temperature (53°C), extension time (50 sec at

72°C) and use of 25-100ng of genomic DNA. PCR products were purified using the QIAquick® PCR purification Kit (Qiagen) and directly sequenced. Nucleotide sequences presenting a double peak in the chromatogram were cloned into the pGEM-T plasmid vector (Promega) and six clones of each were sequenced.

3. Results

3.1 AChE cDNA sequence

Characterization of the AChE cDNA sequence was used to investigate putative mutations involved in OP resistance. Although a few nucleotide substitutions have been observed among sequenced clones, mainly in the N and C terminal regions, a consensual sequence was assembled and three point mutations previously characterized in conferring OP resistance in *D. melanogaster* and *L. cuprina* were surveyed in the NWS populations. Absence of a NWS susceptible reference strain to compare the AChE sequences does not allow inferring the influence of the other nucleotide substitutions on a resistant phenotype.

The ORF of NWS AChE is comprised of 2250 nucleotides (GenBank accession number FJ830868), showing significant nucleotide similarity (88%) with *L. cuprina* AChE. 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%). 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 (Fig. 2).

The highly divergent regions between the AChE sequences are the signal peptide (N-terminal), cleaved from the mature protein during secretion (Nielsen et al., 1997), and the C-terminal region, replaced by a glycolipid anchor (GPI-anchor) during post-translation modifications (Haas et al., 1998). Despite divergence in these regions, the primers designed based on the *L. cuprina* sequence worked for NWS. Based on the alignment and description of the signal peptide for other species (Chen et al., 2001; Kim et al., 2003; Temeyer and Chen, 2007), 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 (Sunyaev et al., 1999), indicated the S721 residue as a potential GPI modification site in the C-terminal region.

<i>C. hominivorax</i>	MARFITSSSLSPSTTPSFASATASPAIASSLPRSKSTKATKARKTILSANSFKTSSLSLSSSSASSPSLSSSPSFFKSSS	80
<i>L. cuprina</i>	T.----SS.TLTTS..AT.PS..WS-----NA..TAT.I..-----H.RT	43
<i>H. irritans</i>	..ST.TI----SSS.SS.SSSP.SLS..SSSI-----SLTSSP..Y.LK..-----T.	46
<i>M. domestica</i>	..SVRTP----IS..SS.SSSRSSWS.PSS-----FY.L..-----FKA	38
<i>D. melanogaster</i>	..ISCRQ-----RVLPMSLPLPLTIP-----	24
<i>C. hominivorax</i>	SSKSRYSSSHLENAFASLIPLSSSLFSSLSSTNDLYRGFFATLIVILLRMSSVAYGITDRLIVQTTSGPVRGRAVTV	160
<i>L. cuprina</i>	.R....T.N.L.....TSR----L.-..S.....LT.....	118
<i>H. irritans</i>	.RQ..P...F--SSV.Y.LAT-----RS..IC..LL..F.....AL.SAM.....	112
<i>M. domestica</i>	..LT.P...--SSV.HHLAA-----RN..IC..L.....ALTSAM..H.T.....S...	101
<i>D. melanogaster</i>	-----LV..LS.HL.G.C-..VI...V...S.....S...	59
<i>C. hominivorax</i>	QGREVHVFTGIPYAKPPVDDLRFKRPVPAEPWHGVLDATRLPATCVQERYEYFPGFSGEEIWNPNNTNVSIEDCLYMNIVAP	240
<i>L. cuprina</i>		198
<i>H. irritans</i>	M.....F.....	192
<i>M. domestica</i>	..D.....F.....	181
<i>D. melanogaster</i>	Y.....E.....S.....I.V.....	139
<i>C. hominivorax</i>	SKARLRHGRGANGVEHAA--KTDPDHLIHSATPQNTTNGLPILIIWYGGGFMGTGSATLDIYNADIMSAVGNVIVASFQYR	318
<i>L. cuprina</i>	A.....G..SS--.....	276
<i>H. irritans</i>	A.....T.G..SS--...Q.....E.....	270
<i>M. domestica</i>	A.....T.G..SS--...Q.....E.....	259
<i>D. melanogaster</i>	A.....G..PNGQA.T....NGN.....A.....	219
<i>C. hominivorax</i>	VGAFLHLSPVMP-GFEEEPGNVGLNDQALALRWLKENARAFGGNPNMTLFGESAGSSSVNAQLVSPVTRGLVKRGM	397
<i>L. cuprina</i>		355
<i>H. irritans</i>	M.....	349
<i>M. domestica</i>	M.....	338
<i>D. melanogaster</i>	A.E..SE.A.....I...D..H.....M.....	299
<i>C. hominivorax</i>	MQSGTMNAPWSHMTSEKAVEIGKALINDCNCNASLLSENQSVMAQMRSDAKTISVQQWNSYSGILSFPSAPTIDGAFF	477
<i>L. cuprina</i>	PA.....A.....L	435
<i>H. irritans</i>	P...A.....L	429
<i>M. domestica</i>	V.....P...A...Q.....L	418
<i>D. melanogaster</i>	M.KT..AH..S.....L	379
<i>C. hominivorax</i>	TADPMTLMKTADMTGYDIMIGNVKDEGTYFLLYDFIDYFDKDEATSLPRDKYLEIMNNIFNKATQAEREALIFQYTSWEG	557
<i>L. cuprina</i>	P.....S.....	515
<i>H. irritans</i>	P.....L...L...LM.....D.....	509
<i>M. domestica</i>	P.....L...LS...L.....D.....Q..S.....	498
<i>D. melanogaster</i>	P.....LKD..LM..R.....D..A.....G.....	459
<i>C. hominivorax</i>	NGPYQNQQQIGRAVGDFHFTCTPTNEYAQAALERGAQVHYFFTHRTSTSLWGEWMGVHLHGDEIEYFFGQPLNTSLQYRPV	637
<i>L. cuprina</i>	A.....	595
<i>H. irritans</i>	G.....	589
<i>M. domestica</i>	S.....N.....	578
<i>D. melanogaster</i>	S.....N.....	539
<i>C. hominivorax</i>	ERELGKRLNSVIEFAKTGNPAVDGEENPNFSKEDPVYYVFTDEKTEKLQRGPLAKRCSFWNDYLPKVRSVWVGSECENN	717
<i>L. cuprina</i>		675
<i>H. irritans</i>	A.....I.....A...DG	669
<i>M. domestica</i>	S.....I.....I.....K	658
<i>D. melanogaster</i>	SA.....Q.....I...D.I..A...A.....A.-T.DGD	618
<i>C. hominivorax</i>	N--AASAAVNNING-QQYLLKQVIMLTIMVTCIPQ	749
<i>L. cuprina</i>	S--E...SI.YEK..N.....	708
<i>H. irritans</i>	SSQS..G.IYKTQQQ.HTT.LT.ALILV..IS...	704
<i>M. domestica</i>	SSTS...IYEMMQ.LT-.LA.AIILT..NS...	692
<i>D. melanogaster</i>	S---G..SISPRLQLLGIAALIY.CAALRTKRV.-	649

Fig. 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.

3.2 Frequency of AChE and E3 mutants

Three point mutations associated with reduced sensitivity to OP insecticides were characterized previously by *in vitro* site-directed mutagenesis in AChE of *L. cuprina* (Chen et al., 2001). These points were investigated in NWS populations, corresponding to the I298V, G401A and F466Y positions in the NWS sequence (Fig. 2). Amplifications using two sets of primers produced fragments of 500bp and 206bp, respectively (data not shown), that encompass the point mutations analyzed. Only one of these mutations (F466Y) was found in two individuals in Pinheiro Machado (RS, Brazil), one being homozygote and one heterozygote. These individuals may be sibling samples since they were obtained from the same wound.

On the other hand, the G137D mutant allele was found at high frequency in homozygosis and heterozygosis in Uruguay (75%) and in the most of the Brazilian States studied such as Goiás (60%), Minas Gerais (50%), Paraná (75%) and Rio Grande do Sul (55%). Only Pará showed a low G137D mutation frequency (20%). Interestingly, no G137D mutation was found in Cuba, Venezuela and Colombia. Genotype frequencies of individuals from each locality are presented in Fig. 3.

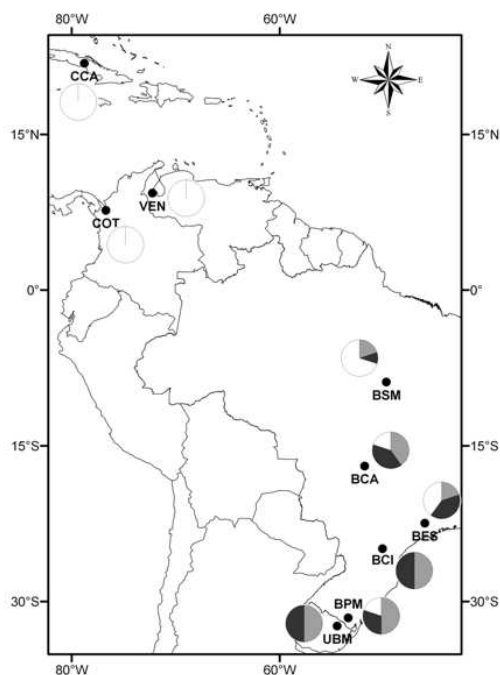


Fig. 3 Map of South and part of Central America showing the regions where NWS were collected and the G137D mutation frequencies in the carboxylesterase E3 gene. White = homozygote wild; Gray = heterozygotes; Black = homozygote mutant.

4. Discussion

In this study, we sequenced AChE cDNA from NWS and surveyed for the presence of mutations involved in OP resistance in AChE and E3 genes in NWS natural populations. Alterations in the AChE gene cause insensitivity to OP, while the G137D mutation is associated with a general form of OP resistance by metabolic detoxification of the insecticide. This study did not directly compare the frequency of these mutations in E3 and AChE genes with phenotypic resistance, as determined by insecticide exposure assays. However, the high conservation of mutations in these genes among the dipteran species suggests that the same resistance mechanisms could have evolved in NWS.

The deduced amino acid sequence of AChE from NWS is highly similar to those of other dipteran AChEs, presenting all the major structural and functional features of the protein conserved. Whilst some insect species of the Orthorrapha group present more than one AChE gene (Ace1 and Ace2), the existence of another AChE 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 (Weill et al., 2002).

A survey of the geographical distribution of mutations in these genes in NWS revealed a high frequency of G137D mutation in several Brazilian populations and Uruguay. The low frequency of the G137D mutation in Pará (Brazil) could be correlated with lower selective pressure since the livestock activity in this region is more recent. Absence of mutant alleles (D137) in Colombia, Venezuela and Cuba could be justified by low OP pressure in these localities, associated with a historical event in which emergence of Amazon forest divided NWS into two geographical populations, restricting gene flow (Fresia PC, personal communication). A recent investigation of the W251S mutation in the NWS E3 gene, involved in dimethyl-OP and pyrethroid resistance, showed the considerable frequency of this mutation in most of the populations analyzed (Silva and Azeredo-Espin, 2009). Alterations in the frequencies of both mutations in the E3 gene seem to be associated with the use of insecticides for NWS control, as shown in Uruguay (Carvalho et al., 2010).

In addition to the possibility of fitness cost caused by altered AChE, the low frequency of AChE mutants found in natural populations of NWS could be explained by the fact that the mutant forms of NWS E3 may possess a higher affinity for OPs than the AChE target site itself, which may serve to protect AChE, as verified in *L. cuprina* (Campbell et al., 1997; Newcomb et al., 1997). Although there are no studies reporting the phenotypic resistance in the NWS fly, this report presents the high frequency of E3 mutants, rather than of the AChE gene, indicating that this mechanism may have been selected by OP pressure in this species, as in other dipteran species. Molecular assays provide information as to the presence and distribution of resistance-associated alleles in populations, even when at a low frequency, allowing resistance to be detected earlier than by insecticide exposure assays. In this regard, this study provides useful information that can facilitate the monitoring and management of resistance for their effectiveness in control programs.

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. 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

- Altschul, S.F., Maden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S., 2004. Improved prediction of signal peptides: Signal P 3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783-795.

- 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.
- Carvalho, R.A., Torres, T.T., Azeredo-Espin, A.M.L., 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.
- Carvalho, R.A., Torres, T.T., Paniago, M.G., Azeredo-Espin, A.M.L., 2009. 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.
- Carvalho, R. A., Limia, C. E. G., Bass, C., Azeredo-Espin, A. M. L., 2010. Changes in the frequency of the G137D and W251S mutations in the carboxylesterase E3 gene of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) populations from Uruguay. *Vet. Parasitol.* doi:10.1016/j.vetpar.2010.02.029.
- 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.
- Claudianos, C., Russel, R. J., Oakeshott, J. G., 1999. The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 675-686.
- Galvin, T.J., Wyss, J.H., 1996. Screwworm Eradication Program in Central America. Vector-borne pathogens: international trade and tropical animal diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 791, 33-240.
- Haas, T., Marshall, T.L., Rosenberry, T.L., 1998. *Drosophila* acetylcholinesterase: demonstration of a glycoinositol phospholipids anchor and an endogenous proteolytic cleavage. *Biochemistry* 27, 6453-6457.
- Hall, M., Wall R., 1995. Myiasis of human and domestic animals. *Adv. Parasitol.* 35, 257-334.

- Infante-Vargas, M.E., Azeredo-Espin, A.M.L., 1995. Genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochem. Genet.* 33, 737-756.
- Kim, C.S., Kim, W.T., Boo, K.S., Kim, S.I., 2003. 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.
- Menozzi, 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.
- 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., Campbell, P.M., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., 1997. 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.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10, 1-6.
- Rosenberry, T. L., 1975. Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol.* 43, 103-218.
- Silva, N.M., Azeredo-Espin, A.M.L., 2009. 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.
- Sunyaev, S.R., Eisenhaber, F., Rodchenkov, I.B., Eisenhaber, B., Tumanyan, V.G., Kuznetsov, E.N., 1999. Prediction of potential GPI-modification sites in protein sequences. *Protein Eng.* 12, 387-394.
- Temeyer, K.B., Chen, A.C., 2007. Identification and characterization of a cDNA encoding the acetylcholinesterase of *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). *DNA Seq.* 18, 85-9.
- 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. Parasitol.* 154, 300-310.

- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876-4882.
- Walsh, S.B., Dolden, T.A., Moores, G.D., Kristensen, M., Lewis, T., Devonshire, A.L., Williamson, M.S., 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem. J.* 359, 175-181.
- Weill, M., Fort, P., Berthomieu A., 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. Series B* 269, 2007-2016.
- Vontas, J.G., Hejazi, M.J., Hawkes, N.J., Cosmidis, N., Loukas, M., Hemingway, J., 2002. Resistance-associated point mutations or organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Mol. Biol.* 11, 329-336.

CAPÍTULO 3

Caracterização do transcriptoma e identificação de genes diferencialmente expressos em indivíduos resistentes

Artigo 4: Carvalho, R. A., Azeredo-Espin, A. M. L., Torres, T. T. Deep sequencing of New World screw-worm transcripts to discover genes involved in insecticide resistance.

“Seqüenciamento massivo dos transcritos da mosca-da-bicheira para identificação de genes envolvidos na resistência a inseticidas.”

Resumo

A mosca-da-bicheira, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), é um dos principais agentes causadores de miíases primárias na região Neotropical e as infestações causadas por suas larvas representam graves prejuízos econômicos para a produção animal. Apesar da importância econômica dessa espécie, poucos estudos têm abordado a identificação dos mecanismos moleculares responsáveis pela resistência a inseticidas nessa espécie, incluindo a caracterização do sítio alvo e a resistência metabólica causada por alteração qualitativa de uma carboxilesterase. Um dos mecanismos mais descritos que conferem resistência a diversas classes de inseticidas é a alteração quantitativa de enzimas que metabolizam os inseticidas em produtos menos tóxicos aos insetos, devido principalmente à super-expressão de alguns genes. Assim, o objetivo desse trabalho foi identificar genes diferencialmente expressos em indivíduos resistentes de *C. hominivorax* que possam estar contribuindo para o fenótipo resistente. No entanto, uma vez que não há informação genômica disponível para esta espécie, um banco de dados foi gerado através da caracterização do transcriptoma utilizando uma das técnicas de sequenciamento de nova geração (Roche 454). Esta nova estratégia vem revolucionando a análise do transcriptoma por gerar resultados mais rapidamente e apresentar custos reduzidos quando comparada ao sequenciamento tradicional. Para isto, foram geradas três bibliotecas 454 normalizadas para larvas, machos adultos e fêmeas adultas. Ao todo, foram obtidas 548.940 seqüências, das quais 357.355 foram consideradas para a montagem, formando 36.650 “contigs” e 782 “singlets”. A média de tamanho dos “contigs” foi de 315 pb, com uma média de cobertura de 5,2 seqüências por posição nucleotídica. Após a anotação desses transcritos, foram selecionados genes candidatos pertencentes às famílias de enzimas de detoxificação metabólica (carboxilesterases, monooxigenases P450 e GSTs) para terem sua expressão comparada entre os indivíduos que sobreviveram ao tratamento (CL₉₀) com o inseticida diclorvós (DDVP, um dimetil-OF) e indivíduos de um grupo controle (sem tratamento).

