

ALBERTO MOURA MENDES LOPES

**“CARACTERIZAÇÃO DO GENE CODIFICANTE DA SUBUNIDADE
 α DO CANAL DE CLORETO (*GluCl α*) POSSIVELMENTE
ASSOCIADO À RESISTÊNCIA ÀS LACTONAS MACROCÍCLICAS
EM *Cochliomyia hominivorax* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)”**

***CHARACTERIZATION OF THE GENE ENCODING THE α SUBUNIT
OF THE CHLORIDE CHANNEL (GLUCL α) POSSIBLY ASSOCIATED
WITH RESISTANCE TO MACROCYCLIC LACTONES IN *Cochliomyia
hominivorax* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)***

**CAMPINAS
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ALBERTO MOURA MENDES LOPES

**“CARACTERIZAÇÃO DO GENE CODIFICANTE DA SUBUNIDADE
 α DO CANAL DE CLORETO (*GluCl α*) POSSIVELMENTE
ASSOCIADO À RESISTÊNCIA ÀS LACTONAS MACROCÍCLICAS
EM *Cochliomyia hominivorax* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)”**

***CHARACTERIZATION OF THE GENE ENCODING THE α SUBUNIT
OF THE CHLORIDE CHANNEL (GLUCL α) POSSIBLY ASSOCIATED
WITH RESISTANCE TO MACROCYCLIC LACTONES IN *Cochliomyia
hominivorax* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)***

Este exemplar corresponde à redação final
da DISSERTAÇÃO defendida pelo
candidato

***ALBERTO MOURA MENDES
LOPES***

e aprovada pela Comissão Julgadora.

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
Título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Animal e
Evolução

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

**CAMPINAS,
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

L881c

Lopes, Alberto Moura Mendes, 1981-

Caracterização do gene codificante da subunidade α do canal de cloreto (GluCl α) possivelmente associado à resistência às lactonas macrocíclicas em *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) / Alberto Moura Mendes Lopes. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Ana Maria Lima de Azeredo Espin.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Resistência a inseticidas. 2. Ivermectina. 3. Canais de cloreto. 4. Pecuária. 5. Ectoparasita. I. Azeredo-Espin, Ana Maria Lima de, 1955-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Characterization of the gene encoding the α subunit of the chloride channel (GluCl α) possibly associated with resistance to macrocyclic lactones in *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae)

Palavras-chave em Inglês:

Resistance to insecticides

Ivermectin

Chloride channels

Animal farming

Ectoparasites

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Ana Maria Lima de Azeredo Espin [Orientador]

Gustavo Adolfo Sabatini

Karina Lucas da Silva Brandão

Data da defesa: 16-08-2013

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

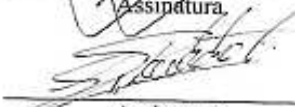
Campinas, 16 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

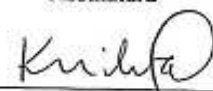
Profª. Dra. Ana Maria Lima De Azeredo Espin
(orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sabatini


Assinatura

Dra. Karina Lucas Da Silva Brandão


Assinatura

Dr. Marcos Roberto Dias Batista

Assinatura

Dra. Márcia Cristina Mendes

Assinatura

“O Homem cria as ferramentas, as ferramentas recriam o Homem”

(Marshall McLuhan)

“Em ciência, uma aparente complexidade é frequentemente simplificada uma vez que você tem a
informação correta...”

(McCavera *et al.*, 2004)

RESUMO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, sendo este um dos setores de geração de renda mais importantes para o país. As infestações por ecto e endoparasitas estão entre os principais problemas que levam à diminuição da produtividade. Dentre eles, a *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), conhecida como mosca-da-bicheira, destaca-se como uma das principais causadoras de miíases, gerando prejuízos de aproximadamente US\$ 1,7 bilhões/ano ao país. Produtos sistêmicos como as lactonas macrocíclicas/macrolactonas, ativadoras, dentre outros, do canal de cloreto (GLUCL α), vêm sendo utilizados intensivamente como medida preventiva e de tratamento nas infestações por *C. hominivorax* e diversos parasitas, e a intensa/prolongada utilização das lactonas macrocíclicas tem levado ao surgimento da resistência a tais produtos. A identificação dos mecanismos moleculares da resistência às lactonas macrocíclicas em outras espécies indica a ocorrência de possíveis alterações no canal de cloreto associados à resistência em *C. hominivorax*. Utilizando-se de sequências do canal de cloreto de outras espécies, previamente depositadas no banco de dados, além de sequências obtidas na caracterização do transcriptoma de *C. hominivorax*, o objetivo deste projeto é amplificar e sequenciar a região codificante do gene da subunidade desse canal de cloreto dependente de L-glutamato (GluCL α) em *C. hominivorax*. Além disso, serão comparadas as sequências de indivíduos resistentes e suscetíveis às macrolactonas visando à identificação da(s) mutação(ões) que confere(m) resistência à tais produtos e, consequentemente, o diagnóstico molecular da resistência.

ABSTRACT

Brazil has the largest commercial cattle herd in the world, being one of the most important sectors of income generation for the country. Infestations by ecto- and endo parasites are among the major problems that lead to low productivity. Among them, the *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), known as the New World Screwworm fly, stands out as a major cause of myiasis, resulting in losses of approximately US\$ 1.7 billion each year to the country. Systemic products such as macrocyclic lactones/macrolactones (MLs), mainly the MLs member ivermectin, have been extensively used as a preventive measure and treatment in infestations by *C. hominivorax* and various parasites, and the intense/prolonged use of macrocyclic lactones have led to the emergence of resistance to such products. The macrolactones target-sites are the cys-loop ligand-gated ion channels receptors, specially the glutamate-gated chloride channel subunit ($\text{GLUCL}\alpha$). The identification of the molecular mechanisms of macrocyclic lactones resistance in other species indicates that possible alterations in chloride channels and $\text{GLYR}\alpha$ and $\text{nAChR}\alpha 7$ are associated with macrolactones resistance in *C. hominivorax*. Using the glutamate-gated chloride channel subunit sequences from other species, previously deposited in the database, and sequences obtained in the characterization of the transcriptome of *C. hominivorax*, the aim of this project was to amplify and sequence the coding region of the glutamate-gated chloride channel subunit gene ($\text{GluCl}\alpha$) in *C. hominivorax*. In addition, sequences will be compared among putative ivermectin resistant and susceptible individuals in order to identify mutation(s) conferring resistance to such product and thereby the molecular diagnosis of resistance.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	iv
BANCA EXAMINADORA	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE	ix
DEDICATÓRIA.....	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
ÍNDICE DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS	xix
ABREVIATURAS E TERMOS EM INGLÊS	xxi
ORGANIZAÇÃO DA TESE	xxiv
PARTE I - INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 PRODUÇÃO PECUÁRIA NO BRASIL E ECTOPARASITAS	1
1.2 <i>Cochliomyia hominivorax</i> E FORMAS DE CONTROLE	2
1.3 USO DOS INSETICIDAS: resistência e macrolactonas	4
1.4 A SUPERFAMÍLIA “Cys - loop LGIC”: GLUCL α e mutações	8
1.5 JUSTIFICATIVA	12
1.6 OBJETIVO	12
PARTE II - CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA SUBUNIDADE α DO CANAL DE CLORETO DEPENDENTE DE L-GLUTAMATO (<i>GluClα</i>)	13
Capítulo 1 - CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO CODIFICANTE DO <i>GluClα</i>	13
1.1 METODOLOGIA DETALHADA	13
Amostras de <i>C. hominivorax</i>	13
Extração de RNA total e síntese do cDNA	13
Amplificação do cDNA por PCR	14
Clonagem e sequenciamento	16
Análise das sequências	17

1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
Amplificação do cDNA por PCR.....	18
Análise das sequências	19
Capítulo 2 - BIOENSAIO PARA OBTENÇÃO DE INDIVÍDUOS POSSIVELMENTE RESISTENTES À IVERMECTINA.....	25
2.1 METODOLOGIA DETALHADA	25
Amostras de <i>C. hominivorax</i>	25
Bioensaios testes	25
Bioensaio definitivo	27
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
Bioensaios testes	29
Bioensaio definitivo	31
Capítulo 3 - CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES POSSIVELMENTE ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA À IVM E DE POSSÍVEIS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DO <i>GluCla</i>	35
3.1 METODOLOGIA DETALHADA	35
Amostras de <i>C. hominivorax</i>	35
Extração do RNA total e síntese do cDNA.....	35
Amplificação do cDNA por PCR.....	36
Clonagem e sequenciamento.....	38
Análise das sequências	39
Análise das frequências das mutações	40
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
Amplificação do cDNA por PCR.....	41
Análise das sequências	43
Análise das frequências das mutações	58

CONCLUSÕES GERAIS.....	61
Múltiplos alvos, uso da técnica “two-electrode voltage clamp” e transcritos alternativos	61
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS	73
Artigo.....	75
Figura Suplementar S1	98
Figura Suplementar S2	101
Dificuldades no bioensaio	106

DEDICATÓRIA

Inicialmente, dedico este trabalho aos meus pais Audálio e Maria Luiza por terem me ajudado sempre que precisei, em todos os aspectos da minha vida, e por terem me apoiado nas escolhas que fiz, mesmo nos momentos em que tive dúvidas. Aos meus irmãos Marcelo e Juliana por me serem meus companheiros.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, quero agradecer à professora Ana Maria por ter me aceito como aluno de mestrado no laboratório de Genética e Evolução Animal e me orientado neste projeto que, além de me instigar a curiosidade pela natureza das mutações, muito me ensinou sobre a ciência da genética e suas técnicas detalhadas. Ao entrar no laboratório, pouco sabia sobre o que era experimentação e, ao terminar este projeto, obtive um aprendizado que espero possuir para sempre ao longo da minha vida acadêmica e profissional. Quero agradecer também pelas duas experiências que tive como monitor da disciplina BG-380, uma como aluno de graduação e outra como aluno de mestrado do laboratório que, juntas ao curto período de discussões do “Journal club”, me ajudaram ainda mais no entendimento de genética.

De forma igualmente importante, agradeço imensamente ao Renato, que com sua ajuda ao longo de mais de dois anos de projeto, mesmo que longe, verdadeiramente me orientou sobre o rumo a ser seguido, as técnicas experimentais, os artigos a serem lidos e o estudo da resistência. Sem sua ajuda fundamental eu não saberia o caminho que o projeto deveria seguir. Ao Pablo Fresia, pela ajuda na disciplina de Genética Fisiológica e Molecular (BG-380) quando foi monitor e nos meus primeiros dias no LabGEA.

Agradeço imensamente à Rosângela pelo ensino, em todos os momentos, de importantes técnicas de laboratório e pesquisa, pelas discussões (sadias!!!) sobre extração de RNA, PCR, sequenciamento, clonagem, entre outros temas, e pelo bate papo nos momentos descontraídos. À Gisele e ao Palocci, que me ajudaram desde o começo com o aprendizado das técnicas a serem usadas e também com as discussões sobre evolução e genética. Sem a paciência e comprometimento da Gisele em me ajudar nos meus primeiros contatos em técnicas experimentais com PCR, extração, entre outras, eu não teria aprendido o básico que todo pós-graduando em genética deve saber. Ao Thiago, que mesmo chegando no final deste projeto me ajudou com discussões sobre a mosca-da-bicheira, correções de pôster e artigo, pelas conversas divertidas e pela amizade, me ajudando sempre que precisei. À Salete, que me ajudou no desenvolvimento do bioensaio e sempre foi muito divertida. Ao Daniel, pela ajuda na prática experimental e pelos bares, e a todas as pessoas que estão ou passaram pelo laboratório, Gabriel, Luiza, Ana Paula e Felipe. Agradeço ao Vitor Antônio Pavinato pelas importantes ajudas no uso dos softwares de análise do bioensaio.

Agradeço também à Ana Claudia Lessinger, Dra. Márcia Cristina Mendes, Marcos Roberto e ao Pablo, pela contribuição e discussões enriquecedoras no exame de qualificação e/ou pré-banca que ajudaram a melhorar a dissertação, e ao Dr. Gustavo Adolfo Sabatini e Dra. Karina Lucas Silva-Brandão pelas contribuições realizadas na banca de defesa. Muito obrigado!

Agradeço aos professores do programa de Genética e Biologia Molecular e os vários pesquisadores que ministraram disciplinas, palestras, seminários, etc, muito importantes na minha formação. Agradeço à professora Hildete Pinheiro do IMECC pela ajuda no entendimento de conceitos na análise estatística. À primeira escola em que estudei ao chegar em Sorocaba, Colégio Salesiano São José, pelos ensinamentos que, agora, percebo terem sido fundamentais. Aos amigos que fiz nesta escola.

Agradeço aos membros da banca de qualificação, Dr. Marcos Roberto Dias Batista, profa. Dra. Ana Cláudia Lessinger e profa. Dra. Márcia Cristina Mendes, pela ajuda na melhoria dos experimentos e no planejamento do projeto.

Aos grandes amigos da Melhor Equipe de Natação do Mundo, a Unicamp Swimming Society Reloaded (USSR), Guerreiro, Rubs, Takata, Mion, Xexeu, Guima, Tulhão, Telles, Serjão, Pedrão. Aos atuais técnicos, Maysa, Leandro e Fer. E à todas as pessoas que nadam e já nadaram nessa equipe. Sem vocês, os treinos e, principalmente, os churrascos, teria sido bem mais difícil a vida em Barão Geraldo. Aos amigos de Sorocaba, Marcus, Rafael e Junior pelos bares, shows e bandas amadoras.

Agradeço à Noelle e sua família pelo carinho, por ter participado da minha vida desde antes deste projeto, me acolhendo em todos os momentos em que estive em sua casa e por todos os momentos e viagens que passamos juntos, os quais adorei. Te adoro. Aos grandes amigos do pensionato Barão, Fernando, André P., Pablo, Luiz C., Saulo, e todos os outros que por ali passaram, pelos bares e festas, que tornaram minha vida social mais agitada. Agradeço à todas as pessoas que conheci nesse percurso, Tuty, Renato Vicentini, Dudu Del Bem, Raphael, os funcionários e amigos do CBMEG. Agradeço à Izabela K. e Lídia.

À Ana Carla, por estar ao meu lado sempre, pelo carinho, pela ajuda na confecção do pôster e na correção gramatical do artigo. Obrigado pela importância que tem na minha vida. Obrigado pela compreensão das ausências em que precisei me ocupar desta dissertação. Te adoro.

Obrigado aos antigos membros da república TAMAR, Zé Alexandre, Josué, Leonardo (Bizu), Zen, Henrique, Virgílio, Victor e Fabrício (Bambu) por terem me recebido em sua casa. Agradeço à minha família, em Sorocaba, meu pai Audálio e minha mãe Maria Luiza por me apoiarem e me permitirem seguir o caminho que eu escolhi. Ao meu irmão Marcelo pela amizade, companheirismo e shows em que fomos.

À minha irmã Juliana por sempre estar disponível para ajudar. À minha família, em Recife, avós, tios, tias e primos.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro recebido nas formas de bolsa e reserva técnica que garantiram, além da minha permanência em Campinas, a apresentação de parte dos resultados deste projeto em um congresso nacional. Agradeço também ao auxílio a projetos de pesquisa recebido pela profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, seja do CNPq, seja da FAPESP, garantindo, assim, a execução deste projeto.

ÍNDICE DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

FIGURAS

Figura 1: Molécula de ivermectina, mostrando as diferenças entre os homólogos B1a e B1b dihidroavermectina (Pág. 7).

Figura 2: Em I: estrutura geral de subunidade Cys-lopp LGIC. Em II: estrutura pentamérica formada por essas subunidades. Em III: posições das mutações Cys-loop LGIC relacionadas à resistência à MLs (Pág. 9).

Figura 3: Localização da hibridização dos “primers” utilizados no GluCl α de *C. hominivorax* e *L. cuprina* (Pág. 16).

Figura 4: Gel de agarose mostrando os produtos amplificados pelos pares de “primers” F1/R3 e F3/R4 (Pág. 19).

Figura 5: Alinhamento entre as sequências da região codificante do GluCl α em *C. hominivorax* e *L. cuprina* (Pág. 20).

Figura 6: Alinhamento de trechos das porções 5' e 3' das sequências do GluCl α das 4 larvas usadas na caracterização (Pág. 22).

Figura 7: Alinhamento entre a sequência predita de aminoácidos do GLUCL α de *C. hominivorax* e o GLUCL α de *D. melanogaster*, *M. domestica*, *L. cuprina* (Pág. 23).

Figura 8: Esquema mostrando a preparação do bioensaio e os materiais utilizados (Pág. 28).

Figura 9: Localização da hibridização dos “primers” utilizados na amplificação do cDNA completo e do trecho de 672 pb do GluCl α das larvas do bioensaio definitivo (Pág. 38).

Figura 10: Gel de agarose mostrando os produtos amplificados pelos pares de “primers” F1/R3, F3/R4, F2/R3 e F1/R4 a partir do cDNA das larvas do bioensaio definitivo (Pág. 42).

Figura 11: Posições das mutações encontradas na sequência predita de aminoácidos do GLUCL α das larvas do bioensaio definitivo (Pág. 45).

Figura 12: Alinhamento entre a sequência predita de aminoácidos do GLUCL α de *C. hominivorax* e receptores Cys-loop LGIC apresentando mutações associadas à resistência/insensibilidade à ivermectina (Pág. 49).

Figura 13: Alinhamento das sequências nucleotídicas do GluCl α dos 6 principais alelos encontrados nas larvas sobreviventes (Pág. 50).

Figura 14: Posições de sequências preditas de sinalizarem a localização do splicing alternativo (Pág. 53).

Figura 15: Alinhamento de trechos das sequências nucleotídicas amplificadas pelo par de “primers” F1/R4, mostrando a posição de sequências associadas ao splicing do pré-RNA_m (Pág. 54).

Figura 16: Análise do N° de clones apresentando determinado SNP com o N° total de clones analisados em cada grupo do bioensaio (mortos e sobreviventes) (Pág.59).

TABELAS

Tabela 1: Sequências dos “primers” utilizados nos testes para encontrar a melhor combinação para amplificar toda a sequência codificante do GluCl α (Pág. 15).

Tabela 2: Resultado do bioensaio teste 1 (Pág. 29).

Tabela 3: Resultado do bioensaio teste 2 (Pág. 30).

Tabela 4: Resultado do bioensaio teste 3 (Pág. 31).

Tabela 5: Resultado das triplicatas do bioensaio definitivo (Pág.31).

Tabela 6: Estimativas do bioensaio obtidas pelo software PoloPlus® (Pág. 33).

Tabela 7: Sequências dos “primers” utilizados na amplificação do cDNA das larvas do bioensaio definitivo (Pág. 36).

Tabela 8: Comparação da taxa de sobrevivência entre os genótipos, considerando 3 clones por larva (Pág. 58).

GRÁFICOS

Gráfico 1: Relação “mortalidade” versus “concentração de ivermectina” no bioensaio definitivo (Pág. 32).

ABREVIATURAS E TERMOS EM INGLÊS

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
Ala	Alanina
APC	Ativos da pecuária de corte
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
AW-IPM	Area Wide-Integrated Pest Management
BLASTN	Basic local alignment search tool using a nucleotide query
BLASTP	Basic local alignment search tool using a protein query
Buffer	Tampão
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
cDNA	DNA complementar
Ce	<i>C. elegans</i>
CeGLUCL α	Subunidade do canal de cloreto dependente de glutamato em <i>C. elegans</i>
CeGLUCL α – IVM	Complexo formado pela IVM ligada ao receptor CeGLUCL α
Ch	<i>Cochliomya hominivorax</i>
ChGluCl α	Gene <i>GluClα</i> em <i>C. hominivorax</i>
CL	Concentração letal
Co	<i>Cooperia oncophora</i>
COOH	Extremidade C-terminal da proteína
Cys	Cisteína
Cys-loop LGIC	Superfamília de receptores dependentes de neurotransmissores
DDT	Inseticida diclorodifeniltricloroetano
DEPC	Água tratada com dietil pirocarbonato
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAg	Ácido desoxirribonucleico genômico
DNase	Enzima que degrada DNA
dNTP	Qualquer um dos quatro possíveis desoxirribonucleotídeos trifosfatos
<i>EcoRI</i>	Enzima de restrição
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EP	Erro padrão
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FlyBase	Banco de dados sobre genética e biologia molecular de drosofilídeos
GABA	Subunidade do canal de cloreto dependente de ácido γ -aminobutírico
Genbank	Banco de sequências do NIH (National Institutes of Health)
Gln	Glutamina
<i>GluClα</i>	Gene que codifica subunidade do canal de cloreto dependente de glutamato
GLUCL α	Subunidade do canal de cloreto dependente de glutamato
GLUCL α 1	Subunidade protéica homóloga da subfamília de canais de cloreto dependentes de glutamato
GLUCL α 2	Subunidade protéica homóloga da subfamília de canais de cloreto dependentes de glutamato

GLUCL α 3	Subunidade protéica homóloga da subfamília de canais de cloreto dependentes de glutamato
GLUCL α 3B	Isoforma B da subunidade protéica homóloga da subfamília de canais de cloreto dependentes de glutamato
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
GLYR α 1	Subunidade do canal de cloreto dependente de glicina
GO	Goiás
Hc	<i>Haemonchus contortus</i>
HcGLUCL α 3B	Isoforma B da subunidade protéica homóloga da subfamília de canais de cloreto dependentes de glutamato em <i>H. contortus</i>
HISCL1	Subunidade protéica homóloga da subfamília de canais de cloreto dependentes de histamina
HISCL2	Subunidade protéica homóloga da subfamília de canais de cloreto dependentes de histamina
Hs	<i>Homo sapiens</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Ile	Isoleucina
IVM	Ivermectina
LB	Meio de cultura para crescimento e manutenção de bactérias
Lc	<i>Lucilia cuprina</i>
LcGluCl α	Gene <i>GluClα</i> em <i>L. cuprina</i>
Leu	Leucina
Loop	Domínio onde ocorre dobra na sequência de aminoácidos
Lys	Lisina
Md	<i>Musca domestica</i>
MdGluCl α	Gene <i>GluClα</i> em <i>M. domestica</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Missense mutation	Mutação que resulta em substituição de aminoácido
ML	Macrolactona/lactona macrocíclica
nAChR α 7	Subunidade do canal de sódio dependente de n-acetilcolina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH ₂	Extremidade N-terminal da proteína
Nonsense mutation	Mutação que não resulta na codificação de nenhum aminoácido
ORF Finder	Open Reading Frame Finder
pb	Pares de base nitrogenada
PCR	Polymerase Chain Reaction
P-gp	P- glicoproteína
pHCL	Subunidade do canal de cloreto dependente da acidez do meio (pH)
Phe	Fenilalanina
Ppm	Partes por milhão
Pré-RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro primário
“Primer”	Oligonucleotídeo iniciador
Pro	Prolina
Rn	<i>Rattus norvegicus</i>
RNA	Ácido ribonucleotídico

RNAm	Ácido ribonucleotídico mensageiro
RNase	Enzima que degrada RNA
RT-PCR	Reverse transcriptase – Polymerase Chain Reaction
Ser	Serina
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SIT	Sterile Insect Technique
Splicing	Clivagem do pré-RNAm para retirada de íntrons
Stop codon	Códon de terminação da tradução da sequência de aminoácidos
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris – EDTA
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tu	<i>Tetranichus urticae</i>
Two-electrode voltage clamp	Técnica usada para medir a corrente de íons através de membranas excitáveis
Tyr	Tirosina
US\$	Dólar americano
UTR	Untranslated region. Regiões não traduzidas do RNAm
UV	Ultra-violeta
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
Val	Valina

ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está organizada em duas partes, às quais tratam de diferentes temas. Na primeira foi redigida uma introdução geral sobre a importância da pecuária brasileira, os principais problemas relacionados aos endo- e ectoparasitas que prejudicam a produção bovina, bem como o uso de macrolactonas para o controle parasitário e a consequente resistência a estes produtos.

A segunda parte está organizada em 3 capítulos e compreende a caracterização molecular do gene *GluCl α* em *C. hominivorax*, um bioensaio com ivermectina e a caracterização de mutações neste gene.

O capítulo 1 trata da caracterização da região codificante do canal de cloreto dependente de glutamato (*GluCl α*) em *C. hominivorax* utilizando “primers” desenhados com base em sequências parciais já caracterizadas de *C. hominivorax* e na sequência de *L. cuprina*.

O capítulo 2 trata do desenvolvimento de um bioensaio com ivermectina com o objetivo de obter larvas sobreviventes e mortas, às quais foram usadas na caracterização de mutações e de transcritos possivelmente oriundos por “splicing” alternativo de pré-RNA.

O capítulo 3 trata da caracterização das mutações encontradas nos indivíduos do bioensaio, com uma discussão das posições e propriedades destas mutações que as associariam à resistência/insensibilidade à ivermectina. Além disso, trata da caracterização dos transcritos alternativos, os quais possuem sequências sinalizadoras conservadas em *D. melanogaster* e vertebrados, que são preditas de estarem relacionadas com o “splicing” do pré-RNA.

Por fim, após a apresentação dos capítulos, há as conclusões gerais, discutindo os diversos receptores que são alvos de macrolactonas e sua participação em mecanismos de resistência. Discute também, as posições e as propriedades das mutações com sua possível relação com mudanças conformacionais que impeçam a abertura do receptor *GLUCL α* pela ivermectina, bem como a necessidade de experimentos que confirmem esta relação. Discute a necessidade de analisar mais de um receptor Cys-loop LGIC e de sequenciar a região genômica do gene *GluCl α* para a elucidação do “splicing” nos transcritos deste gene.

Parte I. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 PRODUÇÃO PECUÁRIA NO BRASIL E ECTOPARASITAS

A produção mundial de produtos oriundos da atividade pecuária, tais como carne e leite, bem como a demanda por esses produtos, vêm aumentando de forma significativa nas últimas décadas, com expressivo percentual desse crescimento ocorrendo em países emergentes, notadamente os do leste e sudeste da Ásia e os da América Latina e Caribe (FAO, 2009). China e Brasil são os países de maior importância na produção e consumo desses produtos nessas regiões (Naylor *et al.*, 2005; FAO, 2009).

Enquanto a produção pecuária dos países desenvolvidos cresce pouco ou está estagnada, apesar de manter a produção em alto nível, o rápido aumento na produção de carne consolidou os países em desenvolvimento na liderança do mercado mundial em meados de 2007, embora o consumo (kg/per capita/ano) desse produto nos países desenvolvidos ainda seja aproximadamente 3 vezes maior do que o consumo praticado em países em desenvolvimento (Alexandratos & Bruinsma, 2012).

Os principais fatores, responsáveis pela alta produtividade pecuária encontrada nos países de industrialização antiga, são a implementação e utilização de pesquisa em ciência e tecnologia animais no combate dos problemas associados à produção animal, entre eles, o manejo e combate de doenças (revisado em Thornton, 2010). De forma contrária, a grande abundância de terras para pastagem, ou de áreas de floresta natural com potencial para abrigar pastagens, na América Latina, tem reduzido a introdução de novas tecnologias que levem ao aumento da produtividade sem a necessidade do aumento da área utilizada (revisado em Thornton, 2010).

A destruição de grandes áreas de biomas naturais, com a finalidade de obter áreas de pastagem, permanece como uma das atividades principais utilizadas para aumentar a produção na pecuária brasileira (Fearnside, 2005), mas que também gera problemas ambientais, entre eles, processos de desertificação e intensificação da degradação do solo e do habitat de espécies endêmicas (Pitesky *et al.*, 2009; revisado em Thornton, 2010).

Diante disso, o aumento da produção pecuária no Brasil, país com importantes biomas naturais, através do aumento da produtividade e não do aumento da área utilizada, se torna fundamental, de modo a promover a preservação de extensas áreas naturais.

O Brasil possui na pecuária um dos seus mais importantes setores de geração de renda, através da exportação de produtos provenientes principalmente da criação de bovinos, suínos e aves. No âmbito da bovinocultura, o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com mais de 212 milhões de cabeças de gado (IBGE, 2011), que utilizam uma área de pastagem de cerca de 172 milhões de hectares,

representando mais de 20% do território nacional (IBGE, 2006). A pecuária brasileira cresce a uma taxa de 4,4% ao ano, suprimindo o mercado nacional e sendo o maior exportador mundial de carne bovina (APCa, 2010).

Em 2011, apenas as exportações brasileiras de carne bovina nas formas *in natura*, industrializada, tripas, miúdos e salgadas, chegaram à aproximadamente 1,1 milhão de toneladas (equivalente carcaça), gerando em torno de US\$ 5,4 bilhões em divisas para o país (ABIEC, 2011; Rocha, 2012) e resultando para o Brasil a segunda posição mundial na produção de carne bovina e primeira posição em volume de exportações desse produto (IBGE, 2011). Números como esses indicam a dimensão potencial do impacto de doenças parasitárias na produção. Tais doenças afetam a produção diretamente, através da mortalidade dos animais, ou indiretamente causando a redução da fertilidade, perda de peso e de produção de leite (Byford, *et al.*, 1992; Borja, 2003). Ambos, ecto e endoparasitas são reconhecidos como sendo duas das principais causas de perdas na produtividade da bovinocultura no Brasil (Vidotto, 2002; Vargas-Terán *et al.*, 2005). Quando associadas à subnutrição e falhas de manejo, incluindo uso incorreto dos parasiticidas, juntamente a ineficácia desses últimos, podem converter-se em fatores limitantes da produção bovina (Vidotto, 2002; Borja, 2003).

Dessa maneira, nota-se que para que o Brasil continue sendo um dos principais países exportadores de carne há a necessidade de aumentar a qualidade sanitária dos produtos de origem animal, através do controle de ecto e endoparasitas. Esse maior controle pode levar ao aumento da produtividade e redução de custos, aumentando a lucratividade sem a necessidade de aumentar o rebanho e áreas para pastagem, o que contribuiria para não agravar os problemas relacionados ao meio ambiente (APCb, 2010; Oliveira & Brito, 2005).

Dentre os principais ectoparasitas, quatro merecem especial atenção devido às perdas provocadas, aos gastos com controle, prevenção e manejo das infestações: o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, a mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*, a mosca-do-berne, *Dermatobia hominis*, e a mosca-da-bicheira, *Cochliomyia hominivorax*. Diante disso, foi realizado, neste trabalho, o estudo da *C. hominivorax*, de forma a ampliar o conhecimento e auxiliar no controle dessa espécie parasita, possibilitando o incremento da produtividade animal nos países afetados por este díptero.

1.2 *Cochliomyia hominivorax* E FORMAS DE CONTROLE

Míase é definida como a “infestação de seres humanos e vertebrados vivos por larvas de dípteros que, pelo menos por algum período de tempo, se alimentam dos tecidos vivos ou mortos do hospedeiro, de

suas substâncias corporais líquidas ou do alimento por ele ingerido” (Zumpt, 1965). Dentre as moscas causadoras de miíases, destacam-se as pertencentes às famílias Oestridae, Sarcophagidae e Calliphoridae (Hall & Wall, 1995), incluindo espécies de grande importância sanitária e econômica, por infestarem o homem, promoverem a disseminação mecânica de patógenos e produzirem grandes prejuízos à pecuária.