Dentre os genes analisados, apenas o gene ortólogo ao *CYP6G1* (P450) de *Drosophila melanogaster* foi diferencialmente expresso nos indivíduos resistentes. No entanto, diferentemente do encontrado em outras espécies resistentes, esse gene teve sua expressão fortemente reduzida em *C. hominivorax*. Para alguns OPs, há a necessidade de bioativação em compostos mais tóxicos por enzimas P450, o que justificaria uma expressão reduzida nos indivíduos resistentes. Mas a associação da redução da expressão desse gene nos resistentes deve ser investigada em trabalhos futuros, uma vez que o DDVP não precisa ser bioativado. Além da investigação da expressão diferencial de genes, foi avaliado, individualmente, o genótipo dos indivíduos para os genes da carboxilesterase E3 e acetilcolinesterase, possivelmente envolvidos na resistência a inseticidas OF. O sítio alvo não se encontrou alterado em nenhum dos grupos. Já o gene da carboxilesterase E3 apresentou a mutação W251S em todos os indivíduos do grupo resistente (n=44), enquanto que no grupo controle (n=40) 13 indivíduos apresentaram a mutação, confirmando a associação dessa mutação com resistência aos dimetil-OF. Apesar de ter sido utilizada uma alta concentração (CL₉₀) no bioensaio, o que poderia não permitir a sobrevivência baseada na super-expressão de enzimas metabólicas, a ausência de genes diferencialmente expressos nos resistentes não exclui a possibilidade de detoxificação metabólica por alteração quantitativa, uma vez que outros genes não avaliados podem ter tido a expressão alterada e contribuído para o fenótipo resistente. Um estudo está sendo conduzido atualmente com esses mesmos grupos utilizando uma outra tecnologia de sequenciamento de nova geração (Illumina) que analisa o perfil global de expressão gênica, visando à identificação de quaisquer genes diferencialmente expressos entre os grupos. Mesmo que seja verificada a presença de algumas outras enzimas de detoxificação, a resistência metabólica causada pela alteração da carboxilesterase E3 é sem dúvida um dos principais mecanismos de resistência na mosca-da-bicheira. Assim, o monitoramento da frequência das mutações nesse gene é uma importante ferramenta que deve ser utilizada para auxiliar na escolha das classes de inseticidas apropriadas para determinada região, contribuindo para estratégias mais eficazes de controle dessa espécie.

Deep sequencing of New World screw-worm transcripts to discover genes involved in insecticide resistance

Renato Assis de Carvalho^{1,2}, Ana Maria Lima de Azeredo-Espin^{1,2}, Tatiana Teixeira Torres^{1§}

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

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

[§]Corresponding author

Email addresses:

RAC: rassis@unicamp.br

AMLAE: azeredo@unicamp.br

TTT: tttorres@unicamp.br

Abstract

Background The New World screw-worm (NWS), *Cochliomyia hominivorax*, is one of the most important myiasis-causing flies, causing severe losses to the livestock industry. In its current geographical distribution, this species has been controlled by the application of insecticides, mainly organophosphate compounds, but a number of lineages have been identified that are resistant to such chemicals. Despite its economic importance, only limited genetic information is available for the NWS. Here, as a part of an effort to characterize *C. hominivorax* genome and identify putative genes involved in insecticide resistance, we sampled its transcriptome by deep sequencing of polyadenilated transcripts using the 454 sequencing technology.

Results Deep sequencing on the 454 platform of three normalized libraries (larvae, male adult and female adult) generated a total of 548,940 reads. Candidate genes coding for three metabolic detoxification enzyme families, cytochrome P450 monooxygenases (CYP), glutathione S-transferases (GST) and carboxyl/cholinesterases (CCE) were selected and gene expression levels were measured using qRT-PCR. Of the investigated candidates, only one gene was expressed differently between control and resistant larvae with more than 40-fold down-regulation in the resistant larvae. The presence of mutations in the acetylcholinesterase (target site) and carboxylesterase E3 genes was investigated and all of the resistant flies presented E3 mutations previously associated with insecticide resistance.

Conclusions Here, we provided the largest database of NWS transcripts that is an important resource, not only further studies on the molecular basis of the OP resistance in NWS fly, but also for functional and comparative studies among Calliphoridae flies. Among our candidates, only one gene was found differentially expressed in resistant individuals, and its role on insecticide resistance should be further investigated. In addition to this, the absence of mutations in the OP target site and the high frequency of mutant carboxylesterase E3 indicate that metabolic resistance mechanisms have evolved preferentially in this species.

Background

Until very recently, the database of genomic sequences for insect species has been restricted to model species. Now, with the recent advances in DNA sequencing technology, the generation of sequence data has increased at an unprecedented rate. As new sequencing technologies became less expensive, it is possible to generate genomic information from non-model species. This holds a great promise for several species with medical, veterinary or economic importance.

New World screw-worm (NWS), *Cochliomyia hominivorax*, is one of the most important insect pests in South and Central America (Hall and Wall, 1995). NWS myiasis is caused by the larval stage of the fly infesting tissues of warm-blooded vertebrates. Such infestations cause significant losses in the livestock industry through morbidity, mortality and the cost of treating infested animals. This insect pest also represents a serious public health problem in the Caribbean region, where screw-worm infestations in humans are frequently reported (Vargas-Terán et al., 2005). Historically, NWS was widely distributed from the southern U.S. to central Argentina. However, this species has been successfully eradicated from North and most of Central America by the Sterile Insect Technique (IAEA, 1998). In South America and in the Caribbean region, however, this pest continues to affect the development of the livestock sector and wider economic development.

In its current geographical distribution, NWS has been controlled exclusively by chemical insecticides, in particular organophosphate (OP) and pyrethroid-based compounds (Carvalho et al., 2006). Nevertheless, the intensive use of these chemicals has led to the selection of resistant strains which, in turn, compromises the effective control of NWS. In this context, the elucidation of the molecular basis of insecticide resistance in NWS is of great value to minimize its effect by adopting resistance management strategies. The major mechanisms of insecticide resistance already described in several insects involve the alteration of target sites inducing insensitivity to the insecticide (target-site resistance) and/or an increase in the rate of insecticide metabolism (metabolic resistance) (Hemingway et al., 1998). The metabolic resistance may result from coding sequence alteration of

metabolic genes and/or over-expression of enzymes capable of metabolizing the insecticide (Li et al., 2007).

Despite its medical and veterinary importance and its negative economic impact on the livestock sector, only limited genetic information is available for the NWS. Molecular studies in this species focused on the characterization of molecular markers in the mitochondrial (reviewed in Azeredo-Espin and Lessinger, 2006) and nuclear genomes (Torres 2004 and 2005), their utilization in population genetic studies (Lyra et al., 2005 and 2009; Torres and Azeredo-Espin, 2009) and the characterization of genes and substitutions involved in insecticide resistance (Carvalho et al., 2006 and 2009; Silva and Azeredo-Espin, 2009). In a recent study, one substitution was found in the acetylcholinesterase gene, which product is the target of OP, but with a very low frequency in several NWS populations (Silva et al, submitted). No substitutions were found in the sodium channel gene, target of pyrethroids (Silva and Azeredo-Espin, 2009). In contrast, substitutions in the carboxylesterase E3 gene with very high frequencies were found in several NWS populations surveyed (Carvalho et al., 2009, Silva and Azeredo-Espin, 2009, Silva et al, submitted). This gene has been previously associated with OP resistance in the sheep blowfly *Lucilia cuprina* and in the housefly *Musca domestica* (Newcomb et al., 1997; Claudianos et al., 1999). In this enzyme, a G137D substitution in the oxyanion hole within the active site results in diethyl OP resistance and a second substitution, W251L, in the acyl pocket of the active site also confers resistance to OPs, mainly dimethyl OP compounds, and pyrethroids (Campbell et al. 1998, Heidari et al, 2005). However, there is no information currently available on metabolic resistance in NWS based on up-regulation of detoxification enzymes such as cytochrome P450 monooxygenases (P450), glutathione S-transferases (GST) and carboxyl/cholinesterases (CCE).

Now, the combined availability of a rapidly growing database of insect genomic sequences and the recent developments in sequencing technology provides an opportunity for genome-wide gene discovery in *C. hominivorax*, including genes that might be involved on insecticide resistance. Parallel sequencing of short cDNA fragments has been demonstrated as an excellent tool to generate genome-wide sequence information (Hahn et al., 2009;

Pauchet et al., 2009; Rasmussen and Noor, 2009; Vera et al., 2008) as well as levels of gene expression (Torres et al., 2008, Torres et al., 2009).

Here, as a part of an effort to characterize *C. hominivorax* genome and identify putative genes involved in insecticide resistance, we sampled its transcriptome by deep sequencing of polyadenilated transcripts using the 454 sequencing technology. In this study, we report the analysis of ~500,000 ESTs generated from three libraries (male, female and larvae), providing, to our knowledge, the largest EST database for a Calliphoridae species. We anticipate that the availability of these sequences will be of significant value to functional studies in *C. hominivorax* and closely related species in the Calliphoridae family.

Furthermore, we performed larval bioassays to select individuals resistant to an OP insecticide. The presence of acetylcholinesterase (target site) and carboxylesterase E3 mutations was investigated and quantitative polymerase chain reaction following reverse transcription (qRT-PCR) was used to identify differentially expressed genes putatively involved in metabolic resistance. Our results add to the basic knowledge of the molecular mechanisms involved OP resistance and are of potential applied interest to point out new and more effective strategies for controlling NWS.

Results

Assembly

Deep sequencing on the 454 platform of the three normalized libraries generated a total of 548,940 reads of raw nucleotide sequence data with an average read length of 195 bp after the removal of low score ends (Table 1). An overview of the pipeline for the analysis of *C. hominivorax* ESTs is presented in figure 1.

Table 1 - Sequences obtained from each cDNA library.

MID	Sample	Initial number of sequences	Final number of sequences*	Mean size
CGTGTCTCTA	Larvae	174.459	145.964	187 pb
CTCGCGTGTC	Male adults	132.646	111.119	184 pb
TAGTATCAGC	Female adults	232.332	192.547	182 pb
Not found	Not attributed	9.503	7.815	171 pb
Total	All	548.940	457.445	184 pb

* Sequences bigger than 30 pb after adapters and primers removal.

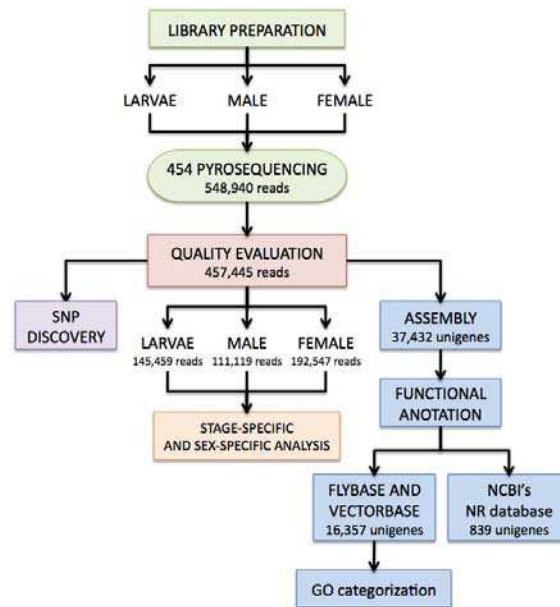


Figure 1. An overview of the pipeline for the analysis of *C. hominivorax* ESTs

After quality evaluation, 457,445 of the obtained reads were assembled using MIRA (Chevreux et al. 2004). A subset of these reads, 357,355 (78%), was considered in the assembly, which resulted in 37,432 unigenes (36,650 contigs and 782 singlets). The mean unigene size was 315 bp, with an average coverage of 5.2 sequences per nucleotide

position. The average contig size obtained is consistent with previous reports describing EST sequencing using the 454 technology for different insect species, *Melitaea cinxia* (Vera et al. 2008), *Sarcophaga crassipalpis* (Hahn et al. 2009), *Chrysomela tremulae* (Pauchet et al. 2009).

The average length of unigenes is affected by the high number of singletons and contigs formed by the assembly of very few short reads. This drawback resulting from the use of NGS is ameliorated by the depth of coverage. Increased sequence depth results in increase length coverage of cDNA sequence. Taking a subset of contigs formed by the assembly of at least 20 reads (3,630 contigs), the average contig size increased to 550 bp (Figure 2). Sampling the 10 % longest contigs (3,743 contigs), the average contig size increased to 660 bp with an average coverage of 9.8 sequences per nucleotide position. This sub-sampling showed that we have more than 3,700 contigs with very good coverage, quality and length for downstream analysis.

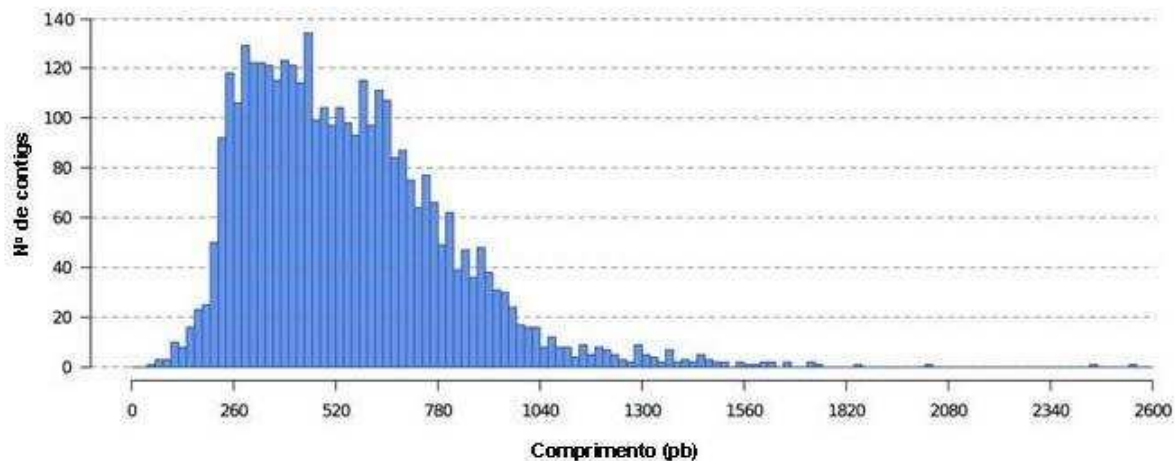


Figure 2. Subset of contigs formed by the assembly of at least 20 reads.

Functional annotation of *C. hominivorax* unigenes

To infer the functional identity of the NWS unigenes, we mapped each sequence to annotated transcripts from *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*, *Ixodes scapularis*, *Pediculus humanus* and the 12 sequenced *Drosophila* species using tBLASTx (Altschul et al., 1997) with relaxed criteria ($e < 10^{-4}$, $> 50\%$ identity, $> 20\%$ of read length included in the high scoring segment pair, HSP). About 44% (16,357) of the NWS unigenes

could be mapped to this database of protein-coding transcripts from the 17 insect species (Figure 3, Table 1). Each NWS unigene was automatically assigned a gene annotation corresponding to the hit in the insect database with the highest E-value and that hit was considered as a putative homolog of the NWS gene.

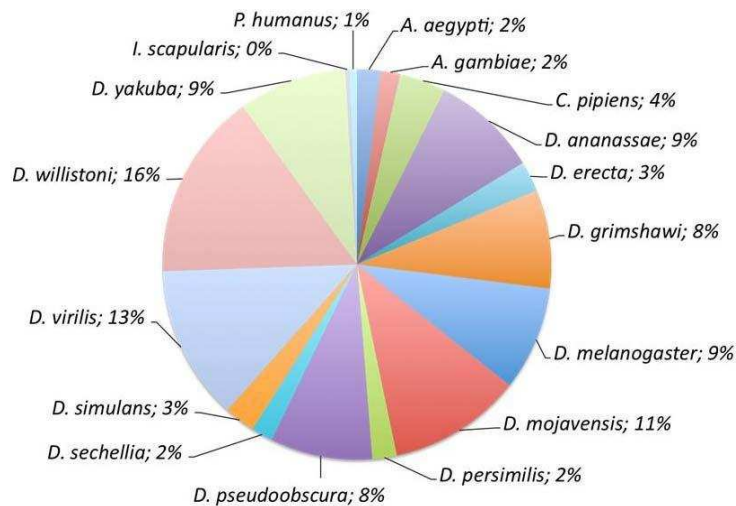


Figure 3. Mapping of the NWS unigenes to databases (Flybase and Vectorbase) of protein-coding transcripts from the 17 insect species.

The remaining unigenes (20,990) were remotely BLASTed against NCBI's non-redundant database and 839 had an acceptable hit against this library under our criteria ($e < 10^{-4}$, $> 50\%$ identity, $> 20\%$ of read length included in the HSP). Blasting *C. hominivorax* unigenes against the NCBI's 'nr' database, we obtained several hits to bacterial sequences that are either in association with *C. hominivorax* or formerly present in the blood and/or meat used in the rearing media (data available upon request)

Gene ontology (GO) classifications (Ashburner et al., 2000) of the corresponding *D. melanogaster* orthologs were obtained from Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>). NWS unigenes were classified into the three GO categories: biological process, molecular function, and cellular component, according to the standard GO terms (<http://www.geneontology.org>). Under the category of biological process, proteolysis,

protein amino acid phosphorylation, transport, mesoderm development and regulation of transcription were among the most highly represented categories, reflecting the most important metabolic activities in *C. hominivorax*. The representation of the biological processes, functions and cellular compartments were very similar among the three libraries. Among the GO classes obtained, none had a different representation between the male and female libraries and few classes were differently represented between larva and adult libraries, reflecting functional categories that differ between the two developmental stages and suggest interesting families for further detailed investigation. Some genes belonging to GO classes putatively involved in organophosphate resistance were selected for gene expression evaluation: cholinesterase, carboxylesterase, juvenile-hormone esterase, serine-type carboxypeptidase, glutathione transferase and monooxygenase activities.

Analysis of sex-specific and stage-specific transcripts

Reads from male, female and larval libraries were sorted by their unique multiplex identifiers sequences (MID). To identify sex- and stage-specific transcripts, we mapped the sorted reads against NWS unigenes. The largest library, adult female, showed the highest number of exclusive (library-specific) unigenes, followed by larval and adult male libraries (Figure 4).

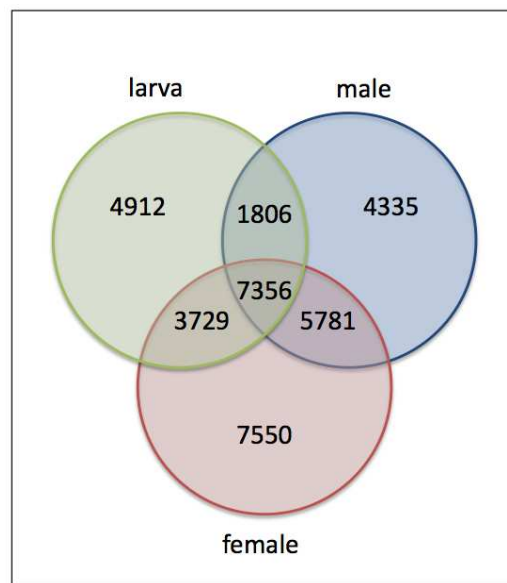


Figure 4. Number of exclusive library-specific unigenes.

In non-normalized cDNA samples, the number of reads mapping to a specific unigene should be proportional to its level of expression. However, differences in transcript abundance in our normalized libraries may reflect different normalization efficiency rather than genuine differences in gene expression. Nevertheless, highly abundant library-specific transcripts are potential candidates for differentially expressed genes among the different libraries. Hence, we performed an analysis to identify such genes by aligning the sorted reads against all unigenes. The number of reads from each library normalized by the library size was used as a measure of the transcript abundance. Comparing the larval library and the combined adult libraries, we found 9,367 and 2,051 with a fold change higher than 5 and 10, respectively (Supplementary table 1). In our comparison between sexes, the number of transcripts with different representation was 5,881 (5 fold change) and 842 (10 fold change). The top 20 unigenes with a different representation had an average fold change of 29 in the comparison between larval and adult samples and of 46 in the comparison between male and female library. Most likely, the fold changes reported here are underestimations of the different representation of the transcripts in the three libraries, due to the small dynamic range of this analysis, but our purpose was to indicate some candidate genes for further studies, rather than a genome-wide gene expression profiling.

Analysis of genes related to secondary metabolism

Genes coding for three enzyme families, cytochrome P450 monooxygenases (CYP), glutathione S-transferases (GST) and carboxyl/cholinesterases (CCE), putatively involved in metabolic detoxification of insecticides were selected after the functional annotation against *D. melanogaster* database. NWS unigenes mapped to 34 *D. melanogaster* genes of the *CYP* family. Of these, 28 corresponded to *CYP* families previously involved in insecticide resistance: 15 to the *CYP6*, eight to the *CYP4* and five to the *CYP12* subfamilies. Seven *CCE* and six *GST* genes were also found among NWS unigenes. All NWS unigenes that mapped to these *D. melanogaster* genes were remotely searched in NCBI (blastx) to confirm the identity of the NWS sequences. Candidate genes for the gene expression analysis using quantitative real time PCR were selected based on unambiguous alignments (Table 2).

Carboxylesterase and acetylcholinesterase genotyping

Bioassays with the dimethyl organophosphate dichlorvos (dimethyl 2,2-dichlorovinyl phosphate) performed in duplicate with 500 NWS larvae selected 44 and 58 resistant individuals in each replicate. A non-treated group was used as a control for further analyses. To identify allelic variants possibly involved in OP resistance, we genotyped three substitutions (I298V, G401A e F466Y) previously associated with OP resistance in *D. melanogaster* and *L. cuprina* (Chen et al., 2001; Menozzi et al., 2004). The two regions containing these substitutions were amplified from the cDNA synthesized using the RNA pools from each group (C and R1). The PCR products were directly sequenced and only the wild allele was observed.

Table 2. Candidate genes selected to gene expression evaluation presenting the number of contigs and reads found for each gene in *C. hominivorax* database.

Genes	<i>D. melanogaster</i> ID	Nº de contigs	Nº de reads
Esterases			
Acetylcholinesterase	FBgn0000024	3	13
Alpha-Esterase-7 <i>EST7</i>	FBgn0015575	1	49
Alpha-Esterase-8 <i>EST8</i>	FBgn0015576	3	15
Alpha-Esterase-9 <i>EST9</i>	FBgn0015577	1	20
Serineprotease 7	FBgn0037515	4	42
GST			
GlutathioneS transferase D1	FBgn0001149	14	205
GlutathioneS transferase E5	FBgn0063495	3	194
GlutathioneS transferase S1	FBgn0010226	5	223
P450			
Cyp4ac1	FBgn0031693	2	8
Cyp4c3	FBgn0015032	1	2
Cyp4d2	FBgn0011576	3	12
Cyp6a14	FBgn0033302	5	46
Cyp6a9	FBgn0013771	13	132
Cyp6d4	FBgn0039006	4	30
Cyp6g1	FBgn0025454	4	14
Cyp6v1	FBgn0031126	2	14
Cyp9f2	FBgn0038037	2	4
Cyp12a4	FBgn0038681	8	75

Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) was used to identify both substitutions, G137D and W251S, previously characterized in NWS E3 (Carvalho, 2006, 2009) and associated with insecticide resistance. Of 40 individuals analyzed from the control group (C), 17 showed a substitution only on the first site (G137D), 13 only on the second site (W251S) and 10 on both sites. Individuals with both mutations had been cloned and sequenced previously (Carvalho et al. 2006) showing only one mutation in each allele, according to studies in *L. cuprina* (Smith et al. 2000). However, all 44 resistant individuals (R1 group) were homozygous for the mutated allele, with the W251S substitution, indicating a strong association between this mutation and dichlorvos (a dimethyl OP) resistance.

Quantitative measure of gene expression in OP resistant larvae

Gene expression levels were measured for 18 candidate genes by qRT-PCR (Table 2). Of these, only one showed significant differences between control and resistant samples (C, R1 and R2). In both resistant groups, R1 and R2, a putative ortholog to the *CYP6G1* gene was down-regulated when compared to the control group. This gene was approximately 45-fold and 10-fold down-regulated in R1 in R2, respectively (Figure 5).

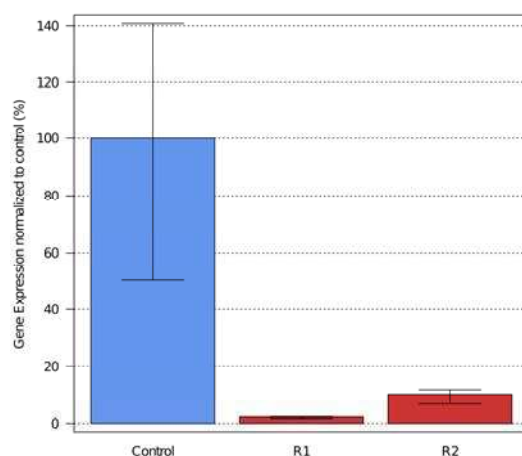


Figure 5. Level of expression of *CYP6G1* in control (C) and resistant (R1 and R2) groups.

Discussion

Given the economic importance of *C. hominivorax* it is surprising that only now there is an interest in functional studies involving this livestock pest. Here, we took advantage of NGS to sequence and characterize *C. hominivorax* expressed sequence tags.

We used this data to investigate molecular mechanisms involved in organophosphate resistance in NWS fly. A bioassay with the dimethyl OP dichlorvos was conducted in order to select resistant individuals. Acetylcholinesterase, target of OP insecticides, is a key enzyme in the nervous system hydrolyzing excess amounts of acetylcholine into acetic acid and choline in the synapses and neuromuscular junctions (Oakeshott et al., 2005). None of the previously identified variants was found in the AChE sequence in any of tested groups, suggesting that OP resistance in NWS is rather due to detoxification enzymes unless other mutations not evaluated occurred in the AChE gene. Absence of altered AChE may occur due to a putative fitness cost caused by the alteration of a fundamental enzyme. In this case, the target site can be protected by mutant form of NWS carboxylesterase E3, which may possess a higher affinity for OPs than the AChE target site itself, as verified in *L. cuprina* (Campbell et al., 1997, Newcomb et al., 1997).

Elevated carboxylesterases levels associated with resistance to OP and carbamate insecticides have been well documented in numerous arthropod species (Hemingway et al., 2004). However, altered carboxylesterase resulting in OP hydrolase activity has been described only for some dipteran species. Substitutions in NWS E3 gene were found in all individuals from resistant and control groups. However, three different genotypes were found in control group, while all individuals resistant to dichlorvos showed a unique genotype; they were all homozygous for the W251S allele. This evidence is strongly supported by biochemical studies in *L. cuprina* in which alteration in the acyl pocket of the active site also confers resistance to dimethyl OPs (Campbell et al. 1998). Although *in vitro* expression for E3 gene has not been performed in NWS, our data indicate that a similar resistance based on altered E3 has evolved in NWS fly.

Besides carboxylesterases, up-regulation of genes encoding P450s and GSTs has been frequently associated with metabolic-based insecticide resistance mechanisms in insects (Enayati et al., 2005; Feyereisen, 1999). In this context, this study is the first evaluation of the expression levels of genes putatively involved in insecticide metabolism in NWS. Of the 18 evaluated genes, only one showed differential gene expression among resistant and control groups, the putative ortholog to *CYP6G1*.

Since P450s play a key role in detoxifying numerous xenobiotic compounds, we expected their involvement in dichlorvos metabolism. However, we did not observe an up-regulation in any of the *CYP* genes analyzed in the resistant groups (R1 and R2). The association of the high expression of the *CYP6G1* gene with insecticide resistance is still in debate. Over-expression of the *CYP6G1* gene was reported in *D. melanogaster* strains resistant to imidacloprid and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) (Daborn et al., 2002). The over-expression in resistant individuals of *D. melanogaster* from several populations was associated with the insertion of an Accord element in the upstream regulatory region of the *CYP6G1* gene (Catania et al., 2004, McCart et al., 2008). Other studies, however, found a lack of correlation between *CYP6G1* expression and DDT resistance (Schlenke and Begun, 2004; Festucci-Buselli et al., 2005; Kuruganti et al., 2007). Our results add yet more complexity to this debate. A putative ortholog to *CYP6G1* was substantially down-regulated in NWS resistant individuals. This is the first report of down-regulation of this *CYP* gene possibly associated with insecticide resistance. These intriguing *CYP6G1* results motivate further investigations to understand the involvement of this gene in insecticide resistance.

It has been previously reported that some organophosphate insecticides require an oxidative biotransformation into more toxic structures that inhibit acetylcholinesterase, a process that is mediated by some P450 enzymes (Scott, 1999). In such cases, a decrease of the expression levels of these *CYP* genes would be an advantage in the presence of an OP insecticide by preventing its bioactivation by P450 enzymes. Although this seems a reasonable explanation for our observed decrease in gene expression, it may not apply to

the OP we used (dichlorvos) because its structure already contains the phosphate ($P = O$) biologically active as AChE inhibitors (Valle, 1998). Nonetheless, the possible involvement of a reduced level of a P450 enzyme with insecticide resistance brings about a discussion on the use of synergistic compounds like PBO that inhibit P450 and esterases (Bingham et al. 2007). Our results are in line with previous studies indicating these synergists should be used caution as in some concentrations they could reduce the insecticide efficacy (Li et al, 2003, Li et al, 2006).

An alternative explanation to this observation is the genetic linkage between the E3 mutant allele and the allele associated with low-expression levels of *CYP6G1*. In this case, the difference in *CYP6G1* expression levels between the control and resistant samples may have resulted from the selection of cis- or trans-acting regulatory variants linked to the selected E3 allele. A third possible scenario for the observed changes in expression levels of *CYP6G1* involves the alternative splicing of this gene in the presence of the insecticide (Maitra et al, 2002; Baxter et al, 2010). It is possible that we measured the expression (by qRT-PCR) of exons that are skipped in the presence of the insecticide.

Contrary to our expectations, none of the 18 genes analyzed showed an increased expression level in the resistant screw-worms. Considering all P450s, GSTs and CCEs found among in *C. hominivorax* characterized transcripts, we analyzed only some genes putatively associated with metabolic resistance and, therefore, we cannot rule out the possibility that other genes are involved in the insecticide resistance in this species. RNA sequencing is a promising approach for identifying novel genes involved in insecticide resistance and it is a natural follow-up to our analysis. Nonetheless, it is possible that the insecticide dose we used (LD90) was too high to allow the metabolic resistance based on the over-expression of hydrolyzing enzymes. This high pressure has selected only individuals that are homozygous for the W251S allele of the E3 gene. This result, associated with the population survey (Carvalho et al, 2010, Silva et al, submmited), represents a strong evidence that altered carboxylesterase E3 is the major mechanism of OP insecticide resistance in NWS. Therefore, the identification of mutations in E3 gene in NWS natural populations can provide important information regarding susceptibility to

some class of insecticides and contribute to implement more effective strategies for NWS control.

Conclusions

By using 454 pyrosequencing we have sampled screwworm transcribed sequences more deeply than has been previously done, providing a large database of protein coding genes. This database is a rich resource, paving the way for future functional studies involving *C. hominivorax* and other Calliphoridae species.

We used this database to investigate the molecular base of the OP resistance in NWS fly. Absence of mutations in the target site indicates that metabolic resistance mechanisms have evolved preferentially in this species. Although no carboxylesterase E3 over-expression has been verified, high correlation between mutation W251S in this gene and resistant phenotypes strongly suggests involvement of this enzyme in dichlorvos metabolism. Real-time PCR revealed that *CYP6G1* is notably under-expressed in resistant individuals. Further empiric studies by using RNA interference could confirm the role of these genes in the resistance phenotype. Although resistance is an inevitable consequence of intensive insecticide use, a better understanding of its genetic basis may help us to implement effective management strategies to control insect pests and reduce damage resulting from their infestations.

Methods

***C. hominivorax* strains**

Screwworm larvae were collected from infested cattle wounds in Caiapônia, Goiás, Brazil. The fly culture was maintained in the laboratory for nearly one year prior to sequencing. Larvae were reared at $30^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ in a medium consisting of fresh ground beef supplemented with blood and water (2:1). Mature larvae were allowed to pupate in sawdust. Adults were maintained in cages (34 x 50 x 26) at 25°C and fed with a diet composed of dried milk, sugar and yeast ferment.