Cochliomyia hominivorax (Coquerel), da família Calliphoridae, conhecida no Brasil como mosca-da-bicheira, é considerada uma das mais importantes moscas causadoras de miíases na região Neotropical. Historicamente sua distribuição geográfica se estendia do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina e Uruguai, exceto Chile (Hall & Wall, 1995). Esta espécie foi erradicada do sul dos Estados Unidos, do México, de vários países da América Central e poucas ilhas do Caribe (pela técnica do SIT: “Sterile Insect Technique”) (Graham, 1985; Vargas-Terán *et al.*, 2005). Atualmente sua distribuição compreende o sul do canal do Panamá, algumas ilhas do Caribe e toda a América do Sul, exceto Chile (Vargas-Terán *et al.*, 2005).

A mosca-da-bicheira deposita seus ovos, em média 200, em feridas pré-existentes ou em orifícios do corpo, como olhos, ouvidos e narinas (Hall & Wall, 1995). Os ovos ficam incubados de 11 a 21 horas, período após o qual as larvas eclodem e alimentam-se do tecido vivo do hospedeiro. A fase larval possui três estágios, L1, L2 e L3, e dura de 4 a 8 dias. O primeiro estágio já penetra na ferida, escavando e aprofundando-a, além de produzir um líquido de aspecto seroso, de cheiro pútrido, às vezes sanguinolento, que atrai novos indivíduos de *C. hominivorax* para novas posturas, podendo a infestação chegar a centenas ou a milhares de larvas de vários tamanhos (Guimarães & Papavero, 1999; Veríssimo, 2003; Oliveira & Brito, 2005). Após esse período, as larvas caem no solo, e se transformam em pupas que levam em média 7 dias para que ocorra a emergência dos adultos. Após a emergência, a primeira postura ocorre entre 5 a 10 dias.

Algumas atividades rotineiras em propriedades rurais, como castração e descorna, e quaisquer ferimentos, assim como cordão umbilical de bezerro recém-nascido não devidamente desinfetado e infestação por carrapatos podem se tornar sítios de oviposição para a *C. hominivorax* (Veríssimo, 2003; Oliveira & Brito, 2005; Batista-da-Silva *et al.*, 2009). Assim o controle adequado das miíases representa ganho de produtividade e qualidade dos produtos de origem animal, como da qualidade do couro e de seus derivados, uma das exigências nos grandes mercados compradores (Oliveira & Brito, 2005). O impacto econômico devido às infestações por *C. hominivorax* na pecuária brasileira é o maior entre os países sul-americanos e é estimado em aproximadamente US\$ 1,7 bilhões (revisado em Vargas-Terán *et al.*, 2005).

O problema das miíases tem sido controlado pelo uso de produtos químicos e, também, através do Manejo Integrado de Pragas em Áreas Extensas (AW-IPM na sigla em inglês) baseado na técnica “Sterile Insect Technique” (SIT), na qual moscas estéreis, obtidas através de radiação ionizante, são dispersas de forma a copularem com fêmeas da população natural e, assim, reduzirem o tamanho populacional (Wyss, 2000). Programas de erradicação usando a SIT foram realizados na América do Norte e Central, iniciando-se em 1957 no sudeste dos EUA (Wyss, 2000) e ainda sendo realizados no Panamá, onde são liberadas 40 milhões de moscas estéreis semanalmente com o objetivo de impedir a reinfestação das áreas já erradicadas ao norte (Robinson *et al.*, 2009). Apesar do sucesso da erradicação nesses locais, o uso da técnica de insetos estéreis apresenta sérios problemas (Krafsur *et al.*, 1987) ainda se mostrando inviável para a América do Sul, onde são utilizados apenas produtos químicos. Recentemente, tentativas de obtenção de moscas estéreis, através da inserção de transgenes em *C. hominivorax*, vêm sendo realizadas com relativo sucesso, mas ainda necessitando de estudos relativos à viabilidade dessas linhagens para a implementação em larga escala (Allen & Scholl, 2005; Handler *et al.*, 2009).

O controle químico, largamente utilizado na América do Sul, pode ser realizado através do tratamento das feridas infestadas ou na prevenção das infestações. No caso de bezerros recém-nascidos ou 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 avermectinas, pertencentes à classe química das lactonas macrocíclicas ou macrolactonas (Woodward, 2012).

1.3 USO DOS INSETICIDAS: resistência e macrolactonas

Até aproximadamente a metade do século 19, poucos inseticidas, tais como os inorgânicos enxofre, arsênico, ácido bórico e arseniato de chumbo, estavam disponíveis para o controle de insetos pragas (revisado em Casida & Quistad, 1998). Esses compostos possuíam pouca eficiência contra os organismos alvo, sendo usados em grandes quantidades, além de serem muito tóxicos para o ambiente e para os seres humanos (Casida & Quistad, 1998).

Posteriormente, com o aumento das pesquisas em inseticidas de origem vegetal, foram descobertos compostos mais eficientes, seletivos e com reduzido impacto sobre o ambiente e a saúde humana em relação aos inorgânicos anteriores (Casida & Quistad, 1998; revisado em Isman, 2006). O impacto desses compostos foi reduzido devido à baixa disponibilidade, alto valor, pouca estabilidade no meio ambiente (Casida & Quistad, 1998), e pela competição com os compostos orgânicos sintéticos

(organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides), com propriedades inseticidas, descobertos posteriormente (revisado em Isman, 2006).

A descoberta das propriedades inseticidas de compostos organoclorados sintéticos, a partir da década de 1930, permitiu obter compostos de alta eficiência, de baixo custo, persistentes no ambiente, estáveis quimicamente, altamente solúveis em lipídios, com baixa volatilidade e taxa de degradação, características que tornaram esses inseticidas extremamente bem-sucedidos até a década de 1960 (revisado em Lipnick & Muir, 2001; revisado em Aktar *et al.*, 2009; Jarman & Ballschmiter, 2012). O principal inseticida representante dessa classe química é o DDT (diclorodifeniltricloroetano), primeiramente sintetizado por Othmar Zeidler em 1873, mas que teve suas propriedades inseticidas descobertas por Paul Hermann Müller somente em 1939 (Lipnick & Muir, 2001). Essas propriedades permitiram ao DDT atuar contra um grande número de espécies de insetos, promovendo o controle de pragas agrícolas e de vetores de doenças como malária e febre tifóide, rendendo a Müller o prêmio Nobel de medicina de 1948 (Lipnick & Muir, 2001; Walker *et al.*, 2003; revisado em Jarman & Ballschmiter, 2012). Juntamente com os enormes benefícios oriundos do uso dos organoclorados sintéticos, também surgiram prejuízos relacionados ao uso desses agentes químicos.

Nos primeiros anos após o início do uso do DDT, em 1941, já eram descritas ocorrências de bioacumulação tecidual em humanos e outros mamíferos, e problemas relativos à contaminação ambiental e mortalidade de peixes e aves, assim como os perigos do uso excessivo para as fontes de água e para o surgimento de resistência (Storer, 1946; revisado em Jarman & Ballschmiter, 2012). O primeiro caso de resistência ao DDT foi descrito na Suécia em 1946, apenas 1 ano após sua introdução para o controle de *Musca domestica*, que foi seguido de inúmeros casos de resistência em outros países e em diferentes espécies, em curtos períodos após o início das aplicações (Brown & Pal, 1971).

As aplicações crescentes de DDT resultaram no aumento dos problemas associados a esse composto, de tal modo que seus resíduos podiam ser encontrados em qualquer tipo de ambiente (revisado em Metcalf, 1973; Walker *et al.*, 2003). À medida em que as evidências relacionando os inseticidas com os perigos para a vida humana e selvagem (Storer, 1946; Cottam & Higgins, 1946), e também com o surgimento de resistência (Brown, 1958; Brown & Pal, 1971) eram encontradas, foram ocorrendo mudanças da percepção pública, e mesmo governamental, sobre os perigos e consequências do uso excessivo dos inseticidas (Nownes, 1991; Conis, 2010). Um dos fatores que ajudaram nesta mudança foi a publicação de um livro pela bióloga marinha Rachel Carson (revisado em Heckel, 2012).

Em seu livro, Carson alerta para os perigos crescentes que o uso sem controle de inseticidas poderia trazer para o meio ambiente, para a vida selvagem e humana, e mesmo para o próprio manejo sustentável dos insetos pragas, citando, inclusive, que os inseticidas “matam os parasitas e os predadores que anteriormente realizavam o controle de muitas pragas, enquanto as próprias pragas se tornam resistentes e requerem quantidades cada vez maiores de aplicações para seu controle” (Carlson, 1962).

Desde a publicação de Carson, mais de 450 espécies de artrópodes se tornaram resistentes a um ou mais inseticidas (revisado em Heckel, 2012).

Neste contexto, com o consequente surgimento de restrições e mecanismos regulatórios governamentais mais rigorosos impostos à comercialização e uso de inseticidas, esforços para a busca de alternativas menos tóxicas ao ambiente e ao homem resultaram na descoberta de inseticidas mais biodegradáveis e menos persistentes, entre eles as macrolactonas.

As macrolactonas são compostos formados por duas subfamílias, as milbemicinas, descobertas em 1967 e representadas pelos compostos nemadectina, moxidectina e milbemicina oxima, e as avermectinas, descobertas em 1974 como resultado de uma colaboração entre a Merck & Co., Inc. e o Instituto Kitasato do Japão (revisado em Prichard *et al.*, 2012).

Entre as avermectinas, estão os compostos doramectina, selamectina, abamectina, eprinomectina, emamectina, e o primeiro representante desse grupo a ser comercializado, a ivermectina (IVM), os quais diferenciam-se entre si pela presença/ausência de pequenos grupos químicos em diferentes posições, natural ou artificialmente inseridos (revisado em Prichard *et al.*, 2012). Pequenos grupos químicos naturalmente presentes/ausentes separam as avermectinas nas séries “A” e “B”, as quais são divididas nos subgrupos “1” e “2” (A₁, A₂, B₁ e B₂). A hidrogenação sob determinadas condições da avermectina B₁ resulta na produção da 22,23- dihidroavermectina B_{1a} e da 22,23- dihidroavermectina B_{1b} (Figura 1 - Campbell *et al.*, 1983), que na proporção aproximada de 90 e 10%, respectivamente, compõem a ivermectina atualmente comercializada (revisado em Prichard *et al.*, 2012).

As avermectinas foram isoladas da bactéria gram-positiva *Streptomyces avermitilis* (Burg *et al.*, 1979; Omura *et al.*, 2001), e desde o início do seu uso comercial em 1981, sob a forma de ivermectina, constituem-se no principal grupo de endectocidas utilizado contra endoparasitas e ectoparasitas que atacam animais e seres humanos (revisado em Campbell, 1983; Omura *et al.*, 2001; revisado em Fox, 2006). Possuem um amplo espectro de ação no controle de diversas parasitoses, com eficácia comprovada no controle de insetos, nematódeos e aracnídeos (Omura & Crump, 2004; Woodward, 2012).

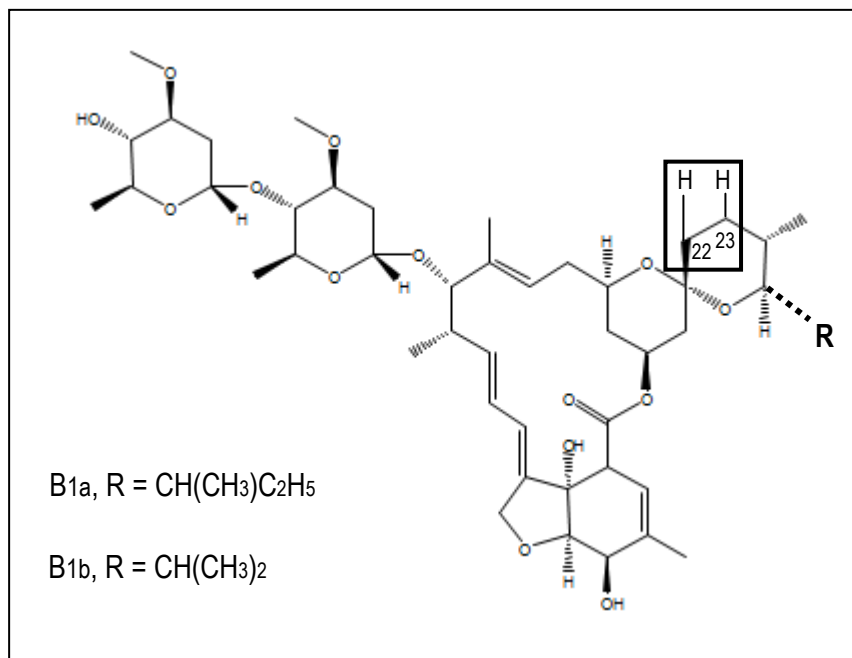


Figura 1: Esquema mostrando as diferenças entre os componentes B1a e B1b da ivermectina (radical R – Campbell *et al.*, 1983) e no retângulo as posições, no C22 e C23, da hidrogenação artificial realizada para obtenção da ivermectina semi-sintética (dihidroivermectina). Adaptado de Prichard *et al.* (2012).

Apesar do sucesso demonstrado pelas lactonas macrocíclicas no início da sua utilização para controle da bicheira (Moya-Borja, 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. A seleção de indivíduos resistentes a determinado produto químico usado na pecuária é um dos principais problemas gerados pelo uso contínuo e/ou incorreto dos produtos antiparasitários, além de deixar resíduos na carne e no leite. Algumas das principais consequências do estabelecimento da resistência são as aplicações mais frequentes dos produtos químicos e o uso de dosagens acima da recomendada, aumentando a quantidade de resíduos deixados nos produtos agropecuários e os custos com o tratamento antiparasitário.

A resistência às macrolactonas também vem sendo encontrada em nematódeos como o *Trichostrongylus colubriformis* (Giordano *et al.*, 1988), *Haemonchus contortus* (Van Wyk & Malan, 1988) e *Ostertagia sp.* (Watson *et al.*, 1996), e em artrópodes como *Drosophila melanogaster* (Kane *et al.*, 2000) e *Tetranychus urticae* (Kwon *et al.*, 2010).

Os principais mecanismos pelos quais pode haver o desenvolvimento da resistência a um inseticida, são a alteração do sítio alvo, tornando-o insensível, e a redução da disponibilidade do inseticida no organismo alvo, que pode ocorrer através do comportamento de fuga, da absorção reduzida e do sequestro e desintoxicação dessa substância (Feyereisen, 1995).

Existem evidências crescentes de resistência às macrolactonas associada à redução da disponibilidade do inseticida no organismo de invertebrados, que podem resultar da desintoxicação metabólica realizada pelas enzimas citocromo P450 (Yoon *et al.*, 2011), da excreção do inseticida por proteínas transportadoras P-gp (Yoon *et al.*, 2011; revisado em Prichard *et al.*, 2012; revisado em Lespine *et al.*, 2012) e da redução da penetração através da cutícula (Dent *et al.*, 2000). Alterações do sítio alvo, através da redução da sensibilidade por meio de substituições ou deleções de aminoácidos (Dent *et al.*, 2000; Kane *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2010; Gosh *et al.*, 2012), e da redução do nível de expressão dos receptores/canais iônicos alvo (El-Abdellati *et al.*, 2011), também são largamente descritas.

As avermectinas e as milbemicinas possuem como sítios alvo os receptores/canais iônicos dependentes de diferentes neurotransmissores (revisado em Prichard *et al.*, 2012), principalmente os canais de Cl⁻ mediados pelo L-glutamato (GLUCL α), pertencentes à superfamília de canais iônicos “Cys-loop LGIC” (Cully *et al.*, 1994; Dent, 2006).

1.4 A SUPERFAMÍLIA “Cys - loop LGIC”: GLUCL α e mutações

A superfamília de canais iônicos dependentes de neurotransmissores “Cys-loop LGIC” é formada por receptores/canais iônicos responsáveis por rápidas transmissões sinápticas entre os neurônios e entre os neurônios e os músculos, de vertebrados e invertebrados (Cleland *et al.*, 1996; Dent, 2006). Entre os representantes dessa superfamília estão os canais permeáveis aos cátions, como o receptor/canal nAChR, responsável pela transmissão sináptica excitatória, e os canais permeáveis aos ânions, como por exemplo o receptor/canal GLUCL α , responsável pela inibição do potencial de ação que se propaga pelos neurônios em direção à musculatura (Delgado *et al.*, 1989; Dent *et al.*, 2006).

Os receptores dessa superfamília são formados pela união de 5 subunidades (I e II - Figura 2), que podem ser idênticas (homopentaméricas) ou diferentes (heteropentaméricas), possuindo um canal central por onde passam os íons que promovem a despolarização (excitatórios) ou a hiperpolarização (inibitórios) da membrana dos neurônios (Thompson *et al.*, 2010).

Estudos mostram que a expressão heteróloga de subunidades idênticas de receptores “Cys-loop LGIC” pode resultar em receptor homomérico (formado por subunidades idênticas) enquanto a expressão de diferentes subunidades (GLUCL α e GABA, por exemplo) pode, também, resultar na formação de um receptor heteromérico (formado por subunidades diferentes) (Raymond-Delpech *et al.*, 2005; Eguchi *et al.*, 2006).

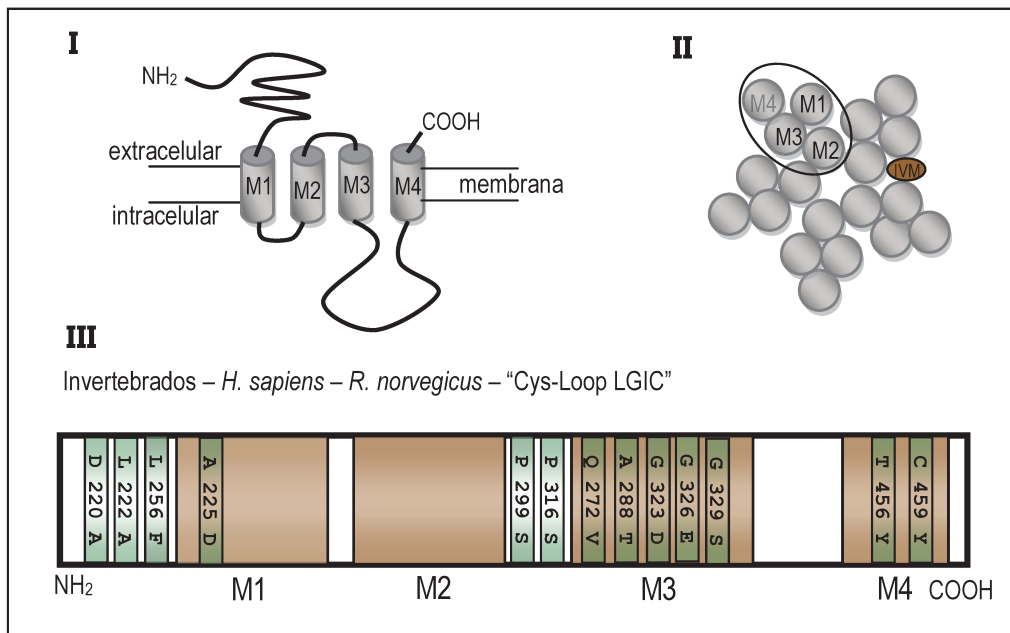


Figura 2: I-Esquema mostrando uma estrutura geral para uma subunidade de canal iônico dependente de neurotransmissores/ligantes (Cys-loop LGIC), na membrana celular. M1-M4 = Regiões transmembrana. II-Vista superior da estrutura predita homopentamérica de canal de Cl⁻ e a ligação da IVM entre duas subunidades. Em destaque no círculo, uma subunidade do receptor. IVM = ivermectina. III-Esquema mostrando as posições das mutações (em verde) nos domínios dos respectivos receptores da superfamília “Cys-loop LGIC” relacionados à resistência ou insensibilidade às macrolactonas (Kane *et al.*, 2000; Njue *et al.*, 2004; McCavera *et al.*, 2009; Lynagh & Lynch, 2010a; 2010b; Kwon *et al.*, 2010; Dermauw *et al.*, 2012; revisado em Wolstenholme, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2012). NH₂= extremidade N-terminal; COOH= extremidade C-terminal. Em marrom domínios transmembrana. L= leucina; T= treonina; P=prolina; A=alanina; G=glicina; F=fenilalanina; D=ácido aspártico; S=serina; Q=glutamina; V=valina; Y=tirosina; C=cisteína.

Diversos membros do grupo “Cys-loop LGIC” apresentam extensa diversidade estrutural e funcional obtida através dos mecanismos de “splicing” alternativo e edição do pré-RNAm, gerando isoformas com propriedades bioquímicas, farmacológicas e fisiológicas diferentes entre si (Reenan, 2001; revisado em Kelemen *et al.*, 2013).

O mecanismo de “splicing” do pré-RNAm é o mecanismo pelo qual os íntrons, sequências não codificantes na sequência do pré-RNAm, são removidos pelo complexo “spliceossomo” no núcleo celular, enquanto as sequências codificantes, os éxons, são mantidos e unidos, formando, assim, a região codificante do RNAm maduro (Watson *et al.*, 2006). Alguns pré-RNAm podem ter íntrons removidos através de mais de um modo, resultando no mecanismo de “splicing” alternativo do pré-RNAm, originando transcritos alternativos. Diferentes vias podem originar transcritos alternativos, entre elas o uso de sítios alternativos de início e término da transcrição e, também, por meio de diferentes estratégias de “splicing” alternativo, tais como o uso de éxons alternativos e a seleção de diferentes sítios de “splicing” nas regiões

5' e 3' de éxons, além da retenção de íntrons e do uso de éxons mutuamente exclusivos (Revisado em Blencowe, 2006; Sprung *et al.*, 2011).

O “splicing” alternativo do pré-RNA é considerado o principal responsável pela diversidade protéica humana (Akker *et al.*, 2004) e um dos eventos que aumentam a diversidade do reduzido número de genes da superfamília “Cys-loop LGIC” encontrados em artrópodes (Semenov & Pak, 1999; Jones & Sattelle, 2006, 2007; Jones *et al.*, 2010; Dale *et al.*, 2010).

Entre os genes codificantes de receptores/canais iônicos mais estudados em *D. melanogaster* está o *GluCl α* , canal de cloreto (Cl⁻) que tem como neurotransmissor o L-glutamato. Este gene, encontrado exclusivamente em invertebrados, possui transcritos alternativos em todos os artrópodes em que foi encontrado (Semenov & Pak, 1999; Jones & Sattelle, 2006, 2007; Jones *et al.*, 2010; Dale *et al.*, 2010), sugerindo a possibilidade de existência de transcritos alternativos para esse gene também em *C. hominivorax*.

Nos invertebrados, a ligação do L- glutamato no *GLUCL α* promove a rápida abertura do canal com consequente influxo de Cl⁻ para a restauração do potencial de repouso da membrana, seguido de rápida interrupção do fluxo (Sattelle, 1992; Usherwood, 1994). Como citado, as macrolactonas agem nos canais iônicos “Cys-loop LGIC”, promovendo a abertura lenta e irreversível desses canais ou potencializando a abertura realizada pelo neurotransmissor endógeno (revisado em Bloomquist, 2003; Danaher, 2006). Com a abertura permanente do canal ocorre o aumento no influxo de Cl⁻, o que leva à inibição do potencial de ação e da atividade elétrica, induzindo a ataxia e sedação dos parasitas alvo (Cully *et al.*, 1996; revisado em Bloomquist, 2003; Danaher, 2006).

O modelo obtido por Hibbs & Gouaux (2011), através da resolução da estrutura do *GLUCL α* em *C. elegans* ligado à IVM, sugere a ligação desse inseticida nos domínios transmembrana M1, M2 e M3 entre duas subunidades sensíveis do receptor (II - Figura 2) em *C. elegans*, o que poderia ocorrer também na ligação com outros canais iônicos e com outras macrolactonas devido ao mesmo modo de ação dessa classe inseticida.

Os principais mecanismos de resistência ou insensibilidade às macrolactonas, por alteração do sítio alvo, já identificados, são baseados em substituições de aminoácidos em posições específicas das subunidades protéicas dos canais “Cys-loop LGIC” (III - Figura 2).

Em *Drosophila melanogaster* foi encontrada a mutação Pro299Ser (III - Figura 2) entre as regiões transmembrana M2 e M3, da subunidade *GLUCL α* (*DmGLUCL α*) do canal de Cl⁻, como associada à

resistência à ivermectina (Kane *et al.*, 2000). Essa substituição também foi relacionada com a diminuição do valor adaptativo dos indivíduos resistentes na ausência do inseticida (Kane *et al.*, 2000), o que tem implicações diretas no manejo da resistência (Carvalho, 2010). Recentemente foram investigadas a existência das mutações Gly323Asp (Figura 2 - Kwon *et al.*, 2010) e Gly326Glu (Figura 2 - Dermauw *et al.*, 2012) localizadas na região transmembrana M3 das subunidades GLUCL α 1 (*TuGLUCL α 1*) e GLUCL α 3 (*TuGLUCL α 3*), respectivamente, no ácaro *Tetranychus urticae*, como sendo associadas à resistência à abamectina, uma macrolactona.

Em nematódeos, também alvo das macrolactonas, a mutação Leu256Phe encontrada em *Cooperia oncophora* (Njue *et al.*, 2004), e as mutações Leu256Phe/Trp/Tyr/Val (McCavera *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2012), Gly329Ser/Ala/Phe/Asp (revisado em Wolstenholme, 2010), Pro316Ser/Ala/Leu, Asp220Ala e Leu222Ala (Yamaguchi *et al.*, 2012), encontradas em *Haemonchus contortus*, todas na região extracelular N-terminal próxima à transmembrana M1 (III - Figura 2) da subunidade GLUCL α 3, também têm sido associadas à resistência a essa classe de endectocidas. No organismo modelo *Caenorhabditis elegans* são necessárias mutações simultâneas em três genes codificando subunidades α de canais de Cl⁻ dependentes de L-glutamato, GLUCL α 1, GLUCL α 2 e GLUCL α 3, para o estabelecimento de resistência à IVM (Dent *et al.*, 2000). Essa descoberta é mais uma evidência de que as macrolactonas se ligam a diferentes canais “Cys-loop LGIC” e sugere a necessidade de mutações em diferentes alvos, responsáveis por diferentes vias de sinalização do sistema nervoso, para que a resistência ocorra.

Estudos de sensibilidade à IVM em receptores de vertebrados demonstram que as alterações Ala288Thr/Phe (III - Figura 2 - Lynagh & Lynch, 2010a; 2010b), no domínio M3 do receptor humano permeável a Cl⁻ e dependente do neurotransmissor glicina (GLYR α 1), possivelmente ortólogo ao GLUCL α invertebrado (Vassilatis *et al.*, 1997), estão associadas a modificações na sensibilidade à IVM. Do mesmo modo, as substituições de aminoácidos Ala225Asp, Gln272Val, Thr456Val e Cys459Tyr no receptor nAChR α 7 de *Rattus norvegicus*, estão associadas à reduções da sensibilidade à IVM (Collins & Millar, 2010).

1.5 JUSTIFICATIVA

Alguns trabalhos recentes têm identificado os mecanismos moleculares da resistência aos inseticidas organofosforados e piretróides na mosca-da-bicheira *C. hominivorax* (Carvalho *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2009, Carvalho *et al.*, 2010b; Carvalho, 2010; Silva e Azeredo-Espin, 2009) os quais são utilizados como produtos larvicidas nas feridas já infestadas. No entanto, nenhum trabalho ainda foi realizado visando identificar os mecanismos moleculares responsáveis pela resistência aos produtos contendo lactonas macrocíclicas na mosca-da-bicheira. Assim, baseando-se nos estudos desenvolvidos em outras espécies, no intenso uso das macrolactonas para controle da mosca-da-bicheira no Brasil e na grande importância econômica e veterinária dessa espécie para a pecuária nacional, é de fundamental importância que estudos sejam conduzidos em *C. hominivorax* visando identificar mecanismos moleculares de resistência que resultem no desenvolvimento de métodos de diagnóstico molecular rápido de indivíduos resistentes auxiliando no controle dessa espécie.

1.6 OBJETIVO

Tendo em vista a intensa utilização das lactonas macrocíclicas no controle e prevenção da mosca-da-bicheira e os relatos de resistência a tais produtos, este projeto tem como objetivo principal caracterizar a região gênica codificante da subunidade α do canal de cloreto dependente de L-glutamato (GluCl α), sítio alvo de lactonas macrocíclicas. Além disso, a sequência dessa região codificante será comparada entre indivíduos *sobreviventes* e *não-sobreviventes* provenientes de bioensaio realizado em geração de *C. hominivorax* da criação do Laboratório de Genética e Evolução Animal, e visando a comparação, identificar a(s) mutação(ões) relacionada(s) à resistência a tais endectocidas.

Parte II. CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA SUBUNIDADE α DO CANAL DE CLORETO DEPENDENTE DE L-GLUTAMATO (*GluCl α*)

Capítulo 1

CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO CODIFICANTE DO *GluCl α*

A caracterização do *GluCl α* em *C. hominivorax* (Ch*GluCl α*), além de ser pela primeira vez investigada nesta espécie, permitirá a comparação entre os seus diferentes *alelos* encontrados. Também possibilitará a comparação entre as regiões codificantes (cDNA) do Ch*GluCl α* e de genes ortólogos já identificados em outras espécies podendo revelar mutações em *C. hominivorax* que foram anteriormente encontradas em outros invertebrados que apresentaram resistência às macrolactonas ou de novas ainda não relatadas na literatura.

1.1 METODOLOGIA DETALHADA

Amostras de C. hominivorax

As amostras foram obtidas da criação do Laboratório de Genética e Evolução Animal. Essa criação provem de larvas coletadas em 2006 no município de Caiapônia - GO, diretamente de feridas de animais infestados e tratados com ivermectina (IVM) na dose recomendada pelo fabricante. Dessa forma, ainda podem existir alelos associados à resistência à IVM. As larvas foram mantidas até a fase adulta como descrito por Infante & Azeredo-Espin (1995) e mantidas por aproximadamente 110 gerações sucessivas sem nenhum tratamento com macrolactonas. Larvas no estágio larval L3, foram identificadas por meio de lupa e período do desenvolvimento e congeladas à -70°C para a posterior extração de RNA total com a finalidade de sintetizar o cDNA.

Extração de RNA total e síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada a partir do RNA total extraído separadamente de 4 larvas no estágio larval L3 pesando aproximadamente 50 mg cada, previamente identificadas e congeladas à -70°C. Cada indivíduo foi colocado em um tubo de 1,5 ml, e os tubos colocados em isopor contendo gelo. Em cada um dos tubos foram adicionados 400 μ L de Trizol (Invitrogen) com o objetivo de realizar a homogenização do tecido larval. Após isso, adicionou-se 600 μ L de Trizol, completando 1 ml do mesmo, misturando a solução em vortex e incubando por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados

200 µL de clorofórmio, misturados em vortex e incubados à temperatura ambiente por 3 minutos. Centrifugou-se a solução por 15 minutos à 12.800 rpm à 5°C. A fase aquosa formada foi removida para um tubo novo e foram adicionados 500 µL de isopropanol e a solução incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se novamente à 12.800 rpm por 15 minutos à 5°C. O sobrenadante foi removido e ao precipitado restante foi adicionado 1 ml de etanol 75%, misturado em vortex e centrifugado à 8.300 rpm à 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e após deixar o precipitado secando por 10 minutos, este foi ressuspensionado em 40 µL de água DEPC. Eletroforese em gel de agarose revelou a integridade do RNA extraído. A quantificação do RNA total foi realizada no aparelho Qubit™ fluorometer (Life Technologies™) de acordo com o recomendado pelo fabricante.