In order to obtain sex-specific and stage-specific transcripts, total RNA from each sample was extracted separately with Trizol (Invitrogen) from whole bodies of 20 larvae, 10 adult females and 10 adult males. Extracted RNA was treated with TerminatorTM 5'-Phosphate-Dependent Exonuclease (1 unit/50 µg of total RNA) (Epicentre Biotechnologies) for producing mRNA-enriched samples by selectively digesting the ribosomal RNA. Genomic DNA contamination was removed by DNase I (Invitrogen) and the mRNA-enriched samples were further purified by using Nucleospin RNA Clean-up tubes (Macherey Nagel). Quantification of RNA was performed using the fluorometer 'Qubit Quantitation Platform' (Invitrogen).

cDNA synthesis and normalization

First-strand cDNA was generated from approximately 0.3 µg of mRNA using the SMART approach (Zhu et al., 2001), according to the Trimmer cDNA normalization kit protocol (Evrogen) using the oligonucleotides CDS-3M (5' – AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC GAG GCG GCC(T)₂₀ VN – 3') and SMART IV (5' – AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ACG GCC GGG – 3'). Double-stranded cDNA was synthesized by using PCR primer IIA (5' – AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA G – 3'). In order to reduce the prevalence of abundant transcripts and increase the efficiency of rare transcript discovery, the resulting double-stranded cDNAs were normalized using a duplex-specific nuclease enzyme (Trimmer cDNA normalization kit, Evrogen) (Zhulidov et al., 2004). Quantification cDNA samples before each procedure was performed using the fluorometer 'Qubit Quantitation Platform' (Invitrogen).

454 sequencing

Approximately 5 µg of double-stranded cDNA prepared from each sample was used for library preparation following previously described methods (Margulies et al. 2005). During library preparation, sample-specific MID adaptors (table 1) were blunt-end ligated onto each DNA fragment in a sample. The three samples were pooled prior to sequencing, which was performed on a Genome Sequencer FLX Instrument (Roche Diagnostic) following standard protocols (Margulies et al., 2005).

Assembly of 454-ESTs

Quality filtering and trimming of low quality read ends and of 454 adaptors was done using 454 run-time applications. SMART adaptors and MID sequences were removed from the 454 reads by using cross match (<http://www.phrap.org/>).

The processed reads were clustered using the MIRA v2.9.26x3 (Chevreux et al., 2004) assembler with the “denovo, EST, normal, 454” parameters. The default assembly options of minimum read length of 40 nucleotides, minimum sequence overlap of 40 nucleotides and a minimum relative overlap score of 80% of similarity were used.

Analysis of library specific transcripts

To identify library-specific transcripts, raw 454-ESTs were sorted according to their MID sequence using an in-house Perl script (available on request). ESTs from each library were mapped against the assembled *C. hominivorax* unigenes using PanGEA (Kofler et al 2009) with default parameters for 454 sequences. The number of sorted reads from each library mapped to each unigene (unigene-count) was used as the representation of that unigene in the analyzed library. Unigene-counts were normalized by dividing them by the total number of reads in each library. When no read was detected in one library, a value of '1' was used to avoid any division by zero.

Fold change in representation of a given unigene was calculated by dividing the highest normalized unigene-count observed between two samples by the lowest normalized unigene-count observed between the same two samples.

Blast searches and unigene annotation

Identity searches (tBLASTx) of unique sequences (unigenes) of *C. hominivorax* were done locally against a transcript database composed of sequences from the 12 *Drosophila* genomes (available from FlyBase <http://flybase.org/>), *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*, *Ixodes scapularis* and *Pediculus humanus* genomes (available from VectorBase <http://www.vectorbase.org>). The e-value cutoff was set at 1×10^{-4} and only alignments with at least 50 bp were considered for unigenes with at least 50% identity with a sequence in the database over at least 50% of their length. Unigenes with no hit against

this database were searched against the NCBI non-redundant 'nr' database. For the tBLASTx remote searches, we required an e-value of 1×10^{-4} and a minimum of 50% of the sequence to be involved in the best hit, with at least 50% of identity. Both, local and remote, searches were automated using in-house Perl scripts (available upon request). For gene ontology mapping, NWS unigenes were mapped to gene and transcript database of *D. melanogaster* release 5.22 (available from FlyBase). The hit with the highest E-value was considered as a putative homolog of the NWS unigene. The FlyBase identifier (FBgn#) of each *D. melanogaster* gene was used for gene ontology (GO) classification (Ashburner et al., 2000) of the mapped NWS unigene.

Bioassay with dichlorvos

To identify genes with an altered level of gene expression after insecticide treatment, we performed a bioassay using the OP insecticide dichlorvos (dimethyl 2,2-dichlorovinyl phosphate; $C_4H_7Cl_2O_4P$). Larvae from the sequenced strain - third and fourth generations - were used in two bioassays (R1 and R2) to select the resistant individuals.

Firstly, we estimated the lethal concentration for 90% of the population (LC90).

Concentration-response curves were first established by exposing second instar larvae to four OP concentrations (22.5 mg/L, 11.2 mg/L, 7.4 mg/L, 5.6 mg/L). The different insecticide amounts were directly mixed to larvae medium. Log probit analysis (Finney, 1971) in the POLO-PC program (LeOra software) was used to calculate the LC90.

Bioassays were carried out (in duplicate) by applying the estimated LC90 (20 mg/L) on 500 NWS larvae (L2 instar). Mortality was observed after 24h exposure and larvae that survived to the treatment were collected immediately for RNA extraction.

The levels of gene expression of 18 candidate genes selected from the 454 data were analyzed in a non-treated (Control) and in the two groups (R1 and R2) that survived to dichlorvos treatment.

Carboxylesterase and acetylcholinesterase genotyping

PCR-RFLP was used to genotype E3 mutations. To amplify the region of the E3 gene with both mutation sites forward and reverse primers (7F1aN:5' GGCTCCAGAACTAAACG

3' and 7R3a:5' ATCCTTATCATTATTTTCACCC 3') were designed based on the E3 nucleotide sequence described in Carvalho et al. (2006). Endonucleases Tsp45I and Eco130I (New England Biolabs) were used to identify the G137D and W251S mutations, respectively. The digested fragments were separated by electrophoresis on 2% agarose gels and stained with ethidium bromide.

Based on NWS AChE previously sequenced, two sets of primers were used to amplify both regions containing three mutation sites: Achef2 (5' CGATCCTGATCATTTAATCC 3') with Acher3 (5' TTGCAATCATTTATCAAAGC 3') and Achef3 (5' AATCCCCAATCGGTTATG 3') with Acher2 (5' CCTCATCCTTGACATTTC 3'), according to Silva et al (submitted). Direct sequencing of the PCR products was done in the ABI 377 automatic sequencer (Applied Biosystems).

Quantitative real-time PCR

Based on the annotation of NWS unigenes, 18 were selected for the comparison of the gene expression levels (Table 2). Primer pairs for each unigene (Supplementary table 1) were designed using the Primer3 software (Rozen and Skaletsky, 2000).

Total RNA was individually extracted from larvae that survived to both bioassays (R1 and R2) and from a subset of larvae (n = 40) of the control group (C) using Trizol (Invitrogen). Five micrograms of total RNA were treated with DNase Turbo (Ambion) and the concentration was determined fluorometrically (Qubit, Invitrogen). First-strand cDNA was synthesized using 'RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase' (Fermentas). Resulting cDNAs were diluted 40 times for PCR reactions.

Data analysis was performed according to the $\Delta\Delta CT$ method (Livak and Schmittgen, 2001) and using the gene encoding the ribosomal protein rp49 as an endogenous control on the Real-Time 7500 PCR System (Applied Biosystems). The efficiency of PCR amplification for each gene-specific primer pair was analyzed with five serial dilutions in three technical replications. The real-time PCR was carried out in 12.5 μ L reactions containing 6.25 μ L SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.4 μ M of each primer and 4.25 μ L of diluted cDNA, according to manufacturer's instructions. Thermal cycling conditions were: 95 °C for 10 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s. For the qRT-PCRs

we used three biological replicates and each reaction was performed in triplicate. Data was statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA).

Authors' contributions

RAC, AMLAE and TTT conceived of the study. RAC and TTT designed and carried out the experiments. TTT carried out the bioinformatic analysis, supervised the project and coordinated all activities. RAC and TTT wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are very grateful to Maria Salete Couto for maintaining the screwworm colonies and to Rosângela Rodrigues and Alessandra Staffocker for valuable technical assistance. We thank Mark Fong and the Creative Genomics team for 454 sequencing. This work was supported by grants to AMLAE and TTT from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grants 08/53592-4). RAC and TTT were supported by fellowships from FAPESP (06/60693-6 and 08/53655-6).

References

- Hall M, Wall R: **Myiasis of human and domestic animals**. *Advances in Parasitology* 1995, **35**: 257-334.
- Vargas-Terán M, Hofmann HC, Tweddle NE: **Impact of screwworm eradication programmes using the sterile insect technique**. In: *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Ed. By V.A. Dyck, J. Hendrichs and A.S. Robinson, Springer, Netherlands, 2005, 629-650.
- IAEA: **Thematic plan for the Sterile Insect Technique for Old and New World Screwworm**. Viena, Áustria, 1998.
- Carvalho RA, Torres TT, 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 Parasit* 2006, **140**: 344-351.
- Hemingway J, Karunaratne SHPP: **Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism.** *Med Vet Entomol* 1998, **12**: 1-12.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR: **Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics.** *An Rev Entomol* 2007, **52**: 231-253.
- Azeredo-Espin AML and Lessinger AC: **Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics.** *Genetica* 2006, **126**(1-2), 111-131.
- Genetica* 2006, **126**(1-2), 111-131.
- Torres TT, Brondani RPV, Garcia JE, Azeredo-Espin AML: **Isolation and characterization of microsatellite markers in the New World screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae).** *Mol Ecol Notes*, 2004, **4**: 182-184.
- Torres TT and Azeredo-Espin AML. **Development of new polymorphic microsatellite markers for the New World screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae).** *Mol Ecol Notes* 2005, **5**: 815-817.
- Lyra ML, Fresia P, Gama S, Cristina J, Klaczko LB, Lima De Azeredo-Espin AM: **Analysis of mitochondrial DNA variability and genetic structure in populations of New World screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay.** *J Med Entomol* 2005, **42**(4): 589-95.
- Lyra ML, Klaczko LB, Azeredo-Espin AM: **Complex patterns of genetic variability in populations of the New World screwworm fly revealed by mitochondrial DNA markers.** *Med Vet Entomol* 2009, **23** Suppl 1: 32-42.
- Torres TT, Azeredo-Espin AML: **Population genetics of New World screwworm from the Caribbean: insights from microsatellite data.** *Med Vet Entomol* 2009, **23** Suppl 1: 23-31.
- Carvalho RA, Torres TT, Paniago MG, 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* 2009, **23**: 86-91.**
- Silva NM, Azeredo-Espin AML: **Investigation of mutations associated with pyrethroid resistance in populations of the New World Screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Genet Mol Res* 2009, DOI: 10.4238/vol8-3gmr643.**
- Silva NM, Carvalho RA, Azeredo-Espin AML, submmited. **Acetylcholinesterase cDNA sequencing and survey of mutations associated with organophosphate resistance in *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae).**
- Newcomb RD, Campbell PM, Russell RJ, Oakeshott JG: **cDNA cloning, baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in organophosphorus insecticide resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* 1997, **27**: 15-25.**
- Claudianos C, Russel RJ, Oakeshott JG: **The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. *Insect Biochem Mol Biol* 1999, **29**: 675-686.**
- Campbell PM, Newcomb RD, Russel RJ, Oakeshott JG: **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 Molec* 1998, **28**: 139–150.**
- Heidari, R., Devonshire, A. L., Campbell, B. E., Bell, K. L., Dorrian, S. J., Oakeshott, J. G., Russel, R. J: **Hydrolysis of pyrethroids by carboxylesterases from *Lucilia cuprina* and *Drosophila melanogaster* with active sites modified by *in vitro* mutagenesis. *Insect Biochem Mol Biol* 2005 **35**: 597-609.**
- Hahn DA, Ragland GJ, Shoemaker DD, Denlinger DL: **Gene discovery using massively parallel pyrosequencing to develop ESTs for the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *BMC Genomics* 2009, **10**: 234.**
- Pauchet Y, Wilkinson P, van Munster M, Augustin S, Pauron D, ffrench-Constant RH: **Pyrosequencing of the midgut transcriptome of the poplar leaf beetle *Chrysomela tremulae* reveals new gene families in Coleoptera. *Insect Biochem Mol Biol* 2009, **39**: 403-413.**

- Rasmussen DA and Noor MA: **What can you do with 0.1x genome coverage? A case study based on a genome survey of the scuttle fly *Megaselia scalaris* (Phoridae).** *BMC Genomics* 2009, **10**:382.
- Vera JC, Wheat CW, Fescemyer HW, Frilander MJ, Crawford DL, Hanski I, Marden JH: **Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing.** *Mol Ecol.* 2008, **17**:1636–1647.
- Torres TT, Metta M, Ottenwälder B, Schlötterer C: **Gene expression profiling by massively parallel sequencing.** *Genome Res* 2008, **18**(1): 172-7.
- Torres et al., 2009
- Chevreux B, Pfisterer T, Drescher B, Driesel AJ, Muller WEG, Wetter T, Suhai S: **Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs.** *Genome Res* 2004, **14**: 1147-1159.
- Altschul SF, Maden TL, Schäffer AA, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**: 3389-3402.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G: **Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium.** *Nat Genet* 2000, **25**(1): 25-9.
- Chen Z, Newcomb R, Forbes E, McKenzie J, Batterham P: **The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2001, **31**: 805-816.
- Menozi P, Shi MA, Lougarre A, Tang ZH, Fournier D : **Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations.** *BMC Evol Biol* 2004, **4**: 4-11.
- Smyth KA, Boyce TM, Russell RJ, Oakeshott JG: **MCE activities and malathion resistances in field populations of the Australian sheep blowfly (*Lucilia cuprina*).** *Heredity* 2000, **84**: 63-72.

- Guerrero FD, Dowd SE, Djikeng A, Wiley G, Macmil S, Saldivar L, Najar F, Roe BA: **A database of expressed genes from *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae).** *J Med Entomol* 2009, **46**(5): 1109-1116.
- Oakeshott JG, Devonshire AL, Claudianos C, Sutherland TD, Horne I, Campbell PM, Ollis DL, Russel RJ: **Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases.** *Chemico-Biological Interactions* 2005, **157–158**: 269–275
- Campbell PM, Trott JF, Claudianos C, Smyth KA, Russell RJ, Oakeshott JG: **Biochemistry of esterases associated with organophosphate resistance in *Lucilia cuprina* with comparisons to putative orthologues in other Diptera.** *Biochemical Genetics* 1997, **35**: 17–40.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H: **The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes.** *Insect Biochem Mol Biol* 2004, **34**: 653 – 665.
- Enayati AA, Ranson H, Hemingway J: **Insect glutathione transferases and insecticide resistance.** *Insect Mol Biol* 2005, **14**(1): 3-8.
- Feyereisen R: **Insect P450 enzymes.** *Annu Rev Entomol.* 1999, **44**: 507-33.
- Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, Tijet N, Perry T, Heckel D, Batterham P, Feyereisen R, Wilson TG, ffrench-Constant RH: **A Single P450 Allele Associated with Insecticide Resistance in *Drosophila*.** *Science* 2002, **297**: 2253.
- Catania F, Kauer MO, Daborn PJ, Yen JL, ffrench-Constant RH and Schlotterer C: **World-wide survey of an *Accord* insertion and its association with DDT resistance in *Drosophila melanogaster*.** *Mol Ecol* 2004, **13**:2491–2504.
- McCart C, ffrench-Constant RH: **Dissecting the insecticide-resistance associated cytochrome P450 gene *Cyp6g1*.** *Pest Manag Sci* 2008, **64**: 639–645.
- Schlenke TA and Begun DJ: **Strong selective sweep associated with a transposon insertion in *Drosophila simulans*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:1626–1631.
- Festucci-Buselli RA, Carvalho-Dias AS, de Oliveira-Andrade M, Caixeta-Nunes C, Li HM, Stuart JJ, Muir W, Scharf ME, Pittendrigh BR: **Expression of *Cyp6g1* and**

- Cyp12d1* in DDT resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*.** *Insect Mol Biol* 2005, **14**:69–77.
- Kuruganti S, Lam V, Zhou X, Bennett G, Pittendrigh BR, Ganguly R: **High expression of Cyp6g1, a cytochrome P450 gene, does not necessarily confer DDT resistance in *Drosophila melanogaster*.** *Gene* 2007, **388**(1-2): 43-53.
- Scott JG: **Cytochromes P450 and insecticide resistance.** *Insect Biochem Mol Biol* 1999, **29**: 757 – 777.
- Vale JA: **Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning.** *Toxicol Lett* 1998, **102-103**: 649-52.
- Bingham G, Gunning RV, Gorman K, Field LM, Moores GD: **Temporal synergism by microencapsulation of piperonyl butoxide and alpha-cypermethrin overcomes insecticide resistance in crop pests.** *Pest Manag Sci* 2007, **63**(3): 276-81.
- Li AY, Davey RB, Miller RJ, George JE: **Resistance to coumaphos and diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism.** *J Med Entomol* 2003, **40**: 482–490.
- Li AY, Guerrero FD, Pruett JH: **Involvement of esterases in diazinon resistance and biphasic effects of piperonyl butoxide on diazinon toxicity to *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae).** *Pest Biochem Physiol* 2006, **87**: 147–155.
- Maitra S, Price C, Ganguly R: ***Cyp6a8* of *Drosophila melanogaster*: gene structure, and sequence and functional analysis of the upstream DNA.** *Insect Biochem Mol Biol* 2002, **32**: 859–870.
- Baxter SW, Chen M, Dawson A, Zhao JZ, Vogel H, Shelton AM, Heckel DG, Jiggins CD: **Mis-Spliced Transcripts of Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 6$ Are Associated with Field Evolved Spinosad Resistance in *Plutella xylostella* (L.)** *PLoS Genet* **6**(1): e1000802.doi:10.1371/journal.pgen.1000802.
- Carvalho RA, Limia CEG, Bass C, Azeredo-Espin AML: **Changes in the frequency of the G137D and W251S mutations in the carboxylesterase E3 gene of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) populations from Uruguay.** *Vet Parasitol* 2010, **170**: 297–301.

- Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R, Siebert PD: **Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction.** *Biotechniques* 2001, **30**(4):892-7.
- Zhulidov PA, Bogdanova EA, Shcheglov AS, Vagner LL, Khaspekoy GL, Kozhemyako VB, Matz MV, Meleshkevitch E, Moroz LL, Lukyanov SA, Shagin DA: **Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(3): e37.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, et al.: **Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors.** *Nature* 2005, **437**: 376-380.
- Kofler R, Torres TT, Lelley T, Schlotterer C: **PanGEA: identification of allele specific gene expression using the 454 technology.** *BMC Bioinformatics* 2009, **10**: 143.
- Finney DJ: *Probit analysis*. 3ed. London: Cambridge University Press, 1971.
- Rozen S, Skaletsky H: **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** *Methods Mol Biol.* 2000, **132**: 365-86.
- Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method.** *Methods* 2001, **25**: 402-408.

(Supplementary table 1)

Primers and ΔC_t for candidate genes

Genes	Forward (5' - 3')	ΔC_t C	ΔC_t R1
Acetylcholinesterase	F: TGCAATTGTAATGCCTCG R: GGAATTCCATTGTTGTACCG	11,011	11,718
Alpha-Esterase-7 <i>EST7</i>	F: CAACACCTTGGGATGG R: CTGGACGTTTAGTTTCTGG	8,203	7,357
Alpha-Esterase-8 <i>EST8</i>	F: CGCACAGCCATTTAATGAAG R: ATGTGGTCGCAAAGTACGTG	9,140	9,990
Alpha-Esterase-9 <i>EST9</i>	F: GGACCGAAGCCTTTACAGAA R: GCCAAACTGAAAACCACCAC	9,687	10,454
Serineprotease 7	F: TGGAGCTAAACAACACCAACAC R: CGGTGTCATTGCCATTGTAG	5,287	5,264
GlutathioneS transferase D1	F: AAAATCAACCTGCCGATCC R: GCCAATAAAGCTAAATCGGCTA	5,345	5,542
GlutathioneS transferase E5	F: TACGTAAACCGCCTTGAAC R: TGCCATCATTGCTTACTTGG	1,009	1,898
GlutathioneS transferase S1	F: GCAGTCGTCTCCTACGAACC R: TTCAATGCCAAATGACCATC	4,420	3,967
Cyp4ac1	F: ATTGCATTGGCCAAAAATTC R: AATCTTCCAATTTTGTATGGGTA	11,144	10,265
Cyp4c3	F: CCGGTTATTCTCCCATAACG R: GATGGCATTACCCAAGAAAG	9,849	10,747
Cyp4d2	F: TTTGCTGTTATGCGTGATCC R: CCAGCCGAAAAAGGAACATA	9,891	10,850
Cyp6a14	F: ATGCCATTGTGGTAGAGGAAG R: AGATCTTTCCCAGGGTTTGAC	6,677	6,516
Cyp6a9	F: AGCAAAACCCATGGTAGAGG R: CAAAACCGAACATGGTGATG	9,508	9,917
Cyp6d4	F: TGAAGGGTATGTTTGGTACGG R: AACCAAAAATTGCCGAAGC	6,685	7,629
Cyp6g1	F: CGGTTTCTGCTTCTTTACGG R: CTTCTCTCCCGAAACCACTG	0,453	5,964
Cyp6v1	F: CCAACCGACCCATTTATTG R: ATAAAGCCGGTTGATGGAAC	9,933	9,229
Cyp9f2	F: TCAATGTTTCCTATTCTTCTTTGC R: CTTGACATTGCGGATTTTCC	3,901	4,206
Cyp12a4	F: AAAGCATTATCCGTGGGATG R: ATGTCCTCATGCCCTCAAAC	6,733	7,377

PARTE III

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

A resistência a inseticidas é um dos casos mais rápidos e bem documentados de adaptação evolutiva às mudanças ambientais, que surgiu em resposta às aplicações recorrentes de inseticidas químicos e até mesmo biológicos. O surgimento e aumento dos casos de resistência não somente reduzem o tempo de vida útil dos inseticidas comercialmente disponíveis mas, também, comprometem a eficácia de novas moléculas devido à resistência cruzada e aos mecanismos de resistência múltipla (Cui et al., 2006). Como já visto anteriormente, a resistência pode ser conferida por diversos mecanismos e pode ser afetada por muitos genes, porém a influência de cada gene no fenótipo resistente não é uniforme (Groeters and Tabashnik, 2000; McKenzie and Batterham, 1994).

Com o advento das tecnologias pós-genômicas, a possibilidade de comparar transcriptomas ou proteomas de linhagens suscetíveis e resistentes de determinada espécie pode aumentar substancialmente o entendimento sobre a resistência e sua complexidade (Hemingway et al., 2004). Nesse sentido, a investigação dos mecanismos moleculares da resistência a inseticidas na mosca-da-bicheira, *C. hominivorax*, pode contribuir para o desenvolvimento de novas classes de inseticidas, assim como permitir contornar a resistência já existente aumentando o tempo de vida útil dos inseticidas disponíveis atualmente, e, conseqüentemente, a eficiência do controle.

A resistência metabólica, causada principalmente por amplificações de genes no genoma, aumento da transcrição e mutações em genes codificantes de carboxilesterases, P450 e GST, têm causado grandes preocupações, uma vez que pode conferir resistência a diversas classes de inseticidas. Já a alteração de sítio alvo, apesar de conferir um maior nível de resistência, geralmente confere resistência cruzada apenas a inseticidas de uma mesma classe. Uma vez que os principais mecanismos que causam resistência em determinada espécie sejam identificados, o uso de ferramentas moleculares, em combinação com bioensaios convencionais pode, então, fornecer informações adicionais sobre a distribuição e frequência de alelos mutantes e contribuir para o monitoramento e implementação de estratégias mais efetivas de controle.

3.1 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES ASSOCIADOS AO FENÓTIPO RESISTENTE

A carboxilesterase E3 e a acetilcolinesterase (AChE) pertencem à família multigênica das carboxil/colinesterases. Os membros dessa família possuem uma tríade catalítica altamente conservada de resíduos não contíguos na sequência primária, assim como outras características estruturais como o ‘oxyanon hole’ e ‘acyl binding pocket’. Apesar de certa divergência de sequência gênica entre as diversas carboxil/colinesterases, parece haver uma grande conservação da estrutura terciária dessas enzimas (Oakeshott et al., 1999). Como já visto anteriormente, a resistência metabólica a inseticidas OF causada por carboxilesterase se dá por duas maneiras: alteração qualitativa da enzima, resultando na aquisição da atividade OP-hidrolase, e alteração quantitativa, causada pela amplificação ou regulação da expressão, resultando na super-expressão das enzimas.

Duas mutações na carboxilesterase E3, previamente caracterizadas por conferir resistência a inseticidas em outras espécies, foram encontradas em populações naturais de *C. hominivorax*. Ensaios bioquímicos envolvendo mutagênese sítio-dirigida e expressão *in vitro* da carboxilesterase E3 de *L. cuprina* mostraram que a mutação G137D, localizada no ‘oxyanion hole’ na estrutura tridimensional da enzima, é responsável por uma forma geral de resistência a OF, hidrolisando preferencialmente os dietil-OF. Já a mutação W251L, localizada no ‘acyl-binding pocket’, hidrolisa preferencialmente os dimetil-OP e alguns piretróides (Heidari et al., 2004 e 2005). Em *M. domestica* e *C. hominivorax*, o triptofano na posição 251 foi substituído por uma serina, ao invés de leucina, como em *L. cuprina*. Essas observações estão de acordo com Heidari et al. (2005) que, através de mutagênese sítio-dirigida, comprovaram que a substituição do triptofano por resíduos menores como glicina, serina ou leucina confere altos níveis de atividade hidrolase de dimetil-OF e certa resistência cruzada com piretróides. Nenhuma outra enzima sintética apresentou maior metabolismo de dietil-OF do que a substituição da glicina na posição 137 pelo aspartato. Apesar de ensaios bioquímicos não terem sido realizados em *C. hominivorax*, a alta conservação da sequência e dos pontos de mutação com *L. cuprina*, outra espécie de califórideo, sugerem que os mesmos mecanismos de resistência podem ter evoluído em *C. hominivorax* (Carvalho et al., 2009).

Outra evidência de que os mesmos mecanismos de resistência tenham sido selecionados em *C. hominivorax* é a correlação encontrada entre a frequência das mutações na carboxilesterase e as classes de inseticidas utilizadas para controle de miíases no Uruguai (Carvalho et al., 2010). Em apenas seis anos houve uma diminuição significativa na frequência da mutação G137D e um aumento significativo da mutação W251S, o que pode estar associado com a intensa e atual utilização de compostos a base de dimetil-OF e piretróides (62 dos 77 produtos registrados em 2009 no Uruguai; DILAVE – MGAP, 2009). Apesar do fenótipo dessas linhagens coletadas no campo não ter sido avaliado através de bioensaios, devido a dificuldades metodológicas, acredita-se que as diferentes classes de inseticidas estejam selecionando as variantes alélicas. Além disso, um recente trabalho com *C. hominivorax* mostrou uma correlação da presença da mutação W251S com resistência moderada ao piretróide cipermetrina (Silva e Azeredo-Espin, 2009).

Embora os piretróides ainda não sejam amplamente utilizados para controle da bicheira no Brasil e a mutação 'kdr' no canal de sódio (sítio alvo) não tenha sido encontrada nas populações naturais de *C. hominivorax* investigadas (Silva e Azeredo-Espin, 2009), é provável que as populações contendo a mutação W251S, selecionadas pelo uso dos dimetil-OF, sejam selecionadas rapidamente pelo uso de alguns piretróides. A presença de mutações pré-existentes que conferem resistência pode, então, levar a um rápido desenvolvimento da resistência a essa classe de inseticidas. Mas deve-se ressaltar que a carboxilesterase alterada pela mutação W251S tem atividade moderada de metabolismo de piretróides do tipo 1 e uma atividade reduzida em relação aos piretróides do tipo 2, que contêm um grupamento ciano na sua molécula, que os tornam mais tóxicos (Heidari et al., 2005; Devonshire et al., 2007). Assim, uma estratégia possível para contornar os efeitos desse mecanismo seria a utilização de piretróides do tipo 2, como a deltametrina.

O bioensaio com o princípio ativo diclorvós (DDVP), cedido gentilmente pela Fort Dodge Saúde Animal, realizado para selecionar os indivíduos resistentes a uma concentração letal para 90% da população (CL₉₀), indicou mais uma vez a correlação da mutação W251S com resistência aos inseticidas dimetil-OF. Dentre os 40 indivíduos pertencentes ao grupo controle, foram encontrados três genótipos diferentes, o que mostra uma variabilidade genética e uma alta frequência de mutantes na população natural

amostrada. Destes, 13 eram mutantes W251S homozigotos, 17 mutantes G137D homozigotos e 10 apresentavam ambas as mutações. Já dos 44 indivíduos resistentes do bioensaio, todos foram W251S homozigotos, indicando que os indivíduos portadores desse alelo mutante em homozigose foram selecionados após o tratamento. Dessa maneira, a confirmação da associação da mutação W251S com resistência aos dimetil-OPs em *C. hominivorax* revela a extensão do problema que os produtores rurais e empresas do setor podem enfrentar para controlar a mosca-da-bicheira, uma vez que essa mutação encontra-se distribuída por toda a extensão geográfica ocupada pela espécie (Silva e Azeredo-Espin, 2009). Como já apresentado na Parte I dessa tese, os produtos a base de dimetil-OP são os mais utilizados para o controle da bicheira no Brasil, o que pode estar contribuindo para a seleção deste mecanismo e, conseqüentemente, para a ineficácia dos tratamentos (Sindan, 2010).

Esses resultados mostram a importância da identificação dos genótipos mutantes para a carboxilesterase no auxílio às estratégias de controle, provendo informações valiosas a respeito de quais classes de inseticidas podem apresentar uma melhor eficácia. As associações de inseticidas têm sido aplicadas extensivamente, o que pode levar ao desenvolvimento da resistência simultaneamente aos dois princípios ativos. Mesmo não possuindo resistência cruzada no sítio alvo, inseticidas de diferentes classes podem ser degradados pelas mesmas enzimas de detoxificação metabólica, como carboxilesterases, P450 e GSTs (Li et al., 2006a). E, nesse caso específico, organofosforados e piretróides podem ser metabolizados por uma mesma carboxilesterase alterada pela mutação W251S. Nesse sentido, é de extrema importância que estudos sejam conduzidos antes do uso da associação de inseticidas, visando à manutenção da eficácia dos produtos por um maior período de tempo.

Além da detoxificação metabólica, outro mecanismo de resistência comumente encontrado em insetos pragas é a alteração do sítio alvo. Com o intuito de desvendar esse mecanismo, o gene codificante do sítio alvo dos inseticidas OF (acetilcolinesterase – AChE) também foi caracterizado em *C. hominivorax* visando à identificação de substituições de nucleotídeos previamente caracterizadas por conferir altos níveis de resistência a OF em outras espécies. Apesar de alguns grupos de insetos apresentarem uma

duplicação do gene da AChE, o grupo das chamadas “moscas verdadeiras” (Cyclorrapha) apresenta somente a presença de um gene, denominado *ace2* (Huchard et al., 2006). Embora em *C. hominivorax* não tenha sido verificada a presença de tal duplicação, o seqüenciamento do gene codificante da AChE revelou uma alta similaridade com os dípteros *L. cuprina*, *H. irritans*, *M. domestica* e *D. melanogaster*, os quais possuem apenas o gene *ace2*, sugerindo que o gene em *C. hominivorax* seja um ortólogo do *ace2* destas espécies.

O padrão de conservação dos sítios catalíticos da seqüência predita da AChE de *C. hominivorax* indica que sua estrutura deve ser similar a de *D. melanogaster* descrita por Harel et al. (2000), indicando que as mesmas mutações encontradas em linhagens resistentes de *D. melanogaster* (Menozzi et al., 2004) podem estar associadas à resistência na mosca-da-bicheira. A presença dessas mutações (I298V, G401A, F466Y) foi verificada em nove populações naturais da América do Sul e Central. Dos 135 indivíduos analisados, apenas dois apresentaram uma das substituições (F466Y), sendo um deles homozigoto e o outro heterozigoto. Uma vez que os dois indivíduos portadores do alelo mutante foram provenientes da mesma ferida, há uma alta probabilidade de serem irmãos, já que a fêmea adulta deposita uma grande quantidade de ovos na borda da ferida. Esta única mutação pode não ter grande contribuição para um fenótipo resistente, uma vez que estudos realizados por mutagênese sítio-dirigida na AChE de *L. cuprina* mostraram que a presença de apenas uma das mutações tinha pouca influência na insensibilidade aos inseticidas OF (Chen et al., 2001). Além disso, o nível de expressão do gene codificante da AChE também foi comparado entre os indivíduos resistentes e controles do bioensaio com DDVP e não foi encontrada diferença significativa entre os grupos.