Para a retirada de resíduos de DNA genômico (DNAg), após a quantificação do RNA total extraído foram retirados 4 µg, misturados em tubo de 1,5 ml juntamente com 0,8 µL de TURBO™ DNase (Life Technologies™), 2 µL de 10X TURBO™ DNase Buffer (Life Technologies™), 0,5 µL de RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas) e água completando 20 µL. A reação foi colocada à 37°C por 30 minutos seguida de adição de 2 µL de EDTA e aquecimento à 75°C por 10 minutos. Eletroforese em gel de agarose revelou a degradação do DNAg após realização de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando-se “primers” que hibridizam em trecho de DNAg de *C. hominivorax*.

Construiu-se o cDNA através da reação de RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) com o kit “RevertAid First Strand cDNA Synthesis” (Fermentas). Em isopor com gelo, foram colocados tubos de 1,5 ml livres de RNase e nestes foram misturados 1 µL do oligonucleotídeo ou “primer” oligodT₁₈VN (0.5 µg/µL), 1 µg do RNA total tratado e quantificado e H₂O-DEPC completando 12,5 µL. A mistura foi aquecida à 70°C por 5 minutos, centrifugada rapidamente e, em seguida, foram adicionados 4 µL de 5X Reaction Buffer (Fermentas), 0,5 µL de “RiboLock™ RNase Inhibitor” (Fermentas), 2 µL de dNTP (10 mM) e 1 µL de “RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase” (200 U/µl) foram adicionados. A mistura foi aquecida a 42°C por 1 hora, finalizando com aquecimento por 10 minutos na temperatura de 70°C e depois armazenadas à -20°C.

Amplificação do cDNA por PCR

Para a obtenção do cDNA completo do ChGluCl α foram testados 8 “primers” (Tabela 1; Figura 3). Desses “primers” testados, o conjunto F1, F2, F3, F4, R1, R2 e R3 foi sintetizado baseando-se na sequência parcial do ChGluCl α obtida através da caracterização do transcriptoma de *C. hominivorax* por Carvalho *et al.* (2010a), e apenas o “primer” R4 foi sintetizado baseado-se no alinhamento múltiplo entre as

sequências codificantes do *GluCl α* de *L. cuprina* (GenBank - AF081674.1), *D. melanogaster* (GenBank - NM_142570.2) e *M. domestica* (GenBank - AB177546.1) realizado pelo software ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Observando-se no alinhamento uma região conservada na posição do “stop codon”, o “primer” R4 foi sintetizado utilizando a sequência de *L. cuprina*.

Tabela 1: “Primers” utilizados nos testes para obtenção das melhores combinações para sequenciar o cDNA completo de Ch*GluCl α* . Em azul “primer” R4, construído a partir da sequência do *GluCl α* de *L. cuprina*.

“Primer”	Sequência no sentido 5’ - 3’
F1	AACCGGCCATTATTTCTGG
F2	ATGCAAGAATACGACCATCC
F3	CCTTTGGATCGTCAAGTCTG
F4	ACCAGCTCGTGTATCATTGG
R1	CGACTATAGCGGGACCATC
R2	TTCAAATTCATGGGACATGC
R3	GATCAAGCCAGAATGACACC
R4	ACTCATCCTCCTCTTCACGG

Com o intuito de testar as melhores condições para a PCR, as reações foram realizadas variando a temperatura de hibridização dos “primers” e as concentrações dos constituintes da reação. Foram testados os pares de “primers” F1/R3, F4/R4, F2/R2, F3/R3, F3/R4, F1/R1, F1/R2 e F2/R3 (Tabela 1; Figura 3). Uma vez identificado que os pares F1/R3 e F3/R4 amplificavam a porção 5’ e 3’, respectivamente, do cDNA de Ch*GluCl α* (Figura 3) com excelente rendimento na reação, estes foram utilizados em todas as amplificações seguintes para a caracterização do cDNA dos 4 indivíduos anteriormente citados e, posteriormente, utilizados na caracterização do cDNA de Ch*GluCl α* de parte dos indivíduos oriundos do bioensaio (Capítulo 2).

As concentrações finais para a reação do par F1/R3 em 25 μ L: 1X de tampão “10X *Taq* Buffer with KCl”, 0,25 mg/ml de BSA, 14 μ M de cada dNTP, 2,8 mM de $MgCl_2$, 0,4 μ M de cada “primer”, 1,5 U de “*Taq* DNA Polymerase” e 1 μ L de cDNA. Para o par F3/R4 as concentrações foram as mesmas exceto: 10 μ M de cada dNTP, 2,4 mM de $MgCl_2$ e 0,16 μ M de cada “primer”.

As reações de PCR foram realizadas no termociclador “MJ Research PTC-200” (MJ Research) e as condições de amplificação para o par F1/R3 foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos (1 ciclo) seguido de 35 ciclos, sendo cada ciclo composto de 95°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com 1 ciclo a 72°C por 7 minutos. As mesmas condições foram utilizadas para o

par F3/R4, exceto a temperatura de hibridização dos “primers”, que foi de 60°C. A visualização dos fragmentos corados em brometo de etídeo foi em transiluminador UV.

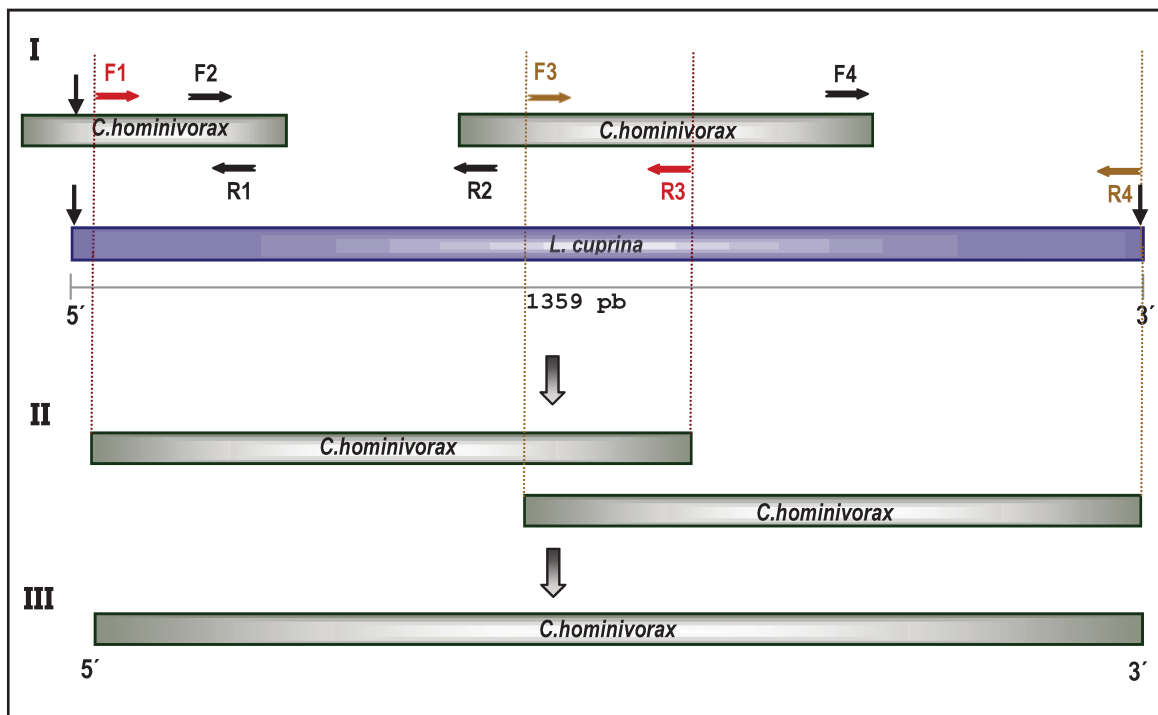


Figura 3: I - Esquema mostrando a localização da hibridização dos “primers” utilizados nos testes em *C. hominivorax* nos dois fragmentos de cDNA de *ChGluCl α* obtidos por Carvalho *et al.* (2010a) e na região correspondente no cDNA do *GluCl α* de *L. cuprina*. Setas verticais à esquerda localizam as posições correspondentes do códon iniciador ATG em ambas as sequências, enquanto a seta vertical à direita localiza a posição do “stop codon” em *L. cuprina*. II - O par de “primers” em vermelho F1/R3 foi escolhido para amplificar a porção 5’ enquanto o par em marrom F3/R4 amplificou a porção 3’ do cDNA do *ChGluCl α* . III - Utilizando a região de sobreposição entre as sequências das duas porções 5’ e 3’ foi realizada a montagem do cDNA. *C. hominivorax*=*Cochliomyia hominivorax*. *L. cuprina*=*Lucilia cuprina*. pb=pares de bases.

Clonagem e sequenciamento

Os dois fragmentos principais, amplificados pelos pares de “primers” F1/R3 e F3/R4, foram purificados com o kit “Invisorb® Fragment CleanUp” (Invitex). O fragmento amplificado pelo par F1/R3 (Figura 4) foi purificado diretamente da reação de PCR, enquanto o fragmento amplificado pelo par F3/R4 foi purificado a partir do gel de agarose, após eletroforese, devido à presença de fragmentos inespecíficos (Figura 4). Os fragmentos foram ligados em vetor plasmidial com o kit “pGEM®-T Easy Vector System I” (Promega) e, após a ligação, transformados em células competentes de *E. coli* DH5 α e plaqueados em meio LB (Luria-Bertani) sólido contendo ampicilina (50 μ g/ml) e X-Gal (0.8mg por placa). Seguiram-se a minipreparação de DNA plasmidial como descrito por Sambrook *et al.* (1989), digestão do DNA por *EcoRI* e visualização em transiluminador UV após corar com brometo de etídeo em gel de agarose. O DNA

plasmidial foi sequenciado usando o “Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Kit”, versão 3.1 (ABI Prism™, Perkin Elmer) bidirecionalmente utilizando os “primers” universais M13⁺ e M13⁻ e uma parte dos fragmentos foi analisada no sistema de sequenciamento automático ABI 3.737 (Life Technologies™), enquanto outra parte no sistema ABI 3.500xL (Life Technologies™). Três clones de cada um dos fragmentos 5’ e 3’ das 4 larvas utilizadas foram sequenciados.

Análise das sequências

As sequências obtidas, analisadas nos sistemas de sequenciamento automático ABI 3.737 ou no sistema ABI 3.500xL (Life Technologies™), foram verificadas através do software “FinchTV” versão 1.4 (Perkin Elmer®). As porções 5’ e 3’ sequenciadas foram utilizadas para a montagem da região codificante completa do *GluCl α* com o auxílio do software “CAP 3” (Huang & Madan, 1999).

Através do aplicativo BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) as sequências obtidas foram submetidas a buscas por similaridades no banco de sequências GenBank. A comparação entre as sequências obtidas de *C. hominivorax* e as sequências de genes ortólogos *GluCl α* foram realizadas através do alinhamento múltiplo com o auxílio do software ClustalX (Thompson *et al.*, 1997).

As sequências nucleotídicas de cDNA completo de *C. hominivorax* foram traduzidas na sequência de aminoácidos pelo software “ORF Finder” (NCBI). Utilizando o aplicativo BLASTP, foram realizadas buscas por identidades entre as sequências de aminoácidos obtidas e as sequências de GLUCL α armazenadas nos bancos de dados, de modo a verificar domínios conservados entre as sequências de ChGLUCL α e as de proteínas pertencentes à superfamília de canais iônicos dependentes de ligantes “Cys-loop LGIC”. Uma análise complementar com o intuito de verificar a que grupo funcional pertencem as sequências obtidas foi realizada através do software “InterProScan”, encontrado no endereço “www.ebi.ac.uk/interpro/”.

A determinação dos domínios comuns encontrados na superfamília “Cys-loop LGIC” foi realizada através de diferentes softwares. A região do peptídeo sinal (Figura 7) foi predita utilizando os resultados de cinco softwares, sendo estes, “SignalP v.4.0” (Petersen *et al.*, 2011), “SIG-Pred” (www.bmbpcu36.leeds.ac.uk), “Signal-3L” (Shen & Chou, 2007), “MEMSAT-SVM” (Nugent & Jones, 2009) e “SOSUISignal” (Gomi *et al.*, 2000). Em seguida, as regiões transmembrana (M1-M4 - Figura 7) foram obtidas através do uso de 10 softwares para predição de topologia protéica, utilizando parâmetros de entrada padrão e após a retirada manual do peptídeo sinal, necessária para uma predição correta (Bertaccini & Trudell, 2002). Os softwares foram os seguintes: “TMHMM” versão 2.0 (Krogh *et al.*, 2001),

“DAS” (Cserzo *et al.*, 1997), “PHDhtm” (Rost *et al.*, 1996), “Spoctopus” (Viklund *et al.*, 2008), “HMMTop” (Tusndy & Simon, 2001), “MEMSAT3” (Jones, 2007), “MEMSAT-SVM” (Nugent & Jones, 2009), “MemPype” (Pierleoni *et al.*, 2011), “Prodiv-TMHMM” (Viklund & Elofsson, 2004) e “MemBrain” (Shen & Chou, 2008). Foi obtida uma média entre os resultados dos softwares anteriormente citados, com relação às posições iniciais, centrais e finais de cada um dos domínios, com a finalidade de otimizar a predição, como recomendado por Bertaccini & Trudell (2002).

1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amplificação do cDNA por PCR

Inicialmente, foi realizada a extração do RNA total das larvas de 3 estágio (L3), que apresentou rendimento médio de 1g/L e, em seguida, o tratamento desse RNA extraído para eliminação do DNA genômico. Após o tratamento, foi realizada a síntese da fita simples de cDNA a partir do RNA total extraído, utilizando o “primer” oligodT₁₈VN como iniciador, hibridizando-se na cauda poliA dos RNAm.

Uma vez obtida excelente amplificação da região 5 do cDNA utilizando o par de “primers” F1/R3, este par foi usado em todas as amplificações seguintes dessa região, produzindo um fragmento de aproximadamente 850 pb (I - Figura 4), o que está de acordo com a região homóloga correspondente nas sequências de *L. cuprina*, *D. melanogaster* e *M. domestica*.

Também para a região 3 do cDNA em *C. hominivorax* apenas uma combinação de “primers”, F3/R4, foi utilizada, resultando na amplificação de um fragmento de aproximadamente 850 pb (II - Figura 4), igualmente ao observado na amplificação da região 5. Esse fragmento de 850 pb está de acordo com o esperado considerando o tamanho da região homóloga nas sequências de *L. cuprina*, *D. melanogaster* e *M. domestica*. Além do fragmento esperado de 850 pb, também foram observados fragmentos amplificados inespecíficos, menores do que o fragmento principal (II - Figura 4), surgindo, assim, a necessidade de extração do fragmento esperado a partir do gel de agarose.

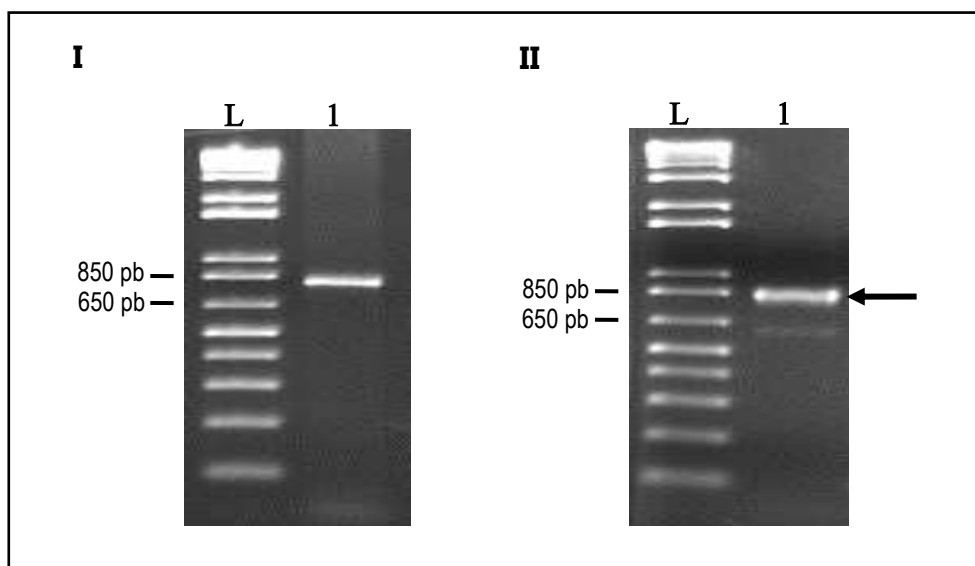


Figura 4: I - Eletroforese em gel de agarose (2%) do produto de PCR amplificado pelo par de “primers” F1/R3 (coluna 1) representando a porção 5’ da região codificante do *GluCl α* em *C. hominivorax*. II – Eletroforese em gel de agarose (2%) do produto de PCR amplificado pelo par de “primers” F3/R4 (coluna 1) representando a porção 3’ da região codificante do cDNA de *GluCl α* . A seta representa o fragmento cortado do gel para posterior sequenciamento. L = padrão de peso molecular “1 Kb Plus DNA Ladder” (Invitrogen).

De acordo com as sequências de *L. cuprina*, a região de sobreposição entre as regiões 5’ e 3’ amplificadas em *C. hominivorax* é de aproximadamente 250 nucleotídeos, distância suficiente para uma montagem segura das duas sequências.

Dessa forma, as amplificações das sequências das regiões 5’ e 3’ permitiram a obtenção da sequência da região codificante completa do Ch*GluCl α* em *C. hominivorax*.

Análise das sequências

Uma vez que os “primers” F1 e R3, ambos específicos para *C. hominivorax* e sintetizados com base no transcriptoma obtido por Carvalho *et al.* (2010a), apresentaram excelente rendimento na amplificação da região 5’ do cDNA do Ch*GluCl α* em *C. hominivorax*, eles foram usados na caracterização dessa região. Através da amplificação realizada com esse par foi obtido um fragmento consenso de 806 pb, correspondendo às posições 6 - 811 (Figura 5) da sequência nucleotídica da região codificante do Lc*GluCl α* em *L. cuprina* (GenBank - AF081674.1), possuindo também 806 pb. Os nucleotídeos nas posições 1 - 5 da região codificante do Ch*GluCl α* foram obtidos de trecho desse gene sequenciado por Carvalho *et al.* (2010a) no qual está o códon iniciador “ATG”.

<i>C. hominivorax</i>	ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA	[70]
<i>L. cuprina</i>	T.....T.....A...T.....	[70]
<i>C. hominivorax</i>	ATGCCAAAATAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAGTCTTAGATCAAATTTAGGTGCAGGCAAATATGA	[140]
<i>L. cuprina</i>		[140]
<i>C. hominivorax</i>	TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAATGGAACGGAAAAATTTACCCACGTATGTCTATGTCAACATGTTT	[210]
<i>L. cuprina</i>	C.....	[210]
<i>C. hominivorax</i>	CTACGGTCAATTTCAAAGATCGACGATTACAAAATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT	[280]
<i>L. cuprina</i>	T.....A.....T.....A.....	[280]
<i>C. hominivorax</i>	GGACTGATGAACGTTTGAAATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	[350]
<i>L. cuprina</i>	G.....C.....C.....A.....C..	[350]
<i>C. hominivorax</i>	TCGTGTTTGGATGCCTGATTGTTTTCTCCAATGAAAAGAGGGTCATTTCACAATATCATTATGCCG	[420]
<i>L. cuprina</i>	...A.....C...C...C...T.....A	[420]
<i>C. hominivorax</i>	AATGTTTATATACGTATTTTCCAATGGTTCAGTTCGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	[490]
<i>L. cuprina</i>	C.....C.....A.....	[490]
<i>C. hominivorax</i>	GTCCCATGAATTTGAAATTATATCCTTTGGATCGTCAAGTCTGTTCACTACGTATGGCCAGTTATGGCTG	[560]
<i>L. cuprina</i>	G.....A.....A.T.....	[560]
<i>C. hominivorax</i>	GACTACAAATGATCTTGTCTTCTGTGGAAGAAGGTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	[630]
<i>L. cuprina</i>	T..T.....	[630]
<i>C. hominivorax</i>	CCTCGCTTTACACTCGAAAAATCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	[700]
<i>L. cuprina</i>	G.....T.....	[700]
<i>C. hominivorax</i>	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTCTCATATTACTTAATTCAAATTTATATCCCATGCTG	[770]
<i>L. cuprina</i>		[770]
<i>C. hominivorax</i>	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACCAGCTCGTGTATCATTG	[840]
<i>L. cuprina</i>		[840]
<i>C. hominivorax</i>	GGTGTAACTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT	[910]
<i>L. cuprina</i>	C..C.....T.....	[910]
<i>C. hominivorax</i>	ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTCGC	[980]
<i>L. cuprina</i>	.C....G.....G.....C.....G....	[980]
<i>C. hominivorax</i>	CTTGGTGAATTATGCTTCCGCTCAGACATGCACAAGGAGAACATGAAAAGAAACGTAGAGATTGGAG	[1050]
<i>L. cuprina</i>	C....G.....T.....AC.G.....	[1050]
<i>C. hominivorax</i>	CAGGCCAGTATAGATGCTGCTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTGCAATGAAACCTT	[1120]
<i>L. cuprina</i>	A..C.....	[1120]
<i>C. hominivorax</i>	TGGTACGTCATCCGGTGATCCATTGGCATTGGAAGTTGAGACAATGTGAAGTTCATATGCAGCCACC	[1190]
<i>L. cuprina</i>	C.....	[1190]
<i>C. hominivorax</i>	AAAACGTCCAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATGTTCTAGATCGAAGAGA	[1260]
<i>L. cuprina</i>	C.....C.....	[1260]
<i>C. hominivorax</i>	ATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTGGTCTACTGGAGCACCT	[1330]
<i>L. cuprina</i>	A.....C..G.....C.....	[1330]
<i>C. hominivorax</i>	ACCTATTCGGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	[1359]
<i>L. cuprina</i>		[1359]

Figura 5: Alinhamento entre a sequência nucleotídica consenso de *C. hominivorax* obtida e de *L. cuprina* (GenBank - AF081674.1).

Para a amplificação da região 3' do cDNA do *GluCl α* de *C. hominivorax* foram utilizados os “primers” F3, específico para *C. hominivorax*, e R4, sintetizado baseando-se na posição do “stop codon” na sequência de *L. cuprina*. A região 3' consenso obtida por esse par de “primers” compreende 844 pb, o que corresponde às posições 514 - 1357 da sequência nucleotídica da região codificante desse gene em *L. cuprina*. Os nucleotídeos nas posições 1358-1359 da região codificante do Ch*GluCl α* correspondem às 2° e 3° posições do “stop codon” do Lc*GluCl α* .

Após o alinhamento, foi obtida a região codificante do Ch*GluCl α* com 1359 pb (Figura 5), possuindo identidade nucleotídica de 96% com a sequência de *L. cuprina*, e o mesmo tamanho. A região codificante do Ch*GluCl α* apresentou, ainda, identidade nucleotídica de 82% com a região codificante do *GluCl α* de *D. melanogaster* (transcrito variante RI) e com a região correspondente no *GluCl α* de *M. domestica* foi apresentada identidade de 89%. A conservação nucleotídica entre estes genes sugere que o Ch*GluCl α* é ortólogo ao *GluCl α* destas espécies.

Dentre os 4 indivíduos sequenciados com a finalidade de caracterizar a região codificante do gene Ch*GluCl α* em *C. hominivorax*, foram encontradas “deleções”/“inserções” nas sequências nucleotídicas nas regiões 5' e 3' analisadas (Figura 6). Essas alterações podem ter se originado através do mecanismo de “splicing” alternativo do pré-RNAm, muito comum nos transcritos dos genes da superfamília “Cys-loop LGIC”, a qual pertence o *GluCl α* . Um dos principais exemplos ocorre em *D. melanogaster*, onde o gene *GluCl α* possui 11 transcritos alternativos, nos quais o mecanismo de “splicing” alternativo tem importante função na origem desses transcritos (www.flybase.org; Semenov & Pak, 1999).

I. Trecho da região 5'		
Ch_1	AAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTCTCATATTACTTAATTCAAATTTATATCCCATGCTGTATGC	[770]
Ch_2.1	AAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTCTCATATTACTTAATTCAAATTTATATCCCATGCTGTATGC	[770]
Ch_2.2	AAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTCT-----ACTTAATTCAAATTTATATCCCATGCTGTATGC	[764]
Ch_3	AAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTCTCATATTACTTAATTCAAATTTATATCCCATGCTGTATGC	[770]
Ch_4	AAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTCTCATATTACTTAATTCAAATTTATATCCCATGCTGTATGC	[770]
II. Trecho da região 3'		
Ch_1	TGAATTGTGCTTCCCGCTCAGATCGGGCCGCAGACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGA	[1050]
Ch_2.1	TGAATTATGCTTCCCGCTCAGATCGGGCCGCAGACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGA	[1050]
Ch_2.2	TGAATTATGCTTCCCGCTCAGA-----CATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGA	[1032]
Ch_3	TGAATTATGCTTCCCGCTCAGA-----CATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGA	[1038]
Ch_4	TGCATTATGCTTCCCGCTCAGA-----CATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGA	[1038]

Figura 6: I. Trecho do alinhamento das sequências codificantes da região 5' do *GluCl α* dos 4 indivíduos usados na caracterização deste gene. II. Trecho de alinhamento das sequências codificantes da região 3' do *GluCl α* dos 4 indivíduos usados na caracterização deste gene. Em cinza estão as posições das “deleções”/“inserções” entre 2 sequências do indivíduo Ch_2 analisadas (Ch_2.1 e Ch_2.2) e entre as sequências deste e dos indivíduos Ch_1, Ch_3 e Ch_4. Ch_1 = indivíduo 1; Ch_2.1 = transcrito variante do indivíduo 2; Ch_2.2 = transcrito variante do indivíduo 2; Ch_3 = indivíduo 3; Ch_4 = indivíduo 4.

A tradução da sequência de nucleotídeos consenso do Ch*GluCl α* resultou na sequência de 452 aminoácidos em *C. hominivorax* (Figura 7), que difere em apenas 1 aminoácido da sequência de 452 aminoácidos do GLUCL α em *L. cuprina*, e resulta em 99% de identidade entre estas sequências. A sequência predita de aminoácidos do Ch*GluCl α* em *C. hominivorax* também apresentou alta similaridade com as sequências de *M. domestica* (95%) e com a sequência da isoforma “PI” de *D. melanogaster* (94%) (Figura 7).

A sequência predita de aminoácidos do GLUCL α de *C. hominivorax* apresentou domínios conservados encontrados no grupo “Cys-loop LGIC” (Figura 7), tais como um grande domínio extracelular N-terminal, onde se liga o neurotransmissor endógeno, dois resíduos de cisteína separados por 13 resíduos, característicos desse grupo, 4 domínios transmembrana, importantes para a formação do canal e a permeabilidade, e um grande “loop” intracelular entre os domínios transmembrana M3 e M4 (Knipple & Soderlund, 2010). Além disso, a sequência apresentou dois resíduos de cisteína adicionais, característicos de alguns membros da família de canais de cloreto (HISCL1, HISCL2, pHCL, GLYR α e GLUCL α - Kniple & Soderlund, 2010; Betz & Laube, 2006).

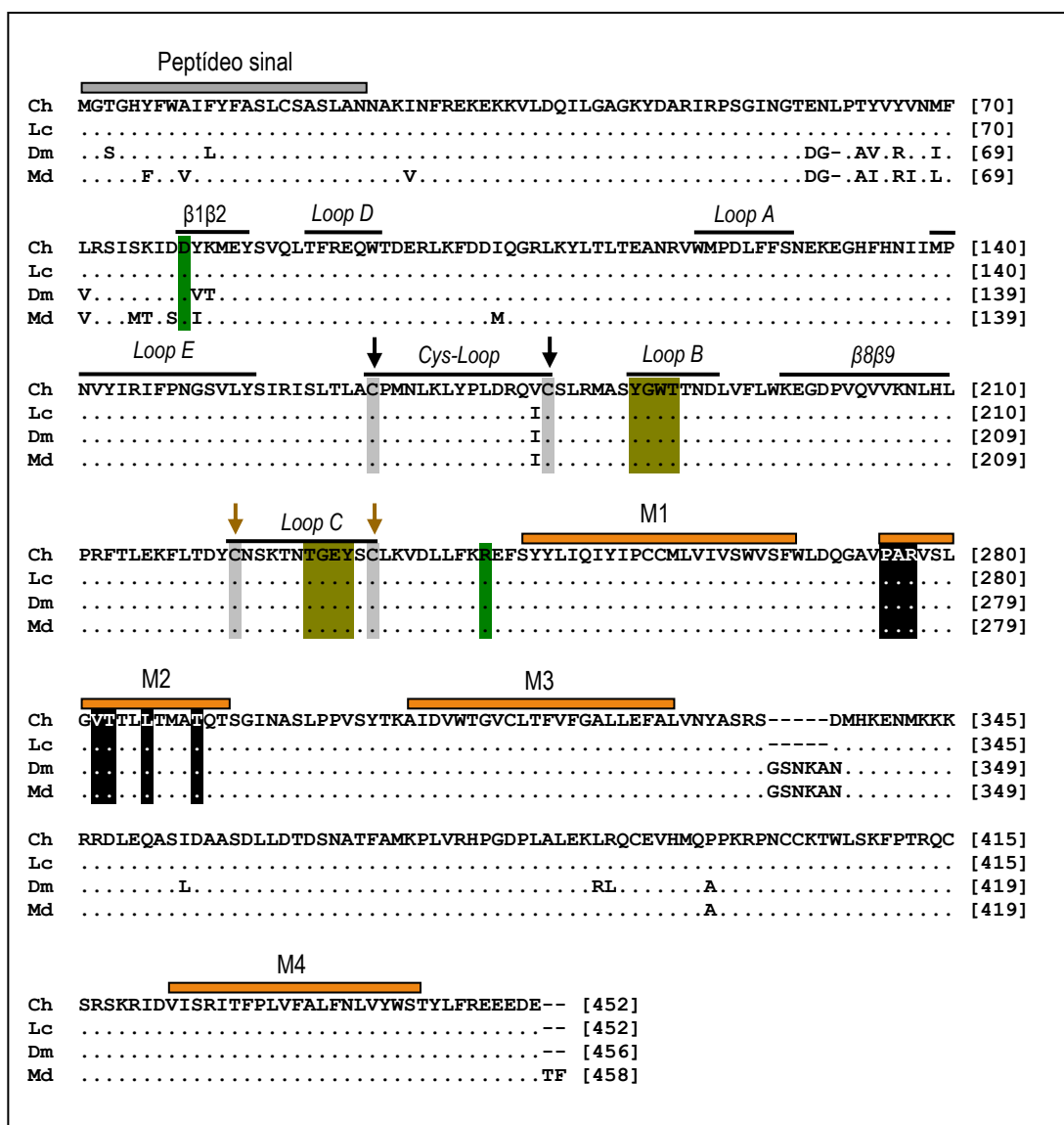


Figura 7: Alinhamento realizado no software ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) e editado no BioEdit Seq. Align. Ed. (Hall, 1999) da sequência predita de aminoácidos consenso do ChGLUCL α (Ch) obtida no estudo, com as sequências dos genes ortólogos de *L. cuprina* (Lc), *M. domestica* (Md) e com a isoforma “P1” do ortólogo em *D. melanogaster* (Dm) M1 - M4 = domínios transmembrana. Em cinza resíduos de cisteína conservados na superfamília “Cys-Loop LGIC” (setas pretas) (Cederholm *et al.*, 2009) e em alguns canais de cloreto dependente de ligantes (setas marrons) (Kniple & Soderlund, 2010; Betz & Laube, 2006). Em marrom sítios preditos de ligação do L - glutamato (Knipple & Soderlund, 2010). Em verde resíduos preditos por Sine & Engel (2006) como conservados em todos os membros da superfamília citada. Em preto resíduos preditos como responsáveis pela seletividade por Cl⁻ (Jensen *et al.*, 2005). Traços escuros representam domínios “Loop” extracelulares característicos da superfamília “Cys-Loop LGIC” (Corringer *et al.*, 2000).