Considerando os sítios analisados, a baixa freqüência de alelos mutantes de AChE em populações naturais, assim como a ausência de mutantes nos indivíduos que sobreviveram ao bioensaio, revela que o mecanismo de resistência metabólica baseado na alteração da carboxilesterase tem sido selecionado preferencialmente em relação à alteração do sítio alvo. Como em outras espécies, a AChE alterada pode promover um custo no valor adaptativo, justificando a baixa freqüência de alelos mutantes em populações naturais. A ausência da AChE mutante poderia ser compensada pelas formas mutantes da

carboxilesterase E3, caso a E3 possua uma maior afinidade pelos inseticidas OF do que a própria AChE, protegendo-a da inibição, assim como foi verificado em *L. cuprina* (Campbell et al., 1997; Newcomb et al., 1997). Apesar de neste trabalho não ter sido encontrada uma alta frequência de indivíduos com AChE mutantes, a caracterização da sequência da região codificante da AChE em *C. hominivorax* possibilitará estudos futuros de associação de mutações com o fenótipo resistente.

Além da alteração do sítio alvo e da carboxilesterase E3, a resistência metabólica baseada na super-expressão de enzimas também foi analisada nos indivíduos de *C. hominivorax* resistentes, selecionados a partir de um bioensaio com o princípio ativo diclorvós. A análise de genes candidatos foi possível devido à geração de um banco de dados de transcritos dessa espécie por meio da caracterização do transcriptoma utilizando uma das tecnologias de seqüenciamento de nova geração, Roche 454 (descrita na Parte I). A caracterização do transcriptoma de *C. hominivorax* terá um papel catalítico para o desenvolvimento de outros projetos de cunho básico e aplicado, aumentando consideravelmente as informações sobre a biologia dessa espécie. Além de auxiliar nas medidas de controle através da identificação de genes envolvidos na resistência a inseticidas, as informações genômicas resultantes desse projeto podem contribuir para estudos sobre a evolução da espécie, como a identificação de genes relacionados ao desenvolvimento do hábito de parasitismo.

A avaliação de 19 genes candidatos não revelou a super-expressão de nenhum gene codificante de enzima metabólica nos indivíduos resistentes quando comparados com os indivíduos do grupo controle. Isso poderia ter ocorrido devido à alta concentração utilizada (CL90), não permitindo a resistência baseada na super-expressão de enzimas metabólicas. No entanto, vale ressaltar que outros genes não avaliados nessa etapa podem estar envolvidos nesse processo, uma vez que apenas 19 genes tiveram sua expressão comparada entre os grupos. Nos dípteros com genoma completo seqüenciado, o conjunto de genes codificante das enzimas metabólicas carboxilesterases, P450 e GST pode chegar a mais de 200 (Strode et al., 2008).

Como forma de complementar essa análise e identificar todos os genes diferencialmente expressos, está em andamento a análise do perfil global da expressão

gênica entre os indivíduos resistentes e controle através do seqüenciamento massivo em paralelo utilizando a plataforma Illumina. Os resultados preliminares mostram que dentre as comparações significativas envolvendo “contigs” representados por pelo menos 100 “reads” na amostra controle ou resistente, 47 apresentaram um aumento de 4 vezes no nível de expressão na amostra resistente ao tratamento com inseticida OF (regulados positivamente) e 41 apresentaram uma diminuição no nível de expressão (regulados negativamente, com uma diminuição de 4 vezes no nível de expressão) nesta amostra. Estudos posteriores são necessários para identificar quais são estes genes diferencialmente expressos e a relação entre a expressão diferencial e o fenótipo resistente.

Dentre os genes candidatos avaliados por qRT-PCR, o único gene que apresentou expressão diferencial nos indivíduos resistentes em relação ao grupo controle foi o ortólogo ao *CYP6G1* de *D. melanogaster*. No entanto, diferentemente do encontrado em trabalhos anteriores (Daborn et al., 2002; McCart e ffrench-Constant, 2008), esse gene teve sua expressão extremamente reduzida nos grupos resistentes, sendo 45 vezes menos expresso no grupo resistente R1 (confirmado pelo seqüenciamento Illumina) e 10 vezes menos expresso no grupo R2. Para alguns inseticidas OF, há a necessidade de bioativação por enzimas P450 em compostos mais tóxicos para a AChE (Scott, 1999), o que justificaria uma possível correlação da diminuição da expressão de P450 com a resistência. Mas, curiosamente, o princípio ativo diclorvós (DDVP) não requer essa ativação uma vez que sua fórmula estrutural já contém o fosfato (P = O) biologicamente ativo na inibição da AChE (Vale, 1998). Uma possível explicação para a expressão reduzida do gene *CYP6G1* pode ser um desequilíbrio de ligação entre o alelo mutante (W251S) da carboxilesterase E3 e o alelo associado com a baixa expressão do *CYP6G1*. Neste caso, a diferença nos níveis de expressão do *CYP6G1* entre as amostras do grupo controle e resistente pode ter resultado da seleção de variantes regulatórias que atuam em *cis* ou em *trans* ligadas ao alelo E3 selecionado. Uma explicação alternativa envolve o *splicing* alternativo deste gene nos indivíduos resistentes, de maneira que tenhamos medido a expressão de *exons* (por qRT-PCR) que não são transcritos nos indivíduos resistentes.

A alteração brusca da expressão de genes relacionados com resistência a inseticidas tem sido explicada em muitos casos pela inserção de elementos transponíveis (TE) na

região promotora do gene. Algumas hipóteses foram levantadas a respeito de como os TEs podem alterar a transcrição de um gene associado à resistência a inseticida. Uma inserção de um TE na extremidade 5' de um gene poderia fornecer um sítio de ligação para os acentuadores (*'enhancers'*) levando a uma super-transcrição ou padrão alterado de transcrição. Outra possibilidade seria a inserção na extremidade 3' do gene, o que aumentaria a estabilidade do RNAm e, conseqüentemente, o produto deste. Um TE poderia também excisar um gene e movê-lo a uma diferente localização genômica, distante de elementos repressores locais normalmente responsáveis por desligar o gene. Além disso, a inserção de um TE pode alterar o padrão dos transcritos resultantes e potencialmente levar a um produto de gene truncado com nova função (Ffrench-Constant et al., 2005). Além disso, alterações pontuais na região promotora do gene também podem ter um efeito determinante na expressão. Nesse sentido, torna-se fundamental a investigação de toda a seqüência do gene *CYP6G1*, assim como da sua região promotora, visando identificar alterações de nucleotídeos entre indivíduos resistentes e suscetíveis que possam estar associadas com a diferença na transcrição.

Mesmo havendo necessidade de maiores investigações, esse foi o primeiro estudo que descreveu a associação da diminuição da expressão de uma P450 específica com resistência a inseticida. Alguns produtos usados como sinergistas aos inseticidas, como o butóxido de piperonila (PBO), atuam inibindo uma série de enzimas metabólicas como P450 e carboxilesterases (Bingham et al., 2007). Esse resultado corrobora alguns trabalhos indicando que esse tipo de sinergista deve ser utilizado com cautela, porque em determinadas concentrações ele pode contribuir para diminuição da toxicidade do inseticida, como já verificado na mosca-dos-chifres *Haematobia irritans* (Li et al., 2006b) e no carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (Li et al., 2003).

3.2 INFLUÊNCIA DOS MECANISMOS NA EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA

A determinação do número de genes envolvidos e do efeito destes na resistência pode contribuir para o manejo da resistência, uma vez que, caso sejam encontrados genes de grande efeito (*'major genes'*), a determinação da frequência de alelos resistentes numa população pode indicar o grau de suscetibilidade da mesma. Tem sido discutido que as respostas monogênicas para mutações raras seriam preferencialmente selecionadas se a seleção atuar fora da distribuição fenotípica de uma população suscetível, por exemplo, usando uma CL_{100} para indivíduos suscetíveis. Por outro lado, uma resposta poligênica seria mais provável caso a seleção atuasse dentro da distribuição fenotípica da população suscetível, em concentrações menores que CL_{100} , uma vez que é esperado que as diferenças genéticas entre os fenótipos de uma distribuição contínua sejam poligênicas. Assim, a resposta observada no campo dependeria da concentração utilizada e da presença de alelos resistentes dos genes de grande efeito.

Porém, é importante salientar que o fato de um fenótipo resistente estar primariamente sob controle monogênico não significa que uma variação poligênica para resistência não exista naquela população (Mckenzie, 2000). Indivíduos resistentes que possuem uma única mutação de grande efeito, como a carboxilesterase alterada, também são selecionados quando utilizada uma concentração que atue dentro da distribuição fenotípica. Com isso, uma concentração que mate aproximadamente 90% da população pode selecionar indivíduos portadores dos alelos resistentes de genes de grande efeito, caso estes estejam presentes na população, assim como os moderadamente resistentes, cuja resistência pode ser baseada em genes de efeitos menores. Dessa maneira, não há razão para supor que somente resistência poligênica poderia surgir de uma seleção fraca, abaixo da CL_{100} (Groeters e Tabashnik, 1995).

Grande parte da discussão a respeito do número de genes envolvidos na resistência surge das seleções em laboratório, que utilizam concentrações menores e geralmente selecionam uma resistência poligênica. No entanto, essa falha em selecionar resistência monogênica é simplesmente porque alelos mutantes de genes com efeitos maiores podem ser raros na população natural amostrada e, conseqüentemente, não estarem presentes na linhagem a ser selecionada. Simulações mostraram que os alelos mutantes de genes com

grande efeito, caso estes estejam presentes na população, terão respostas predominantes à seleção por inseticida mesmo que concentrações menores sejam utilizadas na seleção (Groeters e Tabashnik, 2000). Outro fator que pode contribuir para seleção monogênica no campo é que esta tem uma maior capacidade de dispersão que a poligênica. Se um indivíduo com resistência poligênica migra para uma população suscetível, é provável que os alelos resistentes se diluam, por recombinação, caso a população não seja tratada com inseticida por algumas gerações. Já quando um indivíduo com resistência monogênica (especialmente não recessiva) migra para uma população suscetível, é mais provável de deixar alguns descendentes resistentes, mesmo após algumas gerações não tratadas (Roush e McKenzie, 1987), caso o alelo resistente não confira desvantagem seletiva na ausência do inseticida.

O possível envolvimento de poucos ou vários genes no fenótipo resistente tem implicações fundamentais nas estratégias de manejo da resistência. Para que os resultados dos estudos em laboratório sejam aplicados à realidade do campo, é importante que os estudos experimentais de investigação dos mecanismos de resistência sejam conduzidos de forma semelhante ao tratamento no campo (Roush e McKenzie, 1987). Assim, é fundamental que as linhagens a serem selecionadas em laboratório possuam os genes de efeitos maiores, caso estes sejam os responsáveis pela resistência no campo. Por essas razões, o bioensaio realizado nesse trabalho para seleção dos indivíduos resistentes utilizou uma linhagem recém coletada de uma região com intensa atividade pecuária e previamente conhecida de portar os alelos mutantes da carboxilesterase (Silva e Azeredo-Espin, 2009), proveniente de um grande número de feridas infestadas, permitindo a existência de certa variabilidade genética dentro dessa linhagem. Além disso, a concentração utilizada para seleção (CL₉₀) foi baseada em tratamentos de miíases no campo, nos quais é comum a sobrevivência de alguns indivíduos na ferida infestada, seja por má aplicação ou pela resistência ao produto.

É importante lembrar que a seleção dos fenótipos resistentes ocorre sobre uma variabilidade já existente de genótipos em uma população. O seqüenciamento de uma região do gene da carboxilesterase E3 em indivíduos de *L. cuprina* provenientes de coleções de museu coletadas a mais de 80 anos, os quais nunca haviam sido expostos a

inseticidas OF, revelou a presença de uma mutação (W251L) atualmente relacionada com resistência a tais inseticidas (Hartley et al., 2006). Comparando as seqüências desses indivíduos preservados antes do uso de inseticidas OF com os coletados recentemente, notou-se que a diversidade nucleotídica foi drasticamente reduzida nesse alelo, provocada pela seleção sobre os alelos resistentes. No entanto, a mutação G137D não foi encontrada nesses indivíduos preservados no museu, a qual está localizada no sítio ativo da enzima e é responsável pela resistência a grande parte dos inseticidas OF. A ausência ou baixa freqüência dessa mutação antes do uso de inseticidas OF pode estar relacionada com uma desvantagem seletiva desses mutantes em um ambiente sem inseticida. Mas nota-se que a partir do momento em que se iniciou a utilização de tais inseticidas, essa mutação conferiu uma vantagem adaptativa. Isso evidencia que, apesar da existência de alguns genótipos pré-adaptativos, o uso de inseticidas cria um ambiente que favorece a manutenção de novos alelos resistentes.

A identificação de mutações pré-adaptativas levantou uma série de questões que podem influenciar no manejo da resistência. A primeira delas é a possibilidade de prever a localização e identificar mutações associadas com resistência, o que poderia ser feito com agentes mutagênicos (Mckenzie e Batterham, 1998) e, então, determinar sua freqüência antes da introdução de novos inseticidas. Outra questão é que caso estas mutações pré-adaptativas estejam em alta freqüência elas podem causar falhas precoces no controle de insetos por determinado produto (Hartley et al., 2006). E por último, caso essas mutações sejam polimorfismos neutros, elas não apresentariam um custo no valor adaptativo, não tendo sua freqüência reduzida na ausência de inseticidas, apresentando implicações diretas sobre algumas estratégias de controle. Com isso vemos que a evolução da resistência envolve duas diferentes abordagens em nível molecular, uma em que mutações pré-existentes são polimorfismos que proporcionam uma rápida adaptação aos inseticidas, e outra na qual há uma seleção para novas mutações que surgem após a presença da pressão seletiva (Ffrench-Constant, 2006).

A taxa de mudança da freqüência de um alelo de um determinado loco em uma população estruturada ocorre em função da freqüência do alelo, da dominância, do valor adaptativo dos diversos genótipos e do tamanho populacional, além do possível fluxo

gênico, uma vez que as populações raramente são completamente estruturadas na natureza (Futuyma, 1998). Com isso, vemos que além da identificação dos mecanismos moleculares associados a determinado fenótipo resistente, como já mencionado anteriormente, é importante ressaltar que o manejo da evolução da resistência está intrinsecamente associado com os aspectos genético-ecológicos. Um desses fatores, o valor adaptativo de cada genótipo, relacionado com a seleção a favor ou contra o alelo resistente, tem grandes implicações no manejo da resistência, pois na presença de um inseticida o alelo resistente confere uma vantagem seletiva, enquanto que na ausência do inseticida ele pode conferir um custo no valor adaptativo, tendo sua frequência reduzida nessa população. Assim, uma estratégia bastante usada tem sido alternar inseticidas com diferentes princípios ativos e, conseqüentemente, diferentes modos de ação. Porém, para que tal estratégia seja utilizada é importante determinar se tal desvantagem seletiva conferida pelo alelo resistente na ausência de pesticida é suficiente para se tornar relevante no manejo, visando retardar ou minimizar a evolução da resistência (Roush e McKenzie, 1987).

Alguns exemplos demonstram a importância de se determinar qual a extensão da desvantagem seletiva causada pelo alelo resistente na ausência de inseticidas. Mutações que causam resistência a inseticidas, principalmente àquelas relacionadas com alteração no sítio alvo, normalmente conferem um custo adaptativo aos indivíduos mutantes por ter sérias conseqüências no sistema nervoso. Um trabalho recente com *D. melanogaster* sugere que esses custos podem surgir diretamente da redução da estabilidade da acetilcolinesterase, o que altera sua funcionalidade (Shi et al., 2004). Já na mariposa *Heliothis virescens* resistente a piretróides, a mutação ‘kdr’ alterou as propriedades farmacológicas e biofísicas do canal de sódio, causando uma lentidão na atividade neural na ausência de piretróides pela diminuição da excitabilidade destes canais (Lee et al., 1999). Os custos de portar ambos os alelos resistentes (alteração na AChE e no canal de sódio) foram significativamente menores em uma linhagem resistente do mosquito *Culex quinquefasciatus* (Berticat et al., 2008). Os autores especulam que o custo associado com a eficiência reduzida de degradação da acetilcolina no terminal pós-sináptico devido a AChE alterada pôde ser parcialmente compensado por uma liberação mais lenta de acetilcolina no terminal pré-sináptico (devido à mutação ‘kdr’). Dessa maneira, os indivíduos portadores

de ambos os alelos resistentes possuíam pouca alteração no valor adaptativo na ausência dos inseticidas.