A alta identidade entre a sequência de aminoácidos do $GLUCL\alpha$ de *C. hominivorax* e as sequências de *L. cuprina* (família: Calliphoridae), *M. domestica* e *D. melanogaster* demonstra que são sequências próximas e que o gene *GluCl α* é bastante conservado entre esses dípteros comparados.

A caracterização da região codificante do *GluCl α* em *C. hominivorax* é fundamental para a etapa de análise de mutações nessa espécie que estejam envolvidas em algum nível de resistência à IVM, em que o gene *GluCl α* esteja envolvido, e se essas mutações também são encontradas em outros dípteros, resultando em resistência ao mesmo inseticida.

Capítulo 2

BIOENSAIO PARA OBTENÇÃO DE INDIVÍDUOS POSSIVELMENTE RESISTENTES À IVERMECTINA

A seleção adequada das concentrações de um inseticida para a realização de um bioensaio é um processo repetitivo (Robertson *et al.*, 1984; Miller *et al.*, 2010), e passível de erros ao longo da sua realização (Miller *et al.*, 2010). Sendo assim, foram realizados, inicialmente, 3 *bioensaios testes* com diferentes concentrações com os seguintes objetivos:

- 1 - Obter as concentrações ideais de ivermectina (IVM) a serem utilizadas no *bioensaio definitivo*;
- 2 - Determinar o período necessário, a ser usado no *bioensaio definitivo*, para a observação da mortalidade larval em contato com a IVM;

Baseado nos resultados preliminares desses bioensaios iniciais foi realizado o *bioensaio definitivo*, do qual foram obtidas as larvas utilizadas na verificação de alterações na região codificante do gene *ChGluCl α* . Todas as larvas utilizadas em cada um dos *bioensaios testes* e no *bioensaio definitivo* foram escolhidas aleatoriamente, retiradas da mesma linhagem de laboratório e pertencentes ao 2º estágio larval (L2) de *C. hominivorax*. Todos os bioensaios foram realizados entre dezembro de 2011 e fevereiro de 2012 no Laboratório de Genética e Evolução Animal do CBMEG – UNICAMP.

2.1 METODOLOGIA DETALHADA

Amostras de C. hominivorax

As amostras utilizadas nessa etapa possuem a mesma origem das amostras utilizadas na Parte I, na qual foi realizada a caracterização do cDNA do *GluCl α* de *C. hominivorax*.

Bioensaios testes

Foram realizados 3 *bioensaios testes*, utilizando diferentes concentrações do inseticida IVM, na tentativa de encontrar as concentrações ótimas que apresentassem mortalidades graduais e próximas às concentrações letais de 50 (CL50) e 90% (CL90) dos indivíduos testados, como recomendado por Robertson *et al.* (1980, 1984). O inseticida utilizado em todos os bioensaios foi o Ivomec® injetável (MERIAL), composto por solução a 1% peso/volume (p/v) de IVM e sendo um dos produtos mais utilizados na pecuária brasileira. A IVM comercial utilizada é formada pela mistura de duas moléculas análogas, a

22,23 dihidroavermectina B1a ($C_{48}H_{74}O_{14}$) e a 22,23 dihidroavermectina B1b ($C_{47}H_{72}O_{14}$) em uma relação aproximada de 9:1 (revisado em Prichard *et al.*, 2012; Figura 1). Cada *bioensaio teste* foi realizado em uma única replicata para cada concentração utilizada e sem o grupo controle. Uma vez que as finalidades desta etapa foram apenas obter informações preliminares sobre as concentrações de IVM e o tempo de observação da mortalidade, e que as larvas destes testes não seriam usadas nas análises, o grupo controle não foi usado nestes testes iniciais. Os períodos de observação (24 e 48 hs) utilizados nos bioensaios, foram baseados nos períodos utilizados em bioensaios realizados com ivermectina em *Haematobia irritans* (Allingham *et al.*, 1994) e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Klafke *et al.*, 2006).

Para permitir a construção de uma reta de regressão linear mais adequada (Gráfico 1), as concentrações de IVM utilizadas foram escolhidas de forma a estarem dentro de uma série geométrica (Bliss, 1935; Robertson *et al.*, 1980). Ao colocar esses dados no eixo “X”, que está em uma escala logarítmica de base 10, obtêm-se os dados simetricamente distribuídos e aproximadamente lineares, permitindo melhor ajuste para a reta de regressão (Bliss, 1934, 1935; Robertson *et al.*, 2002).

A escolha inicial das concentrações de IVM se baseou na dose recomendada pelo fabricante para aplicação no sistema sanguíneo de 200 µg/Kg de massa corporal (2 µL de solução Ivomec® em 100 g de “meio” do bioensaio). Desse modo, o *bioensaio teste 1* foi realizado utilizando 5 concentrações de IVM, sendo elas, 0.05 ppm (0.5 µL de solução de Ivomec® em 100 g de “meio”), 0.2 ppm (2 µL), 2 ppm (20 µL), 20 ppm (200 µL) e 200 ppm (2000 µL). O “meio” (dieta) utilizado compõe-se, neste primeiro bioensaio e em todos os bioensaios realizados, de mistura contendo carne bovina moída e solução de sangue bovino e água (proporção de 2:1) resultando em massa total de 100 g por recipiente. Os recipientes utilizados são potes plásticos circulares com 11 cm de diâmetro e 4 cm de altura com tampas adaptadas com tela para a passagem de ar (Figura 8). Cada uma das respectivas doses foi aplicada no “meio” contido em cada um dos 5 recipientes, separadamente, utilizando pipeta automática e uma ponteira diferente para cada dose administrada, de modo que não houvesse adição de IVM na ponteira da dose seguinte, sendo que cada uma das doses foi homogeneizada separadamente no “meio”. Após a mistura das doses foram colocadas 30 larvas de *C. hominivorax* em cada um dos 5 recipientes, totalizando 150 larvas. Nesse primeiro bioensaio e em todos os bioensaios realizados, os recipientes foram deixados em sala escura, devido à sensibilidade do inseticida à luz. Observou-se, após um período de 48 horas, a mortalidade em cada uma das concentrações de IVM.

O critério utilizado para classificar as larvas como “viva” ou “morta”, em todos os bioensaios, foi a motilidade. As larvas que apresentaram motilidade mínima, logo após serem retiradas do “meio” e colocadas em papel toalha, foram consideradas vivas.

O *bioensaio teste 2*, realizado na geração larval seguinte (~após 21 dias), possui o mesmo período de 48 horas para a observação da mortalidade das larvas e as mesmas concentrações de IVM utilizadas no *bioensaio teste 1*, diferenciando-se deste primeiro bioensaio apenas na forma de aplicação do inseticida. Para o *bioensaio teste 2* aplicou-se cada dose do inseticida, separadamente, em frascos de tipo falcon contendo 30 ml (~30 g) de solução de sangue bovino e água (proporção de 2:1) que foi fechado e teve sua solução misturada vigorosamente, por 20 segundos, permitindo que todo o inseticida estivesse homogêneo na solução (Figura 8). Esta mistura foi espalhada sobre 70 g de carne bovina moída em cada um dos recipientes, os quais receberam 30 larvas de *C. hominivorax* cada um, totalizando 150 larvas. Após isso, os recipientes foram deixados em sala escura.

Baseando-se nos resultados do *bioensaio teste 2* foram escolhidas as concentrações de 0.1 ppm (1 µL), 0.32 ppm (3.2 µL), 1 ppm (10 µL) e 3.2 ppm (32 µL) para o *bioensaio teste 3*. Este terceiro bioensaio, realizado com a geração larval seguinte à geração utilizada no segundo bioensaio, possui o mesmo método de aplicação da IVM utilizado no segundo bioensaio. Após o período de exposição de 48 horas dos bioensaios anteriores, foi observado que o “meio” encontrava-se em elevado estado de decomposição, o que poderia causar a morte de larvas e, desse modo, interferir na mortalidade atribuída à IVM. Assim, o tempo de observação da mortalidade das larvas em contato com o inseticida foi reduzido de 48 para 24 horas com o objetivo de reduzir a mortalidade possivelmente associada à decomposição do “meio” utilizado.

Neste bioensaio também foram colocadas 30 larvas de *C. hominivorax* em cada um dos 4 recipientes com suas respectivas concentrações de inseticida, totalizando 120 larvas. As concentrações testadas foram deixadas em sala escura, do mesmo modo ao realizado nos bioensaios anteriores.

Bioensaio definitivo

Após a realização dos 3 bioensaios iniciais foi considerado como ideal para o *bioensaio definitivo* o grupo de doses aplicado no *bioensaio teste 3*, no qual ocorreu mortalidade gradual dos indivíduos ao longo das doses aplicadas. Com a finalidade de aumentar a pressão de seleção exercida pelo inseticida e obter larvas sobreviventes a uma concentração de inseticida com mortalidade mais próxima de 100%, foi adicionada a concentração de 10 ppm (100 µL). Além do aumento da pressão de seleção, a adição de uma dose maior possibilita a construção, neste bioensaio, de uma reta de regressão linear (Gráfico 1) que

permite a estimativa de uma concentração letal CL90 mais precisa (Robertson *et al.*, 1984). Optou-se pela retirada da concentração de 0.1 ppm (1 µL) de IVM uma vez que a utilização de 120 larvas e de 4 doses por replicata está de acordo com o recomendado por Robertson *et al.* (1984) para a realização de bioensaios. A permanência desta dose extra geraria um excesso de larvas que não contribuiria significativamente para a otimização do bioensaio de forma a justificar seu uso (Robertson *et al.*, 1984).

Este bioensaio final foi realizado em 3 repetições para cada dose administrada, sendo 30 larvas por dose em cada replicata, totalizando 90 larvas na triplicata (Figura 8). O grupo controle foi realizado em replicata única com 30 larvas. Deste modo, o *bioensaio definitivo* utilizou um total de 390 larvas.

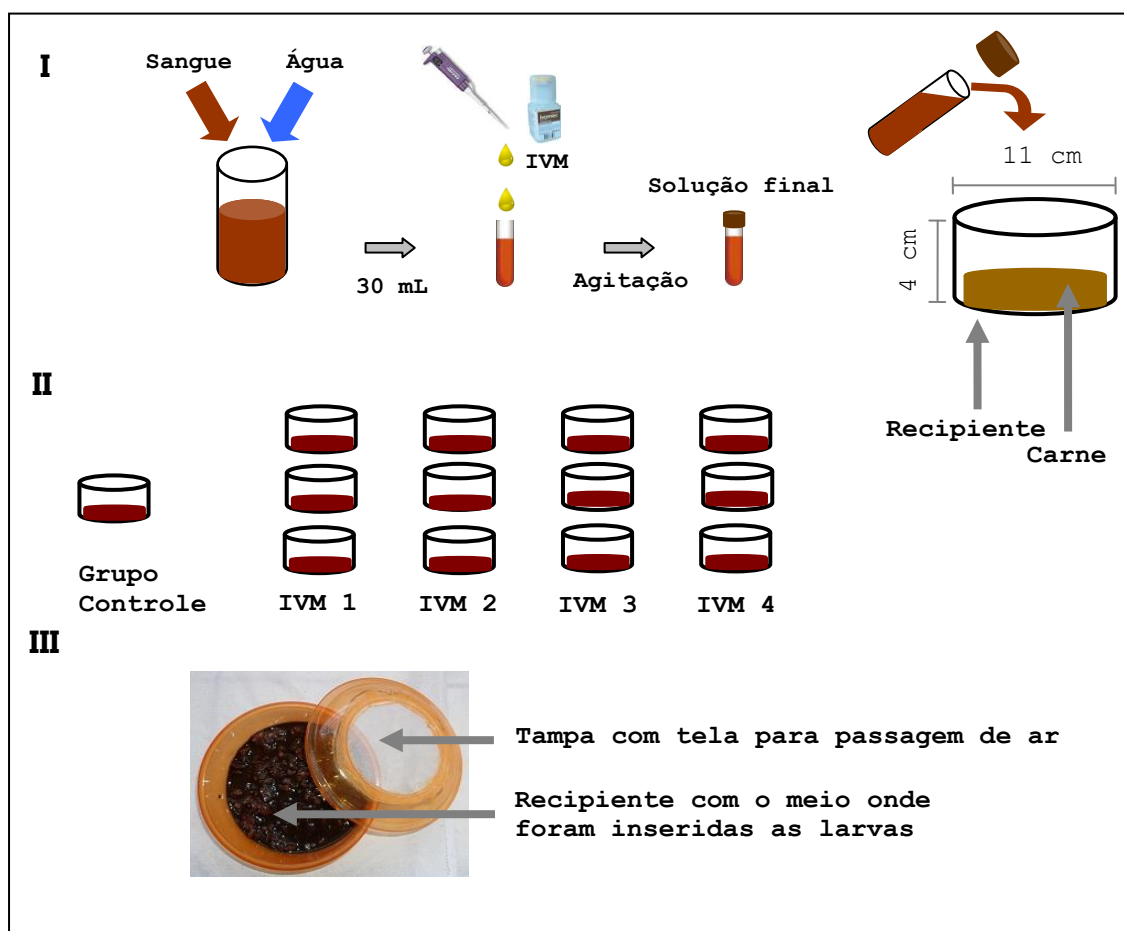


Figura 8: I – Esquema mostrando a preparação da solução final com IVM a ser aplicada na carne nos recipientes do *bioensaio definitivo*. II - Esquema do *bioensaio definitivo* mostrando o grupo controle e as triplicatas de cada concentração de IVM utilizada: Grupo controle = 0 ppm; IVM 1 = 0.32 ppm; IVM 2 = 1 ppm; IVM 3 = 3.2 ppm; IVM 4 = 10 ppm. III – Imagem do recipiente com o “meio” utilizado e da tampa modificada com a colocação de uma tela para passagem de ar. IVM = ivermectina.

Neste bioensaio, realizado na geração larval seguinte à geração do terceiro bioensaio, foi adicionado o grupo controle. No grupo controle foram mantidas todas as outras condições encontradas nas replicatas com o inseticida, sem a adição de IVM. Foram testadas as concentrações de 0.32 ppm (3.2 µL),

1 ppm (10 µL), 3.2 ppm (32 µL) e 10 ppm (100 µL). A aplicação da IVM neste bioensaio final seguiu o mesmo método utilizado no *bioensaio teste 2*.

Passado o período estabelecido de 24 horas, as larvas vivas e mortas de cada concentração, classificadas de acordo com o descrito previamente, foram colocadas separadamente em tubos de tipo “falcon” e imediatamente congeladas em freezer - 70°C para posterior extração de RNA total.

Deste bioensaio final foram utilizados dois grupos para a extração de RNA total, sendo o grupo “A” formado pelas larvas mortas na menor concentração (0.32 ppm) representando os indivíduos suscetíveis, e o grupo “B” formado pelas larvas sobreviventes na maior concentração (10 ppm) representando os indivíduos possivelmente resistentes, os quais poderiam conter polimorfismos relacionados à resistência à IVM.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bioensaios testes

Os *bioensaios testes* utilizados foram realizados com o objetivo de obter dados sobre a mortalidade larval e sobre o tempo ideal de observação desta mortalidade em contato com a IVM, de forma a auxiliar no desenho experimental do *bioensaio definitivo*. Os resultados encontrados nos 3 bioensaios iniciais, com diferentes concentrações de IVM testadas e diferentes períodos de observação, foram essenciais na elaboração do bioensaio final, pois a partir deles foi possível otimizar as concentrações de inseticida e o período ideal.

Tabela 2: Resultado do *bioensaio teste 1* com Ivomec®. Concentrações de IVM e mortalidades após 48 horas.

	Concentração (ppm)	0.05	0.2	2.0	20	200	TOTAL
<i>Bioensaio teste 1</i>	Mortos	4	2	30	30	30	96
	Vivos	26	28	0	0	0	54
	TOTAL	30	30	30	30	30	150

O resultado deste bioensaio mostra que não houve mortalidade gradual entre as dosagens administradas e que houve maior número de mortos na concentração de 0.05 ppm em relação à concentração seguinte, de 0.2 ppm. A mortalidade menor em uma concentração de inseticida maior demonstra que a IVM pode não estar homogênea o suficiente no “meio” para permitir o contato entre todas

as larvas testadas e o inseticida, de modo que um segundo bioensaio com uma nova forma de homogenização do inseticida foi necessário, mantendo-se o mesmo período de 48 horas.

Como observado na Tabela 3 e descrito previamente, a forma de aplicação do inseticida nos *bioensaios testes 2 e 3* e no bioensaio definitivo, diferenciada em relação à forma de aplicação de IVM no primeiro bioensaio, representou um modo mais eficiente de homogenização do inseticida, uma vez que este modo de aplicação torna a IVM distribuída de forma mais uniforme sobre o “meio” onde se encontram as larvas, o que possivelmente explica as diferenças encontradas entre as mortalidades do primeiro e o segundo *bioensaios testes*.

Tabela 3. Resultado do *bioensaio teste 2* com Ivomec®. Concentrações de IVM e mortalidades após 48 horas.

<i>Bioensaio teste 2</i>	Concentração (ppm)	0.05	0.2	2.0	20	200	TOTAL
	Mortos	8	22	30	30	30	120
	Vivos	22	8	0	0	0	30
	TOTAL	30	30	30	30	30	150

Após a realização do *bioensaio teste 2* observou-se que as concentrações de IVM utilizadas, muito diferentes entre si, não foram adequadas, devido ao fato de não ter sido observado mortalidade gradual ao longo das dosagens aplicadas, necessárias para uma estimativa mais adequada da reta de regressão linear (Gráfico 1 - Robertson *et al.*, 1980). Além disso, o contato excessivo de 48 horas entre as larvas e o inseticida, e a decomposição do “meio”, nestes dois dias, podem ter contribuído com a mortalidade larval neste segundo *bioensaio teste* (Tabela 3). O estado de decomposição avançada do “meio”, após 48 horas, pode causar a morte de larvas, prejudicando a interpretação dos dados relativos à mortalidade pela IVM. Diante disso, optou-se pela alteração das concentrações de IVM, tornando-as mais próximas entre si e pela redução do tempo de observação em um terceiro bioensaio (Tabela 4). Por este motivo, no terceiro *bioensaio teste*, o período de observação do experimento foi reduzido para 24 horas.

Tabela 4. Resultado do *bioensaio teste 3* com Ivomec®. Concentrações de IVM e mortalidade após 24 horas.

<i>Bioensaio teste 3</i>	Concentração (ppm)	0.1	0.32	1.0	3.2	TOTAL
	Mortos	0	11	17	23	51
	Vivos	30	19	13	7	69
	TOTAL	30	30	30	30	120

No *bioensaio teste 3* houve mortalidade larval gradual e, sendo assim, foram utilizadas as concentrações de IVM deste bioensaio teste para a composição do *bioensaio definitivo* (Tabela 5), com exceção da concentração de 0.1 ppm (1 µL), retirada, e da concentração de 10 ppm (100 µL), que foi adicionada.

Bioensaio definitivo

A partir dos dados obtidos com os *bioensaios testes* foi planejado o bioensaio final com IVM, que teve como objetivo selecionar indivíduos possivelmente resistentes e verificar se um dos sítios alvo de IVM, o canal de Cl⁻ dependente de L - glutamato, possui alterações em alguma posição similar às encontradas em outras espécies ou em alguma frequência que poderia correlacioná-las com a sobrevivência das larvas em contato com o inseticida.

Tabela 5: Resultado das triplicatas do *bioensaio definitivo* com Ivomec®. Mortalidade após 24 horas; Números entre parênteses representam o número da replicata.

<i>Bioensaio definitivo</i>	Concentração (ppm)	0	0.32 (1)	0.32 (2)	0.32 (3)	1.0 (1)	1.0 (2)	1.0 (3)	3.2 (1)	3.2 (2)	3.2 (3)	10 (1)	10 (2)	10 (3)	TOTAL
	Mortos	2	15	10	10	16	11	12	13	20	18	25	25	22	199
	Vivos	28	15	20	20	14	19	18	17	10	12	5	5	8	191
	Mortalidade (%)	6.7	39			43			57			80			-
	TOTAL	30	90			90			90			90			390

Em relação às larvas na condição “viva” foi observado, após o período de 24 horas, que possuíam tamanho e movimento muito reduzidos, quando colocadas em papel toalha, em comparação com as larvas do grupo controle, possivelmente significando a interferência do inseticida. A análise estatística pelo teste exato de Fisher mostrou diferença significativa ($P = 0,0006$) entre as mortalidades do grupo controle e a encontrada no grupo que recebeu a menor concentração de IVM (0.32 ppm).

Com os dados deste bioensaio obteve-se a reta de regressão linear (Gráfico 1), a partir da qual realizou-se a análise estatística e a estimativa de seus parâmetros (Tabela 6).

A partir da construção da reta de regressão linear utilizando o software PoloPlus© versão 1.0 foi possível estimar o ponto onde ocorre mortalidade de 50% (CL50) e, por extrapolação desta mesma reta, estimou-se o ponto no qual ocorreria mortalidade de 90% (CL90) com os respectivos intervalos de 95% de confiança.

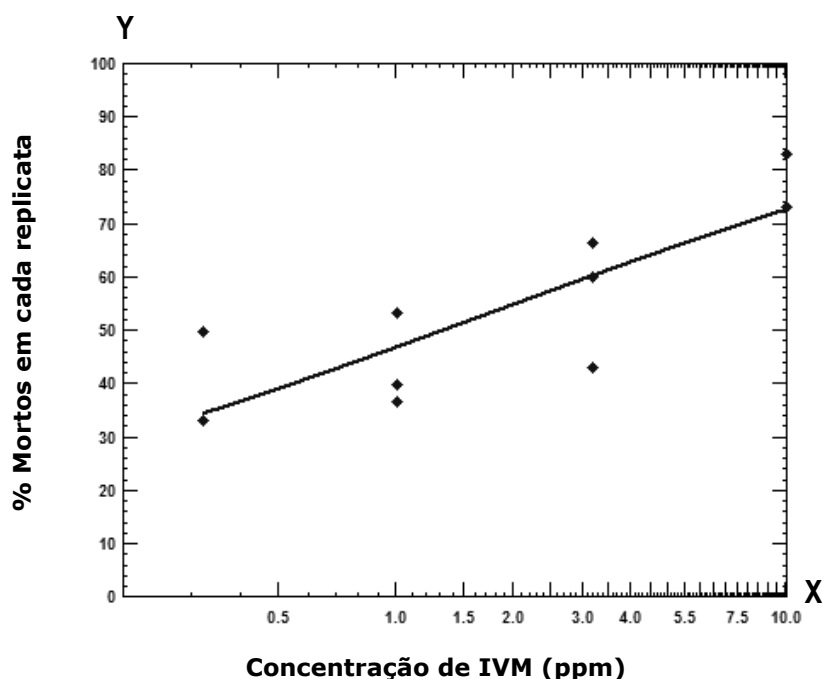


Gráfico 1: Reta de regressão linear obtida pelo programa PoloPlus© 1.0 (LeOraSoftware Company) para o *bioensaio definitivo* realizado em triplicatas. Relação entre a % de mortalidade em cada replicata versus a concentração de IVM.

A maior precisão do intervalo de confiança de 95% para a CL50 em relação ao intervalo para a CL90 deve-se ao fato das concentrações de IVM utilizadas estarem mais próximas e ao redor da CL50 (Tabela 6). De acordo com Robertson *et al.* (1984) para uma estimativa mais precisa da CL90 seria necessária pelo menos uma dose com taxa de mortalidade menor ou igual à 10%, enquanto o restante das doses deveriam ter taxas acima de 75%, diferentemente do resultado observado na Tabela 5.

Tabela 6: Estimativas obtidas pelo software PoloPlus© versão 1.0 a partir da reta de regressão linear. EP = erro padrão.

<i>Estimativas</i>	<i>Intervalo de</i>		<i>CL90 (ppm)</i>	<i>Intervalo de 95% de confiança CL90 (ppm)</i>	<i>Coefficiente de regressão ± EP</i>	<i>t de Student</i>
	<i>CL50 (ppm)</i>	<i>95% de confiança CL50 (ppm)</i>				
<i>Valor</i>	1,735	0,555 – 4,34	104,61	22,696 – 13749	0,720 ± 0,156	4,619

O valor do coeficiente de regressão (Tabela 6) da reta obtida indica que há uma correlação linear positiva, com as duas variáveis aumentando no mesmo sentido, e uma forte associação entre o aumento da concentração de IVM e o aumento da mortalidade larval.

De forma a verificar se a associação entre as taxas de mortalidade e as respectivas concentrações de IVM é significativa foi realizado o teste de significância para o coeficiente de regressão. Considerando que a hipótese nula de independência entre as taxas de mortalidade e as concentrações seja verdadeira, a probabilidade dos resultados deste experimento serem devido ao acaso é de 0,13% ($P = 0,0013$; $t = 4,619$). Portanto, foi rejeitada a hipótese nula e considerou-se que há relação entre as taxas de mortalidade e as respectivas concentrações de IVM.

Capítulo 3

CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES POSSIVELMENTE ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA À IVM E DE POSSÍVEIS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DO *GluCl α*

A comparação do cDNA do *GluCl α* caracterizado a partir das larvas provenientes do *bioensaio definitivo* foi realizada entre os dois grupos já citados, sendo o grupo “A” composto de indivíduos mortos na menor concentração de IVM, 0.32 ppm (suscetíveis), e o grupo “B” composto de indivíduos sobreviventes na maior concentração, 10 ppm (possíveis resistentes).

Para a análise inicial do cDNA do *GluCl α* de *C. hominivorax*, 10 indivíduos de cada grupo tiveram a região codificante sequenciada completamente para a comparação e verificação de alguma alteração na sequência que possa estar relacionada com resistência à IVM. Posteriormente, apenas uma região compreendendo 672 pb do *GluCl α* de 10 novas larvas, sendo 5 mortas e 5 sobreviventes, foi sequenciada, considerando-se a localização e a frequência das principais mutações encontradas. No total, 30 larvas dos dois grupos tiveram a região codificante do *GluCl α* analisada.

3.1 METODOLOGIA DETALHADA

Amostras de C. hominivorax

As amostras utilizadas para a verificação de mutações possivelmente associadas à resistência e de isoformas que podem ter origem através do mecanismo de “splicing” alternativo foram coletadas no *bioensaio definitivo*, dos grupos citados, como descrito no capítulo 2.

Extração de RNA total e síntese do cDNA

O RNA total foi extraído de 30 larvas, separadamente, sendo 15 larvas provenientes do grupo “A” e 15 larvas provenientes do grupo “B”, utilizando Trizol (Invitrogen) e a metodologia descrita no capítulo 1.

Para a construção do cDNA foi utilizada a mesma metodologia descrita na caracterização do cDNA de *ChGluCl α* (Capítulo 1), com exceção do volume e da quantificação do RNA total. Nessa etapa, foram utilizados 11,5 μ l de RNA total extraído, volume máximo permitido pelo kit “RevertAid First Strand cDNA Synthesis” (Fermentas), de forma a obter um melhor rendimento na RT-PCR. Uma vez que as larvas no estágio L2 possuem menor quantidade de RNAm disponível para a RT-PCR do que as no estágio L3,

utilizadas na caracterização do cDNA do Ch*GluCl α* , o volume máximo de RNA total foi utilizado, dispensando a necessidade da etapa da quantificação.

Amplificação do cDNA por PCR

Nesta etapa, a amplificação do cDNA de Ch*GluCl α* foi realizada com a utilização dos pares de “primers” F1/R3, F3/R4, F2/R3 e F1/R4 (Tabela 7; Figura 9), de eficiência testada na caracterização inicial do *GluCl α* (Capítulo 1). Os “primers” F1, F2, F3 e R3 foram construídos especificamente para *C. hominivorax* baseados em trechos de cDNA de Ch*GluCl α* obtidos por Carvalho *et al.* (2010a), enquanto o oligonucleotídeo R4 foi obtido através do alinhamento múltiplo das sequências de genes *GluCl α* de *L. cuprina* (GenBank - AF081674.1), *D. melanogaster* (GenBank - NM_142570.2) e *M. domestica* (GenBank - AB177546.1). Com a identificação de uma região conservada na posição do “stop codon”, foi sintetizado o “primer” R4 baseando-se na sequência de *L. cuprina*.

Para a amplificação das regiões 5' e 3' do cDNA foram utilizados os pares de “primers” F1/R3 e F3/R4, respectivamente. As condições de amplificação para ambos os pares foram as descritas no capítulo 1. Com a finalidade de verificar se os pares de “primers” F1/R3 e F3/R4 poderiam amplificar DNA genômico em Ch*GluCl α* nas condições utilizadas e, desse modo, amplificar regiões com introns, foi realizada a tentativa de amplificação, substituindo o cDNA utilizado por 1 μ L de DNA genômico de *C. hominivorax*. No caso de não haver amplificação de DNA genômico a etapa de retirada desse DNA do RNA total, utilizando TURBO™ DNase (Life Technologies™), poderia ser evitada.

Tabela 7: “Primers” utilizados na amplificação das regiões 5' e 3' da região codificante do Ch*GluCl α* em larvas do *bioensaio definitivo*. Em azul “primer” construído utilizando a sequência de Lc*GluCl α* .

“Primer”	Sequência no sentido 5' - 3'
F1	AACCGGCCATTATTTCTGG
F2	ATGCAAGAATACGACCATCC
F3	CCTTTGGATCGTCAAGTCTG
R3	GATCAAGCCAGAATGACACC
R4	ACTCATCCTCCTCTTCACGG

Além da amplificação das regiões 5' e 3' da região codificante do Ch*GluCl α* separadamente, também foi realizada a amplificação da região codificante completa do *GluCl α* em *C. hominivorax* utilizando o “primer” F1, direto e específico para *C. hominivorax*, e o “primer” reverso R4, sintetizado a partir do

Lc*GluCl α* (Figura 3). Inicialmente, foram testadas diversas temperaturas de hibridização dos “primers”, na tentativa de obter condições ótimas de amplificação, sem a presença de fragmentos inespecíficos. Sendo assim, um gradiente de temperatura de hibridização entre 55° e 63°C foi testado, resultando em rendimento ótimo para as reações na temperatura de 61°C, embora fragmentos inespecíficos tenham sido observados.