Outro evento molecular detectado em linhagens resistentes do mosquito *Culex pipiens* visando reduzir o efeito no valor adaptativo foi a duplicação do gene codificante da AChE, sítio alvo de OPs e carbamatos (Labbe et al., 2007). A duplicação gênica é um importante tipo de mutação porque ela propicia a evolução de novas funções (Kondrashov et al., 2002). No caso da AChE, uma forte pressão seletiva direciona a evolução da resistência, a medida que há um conflito entre o grau de resistência e a habilidade de degradar acetilcolina, uma vez que as moléculas de acetilcolina e OP competem para o mesmo sítio ativo. Assim, a duplicação se mostrou uma maneira eficiente de obter as duas funções, melhorando a sinapse e o valor adaptativo do indivíduo, além da manutenção da resistência (Labbe et al., 2007).

Identificar genes envolvidos em adaptação tem sido um dos grandes desafios na biologia evolutiva, sendo a resistência a inseticidas um bom exemplo em que a relação genótipo-fenótipo tem sido explicada com sucesso (Ffrench-Constant et al., 2004). O número de origens independentes de mutações associadas com resistência a inseticidas é importante para o entendimento da evolução e dispersão da resistência, mas ainda há poucos estudos relatando se as mutações surgem uma vez e se dispersam, como em *Bemisia tabaci* (Anthony et al., 1995), ou se elas podem surgir independentemente em diversos locais, como descrito em *Tribolium castaneum* (Andreev et al., 1999). As duas situações têm diferentes implicações para o manejo da resistência. Na primeira delas, a resistência pode evoluir em qualquer região da distribuição geográfica da espécie, enquanto que na segunda a frequência da mutação pode ser limitante ou a migração tão eficiente, de maneira que restrições ao fluxo de populações dessa espécie podem prevenir a dispersão de linhagens resistentes (Andreev et al., 1999).

Assim, à medida que os mecanismos moleculares vão sendo descobertos, um grande desafio será a utilização dessa informação no desenho e implementação de programas de manejo sustentáveis e eficazes. Os avanços obtidos na caracterização molecular da resistência podem estimular o desenvolvimento de novos produtos com diferentes modos de ação que sejam eficazes no controle, até mesmo das populações resistentes. Uma

estratégia de desenvolvimento de novas moléculas que pode ser promissora é a colaboração entre empresas de biotecnologia e grandes companhias farmacêuticas, na qual as primeiras utilizariam ferramentas de genômica funcional e de bioinformática para identificar novos alvos para drogas nos organismos pragas e as companhias farmacêuticas explorariam esses alvos (Geary et al., 2004).

Considerando os estudos já realizados nessa área e os resultados apresentados neste trabalho, fica evidente que a identificação dos mecanismos moleculares responsáveis pela resistência a inseticidas e o entendimento do processo evolutivo da resistência são informações fundamentais que podem prover uma grande contribuição para futuros programas de controle, seja através da indicação de compostos mais eficazes ou possibilitando o desenvolvimento de novas moléculas. As novas tecnologias genômicas devem ser utilizadas para investigar as alterações nos sítios alvos, as funções das enzimas de desintoxicação metabólica e caracterizar as vias regulatórias que coordenam as respostas que conferem o fenótipo resistente. Como já discutido em alguns trabalhos, independente das estruturas químicas, dos seus modos de ação ou métodos de aplicação, é certo que os inseticidas utilizados atualmente, e os que estão em desenvolvimento, serão selecionados para resistência em populações de insetos, e que a elucidação de tais mecanismos será um desafio constante para os setores envolvidos.

3.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC (2010). Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (www.abiec.com.br).

Adessi, C., Matton, G., Ayala, G., Turcatti, G., Mermoud, J.J., Mayer, P., Kawashima, E. (2010). Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Research* 28(20): e87.

Alon, M., Alon, F., Nauen, R., Morin, S. (2008). Organophosphates' resistance in the B-biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an ace1-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38: 940–949.

Alout, H., Labbe, P., Berthomieu, A., Pasteur, N., Weill, M. (2009). Multiple duplications of the rare ace-1 mutation F290V in *Culex pipiens* natural populations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 884-891.

Andreev, D., Kreitman, M., Phillips, T.W., Beeman, R.W., ffrench-Constant, R.H. (1999). Multiple origins of cyclodiene insecticide resistance in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Molecular Evolution* 48: 615–624.

Anthony, N.M., Brown, J.K., Markham, P.G., ffrench-Constant, R.H. (1995). Molecular analysis of cyclodiene resistance-associated mutations among populations of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 51: 220–228.

Anziani, O.S., Guglielmone, A.A., Aguirre, D.H. (1996). Larvicidal activity of abamectin against natural *Cochliomyia hominivorax* larvae infestation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 791: 443–444.

Anziani, O.S., Flores, S.G., Moltedo, H., Derozier, C., Guglielmone, A.A., Zimmermann, G.A., Wanker, O. (2000). Persistent activity of doramectin and ivermectin in the prevention of cutaneous myiasis in cattle experimentally infested with *Cochliomyia hominivorax*. *Veterinary Parasitology* 87: 243–247.

Barros, A.T.M. e Vasquez, S.A.S. (2004). Recomendações para Prevenção e Controle de Bicheiras em Bezerros no Pantanal. *Comunicado Técnico - Embrapa Pantanal* 35: 1-4.

Baumhover, A.H. (2002). A personal account of developing the sterile insect technique to eradicate the screwworm from Curacao, Florida and the Southeastern United States. *Florida Entomology* 85(4): 666-673.

Beck, A.H., Weng, Z., Witten, D.M., Zhu, S., Foley, J.W., Lacroute, P., Smith, C.L., Tibshirani, R., van de Rijn, M., Sidow, A., West, R.B. (2010). 3'-end sequencing for expression quantification (3SEQ) from archival tumor samples. *PLoS One* 5(1):e8768.

Benitez Usher, C., Cruz, J., Carvalho, L., Bridi, A., Farrington, D., Barrick, R.A., Eagleson, J. (1997). Prophylactic use of ivermectin against cattle myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858). *Veterinary Parasitology* 72: 215–220.

Bentley, D.R. (2006). Whole-genome re-sequencing. *Current Opinion in Genetics and Development* 16: 545–552.

Bergé, J., Feyereisen, R., Amichot, M. (1998). Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 353: 1701-1705.

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 Evolutionary Biology* 8:104.

Bingham, G., Gunning, R.V., Gorman, K., Field, L.M., Moores, G.D. (2007). Temporal synergism by microencapsulation of piperonyl butoxide and alpha-cypermethrin overcomes insecticide resistance in crop pests. *Pest Management Science* 63(3): 276-81.

Bowman, D.D. (2006). Successful and currently ongoing parasite eradication programs. *Veterinary Parasitology* 139: 293 – 307.

Buck, A.H., Perot, J., Chisholm, M.A., Kumar, D.S., Tuddenham, L, Cognat, V., Marcinowski, L., Dölken, L., Pfeffer, S. (2010). Post-transcriptional regulation of miR-27 in murine cytomegalovirus infection. *RNA* 16(2):307-1.

Byford, R.L., Craig, M.E., DeRouen, S.M., Kimball, M.D., Morrison, D.G., Wyatt, W.E., Foil, L.D. (1999). Influence of permethrin, diazinon and ivermectin treatments on insecticide resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). *International Journal of Parasitology* 29, 125-135; discussion 137-128.

Campbell, P.M., Trott, J.F., Claudianos, C., Smith, K.A., Russel, R.J., Oakeshott, J.G. (1997). Biochemistry of esterases associated with organophosphate resistance in

Lucilia cuprina with comparisons to putative orthologues in other Diptera. *Biochemical Genetics*. 35(1-2): 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 Biochemistry and Molecular Biology* 28, 139-150.

Cantacessi, C., Campbell, B.E., Young, N.D., Jex, A.R., Hall, R.S., Presidente, P.J., Zawadzki, J.L., Zhong, W., Aleman, B., Loukas, A., Sternberg, P.W., Gasser, R. (2010). Differences in transcription between free-living and CO₂-activated third-stage larvae of *Haemonchus contortus*. *BMC Genomics* 11(1): 266.

Carvalho, R.A., Torres, T.T., Azeredo-Espin, A.M.L. (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. *Veterinary Parasitology* 140: 344-351.

Carvalho, R.A., Torres, T.T., Paniago, M.G., Azeredo-Espin, A.M.L. (2009). Molecular characterization of esterase E3 gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Medical and Veterinary Entomology* 23: 86-91.

Carvalho, R.A., Limia, C.E.G., Bass, C., Azeredo-Espin, A.M.L. (2010). Changes in the frequency of the G137D and W251S mutations in the carboxylesterase E3 gene of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) populations from Uruguay. *Veterinary Parasitology* 170: 297–301.

Casida, J.E. (2009). Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action. *Chemical research in toxicology* 22: 609–619.

Chaudhury, M.F., Welch, J.B., Alvarez, L.A. (2002). Responses of fertile and sterile screwworm (Diptera: Calliphoridae) flies to bovine blood inoculated with bacteria originating from screwworm-infested animal wounds. *Journal of Medical Entomology* 39(1): 130-134.

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 Biochemistry and Molecular Biology* 31: 805-816.

Chun, J., Kim, K.Y., Lee, J.H., Choi, Y. (2010). The analysis of oral microbial communities of wild-type and toll-like receptor 2-deficient mice using a 454 GS FLX Titanium pyrosequencer. *BMC Microbiology* 10: 101.

Claudianos, C., Russel, R. J., Oakeshott, J. G. (1999). The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 675-686.

Claudianos, C., Crone, E., Coppin, C., Russell, R., Oakeshott, J. G. (2002). A genome perspective on mutant aliesterases and metabolic resistance to organophosphates. In *Agrochemical Resistance: Extent, Mechanism and Detection*. Edited by Marshal Clark J. and Yamaguchi I. Washington, DC. American Chemical Society; pp. 90 – 101.

Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., Feyereisen, R., Oakeshott, J.G. (2006). A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology* 15: 615–636.

Cui, F., Raymond, M., Qiao, C.L. (2006). Insecticide resistance in vector mosquitoes in China. *Pest Management Science* 62: 1013–1022.

Daborn, P.J., Yen, J.L., Bogwitz, M.R., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S., Tijet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterham, P., Feyereisen, R., Wilson, T.G., ffrench-Constant, R.H. (2002). A Single P450 Allele Associated with Insecticide Resistance in *Drosophila*. *Science* 297: 2253-2256.

David, J.P., Strode, C., Vontas, J., Nikou, D., Vaughan, A., Pignatelli, P.M., Louis, C., Hemingway, J., Ranson, H. (2005). The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 102: 4080–4084.

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 Biochemistry and Molecular Biology* 37: 891–902.

DILAVE – MGAP (2009). Listado de curabicheras registrados en 2009. Dirección de Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino”, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca Del Uruguay.

Djogbenou, L., Weill, M., Hougard, J.M., Raymond, M., Akogbeto, M., Chandre, F. (2007). Characterization of insensitive acetylcholinesterase (ace-1R) in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): Resistance levels and dominance. *Journal of Medical Entomology* 44: 805-810.

Djouaka, R.F., Bakare, A.A., Coulibaly, O.N., Akogbeto, M.C, Ranson, H., Hemingway, J., Strode, S. (2008). Expression of the cytochrome P450s, *CYP6P3* and *CYP6M2* are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics* 9: 538.

Enayati, A.A., Ranson, H., Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* 14(1): 3–8.

Fan, F., You, Z., Li, Z., Cheng, J., Tang, Y., Tang, Z. (2009). A butterfly effect: highly insecticidal resistance caused by only a conservative residue mutated of drosophila melanogaster acetylcholinesterase. *Journal of Molecular Modeling* 15: 1229–1236.

Fedurco, M., Romieu, A., Williams, S., Lawrence, I., Turcatti, G. (2006). BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Research* 34(3): e22.

Field, L.M., Blackman, R.L., Tyler-Smith, C., Devonshire, A.L. (1999). Relationship between amount esterase and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal* 339: 737–742.

ffrench-Constant, R.H., Pittendrigh, B., Vaughan, A., Anthony, N. (1998). Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philosophical transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 353(1376):1685-93.

Ffrench-Constant, R.H., Daborn, P.J., Le Goff, G. (2004). The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends in Genetics* 20(3): 163–170.

ffrench-Constant, R.H., Daborn, P., Feyereisen, R. (2005). Resistance and the jumping gene. *BioEssays* 28: 6–8.

ffrench-Constant, R.H. (2006). Which came first: insecticides or resistance? *Trends in Genetics* 23(1): 1-4.

Futuyma, D.J. (1998). *Evolutionary Biology*. 3rd ed., Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Geary, T.G., Conder, G.A., Bishop, B. (2004). The changing landscape of antiparasitic drug discovery for veterinary medicine. *Trends in Parasitology* 20(10): 449-455.

Ghanim, M., e Kontsedalov., S. (2007). Gene expression in pyriproxyfen resistant *Bemisia tabaci* Q biotype. *Pest Management Science* 63:776–783.

Gil, A., Marques, L., Rama, R.P., Piaggio, J., Altuna, M., Caponi, O. (2009). La bichera: pérdidas y acciones a encarar. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 52–56.

Gilardoni, P.A., Schuck, S., Jüngling, R., Rotter, B., Baldwin, I.T., Bonaventure, G. (2010). SuperSAGE analysis of the *Nicotiana attenuata* transcriptome after fatty acid-amino acid elicitation (FAC): identification of early mediators of insect responses. *BMC Plant Biology* 10: 66.

Gilleard, J.S. (2006). Understanding anthelmintic resistance: The need for genomics and genetics. *International Journal for Parasitology* 36: 1227–1239.

Guerrero, F.D., Bendele, K.G., Chen, A.C., Li, A.Y., Miller, R.J., Pleasance, E., Varhol, R., Rousseau, M.E., Nene, V.M. (2007). Serial analysis of gene expression in the southern cattle tick following acaricide treatment of larvae from organophosphate resistant and susceptible strains. *Insect Molecular Biology* 16(1): 49–60.

Guimarães, J.H., Papavero, N., Prado, A.P. (1983). As miíases na região Neotropical (Identificação, Biologia, Bibliografia). *Revista Brasileira de Zoologia* 1:241-420.

Grant, D.F. e Hammock, B.D. (1992). Genetic and molecular evidence for a *trans*-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*. *Molecular and General Genetecis* 234: 169–176.

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.

Groeters, F.R. e Tabashnik, B. (1995) Insecticide resistance. *Trends in Ecology and Evolution* 10(4): 164.

Groeters, F.R. e Tabashnik, B.E. (2000). Roles of selection intensity, major genes, and minor genes in evolution of insecticide resistance. *Journal of Economic Entomology* 93(6): 1580-1587.

Hall, M. e Wall, R. (1995). Myiasis of human and domestic animals. *Advances in Parasitology*, 35: 257-334.

Hammack, L., Bromel, M., Duh, F.M., Gassner, G. (1987). Reproductive factors affecting responses of the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), to an attractant of bacterial origin. *Annals of the Entomologic Society of America* 80: 775-780.

Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T.L., Mallender, W.D., Lewis, T., Fletcher, R.J., Guss, J.M., Silman, I., Sussman, J.L. (2000). Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Science* 9: 1063-1072.

Hartley, C. J., Newcomb, R. D., Russel, R. J., Yong, C. G., Stecens, J. R., Yeats, D. K., La Salle, J., Oakeshott, J. G. (2006). Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 103(23): 8757-62.

He, Z., Xu, M., Deng, Y., Kang, S., Kellogg, L., Wu, L., Van Nostrand, J.D., Hobbie, S.E., Reich, P.B., Zhou, J. (2010). Metagenomic analysis reveals a marked divergence in the structure of belowground microbial communities at elevated CO. *Ecology letters* 13: 564–575.

Heidari, R., Devonshire, A.L., Campbell, B.E., Bell, K.L., Dorrian, S.J., Oakeshott, J.G., Russell, R.J. (2004). Hydrolysis of organophosphorus insecticides by in vitro modified carboxylesterase E3 from *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 353–363.

Heidari, R., Devonshire, A. L., Campbell, B. E., Bell, K. L., Dorrian, S. J., Oakeshott, J. G., Russel, R. J. (2005). Hydrolysis of pyrethroids by carboxylesterases from *Lucilia cuprina* and *Drosophila melanogaster* with active sites modified by *in vitro* mutagenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 597-609.

Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 34: 653 – 665.

Huang, H.S., Hu, N.T., Yao, Y.E., Wu, C.Y., Chiang, S.W., Sun, C.N. (1998). Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in

insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 28: 651–658.

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. *Proceedings Biological Sciences Royal Society* 273(1601): 2595-2604.

IAEA (1998). Thematic plan for the Sterile Insect Technique for Old and New World Screwworm. Viena, Áustria – 1998.