As condições de amplificação para esse par em um volume final de 25 μ L foram as seguintes: 1X de tampão “10X *Taq* Buffer with KCl”, 0.25 mg/ml de BSA, 56 μ M de cada dNTP, 2.8 mM de MgCl₂, 0.4 μ M de cada “primer”, 1.5 U de “*Taq* DNA Polymerase” e 1 μ L de amostra de cDNA. Em um termociclador “PTC-200” (MJ Research), usado na amplificação de todos os fragmentos, essa reação foi submetida a um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos compostos, cada um, de 95°C por 1 minuto (desnaturação), 61°C por 1 minuto (hibridização) e 72°C por 1 minuto e 30 segundos (extensão). Em seguida, uma etapa de extensão a 72°C por 15 minutos foi adicionada de modo a aumentar o rendimento da reação.

Após a obtenção da região codificante completa de Ch*GluCl α* e a identificação de mutações utilizando 20 larvas dos dois grupos do *bioensaio definitivo*, 10 larvas adicionais (5 de cada grupo) tiveram o fragmento, contendo as alterações consideradas principais, amplificado com o “primer” direto F2 e o “primer” reverso R3, ambos sintetizados especificamente para *C. hominivorax* com base no sequenciamento do transcriptoma dessa espécie obtido por Carvalho *et al.* (2010a).

Com a finalidade de obter a melhor temperatura de hibridização do par de “primers” F2/R3, um gradiente de temperatura entre 54° e 58°C foi testado. A temperatura mais elevada, de 58°C, apresentou melhor rendimento na amplificação dessa região, embora tenham ocorridos fragmentos inespecíficos. Para as reações contendo esse par de “primers” as concentrações para o volume final de 25 μ L e as condições usadas no termociclador foram as mesmas descritas para as reações de amplificação da região codificante completa com o par F1/R4, exceto a temperatura de hibridização, ajustada para 58° C, e o tempo final de extensão de 72°C, alterado para 10 minutos. Baseado na sequência caracterizada descrita no capítulo 1, foi esperado um fragmento de aproximadamente 1352 pb (III - Figura 9) para a região codificante completa e para o fragmento menor, amplificado pelos “primers” F2 e R3, um fragmento de cerca de 672 pb (II - Figura 9).

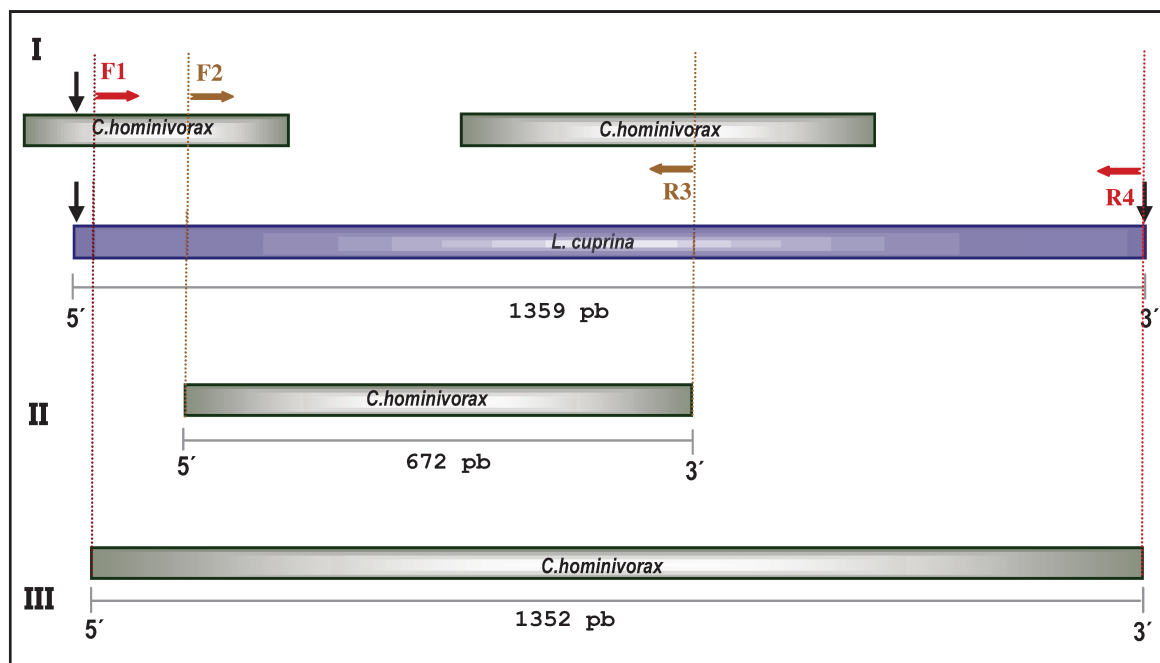


Figura 9: I - Esquema mostrando a localização, em *C. hominivorax* e *L. cuprina*, da hibridização de "primers" utilizados na amplificação do cDNA do *ChGluCl α* das larvas do *bioensaio definitivo*; o par de "primers" F1/R4 amplificou a região codificante completa de *ChGluCl α* ; o par F2/R3 amplificou o fragmento onde foram identificadas mutações consideradas principais. Setas pretas verticais à esquerda localizam as posições correspondentes do códon iniciador "ATG" em ambas as sequências, enquanto a seta preta vertical à direita localiza a posição do "stop codon" em *L. cuprina*. II - Posição do fragmento de cDNA de *ChGluCl α* , de tamanho esperado de 672 pb, amplificado pelo par F2/R3 para verificação de mutações identificadas. III - Posição da região codificante completa do *ChGluCl α* , de tamanho esperado de 1352 pb, amplificado pelo par F1/R4. *C. hominivorax*=*Cochliomyia hominivorax*. *L. cuprina*=*Lucilia cuprina*. pb=pares de bases.

Clonagem e sequenciamento

Para a obtenção da sequência nucleotídica das regiões 5' e 3' do cDNA e da sequência do cDNA completo de *ChGluCl α* foi realizada a clonagem desses fragmentos para posterior sequenciamento. Para o fragmento amplificado pelo par F2/R3 foram realizadas duas estratégias. Uma delas foi o sequenciamento direto dos produtos de PCR, após purificação, e a outra foi a realização do procedimento de clonagem para posterior sequenciamento.

Para os fragmentos obtidos foi realizada a purificação dos produtos de PCR amplificados usando o kit "illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification" (GE Healthcare). Devido à presença de fragmentos inespecíficos em algumas amostras, a região 3', o fragmento obtido com os "primers" F2 e R3 e o fragmento amplificado pelo par de "primers" F1/R4, foram purificados a partir do gel de agarose (Figura 10), enquanto a região 5' (I - Figura 10) foi purificada diretamente da reação de PCR. Após a purificação, os fragmentos foram ligados em vetor plasmidial com o kit "pGEM®-T Easy Vector System I" (Promega) e, após a ligação, transformados em células competentes de *E. coli* DH5 α por meio de choque químico. As

células transformadas foram plaqueadas em meio LB (Luria-Bertani) sólido contendo ampicilina (50µg/ml) e X-Gal (0.8 mg por placa) para que fossem identificadas as colônias recombinantes. Para a extração do DNA plasmidial das colônias recombinantes foi realizada a minipreparação do DNA plasmidial por lise alcalina, através do procedimento descrito por Sambrook *et al.* (1989). De maneira a verificar a presença e o tamanho do fragmento inserido, o plasmídeo foi digerido com a endonuclease *EcoRI*. A digestão plasmidial foi visualizada em luz UV após eletroforese em gel de agarose seguida de tratamento em brometo de etídeo. Entre os plasmídeos que tiveram o fragmento inserido 3 clones foram usados para o sequenciamento.

O DNA plasmidial foi sequenciado usando o “Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Kit”, versão 3.1 (ABI Prism™, Perkin Elmer). Para as reações de sequenciamento foram usadas uma etapa inicial a 96°C por 1 minuto (1 ciclo) para desnaturação, que foi seguida por 35 ciclos de 96°C por 12 segundos, 50°C por 6 segundos e 60°C por 4 minutos. Essa reação foi purificada adicionando-se 80 µL de etanol 80% em cada tubo, seguido por um período de incubação de 15 minutos e centrifugação por 30 minutos. Após isso, o sobrenadante foi descartado e 150 µL de etanol 70% foram adicionados, com nova centrifugação por 10 minutos e descarte do sobrenadante, em seguida. O DNA precipitado foi ressuspensão em 3 µL de TE para posterior sequenciamento. Os “primers” universais M13⁺ e M13⁻ e o “primer” F3 foram usados no sequenciamento.

Análise das sequências

Parte das sequências obtidas foi analisada no sistema de sequenciamento automático ABI 3.730 (Life Technologies™) enquanto outra parte no sistema ABI 3.500xL (Life Technologies™). A verificação das sequências foi realizada pelo software “Sequence Scanner” versão 1.0 (Life Technologies™). Para a montagem da região codificante completa das larvas que tiveram as regiões 5’ e 3’ sequenciadas foi utilizado o software “CAP 3” (Huang & Madan, 1999).

Através do aplicativo BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) as sequências obtidas foram submetidas a buscas por similaridades no banco de sequências GenBank. As análises comparativas entre as sequências nucleotídicas foram realizadas através do alinhamento múltiplo utilizando o ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Uma vez que o “splicing” alternativo ocorre em diversos membros da superfamília “Cys-loop LGIC”, o alinhamento das sequências nucleotídicas possibilitou a busca por regiões de ocorrência de “splicing” no *ChGluCl α* . Para esta análise, foram usadas somente as sequências da região codificante completa do *GluCl α* amplificadas pelo par de “primers” F1/R4. A montagem da região codificante completa utilizando as

regiões 5' e 3', amplificados pelos pares de "primers" F1/R3 e F3/R4, respectivamente, pode resultar na união de éxons e padrões de "splicing" existentes na região 5' que não ocorrem com determinados padrões ou éxons na região 3', como observado nos transcritos alternativos do *GluCl α* em *D. melanogaster* (www.flybase.org).

As sequências nucleotídicas de cDNA de *C. hominivorax* foram traduzidas na sequência de aminoácidos pelo software "ORF Finder" (NCBI) e, em seguida, submetidas a buscas por identidades pelo aplicativo BLASTP, de modo a verificar domínios conservados entre as sequências de ChGLUCL α e as de proteínas pertencentes à superfamília "Cys-Loop LGIC", depositadas nos bancos de dados. Além dessas comparações, uma análise funcional e posterior classificação das sequências obtidas foram realizadas através do software "InterProScan" encontrado no endereço "www.ebi.ac.uk/interpro/".

Com a finalidade de verificar a ocorrência de alterações de aminoácidos possivelmente relacionadas com a resistência à IVM, as sequências traduzidas foram alinhadas pelo software ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). O alinhamento entre as sequências de aminoácidos de ChGLUCL α e de membros das superfamília "Cys-loop LGIC" foi realizado pelo software "PROMALS3D" (Pei *et al.*, 2008).

Análise das frequências das mutações

Entre os 18 indivíduos sobreviventes na maior concentração de IVM (10 ppm) e os 35 mortos na menor concentração (0,32 ppm), 10 indivíduos de cada grupo tiveram a região codificante completa sequenciada, inicialmente, para a verificação de mutações possivelmente relacionadas à resistência. Posteriormente, com a identificação de mutações, 5 indivíduos sobreviventes na concentração de 10 ppm e 5 indivíduos mortos na concentração de 0,32 ppm, tiveram o fragmento contendo a alteração considerada principal sequenciado.

Após o sequenciamento de 30 larvas e identificação de mutações, uma comparação da taxa de sobrevivência entre os principais genótipos encontrados foi realizada. Considerando independência entre os genótipos e a sobrevivência, a significância dos dados foi obtida utilizando o teste exato de Fisher (Lowry, 2013).

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amplificação do cDNA por PCR

Para a amplificação da região codificante completa de *ChGluCl α* foram utilizadas duas estratégias. Uma delas foi a amplificação das regiões 5' e 3', separadamente, para posterior montagem da região codificante completa, e a outra se refere à obtenção dessa região codificante a partir de reação de PCR com o uso de apenas um par de "primers".

As mesmas combinações de "primers" usadas na caracterização inicial do *ChGluCl α* (Capítulo 1) amplificaram, também nesta etapa, a região codificante completa do *GluCl α* dos indivíduos do *bioensaio definitivo*.

Para a região 5' do cDNA do *GluCl α* a amplificação pelos "primers" específicos F1 e R3 resultou um fragmento de aproximadamente 800 pb (I - Figura 10), enquanto a região 3', amplificada pelo "primer" específico F3 e o "primer" degenerado R4, resultou um fragmento de aproximadamente 850 pb (II - Figura 10). Esses fragmentos estão de acordo com o esperado, considerando-se a caracterização inicial do *GluCl α* de *C. hominivorax*, realizada e descrita no capítulo 1.

De acordo com a caracterização realizada no capítulo 1, os fragmentos 5' e 3' amplificados compreendem, cada um, aproximadamente metade da região codificante caracterizada do gene *GluCl α* (1359 pb), e possuem uma região de sobreposição, compartilhada por ambos os fragmentos, de 293 pb. Desse modo, a região codificante completa do *GluCl α* foi obtida.

Um segundo método para a obtenção da região codificante completa do *GluCl α* foi a realização da amplificação através da reação de PCR com um único par de "primers". Após a amplificação utilizando os "primers" F1 e R4, foi observado que, além do fragmento esperado de aproximadamente 1359 pb, fragmentos muito próximos haviam sido obtidos (III - Figura 10). Sabendo-se que a superfamília gênica "Cys-Loop - LGIC", a qual pertence o gene *GluCl α* , possui diversos genes nos quais ocorre o mecanismo de "splicing" alternativo (Copley, 2004; Jones & Sattelle, 2006, 2007; Jones *et al.*, 2010), incluindo o *GluCl α* de *D. melanogaster* (Semenov & Pak, 1999), é possível que esse mecanismo seja conservado no *GluCl α* de *C. hominivorax*. Como citado anteriormente, diferentes estratégias de "splicing" alternativo podem originar transcritos alternativos, tais como o uso de éxons alternativos e a seleção de diferentes sítios de "splicing" nas regiões 5' e 3' de éxons, além da retenção de íntrons e do uso de éxons mutuamente exclusivos (Revisado em Blencowe, 2006; Sprung *et al.*, 2011).

O mecanismo de “splicing” alternativo do pré-RNAm pode participar na determinação do tamanho dos transcritos maduros do gene *GluCl α* de *D. melanogaster*, os quais possuem entre 1406 (*GluCl α* – variante E) e 5417 (*GluCl α* – variante J) nucleotídeos (www.flybase.org; Marygold *et al.*, 2013). Neste contexto, a reação de PCR realizada utilizando cDNA de Ch*GluCl α* como molde poderia amplificar transcritos alternativos que eventualmente pudessem existir.

Considerando as evidências de transcritos alternativos encontrados na superfamília gênica citada, é possível que os fragmentos próximos ao fragmento principal (retângulo – Figura 10), nas amplificações com os “primers” F1 e R4, sejam transcritos alternativos do Ch*GluCl α* . Com a finalidade de verificar esse fato, a região no gel de agarose contendo o fragmento principal, juntamente aos fragmentos menores próximos, foi recortada após eletroforese (III - Figura 10) para posterior sequenciamento.

O fragmento amplificado pelo par de “primers” F2/R3 possui aproximadamente 650 pb (II - Figura 10), como esperado de acordo com a sequência caracterizada de *C. hominivorax*.

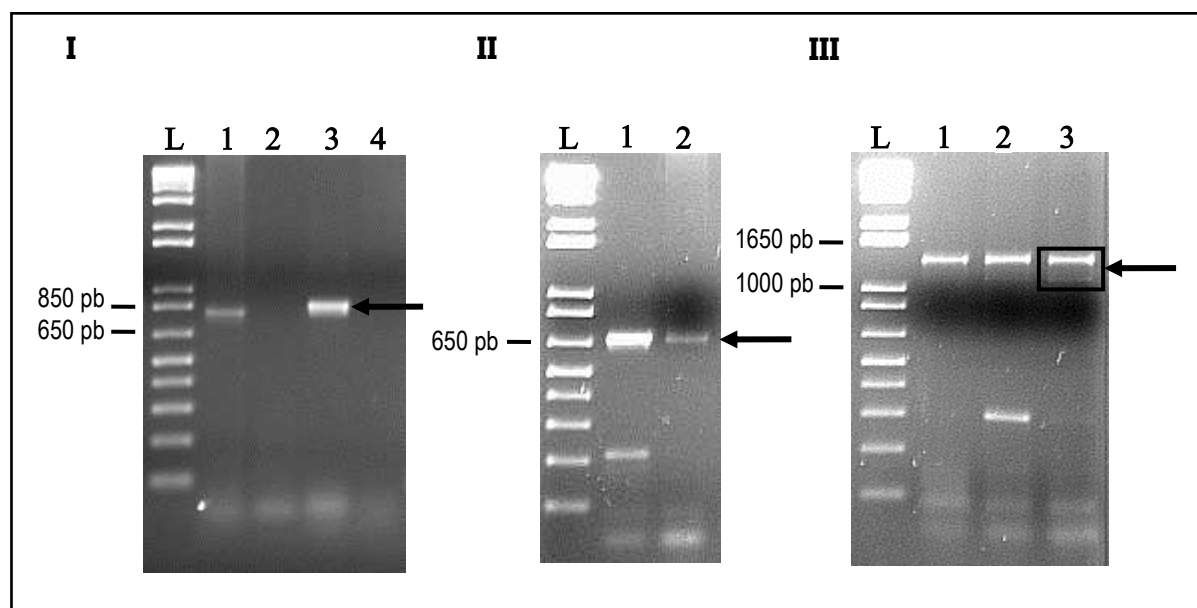


Figura 10: I - Análise em gel de agarose (2%) dos produtos de PCR amplificados com os pares de “primers” F1/R3 e F3/R4, usando cDNA como molde (colunas 1 e 3, respectivamente), e DNA genômico como controle negativo (colunas 2 e 4, respectivamente). Todas as amostras são de *C. hominivorax*. A seta representa o fragmento que foi recortado e purificado do gel. II - Análise em gel de agarose (2%) dos produtos de PCR amplificados com o par de “primers” F2/R3 (colunas 1 e 2) que foram recortados e purificados do gel, indicados pela seta. III - Análise em gel de agarose (2%) dos produtos de PCR amplificados pelo par de “primers” F1/R4. Retângulo, indicado pela seta, representa a região onde estão o fragmento principal (mais forte) e fragmentos menores logo abaixo (mais fraco), recortada e purificada do gel para sequenciamento. L = padrão de peso molecular “1 Kb Plus DNA Ladder” (Invitrogen).

Análise das sequências

A reação de amplificação da região 5' do cDNA do *GluCl α* em *C. hominivorax*, obtida através do “primers” específicos F1, direto, e R3, reverso, resultou na obtenção de diferentes fragmentos. Os fragmentos amplificados possuem 735, 803 e 806 pb e correspondem às posições 6-811 da sequência nucleotídica caracterizada no capítulo 1, embora apresentem, em algumas posições, “deleções” de sequências nucleotídicas características do mecanismo de “splicing” alternativo do pré-RNA. Os menores fragmentos encontrados, com 735 pb e 803 pb, apresentaram ausência de 71 e 3 pb, respectivamente, enquanto o fragmento de 806 pb não apresentou “deleção” de nenhum trecho, em relação à sequência nucleotídica de 806 pb da região 5' do Ch*GluCl α* caracterizado, apresentado no capítulo 1.

Os fragmentos amplificados da região 3' do cDNA de *GluCl α* apresentaram maior variabilidade entre si, compreendendo regiões codificantes de 691, 811, 814 e 844 pb. Os fragmentos correspondem às posições 514-1357 da região codificante caracterizada do Ch*GluCl α* . O alinhamento do fragmento de 691 pb com a região codificante 3' correspondente no Ch*GluCl α* caracterizado mostrou que esse fragmento possui sequências “deletadas” em 4 posições, que representam, juntas, uma ausência de 153 pb. Além desse fragmento, as regiões codificantes de 811 e 814 pb possuem, ambas, em regiões distintas, uma “deleção” de 45 pb e, em outras regiões, “inserções” de 12 pb e 15 pb, respectivamente. Desse modo, as alterações resultam em uma “deleção” de 33 pb para a sequência de 811 pb e para a sequência de 814 pb uma “deleção” de 30 pb. Como esperado, a variante que possui 844 pb não apresentou nenhuma alteração. As “deleções”/“inserções” destes fragmentos são em relação à região 3' da sequência codificante caracterizada do *GluCl α* no capítulo 1. As sequências amplificadas das regiões 5' e 3' apresentaram, ambas, identidade de 97 - 100% com as regiões correspondentes na sequência codificante caracterizada do Ch*GluCl α* .

Além da estratégia de sequenciar as regiões 5' e 3' da região codificante completa, foi realizado o sequenciamento do cDNA completo utilizando os “primers” F1, específico para *C. hominivorax*, e R4, baseado em região conservada no “stop codon” entre os ortólogos de *GluCl α* em *L. cuprina*, *D. melanogaster* e *M. domestica*. A amplificação da região codificante completa do Ch*GluCl α* em *C. hominivorax* utilizando um único par de “primers” (F1/R4) resultou na obtenção de sequências distintas com 1117, 1120, 1236, 1281, 1295, 1304, 1307, 1316, 1319, 1340, 1349, 1352, 1361 e 1364 pb. Estas sequências apresentaram identidade de 93 - 100% entre si e de 92 - 95% com a sequência do Lc*GluCl α* de *L. cuprina* (GenBank - AF081674.1).

Considerando que as posições dos códons de início e término da tradução, nestas sequências de cDNA, sejam nas posições correspondentes a esses códons na sequência caracterizada do *GluCl α* em *C. hominivorax* (Capítulo1), a tradução das sequências de cDNA obtidas resultou em sequências preditas de aminoácidos que apresentaram identidade de 91 - 100% entre si e de 92 - 99% com a sequência predita de aminoácidos do LcGLUCL α em *L. cuprina*. No caso das posições destes códons serem nas posições correspondentes às encontradas na sequência do Ch*GluCl α* , após as adições do trecho de 5 nucleotídeos contendo o códon iniciador ATG e das 2° e 3° posições do “stop codon” (posição 1 - 5 e AA; Figura Suplementar S2) as sequências amplificadas passariam a ter 1124, 1127, 1243, 1288, 1302, 1311, 1314, 1323, 1326, 1347, 1356, 1359, 1368 e 1371 pb.

Analisando as sequências preditas de aminoácidos do ChGLUCL α dos indivíduos do bioensaio foi observado a presença de domínios comuns a membros da superfamília “Cys-Loop LGIC”, tais como 4 regiões transmembrana, uma grande região N-terminal onde se localiza o sítio de ligação do neurotransmissor ou ligante, um “Loop” intracelular altamente variável em seus resíduos e um “Loop” extracelular formado por um par de cisteínas (setas pretas - Figura 12; Sine & Engel, 2006). Além dessas características, ainda ocorre a presença de um segundo “Loop” extracelular formado por um segundo par de cisteínas (setas marrons - Figura 12) conservado e exclusivo de alguns membros da família de canais de cloreto dependentes de neurotransmissores, como o GLUCL α , HISCL1, HISCL2 e pHCL em invertebrados (Knipple & Soderlund, 2010), e o GLYR α 1 em vertebrados (Betz & Laube, 2006). As análises realizadas pelo software “InterProScan” mostraram que essas sequências preditas de aminoácidos pertencem a membros da subfamília de canais de cloreto dependente de L-glutamato, pertencente ao grupo “Cys-Loop LGIC”.

Diferentes mutações foram encontradas na região codificante completa do Ch*GluCl α* . Ao todo foram encontradas 65 posições apresentando SNPs nas sequências da região codificante completa obtidas das 20 larvas iniciais (10 mortas e 10 sobreviventes). Dessas 65 posições, 30 resultaram em substituições de aminoácidos (“missense mutation” – Figura 11), das quais 3 foram selecionadas para posterior verificação nas 10 larvas restantes (5 mortas e 5 sobreviventes), através do sequenciamento do trecho contendo essas alterações, amplificado pelo par de “primers” F2/R3.

Entre as 30 posições com ocorrência de mutações, 20 foram encontradas apenas em indivíduos mortos, enquanto 9 foram encontradas somente nos indivíduos sobreviventes, e apenas uma substituição de aminoácido (Arg242Lys) ocorreu em ambos, mortos e sobreviventes (Figura 11).

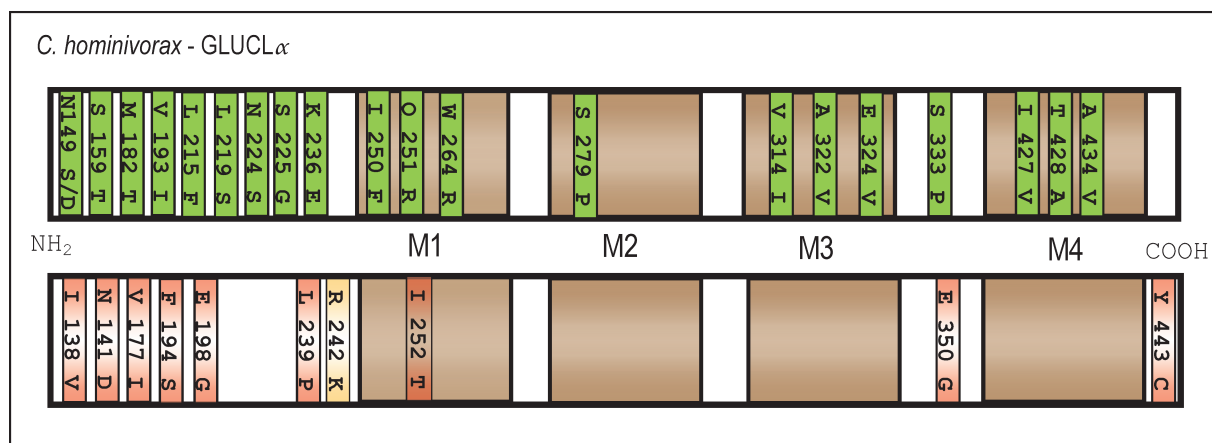


Figura 11: Posições das mutações encontradas nas sequências preditas de aminoácidos do ChGLUCL α obtidas neste estudo. M1-M4 = domínios transmembrana. NH₂ = região N-terminal. COOH = região C-terminal. Em verde, mutações que ocorreram exclusivamente em indivíduos mortos e, em vermelho, as que ocorreram exclusivamente em indivíduos sobreviventes. Em amarelo, a única mutação que ocorreu em indivíduos mortos e sobreviventes. L=leucina; P=prolina; R=arginina; K=lisina; I=isoleucina; F=fenilalanina; Q=glutamina; T=treonina; W=triptofano; S=serina; V=valina; A=alanina; E=ácido glutâmico; Y=tirosina; G=glicina; N=asparagina; D=aspartato; M=metionina.

As 3 mutações, Leu239Pro, Arg242Lys e Ile252Thr (Figura 12), foram selecionadas devido à proximidade com resíduos associados à ligação à IVM, encontrados na estrutura do CeGLUCL α em *C. elegans*, resolvida por Hibbs & Gouaux (2011) (Figura 12), e pela proximidade com mutações em canais iônicos “Cys-Loop LGIC” associadas à resistência ou à redução da sensibilidade à IVM, encontradas em *Cooperia oncophora* (GLUCL α 3 - Leu256Fen; Njue *et al.*, 2004), *Haemonchus contortus* (GLUCL α 3B - Leu256Fen/Trp/Tyr/Val; McCavera *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2012) e *Rattus norvegicus* (nAchR α 7 - Ala225Asp; Collins & Millar, 2010) (Figura 12). Além disso, as mutações Leu239Pro e Ile252Thr ocorreram apenas em larvas sobreviventes (possíveis resistentes), e a mutação Arg242Lys, embora tenha ocorrido tanto nas larvas sobreviventes quanto nas larvas mortas, ocorreu em maior frequência entre as sobreviventes. As mutações restantes ocorreram somente em larvas mortas, exceto as alterações Ile138Val, Asn141Asp, Val177Ile, Phe194Ser, Glu198Gly, Glu350Gly e Tyr443Cys (Figura 12) que, apesar de ocorrerem em larvas sobreviventes, não estão próximas de resíduos associados à ligação com IVM, preditos por Hibbs & Gouaux (2011). As posições dos resíduos em *C. hominivorax* são relativas à sequência predita de 452 aminoácidos caracterizada inicialmente (1359 pb).

Além das mutações citadas, encontradas em *C. oncophora*, *H. contortus* e *R. norvegicus*, resíduos em diversos membros da superfamília “Cys-Loop LGIC”, além do GLUCL α , estão associados à resistência ou à insensibilidade às macrolactonas em espécies distintas, tais como *Haemonchus contortus* (GLUCL α 3B - Gly329Ser/Ala/Phe/Asp, Pro316Ser/Ala/Leu, Asp220Ala e Leu222Ala – revisado em

Wolstenholme, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2012), *Homo sapiens* (GLYR α 1 - Ala288Thr/Phe - Lynagh & Lynch, 2010a; 2010b), *Tetranichus urticae* (GLUCL α 1 - Gly323Asp - Kwon *et al.*, 2010; GLUCL α 3 - Gly326Glu - Dermauw *et al.*, 2012), *Drosophila melanogaster* (GLUCL α - Pro299Ser - Kane *et al.*, 2000) e *Rattus norvegicus* (nAchR α 7 - Gln272Val, Thr456Val, Cys459Tyr - Collins & Millar, 2010) (Figura 12).

O resíduo de arginina (Arg242) dos alelos considerados selvagens em *C. hominivorax*, é codificado pelo códon AGG, encontrado nas posições 724 - 726 da sequência nucleotídica de 1359 pb em *C. hominivorax*, enquanto os códons AAG e TAG codificam, na região correspondente, o resíduo de lisina (Lys242) predito de estar relacionado com possível resistência à IVM e um “stop codon” prematuro (“nonsense mutation”), respectivamente.

As substituições de aminoácido Leu239Pro e Arg242Lys ocorrem na região N-terminal extracelular adjacente ao primeiro domínio transmembrana (M1), e estão separadas desse domínio por 7 e 4 resíduos, respectivamente, enquanto que a substituição Ile252Thr ocorre na M1. Como citado, o domínio transmembrana M1 está intimamente associado à ligação com a IVM no CeGLUCL α de *C. elegans*, formando ligações do tipo “pontes de hidrogênio” e de “Van der Waals” com regiões da molécula de IVM (Hibbs & Gouaux, 2011). Dentre os 15 aminoácidos na sequência de CeGLUCL α preditos de se ligarem ao inseticida, 6 estão localizados no domínio transmembrana M1, indicando, assim, a importância dessa região para a ligação entre as subunidades do receptor/canal CeGLUCL α e o inseticida. Neste contexto, a substituição Ile252Thr em *C. hominivorax*, adjacente ao resíduo Gln280 em *C. elegans*, poderia interferir na interação com o inseticida (Figura 12).

■ = Ile138Val, Asn141Asp, Val177Ile, Phe194Ser, Glu198Gly, Leu239Pro, Ile252Thr, Glu350Gly e Tyr443Cys em *Ch*.
■ = Arg242Lys em *Ch*.
■ = Posições dos resíduos no GLUCL α de *Ce* preditos de ligação com IVM.
■ = Mutações em *Hc* (G329S/A/F/D), *Hs* (A288T/F), *Tu* α 3 (G326E) e *Tu* α 1 (G323D) e um dos resíduos preditos de ligação com IVM no GLUCL α de *Ce*.
 — = Regiões de “Loop”

■ = Mutações em *Co* (L256F) e *Hc* (L256F/W/Y/V)
■ = Mutações em *Hc* (D220A e L222A)
■ = Mutações em *Dm* (P299S) e *Hc* (P316S/A/L)
 ↓ = Cisteínas características de “Cys-Loop LGIC”
 ↓ = Cisteínas características de GLUCL α
■ = Mutações no *Rn* (A225D, Q272V, T456V, C459Y)

<i>Ch</i>	M-----GTGH-----YFW-AIFYFASLC-----SASLANN-----	[24]
<i>Ce</i>	M-----ATWIV-----GKLIASLILGIQAQQARTKSQDIFEDDNDNGTTTLESARLTSP-----	[51]
<i>Hc</i>	M-----RNSVP-----LATRIGPML-----ALICTVSTI-----	[24]
<i>Hs</i>	M-----YSFN-----TLRLYLWET-----IVFFSLAAS-----KEAEAA	[29]
<i>Co</i>	M-----RTSVP-----LATRIGPIL-----ALICIVITI-----	[24]
<i>Dm</i> α	M-----GSGH-----YFW-AIFYFASLC-----SASLANN-----	[24]
<i>Rn</i>	M-----C-----GGRGGIWL-----LAAALLHVS-----	[20]
<i>Tu</i> α 3	ISTVEGKRKLKEQEI--QRILN--NYDWRVRPRGLNASWPDG--PVLVTVNIYLRISIKIDVDNMEYSAQTFREEWVD	[16]
<i>Tu</i> α 1	MLCLPGPKYHI-----TFY-LLIYFSDFI-----IIPWLLNLP-----	[32]

		<u>β1β2</u>	<u>Loop D</u>
<i>Ch</i>	---AKINFREKEKKVL-DQILGAGKYDARIRPSGINGT---ENLPTYVYVMFLRSISKIDDYKMEYSVQLTFREQWTD	[96]	
<i>Ce</i>	IHIPIEQPQTSDSKILAHLFTS--GYDFRVRPPTD-----NGG-PVVVSVMMLLRTISKIDVNMMEYSAQLTLRESWID	[122]	
<i>Hc</i>	MSAVEAKRKLKEQEI--QRILN--NYDWRVRPRGLNASWPDG--PVLVTVNIYLRISIKIDVDNMEYSAHFTFREEWVD	[100]	
<i>Hs</i>	RSAPKPMSPSDFLDKL-MGRTS--GYDARIRPNFK-----GP-PVNVSCNIFINSFGSIAETMDYRVNIFLRQQWND	[98]	
<i>Co</i>	ISTVEGKRKLKEQEI--QRILN--NYDWRVRPRGLNASWPDG--PVLVTVNIYLRISIKIDVDNMEYSAQTFREEWVD	[100]	
<i>Dm</i> α	---AKINFREKEKKVL-DQILGAGKYDARIRPSGINGT---DG-PAIVRINLFVRSIMTISDIKMEYSVQLTFREQWTD	[95]	
<i>Rn</i>	-----LQGEFQRRLY-KELVK--NYNPLERPVAN-----DSQ-PLTVYFSLSLQIMDVDEKNQVLTNTNIWLQMSWTD	[84]	
<i>Tu</i> α 3	FTSGSASFREQEKKIL-DSIIGQAYDRRIRPSGLNAS-AEGDG-PCIVSINIYLRISIKISDLDEMEYSVQITFREEWKD	[93]	
<i>Tu</i> α 1	FTSGSASFREQEKKIL-DSIIGQAYDRRIRPSGLNAS-AEGDG-PCIVSINIYLRISIKISDLDEMEYSVQITFREEWKD	[109]	

		<u>Loop A</u>	<u>Loop E</u>	↓
<i>Ch</i>	ERLKFDIDIQGR-----LKYLTLTEANRVWMPDLFFSNEKEGHFHNI	MPNVYIRIFPNGSVLYSIRISLTACPM	[166]	
<i>Ce</i>	KRLSYGVKGDG-----QPDFVILTGVHQIWMPTDFFPNEKQAYKHTI	KPNVLIIRIHNDGTVLYSVRISLVLSCPM	[193]	
<i>Hc</i>	ARLAYGRFEDESTEVPPFVVLATSENADQSQQIWMPTDFFQNEKEARRHLI	KPNVLIIRIHKGDSILYSVRLSLVLSCPM	[180]	
<i>Hs</i>	PRLAYNEYPD-----DSLDDLPSMLDSIWKPDLEFANEKGAFHEI	TDNKLRLIRSRNGNVLYSIRITLTACPM	[168]	
<i>Co</i>	ARLAYGRFEDESTEVPPFVVLATSENADQSQQIWMPTDFFQNEKEARRHLI	KPNVLIIRIHKGDSILYSVRLSLVLSCPM	[180]	
<i>Dm</i> α	ERLKFDIDIQGR-----LKYLTLTEANRVWMPDLFFSNEKEGHFHNI	MPNVYIRIFPNGSVLYSIRISLTACPM	[165]	
<i>Rn</i>	HYLQWNMSEYP-----GVKNVRFPDQIWKPDILLYNSADERFDAT	ETNVLVNASGHQYLPPIGFKSSCYI	[152]	
<i>Tu</i> α 3	SRLVYRDPSEK-----IRYLTLTDPDRIWKPDVFFTNEKEGHFHNI	MPNVLLRIGSDGGVLYSIRLSLILSCPM	[163]	
<i>Tu</i> α 1	SRLVYRDPSEK-----IRYLTLTDPDRIWKPDVFFTNEKEGHFHNI	MPNVLLRIGSDGGVLYSIRLSLILSCPM	[179]	

	<u>Cys-Loop</u>	↓	<u>Loop B</u>	<u>β8β9</u>	↓	<u>Loop C</u>	↓
<i>Ch</i>	NLKLYPLDRQCSLRMASYGWTTNDLVFLWKEGDP-VQ--VKNLHLPRFTLEKFLTDY-CNSKTNT--GEYSCLVKDL	[240]					
<i>Ce</i>	YLQYYPMDVQCSIDLASYAYTTKDIEYLWKEHSP-LQLKGLSSSLPSFQLTNTSTTY-CTSVTNT--GIYSCLRTTIC	[269]					
<i>Hc</i>	SLEFYPLDRQCLIDLASYAYTTQDIKEWKEQNP-VQKKGLRQSLPSFELQDVVTKY-CTSKTNT--GEYSCARVKLL	[256]					
<i>Hs</i>	DLKNFPMVDQICIMQLESFGYTMNDLIFEWQSGA-VQ--VADGLTLPQFILKEEKDLRYCTKHNT--GKFTCIEARF	[243]					
<i>Co</i>	SLEFYPLDRQCLIDLASYAYTTQDIKEWKEQNP-VQKKGLRQSLPSFELQDVVTKY-CTSKTNT--GEYSCARVKLL	[256]					
<i>Dm</i> α	NLKLYPLDRQCSLRMASYGWTTNDLVFLWKEGDP-VQ--VKNLHLPRFTLEKFLTDY-CNSKTNT--GEYSCLVKDL	[239]					
<i>Rn</i>	DVRWFPFDVQCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQAD-----SSYIPNGEWDLMGIPGKR-NEKFYECCKEPYPDVYTYVT	[225]					
<i>Tu</i> α 3	NLKYYPLDKQCYIKMASYGYTTEDLVFMWKRTDP-VQ--VTKQLHLPTFALADYITEY-CTSRNT--GEYSCVQVKLI	[237]					
<i>Tu</i> α 1	NLKYYPLDKQCYIKMASYGYTTEDLVFMWKRTDP-VQ--VTKQLHLPTFALADYITEY-CTSRNT--GEYSCVQVKLI	[253]					

Continua

Continua

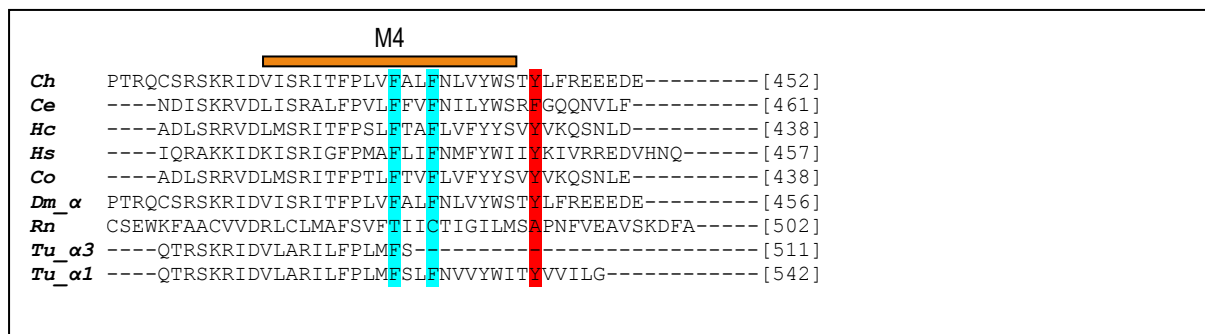


Figura 12: Alinhamento realizado pelo software “PROMALS3D” da sequência predita de aminoácidos a partir da sequência de ChGluCl α (Ch; 1359 pb) obtida nesse estudo com as sequências preditas de aminoácidos de membros da superfamília “Cys-Loop LGIC” que apresentam resíduos e mutações relacionados à ligação e resistência à IVM, respectivamente: GLUCL α de *C.elegans* (Ce; GenBank - U14524.1), GLUCL α 3B de *H. contortus* (Hc; GenBank - Y14234.1), GLYR α 1 de *H. sapiens* (Hs; GenBank - NM_001146040.1), GLUCL α 3 de *C. oncophora* (Co; GenBank - AY372756), GLUCL α – isoforma PI de *D. melanogaster* (Dm_α; FlyBase - FBtr0335417), nAchR α 7 de *R. norvegicus* (Rn; GenBank - NM_012832.3), GLUCL α 1 e GLUCL α 3 de *T. urticae* (Tu_α1; GenBank - AB567687.1 e Tu_α3; GenBank - JQ738193, respectivamente). M1–M4 = domínios transmembrana de ChGLUCL α . (Conclusão).

Os códons CCA (posições 715-717) e ACT (posições 754-756) (Figura 13), codificam a Pro239 e a Thr252, respectivamente, encontrados somente em indivíduos sobreviventes e possivelmente associados à resistência. Dentre as mutações encontradas nos indivíduos sobreviventes, o Glu350Gly e a Tyr443Cys, além de terem ocorrido no mesmo indivíduo, ocorreram no mesmo alelo, assim como a Ile138Val e a Phe194Ser ocorreram em outro indivíduo, mas em alelos diferentes. As demais mutações ocorreram em indivíduos diferentes.

O aminoácido Lys242, ocorre juntamente com 8 substituições de aminoácidos encontradas unicamente nos sobreviventes (Ile138Val; Asn141Asp; Val177Ile; Phe194Ser; Leu239Pro; Ile252Thr; Glu350Gly; Tyr443Cys), enquanto o aminoácido Arg242, ocorre no alelo contendo a mutação Glu198Gly, também encontrada somente em larva sobrevivente.

As mutações Ile138Val, Asn141Asp, Val177Ile, Phe194Ser e Glu198Gly, no domínio extracelular N-terminal do ChGLUC α identificadas nos indivíduos sobreviventes, embora distantes dos domínios transmembrana, estão localizadas nos “Loops” extracelulares ou adjacências (Figura 12), domínios importantes para o mecanismo de ativação e abertura do receptor (Bartos *et al.*, 2009). Dentro do domínio extracelular N-terminal, diversas regiões, incluindo o “Cys-Loop”, o “Loop” $\beta\beta\beta$ 9 e a região imediatamente anterior à transmembrana M1 (pré-M1), formam conexões que transmitem mudanças conformacionais, ocorridas devido à ligação de agonistas, que resultam na abertura do canal (Bartos *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Kash *et al.*, 2003; Khatri & Weiss, 2010). Com a finalidade de demonstrar a participação do

“Loop” β8β9 na abertura do canal no GLUCLα3B de *H. contortus* por macrolactonas, Yamaguchi *et al.* (2012) mostraram que as mutações Asp220Ala e Leu222Ala (Figura 12) promoveram redução ou ausência da ligação de milbemicina, uma macrolactona, no GLUCLα3B, concluindo que mudanças conformacionais ocorridas nesse “Loop” afetam a ligação dessa macrolactona, mesmo que esses resíduos não façam contato direto com o inseticida.

		D141	
Ch_D141_K242	CATTTCACAAATATCATTATGCCG	GATGTTTATATACGTATTTTCCAAATGGTTCAGTTCTGTACAGTA	[466]
Ch_I177_K242	A.....		[463]
Ch_G198_R242	A.....		[463]
Ch_P239_K242	A.....		[463]
Ch_T252_K242	A.....		[466]
		I177	
Ch_D141_K242	TTCTGATTTCACTGACATTGGCATGTCCCATGAATTTGAAATTATATCCTTTGGATCGTCAAGTCTGTTC		[536]
Ch_I177_K242	A.....		[533]
Ch_G198_R242			[533]
Ch_P239_K242			[533]
Ch_T252_K242			[536]
		G198	
Ch_D141_K242	ACTACGTATGGCCAGTTATGGCTGGACTACAAATGATCTTGTCTTCTGTGAAAGAGGTGACCCAGTA		[606]
Ch_I177_K242			[603]
Ch_G198_R242	G.....		[603]
Ch_P239_K242			[603]
Ch_T252_K242			[606]
Ch_D141_K242	CAAGTGGTAAAGAATTTACACCTACCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCTTGACTGATTACTGCAACAGTA		[676]
Ch_I177_K242			[673]
Ch_G198_R242			[673]
Ch_P239_K242			[673]
Ch_T252_K242			[676]
		P239	K242
Ch_D141_K242	AAACCAATACGGGTGAATACAGTTGCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTCTCATATTACTT		[746]
Ch_I177_K242			[743]
Ch_G198_R242			[743]
Ch_P239_K242	C.....		[743]
Ch_T252_K242			[746]
		T252	
Ch_D141_K242	AATTCAAATTTATATCCCATGCTGTATGCT		[776]
Ch_I177_K242			[773]
Ch_G198_R242			[773]
Ch_P239_K242			[773]
Ch_T252_K242	C.....		[776]

Figura 13: Alinhamento de trechos de seqüências de nucleotídeos de alelos de ChGluClα encontrados em *C. hominivorax* contendo as 6 posições dos códons codificando os aminoácidos D141, I177 e G198 em domínios “Loop”, os aminoácidos P239 e Lys242 na região imediatamente anterior ao domínio transmembrana M1, e a Thr252 na M1, considerados possivelmente associados à resistência. Ch_D141_K242: alelo contendo o Asp141 e a Lys242; Ch_I177_K242: alelo contendo a Ile177 e a Lys242; Ch_G198_R242: alelo contendo a Gly198 e a Arg242; Ch_P239_K242: alelo contendo a Pro239 e a Lys242; Ch_T252_K242: alelo contendo a Thr252 e a Lys242. Setas indicam a posição modificada no códon. Em cinza posições dos códons para mutações exclusivas de indivíduos sobreviventes. Em verde posição do códon da mutação R242K. Figura Suplementar S1=alinhamento das seqüências nucleotídicas de todos os alelos encontrados nos sobreviventes.

Do mesmo modo que mutações no GLUCL α 3B de *H. contortus*, as mutações dos resíduos Asn141 (Loop E) e Glu198 (Loop β 8 β 9), altamente conservados entre membros da superfamília “Cys-Loop LGIC” (Figura 12), e do resíduo Val177 (Cys-Loop), poderiam mudar a estrutura desses domínios, resultando na inibição da abertura do receptor por macrolactonas. Esses aminoácidos são codificados pelos códons GAT (Asn141), ATC (Val 177) e GGA (Glu198), nas posições 421-423, 529-531 e 592-594 (Figura 13) da região codificante do ChGluCl α , respectivamente.

Assim como mutações no “Loop” β 8 β 9 podem levar à ausência da ligação de macrolactonas no HcGLUCL α 3B, mutações na região imediatamente anterior ao domínio M1, região onde também ocorre mudança estrutural relacionada à abertura do receptor (Lee *et al.*, 2009), podem levar à insensibilidade na ligação com macrolactonas. Diante disso, as mutações Arg242Lys e Leu239Pro em *C. hominivorax*, localizadas anteriormente à M1 (pré-M1) e também próximas aos resíduos de ligação com IVM em CeGLUCL α , podem resultar na insensibilidade com a IVM, causando, assim, resistência.

Os aminoácidos glicina (Gly350), localizada no “Loop” intracelular entre os domínios transmembrana M3 e M4, e a tirosina (Cys443), na região C-terminal extracelular, não estão em posições associadas à ligação com macrolactonas. A resolução do complexo “CeGLUCL α – IVM” por Hibbs & Gouaux (2011) mostrou que a ivermectina liga-se aos domínios transmembrana M1, M2 e M3 e ao “Loop” extracelular entre os domínios M2 e M3, não formando ligações com a parte intracelular ou o domínio M4 e adjacências, no receptor alvo. Além da resolução do complexo “CeGLUCL α – IVM”, modelagens computacionais realizadas por Collins & Millar (2010), Yamaguchi *et al.* (2012) e Lynagh & Lynch (2012) predizem a ligação de macrolactonas nas regiões transmembrana dos receptores/canais nAchR α 7, GLUCL α 3B e GLYR α 1, respectivamente.

As macrolactonas, além de causarem a abertura direta dos receptores alvo, também são conhecidas por serem moduladores alostéricos positivos, potencializando o efeito causado pelo neurotransmissor endógeno (Collins & Millar, 2010; revisado em Wolstenholme, 2010). Apenas duas mutações em domínio M4, Thr456Val e Cys459Tyr (nAchR α de *R. norvegicus*), são conhecidas por promoverem redução da potencialização causada pela IVM (Collins & Millar, 2010), resultando na quase ausência do efeito modulador desse inseticida na abertura do receptor.

Diante disso, torna-se evidente que os resíduos Asp141, Ile177, Gly198, Pro239 e a Lys242, localizados em regiões no domínio N-terminal extracelular associadas à abertura de receptores/canais “Cys-Loop LGIC”, e o resíduo Thr252, localizado no domínio transmembrana M1, possuem maior

possibilidade de participação na redução da afinidade da IVM na ligação e na abertura do $GLUCL\alpha$ em *C. hominivorax*.

No entanto, são necessários estudos mais detalhados para determinar se existem diferenças entre os alelos encontrados somente nos sobreviventes e os alelos equivalentes considerados selvagens, e entre os alelos Arg242 e Lys242, em relação à ligação ou abertura pela IVM do receptor/canal *GluCl α* em *C. hominivorax*. Tais estudos, como os realizados por Yamaguchi *et al.* (2012), Collins & Millar (2010), Lynagh & Lynch (2010) e McCavera *et al.* (2009) são importantes na caracterização da relação entre mutação e ligação/abertura do receptor/canal.

A análise das substituições de aminoácidos citadas, associadas à resistência ou insensibilidade às macrolactonas em diferentes espécies (Figura 12), sugere a possibilidade de que a mudança de 2 propriedades relacionadas à estrutura das cadeias laterais desses aminoácidos possam estar envolvidas na resistência. Das 22 mutações apresentadas e associadas à resistência (Figura 12), 14 apresentaram mudança entre aminoácidos alifáticos e não-alifáticos, ou seja, enquanto o resíduo relacionado à suscetibilidade possuía uma cadeia lateral alifática, o resíduo mutante era não-alifático e vice-versa. O mesmo ocorre com a propriedade relacionada ao tamanho das cadeias laterais, onde 18 das 22 mutações apresentaram mudanças entre o tamanho do aminoácido (pequeno, médio, grande; Pommié *et al.*, 2004) no resíduo considerado selvagem e o tamanho do resíduo mutante. Entre as 6 mutações (Asn141Asp, Val177Ile, Glu198Gly, Leu239pro, Arg242Lys e Ile252Thr) encontradas em *C. hominivorax*, nos domínios considerados associados direta ou indiretamente à ligação da IVM (Figura 13), 5 apresentaram mudança no tamanho da cadeia lateral entre o resíduo selvagem e o mutante, exceto a Arg242Lys, embora apenas 2 mutações (Ile252Thr e Glu198Gly) tenham mostrado diferença na propriedade alifático/não-alifático entre os resíduos. Essas evidências indicam que o tamanho da cadeia lateral dos resíduos encontrados em posições específicas do $GLUCL\alpha$ podem ter função importante na ligação da IVM ao receptor, podendo, ainda, existirem outras propriedades bioquímicas que interfiram na interação entre o inseticida e o receptor.

O alinhamento e análise das sequências nucleotídicas de cDNA de *C. hominivorax*, amplificadas pelos “primers” F1 e R4, apresentaram, ainda, “deleções”/“inserções” de nucleotídeos, e sequências sinalizadoras consenso compatíveis com o mecanismo de “splicing” alternativo do pré-RNA_m (Figura 15; Mount *et al.*, 1992). Para a sinalização do limite 5’ de íntrons ocorre o grupo conservado de nucleotídeos “MAG / GTRAGT” (R = A ou G; M = A ou C – Figura 14), onde o trinucleotídeo MAG sinaliza o limite 3’ de éxons, imediatamente adjacente à sequência GTRAGT intrônica, sinalizando o limite 5’ de íntrons (Mount *et al.*, 1992; Irimia *et al.*, 2007).

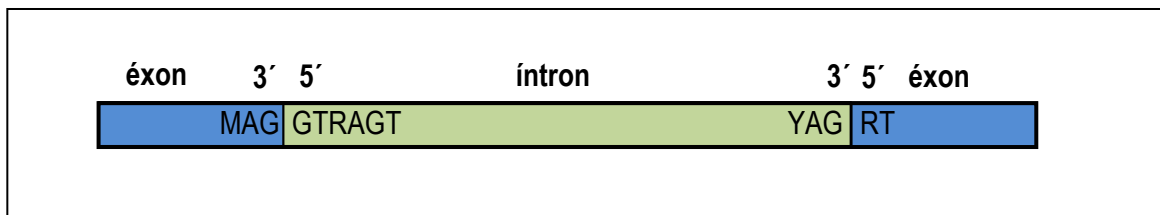


Figura 14: Sequências conservadas nos íntrons e éxons nas posições preditas de ocorrência do “splicing” do pré-RNAm (Mount *et al.*, 1992; Senapathy *et al.*, 1990 *apud* Mount *et al.*, 1992; Irimia *et al.*, 2007).

Para a região 3’ de íntrons o limite é sinalizado pela sequência YAG, enquanto a sequência RT sinaliza a região 5’ no éxon adjacente, encontrados no grupo conservado “YAG / RT” (Y = C ou T – Figura 14) (Mount *et al.*, 1992; Irimia *et al.*, 2007). Embora as sequências citadas sejam altamente conservadas, Mount *et al.* (1992) descrevem outras combinações, menos frequentes, de sequências que também ocorrem nas mesmas posições e sinalizam o mesmo mecanismo.

I		
Ch_1124	CGGATGGTCCAGCCGT---TGTGCGCGTCAACATTTTCGTAAGAAGTATCTCAAAAATCGATGATGTTACTATGGAA	[246]
Ch_1127	CGGAAAATTTACCCACGTATGCTATGTCAACATGTTCTACGGTCAATTTCAAAGATCGACGATTACAAAATGGAA	[249]
Ch_1243	CGG-----	GAA [178]
Ch_1288	CGG-----	GAA [178]
Ch_1302	CGG-----	GAA [177]
Ch_1311	CGGATGGTCCAGCCGT---TGTGCGCGCCAACATTTTCGTAAGAAGTATTTCAAAAATCGATGATGTTACTATGGAA	[246]
Ch_1314	CGGAAAATTTACCCACGTATGCTATGTCAACATGTTCTACGGTCAATTTCAAAGATCGACGATTACACAATGGAA	[249]
Ch_1323	CGGATGGTCCCGCTATA---GTCAGAATCAATCTTTTGTACGAAGTATTATGACGATTAGTGACATTAAAATGGAA	[246]
Ch_1326	CGGATGGTCCAGCCGT---TGTGCGCGTCAACATTTTCGTAAGAAGTATTTCAAAAATCGATGATGTTACTATGGAA	[246]
Ch_1347	CGGAAAATTTACCCACGTATGCTATGTCAACATGTTCTACGGTCAATTTCAAAGATCGACGATTACAAAATGGAA	[249]
Ch_56_A	CGGATGGTCCAGCCGT---TGTGCGCGTCAACATTTTCGTAAGAAGTATTTCAAAAATCGATGATGTTACTATGGAA	[246]
Ch_56_B	CGGATGGTCCCGCTATA---GTCAGAATCAATCTTTTGTACGAAGTATTATGACGATTAGTGACATTAAAATGGAA	[246]
Ch_59_A	CGGAAAATTTACCCACGTATGCTATGTGACATGTTCTACGGTCAATTTCAAAGATCGACGATTACAAAATGGAA	[249]
Ch_59_B	CGGAAAATTTACCCACGTATGCTATGCCAACATGTTCCCGCGGTCAATTTCAAAGATCGACGATTACAAAATGGAA	[249]
Ch_1368	CGGATGGTCCAGCCGT---TGTGCGCGTCAACATTTTCGTAAGAAGTATTTCAAAAATCGATGATGTTACTATGGAA	[246]
Ch_1371	CGGAAAATTTACCCACGTATGCTATGTCAACATGTTCTACGGTCAATTTCAAAGATCGACGATTACAAAATGGAA	[249]
II		
Ch_1124	TATGCTTCCCGCTCAG-----	[1003]
Ch_1127	TATGCTTCCCGCTCAG-----	[1006]
Ch_1243	TATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGATTTGGAGCA	[981]
Ch_1288	TATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGATTTGGAGCA	[981]
Ch_1302	TATGCTTCCCGCTCAGGTTTGAATAAAGCTAACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGGATTTGGAGCA	[995]
Ch_1311	TATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGGATTTGGAGCA	[1049]
Ch_1314	TATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGATTTGGAGCA	[1052]
Ch_1323	TATGCTTCCCGCTCAGATCGGGCCGCAG---ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGATTTGGAGCA	[1061]
Ch_1326	TATGCTTCCCGCTCAGGTTTGAATAAAGCTAACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGATTTGGAGCA	[1064]
Ch_1347	TATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGATTTGGAGCA	[1052]
Ch_56_A	TATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGATTTGGAGCA	[1049]
Ch_56_B	TATGCTTCCCGCTCAGATCGGGCCGCAG---ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGATTTGGAGCA	[1061]
Ch_59_A	TATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGATTTGGAGCA	[1052]
Ch_59_B	TATGCTTCCCGCTCAGATCGGGCCGCAG---ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGATTTGGAGCA	[1064]
Ch_1368	TATGCTTCCCGCTCAGATCGGGCCGCAG---ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGATTTGGAGCA	[1061]
Ch_1371	TATGCTTCCCGCTCAGATCGGGCCGCAG---ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGTAGAGATTTGGAGCA	[1064]

Continua

III

```

Ch_1124 -----
Ch_1127 -----
Ch_1243 TATAGATGCTACTTCAGATTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTGCAATG----- [1042]
Ch_1288 TATAGATGCTGCTTCAGATTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGG [1064]
Ch_1302 TATAGATGCTGCTTCAGATTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGG [1078]
Ch_1311 TATAGATGCTGCTTCAGATTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTGCAATG----- [1110]
Ch_1314 TATAGATGCTGCTTCAGATTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTGCAATG----- [1113]
Ch_1323 TATAGATGCTGCTTCAGATTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTGCAATG----- [1122]
Ch_1326 TATAGATGCTGCTTCAGATTATTGGATACCGATAGTAGTGAACATTTGCAATG----- [1125]
Ch_1347 TATAGATGCTGCTTCAGATTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGG [1135]
Ch_56_A TATAGATGCTGCTTCAGATTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGG [1132]
Ch_56_B TATAGATGCTGCTTCAGATTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGG [1144]
Ch_59_A TATAGATGCTGCTTCAGATTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGG [1135]
Ch_59_B TATAGATGCTGCTTCAGATTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGG [1147]
Ch_1368 TATAGATGCTGCTTCAGATTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGG [1144]
Ch_1371 TATAGATGCTGCTTCAGATTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGG [1147]

```

IV

```

Ch_1124 -----
Ch_1127 -----
Ch_1243 -----TTGAGACAATGTGAAGTTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAG [1096]
Ch_1288 GTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAGTTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAG [1141]
Ch_1302 GTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAGTTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAG [1155]
Ch_1311 -----TTGAGACAATGTGAAGTTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAG [1164]
Ch_1314 -----TTGAGACAATGTGAAGTTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAG [1167]
Ch_1323 -----TTGAGACAATGTGAAGTTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAG [1176]
Ch_1326 -----TTGAGACAATGTGAAGTTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAG [1179]
Ch_1347 GTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAGTTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAG [1212]
Ch_56_A GTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAGTTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAG [1209]
Ch_56_B GTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAGTTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAG [1221]
Ch_59_A GTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAGTTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAG [1212]
Ch_59_B GTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAGTTCATATGCAGCCACCAATAACGTCCAAACTGTTGTAAG [1224]
Ch_1368 GTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAGTTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAG [1221]
Ch_1371 GTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAGTTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAG [1224]

```

V

```

Ch_1124 -----ACAATGTTCTAGATCGAAGAGAATC [1028]
Ch_1127 -----ACAATGTTCTAGATCGAAGAGAATC [1031]
Ch_1243 TGGCTGTCAAAGTTTCCACAAAGACAATGTTCTAGATCGAAGAGAATC [1147]
Ch_1288 TGGCTGTCAAAGTTTCCACAAAGACAATGTTCTAGATCGAAGAGAATC [1192]
Ch_1302 TGGCTGTCAAAGTTTCCACAAAGACAATGTTCTAGATCGAAGAGAATC [1206]
Ch_1311 TGGCTGTCAAAGTTTCCACAAAGACAATGTTCTAGATCGAAGAGAATC [1215]
Ch_1314 TGGCTGTCAAAGTTTCCACAAAGACAATGTTCTAGATCGAAGAGAATC [1218]
Ch_1323 TGGCTGTCAAAGTTTCCACAAAGACAATGTTCTAGATCGAAGAGAATC [1227]
Ch_1326 TGGCTGTCAAAGTTTCCACAAAGACAATGTTCTAGATCGAAGAGAATC [1230]
Ch_1347 TGGCTGTCAAAGTTTCCACAAAG-----ATCGAAGAGAATC [1251]
Ch_56_A TGGCTGTCAAAGTTTCCACAAAGACAATGTTCTAGATCGAAGAGAATC [1260]
Ch_56_B TGGCTGTCAAAGTTTCCACAAAG-----ATCGAAGAGAATC [1260]
Ch_59_A TGGCTGTCAAAGTTTCCACAAAGACAATGTTCTAGATCGAAGAGAATC [1263]
Ch_59_B TGGCTGTCAAAGTTTCCACAAAG-----ATCGAAGAGAATC [1263]
Ch_1368 TGGCTGTCAAAGTTTCCACAAAGACAATGTTCTAGATCGAAGAGAATC [1272]
Ch_1371 TGGCTGTCAAAGTTTCCACAAAGACAATGTTCTAGATCGAAGAGAATC [1275]

```

Figura 15: Alinhamento de trechos (I-V) do cDNA dos transcritos alternativos de *ChGluCl α* obtidos neste estudo. Em cinza estão sequências relacionadas com sinalização no mecanismo de “splicing” do pré-RNA_m em *D. melanogaster* (Mount *et al.*, 1992; Senapathy *et al.*, 1990 *apud* Mount *et al.*, 1992). Ch_X_Y=tamanho da região codificante de cada transcrito variante obtido, onde X representa o número de nucleotídeos respectivos e Y o padrão do possível “splicing” alternativo nas diferentes sequências de 1356 e 1359 pb (A e B). O tamanho das sequências se refere ao tamanho obtido após a adição do trecho de 5 nucleotídeos com o códon “ATG” e das 2^o e 3^o posições do “stop codon”. Figura Suplementar S2 = Alinhamento completo. (Conclusão).