IBGE (2008). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Produção da pecuária municipal – 2008. vol. 36.

Jiang, X., Qub, M., Denholm, I., Fang, J., Jiang, W., Han, Z. (2009). Mutation in acetylcholinesterase1 associated with triazophos resistance in rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378: 269–272.

Kakani, E.G., Ioannides, I.M., Margaritopoulos, J.T., Seraphides, N.A., Skouras, P.J., Tsitsipis, J.A., Mathiopoulos, K.D. (2008). A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38: 781– 787.

Karunaratne, S. H. P. P., Vaughan, A., Paton, M. G., Hemingway, J. (1998). Amplification of a serine esterase gene is involved in insecticide resistance in Sri Lanka *Culex tritaeniorhynchus*. *Insect Molecular Biology* 7: 307-315.

Karunker, I., Benting, J., Lueke, B., Ponge, T., Nauen, R., Roditakis, E., Vontas, J., Gorman, K., Denholm, I., Morin, S. (2008). Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38: 634–644.

Khajehali, J., Van Leeuwen, T., Grispou, M., Morou, E., Alout, H., Weill, M., Tirry, L., Vontas, J. Tsagkarakoub, A. (2010). Acetylcholinesterase point mutations in European strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) resistant to organophosphates. *Pest Management Science* 66: 220–228.

Kondrashov, F.A., Rogozin, I.B., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. (2002). Selection in the evolution of gene duplications. *Genome Biology* 3(2):research0008.

Konno, T., Hodgson, E., Dauterman, W.C. (1989). Studies on methyl parathion resistance in *Heliothis virescens*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 33: 189–199.

Kristensen, M. (2005). Glutathione S-Transferase and insecticide resistance in laboratory strains and field populations of *Musca domestica*. *Journal of Economic Entomology* 98(4): 1341-1348.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N. (2006). *Molecular Aspects of Medicine* 27(2-3): 95-125

Labbé, P., Berticat, C., Berthomieu, A., Unal, S., Bernard, C., Weill, M., Lenormand, T. (2007). Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the mosquito *Culex pipiens*. *PLoS Genetics* 3(11):e205.

Le Goff, G., Hilliou, F., Siegfried, B.D., Boundy, S., Wajnberg, E., Sofer, L., Audantb, P., ffrench-Constant, R.H., Feyereisen, R. (2006). Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: sex-dependence of P450 and GST gene induction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 674–682

Lee, D., Park, Y., Brown, T.M., Adams, M.E. (1999). Altered properties of neuronal sodium channels associated with genetic resistance to pyrethroids. *Molecular Pharmacology* 55(3): 584-593.

Lee, C.Y., Hemingway, J., Yap, H.H., Chong, N.L. (2000). Biochemical characterization of insecticide resistance in the German cockroach, *Blattella germanica*, from Malaysia. *Medical and Veterinary Entomology* 14(1): 11–18.

Li, A.Y., Davey, R.B., Miller, R.J., George, J.E. (2003) Resistance to coumaphos and diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism. *Journal of Medical Entomology* 40: 482–490.

Li, X., Schuler, M. A., Berenbaum, M. R. (2006a). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology* 52: 231-253.

Li, A.Y., Guerrero, F.D., Pruett, J.H. (2006b). Involvement of esterases in diazinon resistance and biphasic effects of piperonyl butoxide on diazinon toxicity to *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87: 147–155.

Libault, M., Farmer, A., Brechenmacher, L., Drnevich, J., Langley, R.J., Bilgin, D.D., Radwan, O., Neece, D.J., Clough, S.J., May, G.D., Stacey, G. (2010). Complete transcriptome of the soybean root hair cell, a single-cell model, and its alteration in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection. *Plant Physiology* 152(2): 541-52.

Liu, N., Liu, H., Zhu, F., Zhang, L. (2007). Differential expression of genes in pyrethroid resistant and susceptible mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* (S.). *Gene* 394: 61–68.

Lumjuan, N., McCarroll, L., Prapanthadara, L.A., Hemingway, J., Ranson, H. (2005). Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 861–871.

Marcombe, S., Poupardin, R., Darriet, F., Reynaud, S., Bonnet, J., Strode, C., Brengues, C., Yébakima, A., Ranson, H., Corbel, V., David, J.P. (2010). Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics* 10: 494.

Mardis, E.R. (2008). Next-Generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9: 387-402.

Marguerat, S. e Bahler, J. (2010). RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 569–579.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner,

M.P., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J.M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactor. *Nature* 437(7057): 376-80

Mazé, A., Boël, G., Zúñiga, M., Bourand, A., Loux, V., Yebra, M.J., Monedero, V., Correia, K., Jacques, N., Beaufils, S., Poncet, S., Joyet, P., Milohanic, E., Casarégola, S., Auffray, Y., Pérez-Martínez, G., Gibrat, J.F., Zagorec, M., Francke, C., Hartke, A., Deutscher, J. (2010). Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *Journal of Bacteriology* 192(10):2647-8

Mckenzie, J.A. e Batterham, P. (1994). The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 166-169.

Mckenzie, J.A. (2000). The character or the variation: the genetic analysis of the insecticide-resistance phenotype. *Bulletin of Entomological Research* 90: 3–7.

McCart, C. e ffrench-Constant, R.H. (2008). Dissecting the insecticide-resistance associated cytochrome P450 gene *Cyp6g1*. *Pest Management Science* 64: 639–645.

McKenzie, J.A. e Batterham, P. (1998). Predicting insecticide resistance: mutagenesis, selection and response. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 353: 1729-1734.

Melo-Santos, M.A.V., Varjal-Melo, J.J.M., Araújo, A.P., Gomes, T.C.S., Paiva, M.H.S., Regisa, L.N., Furtado, A.F., Magalhaes, T., Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T.M., Ayresa, C.F.J. (2010). Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Tropica* 113: 180–189.

Menozi, P., Shi, M.A., Lougarre, A., Tang, Z.H., Fournier, D. (2004). Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *BMC Evolutionary Biology* 4, 4.

Mitra, R.D. e Church, G.M. (1999). In situ localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules. *Nucleic Acids Research* 27(24):e34.

Mouches, C., Pasteur, N., Berge, J.B., Hyrien, O., Raymond, M., De Saint Vicent, B.R. (1986). Amplification of an esterase gene in responsible for insecticide resistance in a californian *Culex* mosquito. *Science* 233: 778–780.

Moya Borja, G.E., Oliveira, C.M.B., Muñiz, R.A., Goncalves, L.C.B. (1993). The prophylactic and persistent efficacy of doramectin against *Cochliomyia hominivorax* in cattle. *Veterinary Parasitology* 49: 95–105.

Müller, P., Donnelly, M.J., Ranson, H. (2007). Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana. *BMC Genomics* 8: 36.

Müller, P., Warr, E., Stevenson, B.J., Pignatelli, P.M., Morgan, J.C., Steven, A., Yawson, A.E., Mitchell, S.N., Ranson, H., Hemingway, J., Paine, M.J., Donnelly, M.J. (2008). Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genetics* 4(11): e1000286.

Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M., Fournier, D. (1994) Resistance associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 91: 5922-5926.

Nechaev, S., Fargo, D.C., dos Santos, G., Liu, L., Gao, Y., Adelman, K. (2010). Global analysis of short RNAs reveals widespread promoter-proximal stalling and arrest of Pol II in *Drosophila*. *Science* 327(5963): 335-338.

Newcomb, R. D., Campbell, P. M., Ollis, D. L., Cheah, E., Russel, R. J., Oakeshott, J. G. (1997). A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphate hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 94, 7464-7468.

Nolan, J. and Schnitzerling, H. (1986). Drug resistance in arthropod parasites. In: Campbell, W. C. and Lew, R. S. (Eds). *Chemoteraphy of parasitic diseases*. New York, Plenum press, 1989. p. 603-620.

Oakeshott, J.G., Claudianos, C., Russell, R.J., Robin, G.C. (1999). Carboxyl/cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multigene family. *Bioessays* 21(12): 1031–1042

Oakeshott, J. G., Horne, I., Sutherland, T. D., Russell, R. J. (2003). The genomics of insecticide resistance. *Genome Biology* 4(1): 202–205.

Ortelli, F., Rossiter, L. C., Vontas, J., Ranson, H., Hemingway, J. (2003). Heterologous expression of four glutathione transferase gene genetically linked to a major

insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal* 373: 957–963.

Otto, T.D., Wilinski, D., Assefa, S., Keane, T.M., Sarry, L.R., Böhme, U., Lemieux, J., Barrell, B., Pain, A., Berriman, M., Newbold, C., Llinás, M. (2010). New insights into the blood-stage transcriptome of *Plasmodium falciparum* using RNA-Seq. *Molecular Microbiology* 76(1): 12-24.

Pontes, J.B., Severo, J.E.V., Garcia, E.F.C., Colares, R., Kohek Jr., I., Reverbel, M.S. (2009). Projeto demonstrativo de controle e possível erradicação da mosca da bicheira. *A hora veterinária* 171: 28-30.

Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J., David, J.P. (2008). Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38(5): 540-551.

Ranson, H., Rossiter, L., Ortelli, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C.W., Collins, F.H., Hemingway, J. (2001). Identification of a novel class of insecticide glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal* 359: 295–304.

Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M. V., Unger, M.F., Collins, F.H., Feyereisen, R. (2002). Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298: 179–181.

Ranson, H. e Hemingway, J. (2005). Mosquito glutathione transferases. *Methods in Enzymology* 401: 226-41

Raymond, M., Chevillon, C., Guillemaud, T., Lenormand, T., Pasteur, N. (1998). An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 353: 1707–1711.

Robinson, A.S., Vreysen, M.J.B., Hendrichs, J., Feldmann, U. (2009). Enabling technologies to improve area-wide integrated pest management programmes for the control of screwworms. *Medical and Veterinary Entomology* 23 (Suppl. 1): 1–7.

Rooker, S., Guillemaud, T., Berge, J.B., Pasteur, N., Raymond, M. (1996). Coamplification of esterase A and B gene as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity* 77: 555–561.

Rothberg, J.M. e Leamon, J.H. (2008). The development and impact of 454 sequencing. *Nature Biotechnology* 26(10): 1117-1124.

Roush, R.T. e McKenzie, J.A. (1987). Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annual Review of Entomology* 32: 361-80.

Salinas, A.E. e Wong, M.G. (1999). Glutathione S-transferases – A review. *Current Medicinal Chemistry* 6: 279–309.

Scott, J.G. (1999). Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 757–777.

Sereno, J.R.B., Catto, J.B., Sereno, F.T.P.S. (1996). Prevenção de miíases umbilicais em bezerros criados extensivamente, no Pantanal, através da utilização de ivermectin. *Comunicado técnico – Embrapa Pantanal* 16: 1-5.

Shendure, J. e Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology* 26(10): 1135-1145.

Shi, M.A., Lougarre, A., Alies, C., Fremaux, I., Tang, Z.H., Stojan, J., Fournier, D. (2004). Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BMC Evolutionary Biology* 4: 5-13.

Silva, N.M. e Azeredo-Espin, A.M.L. (2009). Investigation of mutations associated with pyrethroid resistance in populations of the New World Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Genetics and Molecular Research* 8: 1067-1078.

Sindan (2010). Sindicato nacional da indústria de produtos para saúde animal (www.sindan.org.br).

Small, G.J. e Hemingway, J. (2000). Molecular characterization of the amplified carboxylesterase gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology* 9(6): 647–653.

Srigiriraju, L., Semtner, P.J., Anderson, T.D., Bloomquist, J.R. (2009). Esterase-based resistance in the tobacco-adapted form of the green peach aphid, *Myzus persicae* (sulzer) (Hemiptera: Aphididae) in the eastern United States. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 72(2): 105–123.

Strode, C., Wondji, C.S., David, J.P., Hawkes, N.J., Lumjuan, N., Nelson, D.R., Drane, D.R., Karunaratne, S., Hemingway, J., Black, W.C., Ranson, H. (2008). Genomic

analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38(1): 113-123.

Sultatos, L.G. (2006). Interactions of Organophosphorus and Carbamate Compounds with Cholinesterases, pp. 209-218. In *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. Elsevier Academic Press, London.

Teese, M.G., Campbell, P.M., Scott, C., Gordon, K.H.J., Southon, A., Hovan, D., Robin, C., Russell, R.J., Oakeshott, J.G. (2010). Gene identification and proteomic analysis of the esterases of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 1-16.

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). *Veterinary Parasitology* 154: 300-310.

Torres, T.T., Metta, M., Ottenwlder, B., Schltterer, C. (2008). Gene expression profiling by massively parallel sequencing. *Genome Research* 18(1): 172-177.

Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews Genetics* 10(1): 57-63.

Wei, S.H., Clark, A.G., Syvanen, M. (2001). Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the house fly *Musca domestica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 1145–1153.

Wilhelm, B.T. e Landry, J.R. (2009). RNA-Seq: quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods* 48: 249–257.

Willoughby, L., Chung, H., Lumb, C., Robin, C., Batterham, P., Daborn, P.J. (2006). A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and phenobarbital. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 934–942.

Willoughby, L., Batterham, P., Daborn, P.J. (2007). Piperonyl butoxide induces the expression of cytochrome P450 and glutathione S-transferase genes in *Drosophila melanogaster*. *Pest Management Science* 63(8): 803-808.

Wolstenholme, A.J. e Rogers, A.T. (2005). Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology* 131: 85–95.

Wondji, C.S., Irving, H., Morgan, J., Lobo, N.F., Collins, F.H., Hunt, R.H., Coetzee, M., Hemingway, J., Ranson, H. (2009). Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome Research* 19(3): 452-459.

Wong, M.L. e Medrano, J.F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39(1): 75-85.

Wyss, J.H. (2000). Screwworm Eradication in the Americas. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916: 186-93.

Vale, J.A. (1998). Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters* 102-103: 649-52.

Vaughan, A., Hemingway, J. (1995). Mosquito carboxylesterase Est alpha 2(1) (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Biological Chemistry* 270: 17044–17049.

Vera, J.C., Wheat, C.W., Fescemyer, H.W., Frilander, M.J., Crawford, D.L., Hanski, I., Marden, J.H. (2008). Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology* 17: 1636–1647.

Veríssimo, C.J. (2003). Morte de ruminantes devido a infecção na orelha conseqüente à miíase causada por *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858). *Comunicação científica – Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v.70(2): 187-189.

Villarino, M. A., Wagner, G. G., George, J. E. (2003). *In vitro* detection of acaricide resistance *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Applied Acarology* 28(1-4): 265 – 271.

Vontas, J., Blass, C., Koutsos, A.C., David, J.P., Kafatos, F.C., Louis, C., Hemingway, J., Christophides, G.K. and Ranson, H. (2005). Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. *Insect Molecular Biology* 14: 509–521.

Vontas, J., David, J.P., Nikou, D. , Hemingway, J., Christophides, G.K., Louis, C., Ranson, H. (2007). Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Molecular Biology* 16(3): 315–324.

Vulule, J.M., Beach, R.F., Atieli, F.K., McAllister, J.C., Brogdon, W.G., Roberts, J.M. (1999). Elevated oxigenase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Medical and Veterinary Entomology* 13: 239–244.

Yang, Y., Chen, S., Wu, S., Yue, L., Wu, Y. (2006). Constitutive overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera*. *Journal of Economic Entomology* 99(5): 1784-1789.

Young, A.S., Morzaria, S.P. (1986). Biology of babesia. *Parasitology Today* 2: 211-219.

Yu, Q., Lu, C., Li, B., Fang, S., Zuo, W., Dai, F., Zhang, Z., Xiang, Z. (2008). Identification, genomic organization and expression pattern of glutathione S-transferase in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38: 1158–1164.

Zhang, L., Shi, J., Shi, X., Liang, P., Gao, J., Gao, X. (2010a). Quantitative and qualitative changes of the carboxylesterase associated with beta-cypermethrin resistance in the housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 156: 6–11.

Zhang, W., Li, F., Nie, L. (2010b). Integrating multiple ‘omics’ analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology* 156: 287–301.

Zhu, F., Li, T., Zhang, L., Liu, N. (2008). Co-up-regulation of three P450 genes in response to permethrin exposure in permethrin resistant house flies, *Musca domestica*. *BMC Physiology* 8:18.

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
13 de agosto de 2010.

CIBio: 05/2010

Projeto CIBio: 05/2008

Identificação:

Doutorado: Renato Assis de Carvalho

Projeto: Bases moleculares da resistência a inseticidas organofosforados em *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae).

Parecer:

Projeto aprovado pela CIBio/CBMEG em 12/08/2008 sob número 05/2008
(em andamento)

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



Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato
Presidente da CIBio/CBMEG - UNICAMP