Como observado, a maioria das regiões limítrofes entre as “deleções”/“inserções” das sequências nucleotídicas de ChGluCl α (Figura 15) são similares com as sequências de sinalização conservadas descritas para o mecanismo de “splicing” do pré-RNAm, resultando na produção dos transcritos variantes vistos em *C. hominivorax*. Foi encontrada alta frequência dos dinucleotídeos “AG” e “TG” nos limites das “deleções”/“inserções” (Figura 15), preditos de serem sequências consenso altamente conservadas, (Mount *et al.*, 1992) e encontradas nas bordas 5’ e 3’ de éxons e íntrons de transcritos em *D. melanogaster* (Mount *et al.*, 1992) e vertebrados (Senapathy *et al.*, 1990 *apud* Mount *et al.*, 1992), sinalizando a localização da ocorrência do “splicing”.

Assim como as sequências descritas são responsáveis pela sinalização do local de ocorrência de “splicing” no pré-RNAm de *D. melanogaster* e espécies de vertebrados, as sequências encontradas em *C. hominivorax* podem sinalizar a localização de eventos de “splicing” alternativo que resultariam em diferentes transcritos alternativos do gene ChGluCl α , incluindo os transcritos obtidos neste estudo.

As sequências de 1356 pb possuem regiões diferentes entre si (Ch_56_A e Ch_56_B), assim como as sequências de 1359 pb (Ch_59_A e Ch_59_B - Figura 15). A sequência mais encontrada foi a de 1359 pb com 31% das ocorrências, seguida das sequências de 1127 e 1356 pb com cerca de 19 e 12% das ocorrências, respectivamente. As sequências restantes representaram menos de 7% dos transcritos sequenciados. Estes resultados sugerem que a região codificante de 1359 pb seja dominante em relação às demais.

As sequências de 1124, 1127, 1243, 1288 e 1302 pb, além da variante “B” de 1359 pb, apresentaram “stop codons” prematuros (Figura Suplementar S2) em relação ao “stop codon” conservado nas sequências ortólogas de GluCl α em *D. melanogaster*, *L. cuprina* e na sequência caracterizada de *C. hominivorax* (Figura 7; Capítulo 1).

Considerando que o códon iniciador nas sequências nucleotídicas de 1124, 1127 e 1359 pb (transcrito B) seja na posição correspondente à posição desse códon na sequência caracterizada do GluCl α , a tradução destas sequências mostrou que a presença de “stop codons” prematuros resultaria em sequências preditas de 348, 349 e 401 aminoácidos, respectivamente. A análise dos domínios comuns à superfamília “Cys-Loop LGIC” mostrou que essas sequências preditas de aminoácidos não possuem o domínio transmembrana M4 e uma parte do “loop” intracelular entre os domínios M3 e M4, quando comparada com a sequência caracterizada do GLUCL α no Capítulo 1. As isoformas “PE” de 263 resíduos e “PF” de 349 resíduos, do GLUCL α em *D. melanogaster* (www.flybase.org), também não possuem os mesmos domínios. Dessa forma, concluímos que as isoformas de 348, 349 e 401 aminoácidos em *C.*

hominivorax podem ter a mesma viabilidade das isoformas citadas em *D. melanogaster*. A sequência de cDNA de 1364 pb obtida em *C. hominivorax*, que juntamente com as sequências de 5 nucleotídeos, com o códon ATG, “upstream” ao “primer” F1, e os 2 nucleotídeos do “stop codon”, restantes, possui os mesmos 1371 pb da região codificante dos transcritos variantes RI, RM e RP do *GluCl α* em *D. melanogaster*, (www.flybase.org) as quais traduzem sequências preditas de 456 aminoácidos.

Considerando que a códon iniciador, também nas sequências nucleotídicas de 1243, 1288 e 1302 pb, seja na posição correspondente à posição desse códon na sequência caracterizada do *GluCl α* , a presença de “stop codon” prematuro nestas sequências nucleotídicas resultaria em sequências com 67 resíduos após a tradução, sem a presença dos domínios transmembrana M1, M2, M3 e M4. No entanto, é importante citar que, transcritos alternativos podem ter, entre si, diferentes sítios de início e término da transcrição, de modo que as posições dos códons de início e término da tradução, nestas sequências, também podem estar em posições diferentes, em relação às posições encontradas na sequência caracterizada no Capítulo 1. Assim, os transcritos que originaram estas sequências podem ter posições diferentes para os códons de início e término da tradução, em relação às posições correspondentes às encontradas na sequência caracterizada do *GluCl α* .

Em relação ao grupo de larvas sobreviventes, não foi verificada a ocorrência das sequências de 1243, 1326 e 1347 pb, enquanto que no grupo representado pelas larvas mortas, as sequências de 1124, 1288, 1302 e 1359 pb (transcrito B) todos com parada prematura da tradução, não foram encontrados. Este fato significa que foram encontrados mais transcritos com “stop codon” prematuro no grupo das larvas sobreviventes do que no grupo onde as larvas morreram e, portanto, isso poderia ter relação com a insensibilidade à ivermectina, embora essa diferença não seja significativa.

Insensibilidade aos inseticidas, em receptores “Cys-loop LGIC” devido a um “stop codon” prematuro, já é conhecida na resistência aos neonicotinóides e espinosinas nos receptores nAChRs, resultando inclusive na perda de função desses receptores (revisado em Perry *et al.*, 2011). No caso de macrolactonas, apesar de serem limitados, existem estudos que associam a presença prematura de códons de terminação surgidos em determinados transcritos variantes do *GluCl α 3* com a insensibilidade na ligação com macrolactonas, em nematódeos (Dent *et al.*, 2000). Diante disso, estudos qualitativos, principalmente com o uso da técnica “two-electrode voltage clamp”, largamente utilizada para estudar as propriedades de receptores “Cys-loop LGIC” (Kane *et al.*, 2000; Eguchi *et al.*, 2006), seriam necessários para obtenção das propriedades farmacológicas das isoformas de 348, 349 e 401 resíduos, encontradas neste estudo. Nesta técnica, o receptor “Cys-loop LGIC”, expresso na membrana citoplasmática de oócitos

de *Xenopus*, tem a sua corrente iônica (Cl^- no caso do $\text{GLUCL}\alpha$) medida por microeletrodos após a adição do ligante, que são MLs no caso do estudo da resistência (Baumgartner *et al.*, 1999). No caso de haver alguma alteração que impeça a ligação ou abertura do receptor pela ML, a corrente iônica não passará ou será reduzida, sugerindo que a existência dessa alteração em um organismo alvo de MLs pode resultar em resistência (Kane *et al.*, 2000; Eguchi *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2012 Lynch & Lynagh, 2010a, 2010b).

Análise das frequências das mutações

Entre as 9 mutações encontradas somente nos indivíduos sobreviventes, a Glu350Gly e a Tyr443Cys foram encontradas no mesmo alelo de um único indivíduo, enquanto a Ile138Val e a Phe194Ser foram encontradas em alelos diferentes de uma segunda larva. Cada uma das mutações Asn141Asp, Val177Ile, Glu198Gly, Leu239Pro e Ile252Thr, foram encontradas em apenas 1 indivíduo separadamente. Considerando os 3 clones analisados por larva, todos os indivíduos são heterozigotos para as posições de suas mutações.

Em relação à mutação Arg242Lys, encontrada em indivíduos mortos e sobreviventes, a análise das sequências de cada um desses indivíduos mostrou que apenas o indivíduo com as mutações Glu350Gly e Tyr443Cys é heterozigoto (Arg/Lys) para a posição 242. Não foram encontrados indivíduos homozigotos para arginina (Arg/Arg).

Os aminoácidos lisina e arginina, na posição 242 da sequência predita de aminoácidos do $\text{ChGLUCL}\alpha$, foram encontrados tanto em larvas sobreviventes quanto mortas. Nessa posição, ainda foi encontrado um “stop codon” em um indivíduo morto.

Considerando independência entre os genótipos e a sobrevivência das larvas, a comparação da taxa de sobrevivência entre os genótipos na posição 242 do $\text{ChGLUCL}\alpha$ pelo teste exato de Fisher mostrou que houve uma diferença significativa da sobrevivência ($P = 0,08$; $\alpha = 0,1$) entre as classes genotípicas. Desse modo, rejeitamos, assim, a hipótese nula de independência (Tabela 8).

Tabela 8: Comparação da taxa de sobrevivência entre os genótipos (considerando 3 clones/larva) para 15 larvas de cada grupo, para a posição 242 da sequência predita de aminoácidos do ChGLUCL α .

<i>Genótipos</i>	<i>Sobreviventes</i>	<i>Mortos</i>	<i>TOTAL</i>
Lys/Stop	0	1	1
Arg/Lys	1	5	6
Lys/Lys	14	9	23
TOTAL	15	15	30

Estes resultados sugerem que há relação entre a sobrevivência das larvas e alterações na posição 242 da sequência predita de aminoácidos do *GluCl α* de *C. hominivorax*.

Embora a probabilidade de se obter os resultados deste estudo ($P = 0,08$) não seja um valor significativo em nível de significância de 5%, o aumento do tamanho amostral (N) e, conseqüentemente, do poder do teste estatístico, possivelmente poderia tornar o resultado significativo estatisticamente neste nível (Emden, 2008). Entretanto, o valor obtido de 8% para o P -valor não exclui a possível relação entre a presença da Lys242 e a sobrevivência ao inseticida (Motta, 2006). A localização em uma posição relacionada com a abertura do receptor e próxima de posições relacionadas com a ligação e resistência à IVM, além da conservação do resíduo Arg242 nos membros “Cys-loop LGIC” (Figura 13) e da maior frequência da Lys242 em indivíduos sobreviventes, são evidências da possibilidade da relação com a sobrevivência das larvas, embora possa não ser requisito determinante para isso. Tendo em vista que das 30 posições apresentando mutações nos indivíduos do bioensaio, apenas 9 foram selecionadas em ambiente com inseticida, exclusivamente nos indivíduos sobreviventes, e dessas, 5 estão em domínios associados à interação com a IVM e com resíduos que, quando mutados, levam à resistência, é possível que essas substituições tenham, isoladamente ou em conjunto, participação no mecanismo de resistência, em diferentes intensidades.

Substituições de AA Mort.	SNP/Total Mort.	Substituições de AA Sobr.	SNP/Total Sobr.	Domínio no GLUCLα dos Sobr.
N149S	1/30	I138V	1/30	NTE
N149D	1/30	N141D	1/30	NTE, Loop E
S159T	1/30	V177I	1/30	NTE, Cys-Loop
M182T	1/30	F194S	1/30	NTE
V193I	1/30	E198G	1/30	NTE, Loop $\beta 8\beta 9$
L215F	1/30	L239P	1/45	NTE, pré-M1
L219S	1/30	I252T	1/45	M1
N224S	1/30	E350G	1/30	M3-M4 Loop
S225G	1/30	Y443C	1/30	CTE
K236E	1/30	R242K	44/45	NTE, pré-M1
I250F	1/30			
Q251R	1/30			
W264R	1/30			
S279P	1/30			
V314I	1/30			
A322V	1/30			
E324V	1/30			
S333P	1/30			
I427V	1/30			
T428A	1/30			
A434V	1/30			
R242K	35/45			
R242*	1/45			

Figura 16: Análise do N° de clones apresentando determinado SNP com o N° total de clones analisados em cada grupo (mortos e sobreviventes) e os domínios no GLUCL α apresentando os SNPs do grupo de larvas sobreviventes. NTE=N-terminal; CTE=C-terminal; Mort.=Mortos; Sobr.=Sobreviventes; AA=aminoácidos.

A análise estatística através do teste exato de Fisher mostrou uma diferença significativa ($P = 0,007$) entre o número de clones que apresentaram a substituição R242K no grupo de larvas mortas na menor concentração de IVM e o número de clones que apresentaram essa substituição no grupo de larvas sobreviventes na maior concentração do inseticida (Tabela 9). Desta forma, a maior presença de clones com o SNP para K242 (códon AAG) no grupo sobrevivente, é uma evidência da possível associação desse aminoácido com a sobrevivência. Na posição K241 no GLUCL α de *D. melanogaster* (Figura 7), correspondente à posição da alteração R242K em *C. hominivorax*, ocorre edição do pré-RNAm (Semenov & Pak, 1999), mudando o códon AAG (K241) para AGG (R241). No caso dessa edição também ocorrer em *C. hominivorax* o maior número de sequências apresentando K242 nas larvas sobreviventes sugere que a maior concentração de IVM nesse grupo poderia interferir no mecanismo de edição, resultando no menor número de sequências editadas (44/45 com o códon AAG – K242).

CONCLUSÕES GERAIS

Múltiplos alvos, uso da técnica “two-electrode voltage clamp” e transcritos alternativos

A resistência aos endectocidas disponíveis, por meio das alterações nos sítios alvo, é um dos principais mecanismos que os invertebrados dispõem para sobreviver em ambientes onde a pressão de seleção exercida pela aplicação cada vez mais frequente e intensa desses produtos químicos, permite os indivíduos mais adaptados transferirem para seus descendentes os alelos selecionados.

Atualmente, um grande número de compostos inseticidas e nematicidas possui como alvo componentes importantes do sistema nervoso desses invertebrados, notadamente os receptores/canais iônicos dependentes de neurotransmissores (revisado em Perry *et al.*, 2011), os quais são de importância vital para o funcionamento correto da permeabilidade e comunicação celulares e para a formação do potencial de ação que se propaga entre os neurônios.

Somente em *D. melanogaster*, organismo modelo extensivamente estudado em relação à resistência, entre os 23 receptores/canais pertencentes à superfamília “Cys-loop LGIC” nessa espécie (Jones & Sattelle, 2007), são conhecidos pelo menos 5 membros os quais interagem com inseticidas da classe das macrolactonas. O receptor $GLUCL\alpha$, considerado o principal alvo das macrolactonas, além de subunidades dos receptores GABA (*ativado por ácido γ - aminobutírico*), $HISCL1$ e $HISCL2$ (*ativados por histamina*), e $pHCL$ (*ativado por H^+*) são alvos conhecidos de avermectinas e milbemicinas em *D. melanogaster* (Cully *et al.*, 1996; Ludmerer *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2002; Schnizler *et al.*, 2005; Yusein *et al.*, 2010; revisado em Wolstenholme & Rogers, 2005).

Além dos alvos já validados experimentalmente no modelo *D. melanogaster*, diversos receptores em parasitas nematódeos e artrópodes já foram verificados como importantes nas suas relações com macrolactonas, evidenciando inclusive a existência de mais de um receptor, na mesma espécie, com mutações resistentes na interação com IVM. No ácaro *Tetranychus urticae*, por exemplo, dois receptores da família dos canais de cloreto dependentes de L-glutamato ($GLUCL\alpha1$ e $GLUCL\alpha3$) foram identificados com mutações que os levaram à resistência à abamectina (Dermauw *et al.*, 2012). A presença da mutação adicional no receptor $GLUCL\alpha3$ resultou em resistência maior do que a conferida isoladamente pela mutação encontrada no $GLUCL\alpha1$ desse ácaro.

Em parasitas nematódeos, o caráter múltiplo dos alvos das macrolactonas é evidenciado na seleção de alelos no $GLUCL\alpha3$ de *C. oncophora* (Njue & Prichard *et al.*, 2004) e no GABA de *H. contortus* (Blackhall *et al.*, 2003), entretanto, o caso mais detalhado sugerindo a existência de múltiplos receptores

“Cys-loop LGIC” com afinidade à ivermectina e envolvidos na resistência, foi o estudado por Dent *et al.* (2000). Em seu estudo demonstra a necessidade de mutações em pelo menos 2 receptores da família dos canais de cloreto dependentes de L-glutamato (GLUCL α 2, GLUCL α 3) para o desenvolvimento de uma resistência moderada, e de mutação em mais um membro dessa família (GLUCL α 1) para resistência a doses maiores.

Estes resultados, obtidos em artrópodes e nematódeos, indicam a natureza poligênica da resistência mediada por diferentes sítios-alvo nesses organismos, característica que, inclusive, permitiria a redução da taxa de evolução da resistência, uma vez que muitos alvos simultâneos precisariam ser mutados para o estabelecimento da mesma (Dent *et al.*, 2000).

Um fator que influenciaria no número de genes mutantes necessários para o estabelecimento de diferentes níveis de resistência, seria a intensidade da seleção promovida pelo inseticida aplicado. De acordo com Ffrench-Constant (2004) a intensa seleção realizada pela aplicação de doses maiores de inseticidas levaria à seleção dos “major genes”, um ou poucos genes que conteriam mutações responsáveis pela sobrevivência às grandes doses de inseticida, enquanto o caráter poligênico da resistência seria observado em uma seleção menos rigorosa.

Neste contexto, este fenômeno poderia ter ocorrido na seleção promovida pelo bioensaio deste estudo, o que significaria que as mutações encontradas no GLUCL α de *C. hominivorax* poderiam ser apenas auxiliares, juntamente com mutações em receptores como GABA, HISCL1, pHCL, entre outros, na determinação da sobrevivência das larvas.

Para que a participação no desenvolvimento de resistência das mutações encontradas neste estudo, especialmente das 6 principais mutações encontradas, seja elucidada, é fundamental o uso da técnica “two-electrode voltage clamp”, largamente utilizada para encontrar as propriedades farmacológicas de receptores mutantes apresentando resistência à ivermectina (Kane *et al.*, 2000; Eguchi *et al.*, 2006; Lynagh & Lynch, 2010a, 2010b).

O uso desta técnica, inclusive aplicada em receptores com mutagênese sítio-dirigida em laboratório, é de extrema utilidade na descoberta das posições e domínios associados à interação com o inseticida, antes que mutações em populações de campo venham a ser analisadas (revisado em Perry *et al.*, 2011). A abordagem desta técnica permite, ainda, descobrir se um determinado receptor, juntamente com mutações associadas a ele, interage com diferentes inseticidas, possibilitando a descoberta de resistência cruzada, e sendo uma importante ferramenta na rotação de inseticidas com diferentes modos de ação, auxiliando na prática do manejo integrado (revisado em Perry *et al.*, 2011).

Considerando que nenhuma mutação específica tenha sido encontrada ligada à resistência em todos os indivíduos sobreviventes, e também a baixa frequência das mutações exclusivas dos sobreviventes, encontradas em domínios relacionados direta ou indiretamente à abertura do receptor (Loops, pré-M1 e M1), não podemos concluir que estejam relacionadas à resistência/insensibilidade à IVM, embora as posições nos domínios em que se encontram, sugiram o contrário, isto é, que há possibilidade de participação na sobrevivência das larvas. Além disso, a evidência da possível participação dessas substituições na sobrevivência é reforçada pela diferença nas propriedades da cadeia lateral entre aminoácidos. Uma vez que há uma participação significativa de propriedades da cadeia lateral entre os resíduos das mutações relacionadas à resistência/insensibilidade à IVM na literatura citada (18/22 diferem no tamanho da cadeia lateral) e nas mutações N141D (Loop E), V177I (Cys-Loop), E198G (Loop β 8 β 9), L239P (Pré-M1) e I252T (M1) (todas diferem no tamanho), exclusivas de sobreviventes e localizadas nos domínios relacionados à abertura do receptor, isto evidencia a possível importância desta propriedade na interação IVM/receptor.

Em relação aos transcritos variantes obtidos do *GluCl α* em *C. hominivorax*, os resultados são consistentes com a ampla distribuição de formas alternativas de RNAm entre os membros “Cys-loop LGIC”, e com os trechos de sequências sinalizadoras de “splicing” conservadas em *D. melanogaster* e vertebrados (Mount *et al.*, 1992), também encontradas nas sequências obtidas, sugerindo a existência de transcritos alternativos no gene do canal de cloreto dependente de glutamato em *C. hominivorax*.

Além disso, também foram encontradas nas sequências de cDNA obtidas de *C. hominivorax* regiões similares às regiões codificantes dos transcritos alternativos do *GluCl α* de *D. melanogaster*, como as que ocorrem entre a sequência obtida de cDNA de 1120 pb, que codificaria sequência predita de 349 aminoácidos, e a região codificante do transcrito variante *GluCl α* - RF de *D. melanogaster*, que codifica uma sequência de 349 aminoácidos. Similaridade também ocorre entre os transcritos alternativos *GluCl α* - RI, RM e RP de *D. melanogaster*, com regiões codificantes de 1371 nucleotídeos, e a sequência obtida de cDNA de 1364 nucleotídeos em *C. hominivorax*, todos codificando sequências preditas de 456 resíduos, exemplificando a similaridade de transcritos nestas espécies.

Apesar dessas descobertas, ainda são necessários novos estudos de modo a caracterizar a sequência completa dos transcritos, como suas regiões “UTR” e, talvez, até associar determinadas isoformas com a insensibilidade à ivermectina. O sequenciamento da região genômica do gene *GluCl α* também é muito importante nessa caracterização, uma vez que permite determinar as posições dos éxons e íntrons e, assim, descobrir como ocorre o uso alternativo de éxons nos diferentes transcritos.

REFERÊNCIAS

- Allingham, P.G.; Kemp, D.H.; Thompson, D.R.; Rugg, D. Effect of Ivermectin on Three Field Populations and a Laboratory Strain of *Haematobia irritans exigua* (Diptera: Muscidae). *J. of Econ. Entom.* v. 87, n. 3, p. 573-576, 1994.
- ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne) - Exportações brasileiras de carne bovina – 2011. <http://www.abiec.com.br/download/2011_Site%20total.pdf>.
- Akker, S.A.; Khoo, B.C.E.; Shew, S.L. Alternative Splicing. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, v. 1, 2004.
- Aktar, M.W.; Sengupta, D.; Chowdhury, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisc. Toxicol.* v. 2, n. 1, p. 1-12, 2009.
- Alexandratos, N.; Bruinsma, J. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. Rome: FAO, 2012.
- Allen, M.L.; Scholl, P.J. Quality of Transgenic Laboratory Strains of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *J. Econ. Entomol.* v. 98, n. 6, 2005.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- Anziani, O.S.; Flores, S.G.; Molledo, H.; Derozier, C.; Guglielmone, A.A.; Zimmermann, G.A.; Wanker, O. Persistent activity of doramectin and ivermectin in the prevention of cutaneous myiasis in cattle experimentally infested with *Cochliomyia hominivorax*. *Veterinary Parasitology*, v. 87, n. 2-3, p. 243-247, 2000.
- Anziani, O.S.; Guglielmone, A.A.; Aguirre, D.H. Larvicidal activity of abamectin against natural *Cochliomyia hominivorax* larva infestation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 791, p. 443-444, 1996.
- APCa (Ativos da Pecuária de Corte). 17 ed. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), Ano 2, 2010.
- APCb (Ativos da Pecuária de Corte). 11 ed. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), Ano 2, 2010.
- Bartos, M.; Corradi, J.; Bouzat, C. Structural Basis of Activation of Cys-Loop Receptors: the Extracellular-Transmembrane Interface as a Coupling Region. *Mol. Neurobiol.*, v. 40, p. 236–252, 2009.
- Batista-da-Silva, J.A.; Abádio, H.C.; Queiroz, M.M.C. Miíase humana por *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr.) (Diptera, Cuterebridae) e *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera, Calliphoridae) em Sucessão Parasitária. *EntomoBrasilis*, v. 2, n. 2, p. 61-63, 2009.
- Baumgartner, W.; Islas, L.; Sigworth, S.J. Two-Microelectrode Voltage Clamp of *Xenopus* Oocytes: Voltage Errors and Compensation for Local Current Flow. *Biophysical Journal*, v. 77, 1999.
- Benitez Usher, C.; Cruz, J.; Carvalho, L.; Bridi, A.; Farrington, D.; Barrick, R.A.; Eagleson, J. Prophylactic use of ivermectin against cattle myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858). *Veterinary Parasitology*, v. 72, n. 2, p. 215-220, 1997.
- Bertaccini, E.; Trudell, J.R. Predicting the transmembrane secondary structure of ligand-gated ion channels. *Protein Engineering*, v. 15, n. 6, p. 443-453, 2002.
- Betz, H.; Laube, B. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J. of Neurochemistry*, v. 97, p. 1600-1610, 2006.
- Blackhall, W.J.; Prichard, R.K.; Beech, R.N. Selection at a γ -aminobutyric acid receptor gene in *Haemonchus contortus* resistant to avermectins/milbemycins. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v. 131, p. 137–145, 2003.

- Blencowe, B.J.** Alternative Splicing: New Insights from Global Analyses. *Cell*, v. 126, 2006.
- Bliss, C.I.** The method of probits. *Science*, v. 79, n. 2037, 1934.
- Bliss, C.I.** The calculation of the dose-mortality curve. *Annals of Applied Biology*, v. 22, n. 1, p. 134-167, 1935.
- Bloomquist, J.R.** Chloride Channels as Tools for Developing Selective Insecticides. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* v. 54, p. 145–156, 2003.
- Borja, G.E.M.** Erradicação ou manejo integrado das miíases neotropicais das Américas? *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 23, n. 32, p. 131-138, 2003.
- Brown, A.W.A.** THE INSECTICIDE-RESISTANCE PROBLEM: A Review of Developments in 1956 and 1957. *Bull. Wid Hith Org.* v. 18. p. 309-321, 1958.
- Brown, A.W.A.; Pal, R.** Insecticide resistance in arthropods. Geneva: World Health Organization, 487p. 1971.
- Byford, R. L.; Craig, M. E.; Crosby, B. L.** A Review of ectoparasites and their effect on cattle production. *J. ANIM. SCI.* v. 70, p. 597-602, 1992.
- Burg, R. W.; Miller, B. M.; Baker, E. E.; Birnbaum, J.; Currie, S. A.; Hartman, R.; Kong, Y.; Monaghan, R. L.; Olson, G.; Putter, I.; Tunac, J. B.; Wallick, H.; Stapley, E. O.; Oiwa, R.; Omura, S.** Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 361-367, 1979.
- Campbell, W.C.; Fisher, M.H.; Stapley, E.O.; Albers-Schönberg, G.; Jacobsource, T.A.** Ivermectin: A Potent New Antiparasitic Agent. *Science*, New Series, v. 221, n. 4613, p. 823-828, 1983.
- Carlson, R.L.** Silent spring. 1 ed. New York: Houghton Mifflin, 1962, 400p.
- Carvalho, R.A.** Isolamento e caracterização do gene da esterase relacionado à resistência a inseticidas organofosforados na mosca praga da pecuária *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae). 2006. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- Carvalho, R.A.** Bases moleculares da resistência a inseticidas organofosforados na mosca praga da pecuária *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). 2010. 120 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- 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. *BMC Genomics*, v. 11, 2010a.
- Carvalho, R.A.; Limia, C.E.G.; Bass, C.; Azeredo-Espin, A.M.L.** 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*, 2010b.
- Carvalho, R.A.; Torres, T.T.; Azeredo-Espin, A.M.L.** 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*, v. 140, p. 344-35, 2006.
- Carvalho, R.A.; Torres, T.T.; Paniago, M.G.; Azeredo-Espin, A.M.L.** Molecular characterization of esterase E3 gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 23, p. 86-91, 2009.
- Casida, J.E.; Quistad, G.B.** Golden age of insecticide research: Past, Present, or Future? *Annu. Rev. Entomol.*, v. 43, p. 1-16, 1998.
- Cederholm, J.M.E.; Schofield, P.R.; Lewis, T.M.** Gating mechanisms in Cys-Loop receptors. *European Biophysics Journal*, v. 39, p. 37-49, 2009.
- Cleland, T.A.** Inhibitory glutamate receptor channels. *Molecular Neurobiology*, v. 13, p. 97-136, 1996.
- Collins, T.; Millar, N.S.** Nicotinic Acetylcholine Receptor Transmembrane Mutations Convert Ivermectin from a Positive to a Negative Allosteric Modulator. *Molecular pharmacology*, v. 78, n. 2, p. 198-204, 2010.

- Copley, R.R.** Evolutionary convergence of alternative splicing in ion channels. *TRENDS in Genetics*, v. 20., n. 4, 2004.
- Corringer, P.J.; Le Novere, N.; Changeux, J.P.** Nicotinic receptors at the aminoacid level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* V. 40, p. 431 - 458, 2000.
- Cserzo, M.; Wallin, E.; Simon, I.; Von Heijne, G.; Elofsson, A.** Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method; *Prot. Eng.* v. 10, n. 6, p. 673-676, 1997.
- Cully, D.F.; Paress, P.S.; Liu, K.K.; Schaeffer, J.M.; Arena, J.P.** Identification of a *Drosophila melanogaster* Glutamate-gated Chloride Channel Sensitive to the Antiparasitic Agent Avermectin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 33, p. 20187–20191, 1996.
- Dale, R.P.; Jones, A.K.; Tamborindeguy, C.; Davies, T.G.E.; Amey, J.S.; Williamson, S.; Wolstenholme, A.; Field, L.M.; Williamson, M.S.; Walsh, T.K.; Sattelle, D.B.** Identification of ion channel genes in the *Acyrtosiphon pisum* genome. *Insect Molecular Biology*. v. 19, p. 141–153, 2010.
- Danaher, M.; Howells, L.C.; Crooks, S.R.H.; Cerkvénik-Flajs, V.; O'keeffe, M.** Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B*, v. 844, p. 175–203, 2006.
- Delgado, R.; Barla, R.; Latorre, R.; Labarca, P.** L-Glutamate activates excitatory and inhibitory channels in *Drosophila* larval muscle. *FEBS letters*, v. 243, n. 2, p. 337-342, 1989.
- Dent, J.A.** Evidence for a Diverse Cys-Loop Ligand-Gated Ion Channel Superfamily in Early Bilateria. *Journal of Molecular Evolution*, v. 62, p. 523-535, 2006.
- Dent, J.A.; Smith, M.M.; Vassilatis, D.K.; Avery, L.** The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS*, v. 97, n. 6, p. 2674–2679, 2000.
- Dermauw, W.; Ilias, A.; Riga, M.; Tsagkarakou, A.; Grbi, M.; Tirry, L.; Van Leeuwen, T.; Vontas, J.** The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Tetranychus urticae*: Implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 42, p. 455-465, 2012.
- Eguchi, Y.; Ihara, M.; Ochi, E.; Shibata, Y.; Matsuda, K.; Fushiki, S.; Sugama, H.; Hamasaki, Y.; Niwa, H.; Wada, M.; Ozoe, F.; Ozoe, Y.** Functional characterization of *Musca* glutamate- and GABA-gated chloride channels expressed independently and coexpressed in *Xenopus* oocytes. *Insect Molecular Biology*, v. 15, n. 6, p. 773-783, 2006.
- El-Abdellati, A.; De Graef, J.; Van Zeveren, A.; Donnan, A.; Skuce, P.; Walsh, T.; Wolstenholme, A. Tait, A.; Vercruysse, J.; Claerebout, E.; Geldhof, P.** Altered avr-14B gene transcription patterns in ivermectin-resistant isolates of the cattle parasites, *Cooperia oncophora* and *Ostertagia ostertagi*. *International Journal for Parasitology*, v. 41, p. 951-957, 2011.
- Emden, H.F.** Statistics for Terrified Biologists. 1 ed. Oxford: Blackwell publishing, 2008, 343p.
- Fearnside, P.M.** Deforestation in Brazilian Amazonia: History, rates and consequences. *Conservation Biology*, v. 19, n. 3, p. 680-688, 2005.
- Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO).** The state of food and agriculture: livestock in the balance. 2009.
- Feyereisen, R.** Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicology Letters*, v. 82/83, p. 83-90, 1995.
- Ffrench-Constant, R. Daborn, P.J.; Le Goff, G.** The genetics and genomics of insecticide resistance. *TRENDS in Genetics*, v. 20, n. 3, 2004.
- Fox, L.A.** Ivermectin: uses and impact 20 years on. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 19, n. 6, p. 588-593, dez. 2006.
- Giordano, D. J.; Tritschler II, J. P.; Coles, G. P.** Seletion of ivermectin-resistant *Trichostrongylus colubriformis* in lambs. *Veterinary Parasitology*, v. 30, p. 139-148, 1988.

- Gomi, M.; Akazawa, F.; Mitaku, S.** SOSUlsignal: Software System for Prediction of Signal Peptide and Membrane Protein. *Genome Informatics*, v. 11, p. 414–415, 2000.
- Gosh, R.; Andersen, E.C.; Shapiro, J.A.; Gerke, J.P.; Kruglyak, L.** Natural Variation in a Chloride Channel Subunit Confers Avermectin Resistance in *C. elegans*. *Science*, v. 335, n. 774, 2012.
- Graham, O.H.** (Ed.). Symposium on Eradication of the Screwworm from the United States and México, 62. 1985. Maryland: Misc. Publ. *Entomological Society of America*, 1985. 68 p.
- Guimarães, J.H. & Papavero, N.** *Myiasis in man and animals in the neotropical region*; bibliographic database. São Paulo: Plêiade/FAPESP, 308p, 1999.
- Hall, M.; Wall, R.** Myiasis of humans and domestic animals. *Advances in Parasitology*, v. 35, 1995.
- Hall, T.A.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* v. 41, p. 95-98, 1999.
- Handler, A.M. ; Allen, M.L.; Skoda, S.R.** Development and utilization of transgenic New World screwworm, *Cochliomyia hominivorax*. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 23, p. 98 -105, 2009.
- Heckel, D.G.** Insecticide Resistance After *Silent Spring*. *Science*, v. 337, n. 1612, 2012.
- Hibbs, R.E. & Gouaux, E.** Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*, v. 474, 2011.
- Huang, X. & Madan, A.** CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, v. 9, p. 868-877, 1999.
- Infante, M.E. & Azeredo-Espin, A.M.L.** Genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochemical Genetics*, v. 33, n. 7-8, p. 737-756, 1995.
- IBGE.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Censo agropecuário 2006: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. 2006.
- IBGE.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Produção da pecuária municipal – 2011. v. 39, 2011.
- Irimia, M.; Penny, D.; Roy, S.W.** Coevolution of genomic intron number and splice sites *Trends in Genetics*, v. 23, n. 7, p. 321-325, 2007.
- Isman, M.B.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* v. 51, p. 45 – 66, 2006.
- Jarman, W.M.; Ballschmiter, K.** From coal to DDT: the history of the development of the pesticide DDT from synthetic dyes till Silent Spring. *Endeavour*, v.36, n. 4, p. 131-42, 2012.
- Jensen, M.L.; Schousboe, A.; Ahring, P.K.** Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels. *Journal of Neurochemistry*, v. 92, p. 217–225, 2005.
- Jones, A.K.** Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Bioinformatics*, v. 23, n. 5, p. 538–544, 2007.
- Jones, A.K. & Sattelle, D. B.** The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the honeybee, *Apis mellifera*. *Invert. Neurosci.* v. 6, p. 123-132, 2006.
- Jones, A.K. & Sattelle, D. B.** The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* . *BMC Genomics*, v. 8; n. 327; 2007.
- Jones, A.K.; Bera, A.N.; Lees, K.; Sattelle, D.B.** The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the parasitoid wasp, *Nasonia vitripennis*. *Heredity*, v. 104, p. 247-259, 2010.
- Kane, N.S.; Hirschberg, B.; Qian, S.; Hunt, D.; Thomas, B.; Brochu, R.; Ludmerer, S.W.; Zheng, Y.; Smith, M.; Arena, J.P.; Cohen, C.J.; Schmatz D.; Warmke, J.; Cully, D.F.** Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulisporic acid and ivermectin. *Genetics Neurobiology*, v. 97, n. 25, p. 13949–13954, 2000.
- Kash, T. L.; Jenkins, A.; Kelley, J.C.; Trudell, J.R.; Harrison, N.L.** Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA_Areceptor. *Nature*, v. 421, p. 272-275, 2003.

- Kelemen, O.; Convertini, P.; Zhang, Z.; Wen, Y.; Shen, M.; Falaleeva, M.; Stamm, S.** Function of alternative splicing. *Gene*, v. 514 p. 1-30, 2013.
- Khatri, A.; Weiss, D.S.** The role of Loop F in the activation of the GABA receptor. *Physiol.*, v. 588, n. 1, p. 59-66, 2010.
- Klafke, G.M.; Sabatini, G.A.; Albuquerque, T.A.; Martins, J.R.; Kemp, D.H.; Miller, R.J.; Schumaker, T.T.S.** Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 142, p. 386-390, 2006.
- Knipple, D.C.; Soderlund, D.M.** The ligand-gated chloride channel gene family of *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and physiology*, v. 97, p. 140-148, 2010.
- Krafsur, E.S.; Whitten, C.J.; Novy, J.E.** Screwworm eradication in North and Central America. *Parasitology Today*, v. 3, n. 5, p. 131-137, 1987.
- Krogh, A.; Larsson, B.; Von Heijne, G.; Sonnhammer, E.L.L.** Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001.
- Kwon, D.H.; Yoon, K.S.; Clark, J.M.; Lee, S.H.** A point mutation in a glutamate-gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Insect Molecular Biology*, v. 19, n. 4, p. 583-591, 2010.
- Lee, W.Y.; Free, C.R.; Sine, S.M.** Binding to Gating Transduction in Nicotinic Receptors: Cys-Loop Energetically Couples to Pre-M1 and M2-M3 Regions. *The Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 10, p. 3189-3199, 2009.
- LeOra Software Company.** Disponível em: <<http://www.leorasoftware.com/>>. Acesso em: 29 abr. 2012.
- Lespine, A.; Ménez, C.; Bourguinat, C.; Prichard, R. K.** P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 2, p. 58-75, 2012.
- Lipnick, R.L.; Muir, D.C.G.** *Persistent, Bioaccumulative, and Toxic Chemicals I*. Washington, DC: ACS Symposium Series, v. 772, p. 1-12, 2000.
- Lowry, R.** Fisher exact test. Disponível em: <www.vassarstats.net>. Acesso em: 10 nov. 2012. 2013
- Ludmerer, S.W.; Warren, V.A.; Williams, B.S.; Zheng, Y.; Hunt, D.C.; Ayer, M.B.; Wallace, M.A.; Chaudhary, A.G.; Egan, M.A.; Meinke, P.T. Dean, D.C.; Garcia, M.L.; Cully, D.F.; Smith, M.M.** Ivermectin and Nodulisporic Acid Receptors in *Drosophila melanogaster* Contain Both γ Aminobutyric Acid-Gated Rdl and Glutamate-Gated GluClR Chloride Channel Subunits. *Biochemistry*, v. 41, p. 6548-6560, 2002.
- Lynagh, T.; Lynch, J.W.** An Improved Ivermectin-activated Chloride Channel Receptor for Inhibiting Electrical Activity in Defined Neuronal Populations. *The journal of biological chemistry*, v. 285, n. 20, p. 14890-14897, 2010a.
- Lynagh, T.; Lynch, J.W.** A glycine residue essential for high ivermectin sensitivity in Cys-loop ion channel receptors. *Int. J. Parasitol*, v. 40, p. 1477-1481, 2010b.
- Lynagh, T.; Lynch, J.W.** Ivermectin binding sites in human and invertebrate Cys-loop receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 33, n. 8, 2012.
- Marygold, S.J.; Leyland, P.C.; Seal, R.L.; Goodman, J.L.; Thurmond, J.R.; Strelets, V.B.; Wilson, R.J.; the FlyBase Consortium.** FlyBase: improvements to the bibliography. *Nucleic Acids Res.* v. 41, n. D1, p. D751-D757, 2013.
- McCavera, S.; Rogers, A.T.; Yates, D.M.; Woods, D.J.; Wolstenholme, A.J.** An Ivermectin-Sensitive Glutamate-Gated Chloride Channel from the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular Pharmacology*, v. 75, n. 6, 2009.

- Metcalf, R.L.** A Century of DDT. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 1, n. 4, 1973.
- Miller, A.L.E.; Tindall, K.; Leonard, B.R.** Bioassays for monitoring insecticide resistance. *J. Vis. Exp.*, v. 46, n. 2129, 2010.
- Molento, M.B.** Parasite control strategies. *Veterinary Record*, v. 161, p. 180, 2007.
- Motta, V.T.** *Bioestatística*. 2 ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2006. 190 p.: il.
- Mount, S.M.; Burks, C.; Hertz, G.; Stormo, G. D.; White, O; Fields, C.** Splicing signals in *Drosophila*: intron size, information content, and consensus sequences. *Nucleic Acids Research*, v. 20, n. 16, p. 4255-4262, 1992.
- Moya - Borja, G.E.; Oliveira, C.M.; Muniz, R.A.; Goncalves, L.C.** Prophylactic and persistent efficacy of doramectin against *Cochliomyia hominivorax* in cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 49, n. 1, p. 95-105, 1993.
- Naylor, R.; Steinfeld, H.; Falcon, W.; Galloway, J.; Smil, V.; Bradford, E.; Alder, J.; Mooney, H.** Losing the Links Between Livestock and Land. *Science*, v. 310, 2005.
- Njue, A.I.; Prichard, R.K.** Genetic variability of glutamate-gated chloride channel genes in ivermectin-susceptible and -resistant strains of *Cooperia oncophora*. *Parasitology*, v. 129, p. 741-751, 2004.
- Njue, A.I.; Hayashi, J; Kinne, L.; Feng, X.P.; Prichard, R.K.** Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel $\alpha 3$ and β subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. *Journal of Neurochemistry*, v. 89, p. 1137–1147, 2004.
- Nownes, A.J.** Interest groups and the regulation of pesticides: Congress, coalitions, and closure. *Policy Sciences*, v. 24, p. 1-18, 1991.
- Nugent, T.; Jones, D.** Transmembrane protein topology prediction using support vector machines. *BMC Bioinformatics*, v. 10, n. 159, 2009.
- Oliveira, M.C.S. e Brito, L.G.** Miíases dos Bovinos. *Comunicado Técnico 56* [da] Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Pecuária Sudeste. São Carlos, SP, Novembro, 2005.
- Omura, S. e Crump, A.** The life and times of ivermectin — a success story. *Nat Rev Microbiol*, v. 2, n. 12, p. 984-989, 2004.
- Omura, S.; Ikeda, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Takahashi, C.; Shinose, M.; Takahashi, Y.; Horikawa, H.; Nakazawa, H.; Osonoe, T.; Kikuchi, H.; Shiba, T.; Sakaki, Y.; Hattori, M.** Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *PNAS*, v. 98, n. 21, p. 12215–12220, 2001.
- Pei, J.; Kim, B-H.; Grishin, N.V.** PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res.* v. 36, n. 7, p. 2295-2300, 2008.
- Pitesky, M.E.; Stackhouse, K.R.; Mitloehner, F.M.** Clearing the Air: Livestock's Contribution to Climate Change. Burlington: Academic Press. 2009. p. 1-40. (Advances in Agronomy, v. 103).
- McQuilton, P.; St Pierre, S.E.; Thurmond, J.** The FlyBase Consortium. FlyBase 101 – the basics of navigating FlyBase. *Nucleic Acids Res.* v. 40, 2012.
- Perry, T.; Batterham, P.; Daborn, P.J.** The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 41, p. 411-422, 2011.
- Petersen, T.N.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H.** SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, v. 8, p. 785-786, 2011.
- Pierleoni, A.; Índio, V.; Savojardo, C.; Fariselli, P.; Martelli, P.L.; Casadio, R.** MemPype: a pipeline for the annotation of eukaryotic membrane proteins. *Nucleic Acids Research*, v. 39, 2011.
- Prichard, R.; Ménez, C.; Lespine, A.** Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. *Int. Journal for Parasit.*, v. 2, p. 134-153, 2012.
- Quevillon E., Silventoinen V., Pillai S., Harte N., Mulder N., Apweiler R., Lopez R.** InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Researchs*, v. 33, 2005.

- Raymond-Delpech, V.; Matsuda, K.; Sattelle, B.M.; Rauh, J.J.; Sattelle, D.B.** Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert. Neurosci.* v. 5, p. 119–133, 2005.
- Reenan, R.A.** The RNA world meets behavior: A-I pre-mRNA editing in animals. *TRENDS in Genetics.* v.17, n. 2, 2001.
- Robertson, J.L.; Russel, R.M.; Savin, N.E.** POLO: a users guide to Probit or Logit analysis. United States Department of Agriculture, Forest Service, *Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station*, 1980.
- Robertson, J.L.; Smith, K.C.; Savin, N.E., Lavigne, R.J.** Effects of dose selection and sample size on the precision of the lethal dose estimates in dose-mortality regression. *Journal of economic entomology*, v. 77, p. 833-837, 1984.
- Robertson, J.L.; Preisler, H. K.; Russel, R.M.** PoloPlus: Probit and Logit analysis. User's guide. LeOra Software, 2002.
- Robinson, A.S.; Vreysen, M.J.B.; Hendrichs, J.; Feldman, U.** Enabling technologies to improve area-wide integrated pest management programmes for the control of screwworms. *Medical and Veterinary Entomology.* v. 23, p. 1-7, 2009.
- Rocha, A. A.** Exportação de carne deve somar US\$ 6 bilhões. *Valor Econômico*, 18 de jan. 2012.
- Rost, B.; Fariselli, P.; Casadio, R.** Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Prot. Science*, v. 5, p. 1704-1718, 1996.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, 2, 3, 1989.
- Sattelle, D. B.** Receptors for L-glutamate and GABA in the nervous system of an insect (*Periplaneta americana*). *Comp. Biochem. Physiol.* v. 103C, n. 3, p. 429-438, 1992.
- Schnizler, K.; Saeger, B.; Pfeffer, C.; Gerbaulet, A.; Ebbinghaus-Kintscher, U.; Methfessel, C.; Franken, E.M.; Raming, K.; Wetzel, C.H.; Saras, A.; Pusch, H.; Hatt, H.; Gisselmann, G.** Novel Chloride Channel in *Drosophila melanogaster* Is Inhibited by Protons. *Journal of Biol. Chem.*, v. 280, n. 16, p. 16254–16262, 2005.
- Semenov, E.P.; Pak, W.L.** Diversification of *Drosophila* chloride channel gene by multiple posttranscriptional mRNA modifications. *J. Neurochem.* v. 72, p. 66-72, 1999.
- Senapathy, P.; Shapiro, M.B.; Harris, N.L.** Splice junctions, branch point sites, and exons: Sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods in Enzymology*, v. 183, p. 252–278, 1990.
- Shen, H-B.; Chou, K-C.** Signal-3L: a layer approach for predicting signal peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 363, p. 297-303, 2007.
- Shen, H-B.; Chou, J.J.** MemBrain: Improving the Accuracy of Predicting Transmembrane Helices. *PLoS ONE*, v. 3, n. 6, 2008.
- Silva, N.M.; Azeredo-Espin, A.M.L.** Investigation of mutations associated with pyrethroid resistance in populations of the New World Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Genetics and Molecular Research*, v. 8, n. 3, p. 1067-1078, 2009.
- Sine, S.M.; Engel, A.G.** Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature*, v. 440, p. 448-455, 2006.
- Sprung, C.N.; Li, J.; Hovan, D.; McKay, M.J.; Forrester, H.B.** Alternative Transcript Initiation and Splicing as a Response to DNA Damage. *PLoS ONE*, v. 6, n. 10, 2011.
- Storer, T.I.** DDT and Wildlife. *The Journal of Wildlife Management*, v. 10, n. 3 p. 181-183, 1946.
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D.G.** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 24, p. 4876–4882, 1997.

- Thompson, A.J.; Lester, H.A.; Lummis, S.C.R.** The structural basis of function in Cys-loop Receptors. *Quarterly Reviews of Biophysics* v. 43, n. 4, p. 449–499, 2010.
- Thornton, P.K.** Livestock production: recent trends, future prospects. *Phil. Trans. R. Soc. B.* v. 365, p. 2853–2867, 2010.
- Tusndy, G.E.; Simon, I.** The HMMTop transmembrane topology prediction server. *BIOINFORMATICS*, v. 17, n. 9, p. 849–850, 2001.
- Usherwood, P.N.R.** Insect L-glutamate receptors. *Adv. Insect Physiol*, v. 24, p. 309–334, 1994.
- Van Wyk, J. & Malan, F.** Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Veterinary Record*, v. 123, p. 226–228, 1988.
- Vargas-Terán, M.; Hofmann, H. C.; Tweddle, N. E.** Impact of screwworm eradication programmes using the sterile insect Technique. *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management-FAO*, p. 629–650, 2005.
- Vassilatis, D.K.; Elliston, K.O.; Pareess, P.S.; Hamelin, M.; Arena, J.P.; Schaeffer, J.M.; Van der Ploeg, L.H.T.; Cully, D.F.** Evolutionary Relationship of the Ligand-Gated Ion Channels and the Avermectin-Sensitive, Glutamate-Gated Chloride Channels. *J. Mol. Evol.* v. 44, p. 501–508, 1997.
- Veríssimo, J.C.** Morte de ruminantes devido à infecção na orelha consequente  miase causada por *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858). *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 70, n. 2, p. 187–189, 2003.
- Vidotto, O.** Estratégias de combate aos principais parasitas que afetam os bovinos. *Anais do Sul- Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil*, p. 192–212, 2002.
- Viklund, H.; Elofsson, A.** Best alpha-helical transmembrane protein topology predictions are achieved using hidden Markov models and evolutionary information. *Protein Sci.*, v. 13, n. 7, p. 1908–1917, 2004.
- Viklund, H.; Bernsel, A.; Skwark, M.; Elofsson, A.** SPOCTOPUS: a combined predictor of signal peptides and membrane protein topology. *Bioinformatics*, v. 24, n. 24, p. 2928–2929, 2008.
- Walker, K.R.; Ricciardone, M.D.; Jensen, J.** Developing an international consensus on DDT: a balance of environmental protection and disease control. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* v. 206, p. 423–435, 2003.
- Watson, T.G.; Hosking, B.C.; Leathwick, D.M.; McKee, P.F.** Ivermectin-moxidectin side resistance by *Ostertagia* species isolated from goats and passage to sheep. *Veterinary Record*, v. 138, n. 19, p. 472–473, 1996.
- Watson, J.D.; Baker, T.A.; Bell, S.P.; Gann, A.; Levine, M.; Losick, R.** Molecular biology of the gene. 6^{ed}. New Yor: Cold Spring Harbor, 2008, 841p.
- Wolstenholme, A.J.** Recent progress in understanding the interaction between avermectins and ligand-gated ion channels: putting the pests to sleep. *Invert. Neurosci.*, v. 10, p. 5–10, 2010.
- Wolstenholme, A.J. & Rogers. A.T.** Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, v. 31, Supplement S1, p. S85–S95, 2005.
- Woodward, K. N.** *Macrocyclic Lactone Endectocides*. In: Marrs, T.C. (Org.). *Issues in Toxicology N12: mammalian Toxicology of Insecticides*. Londres: Royal Society of Chemistry, 2012. cap.13, p. 427 - 467.
- Wyss, J.** Screwworm Eradication in the Americas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 916, p. 186 - 193, 2000.
- Yamaguchi, M.; Sawa, Y.; Matsuda, K.; Ozoe, F.; Ozoe, Y.** Amino acid residues of both the extracellular and transmembrane domains influence binding of the antiparasitic agent milbemycin to *Haemonchus contortus* AVR-14B glutamate-gated chloride channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 419, n. 3, p. 562–566, 2012.

- Yoon, K. S.; Strycharz, J.P.; Baek, J.H.; Sun, W.; Kim, J.H.; Kang, J.S.; Pittendrigh, J.B. Lee, S. H.; Clark, J. M.** Brief exposures of human body lice to sublethal amounts of ivermectin over-transcribes detoxification genes involved in tolerance. *Insect Molecular Biology*, 2011.
- Yusein, S.; Wolstenholme, A.; Semenov, E.** Functional consequences of mutations in the *Drosophila* histamine receptor HCLB. *J Insect Physiol.* v. 56, n. 1, p. 21-27, 2010.
- Zheng, Y.; Hirschberg, B.; Yuan, J.; Wang, A.P.; Hunt, D.C.; Ludmerer, S.W.; Schmatz, D.M.; Cully, D.F.** Identification of Two Novel *Drosophila melanogaster* Histamine-gated Chloride Channel Subunits Expressed in the Eye. *The journal of biological chemistry*, v. 277, n. 3, p. 2000-2006, 2002.
- Zumpt, F.** *Myiasis in man and animals in the old world*. Londres: Butterworths, 1965. 267 p.: il.

ANEXOS: Artigo

A caracterização da região codificante do gene $\text{GluCl}\alpha$, de substituições de aminoácidos possivelmente associadas à resistência à ivermectina e de sequências variantes de cDNA, resultaram em um artigo intitulado “Characterization of glutamate-gated chloride channel subunit of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) and its possible role in the survival to ivermectin” submetido ao periódico “*International Journal for Parasitology: Drugs and Drug resistance*” (ISSN: 2211-3207).

Characterization of glutamate-gated chloride channel subunit of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) and its possible role in the survival to ivermectin.

Alberto Moura Mendes Lopes^a

Renato Assis de Carvalho^a

Ana Maria Lima de Azeredo-Espin^a

^a Laboratory of Genetics and Animal Evolution, Center of Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), Dept. of Genetics, Evolution and Bioagents, University of Campinas, Campinas, SP, 6010, Brazil; A.M.M.L. e-mail: bmml@gmail.com; R.A.C. e-mail: rassis@gmail.com; A.M.L.A.E. e-mail: azeredo@unicamp.br.

Corresponding author: A. M. M. Lopes, Laboratory of Genetics and Animal Evolution, Center of Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), Dept. of Genetics, Evolution and Bioagents, University of Campinas, Campinas, SP, 6010, Brazil.

13083-875 Campinas, São Paulo, Brazil.

Tel.: + 55 19 35211120; Fax: + 55 19 3521 1089; E-mail: bmml321@gmail.com

*

Note: Supplementary data associated with this article

Abstract

Cochliomyia hominivorax (NWS) is one of the major myiasis-causing flies that injures livestock, leading to several production losses in South America, of about US\$ 2.8 billions. The most used preventive insecticides class to control this parasite in cattle is the macrolactones (MLs), most represented by ivermectin (IVM). The MLs target-sites are the cys-loop LGIC superfamily receptors, especially the glutamate-gated chloride (GLUCL α) channels, binding between two receptor's subunits and irreversibly opening these channels, which results in the parasite death. Many mutations in *C. oncophora*, *H. contortus*, *D. melanogaster* and *T. urticae* GLUCL α subunits orthologues have been found, including mutations in mammals GLYR α and nAChR α 7 receptors, in specific positions to be associated with MLs resistance. This work determined the full-length coding sequence of the *GluCl α* gene in *Cochliomyia hominivorax*, including 14 *GluCl α* transcript variants. The alignment of these transcripts sequences showed that they possess signaling motifs predicted to be related to pre-mRNA splicing, which agree with the large distribution of post-transcriptional alterations among the cys-loop LGIC receptors in invertebrates. It was conducted a IVM

bioassay and the *GluClα* coding sequences from 15 NWS larvae of both the survivors (ChIVR) and the death (ChSusc) larvae were analyzed to find mutations of interest that could be potentially associated with IVM resistance. It was found exclusive 21 mutations in ChSusc and 9 mutations in ChIVR groups. The mutation R242K was the only shared by both groups, with higher frequency in ChIVR. Among the mutations of the ChIVR group, five were found in important domains (Loops, pre-M1 and M1) to channel opening, including R242K (pre-M1). Considering only the frequency of the exclusive mutations in ChIVR group, we cannot conclude that they result in IVM resistance in NWS, but the amino acid substitutions positions and properties link them with the possibility to participation in IVM insensibility.

Keywords: *Cochliomyia hominivorax*; Cattle; *GluClα*; Mutation; Macrolactones

1. Introduction

Cochliomyia hominivorax (Coquerel), known as the New World screwworm fly (NWS), naturally occurs in the Neotropical region and is one of the worst parasites that injures livestock population in South American countries, except Chile, leading to economic losses of about US\$ 2.8 billion annually (Vargas-Terán et al., 2005). In Brazil, home of the largest commercial cattle herd in the world, the annual benefits of an eventual screwworm eradication were estimated in US\$ 1.77 billion (Wyss, 2000). The screwworm fly has an obligatory parasitic and myiasis-causing larval stage on its life-cycle, parasitizing warm-blooded vertebrates, including humans (Hall and Wall, 1995), and resulting in reduction of fertility, weight and milk production, besides leading to poor quality leather when attacking livestock animals (OIE, 2012). The NWS eggs are laid at the body orifices, mucous membranes or the edges of wounds, especially the navels of new-born calves and the vulval region of the mothers, and the emerged larvae immediately begin to feed on the wound fluids and tissues, resulting in extensive tissue damage, that if untreated may be lethal to the host (OIE, 2012).

The NWS control in the North and Central America and part of the Caribbean islands has been achieved by the release of sterile males in infested areas through the sterile insect technique in a 45-year eradication program, with the establishment of a barrier zone in southern Panama (Vargas-Terán et al., 2005). In South America, the control is historically accomplished by using insecticides, especially from the organophosphorus class, and more recently from the avermectins class as subcutaneous injections to animals at risk, as a preventive measure (OIE, 2012).

Avermectins are a subgroup of the macrocyclic lactones (MLs), the most profitable endectocides used in the world and one of the best anthelmintic, acaricides and insecticides in the market (Woodward, 2012). MLs were discovered in the decade of 1970 by the Kitasato Institute in Japan (Omura and Crump, 2004). The first commercial and most used avermectin is the ivermectin (IVM) (Omura and Crump, 2004). The discovery that IVM was safe for humans in the mid 1980s and the drug approval of the French government in 1987 generalized its use against a large number of ecto- and endoparasites that injury humans (Omura and Crump, 2004).

The main target-site of MLs are the members of the cys-loop ligand-gated ion channel superfamily (cys-loop LGIC) (Wolstenholme, 2010; Prichard et al., 2012), responsible for the excitatory or inhibitory flux of different ions moving through muscle and nerve cell membranes of vertebrate and invertebrate animals (Cleland, 1996). The cys-loop LGIC receptors are formed by five identical or different subunits that co-assemble to form the ionic channels in the post-synaptic neurons and in the motor neuron junctions (Eguchi et al., 2006; Ludmerer et al., 2002). The structural diversity of these receptors is largely broadened by editing and alternative splicing of transcripts in many members. The pre-mRNA editing and alternative splicing have been found in the *D. melanogaster GluCl α* (Semenov and Pak, 1999; www.flybase.org), GABA (Hosie et al., 2001), HisCl1 (Knipple and Soderlund, 2010) and pHCl (Schnizler et al., 2005) genes transcripts, as well as in the *A. mellifera* (Jones and Sattelle, 2006), *N. vitripennis* (Jones et al., 2010) and *T. castaneum* (Jones and Sattelle, 2007) cys-loop LGIC receptors. The most important ion channels for avermectins action are the glutamate-gated chloride channels (GLUCL α), only found in invertebrates, making the avermectins relatively safe for the chemical treatment of mammals (Wolstenholme and Rogers, 2005). The IVM is predicted to bind between two channel subunits (Wolstenholme, 2010; Hibbs and Gouaux, 2011), irreversibly opening the receptor channel and causing the influx of chloride ions, which causes the parasites paralysis and death (Cully et al., 1996).

Mutations have been found in *GluCl α* genes to be associated with MLs resistance or insensibility in nematodes and arthropods. Mutations in *C. oncophora* (L256F) (Njue et al., 2004), *H. contortus* (L256F/W/Y/V, G329S/A/F/D, P316S/A/L, D220A, L222A) (McCavera et al., 2009; Yamaguchi et al., 2012), *T. urticae* (G323D, G326E) (Kwon et al., 2010; Dermauw et al., 2012) and *D. melanogaster* (P299S) (Kane et al., 2000) *GluCl α* gene subfamily have been associated with resistance or receptor insensibility to MLs, including IVM. Site-directed mutagenesis in specific positions of the GLYR α (A288T/F) and nAChR α 7 (A225D, Q272V, T456V, C459Y) in mammals have been associated these mutations to MLs insensibility, resulting in low channel opening when binding to MLs (Lynagh and Lynch, 2010a, 2010b; Collins and Millar,

2010). Given the high degree of AA similarity among the *GluClα* genes, and even between the *GluClα* gene subfamily and other receptors as GLYRα and nAChRα7 (Ortells and Lunt, 1995), is possible that the subunit domains where these mutations were found could have alterations in *GluClα* genes from other species which could be resistant to IVM.

The development of a molecular diagnostic in NWS myiasis-causing larvae for IVM target-site resistance would help farmers and veterinarians to manage the IVM use and delay the rising and growth of resistance in the field. Based on this, the aims of this study were the characterization of the full-length coding sequence of the *GluClα* gene in *C. hominivorax* (Ch*GluClα*), including possible transcript variants. Since there is no reference resistant and susceptible strains of *C. hominivorax* to study molecular mechanisms of resistance, it was carried out a bioassay with IVM, and the *GluClα* coding region of the bioassay larvae were compared to find polymorphisms probably associated with resistance.

2. Materials and methods

2.1 NWS samples

The NWS larvae used were from the *C. hominivorax* strain maintained in the Laboratory of Genetics and Animal Evolution at the University of Campinas (Campinas, SP, Brazil). This strain were originally collected in 2006 directly from infested livestock animals on farms with a history of MLs use, located in the municipality of Caiapônia (16°57'14''S - 51°48'57''W), State of Goiás, Brazil, reared to adults and maintained in laboratory conditions according to Infante and Azeredo-Espin (1995). This NWS strain was maintained for several generations for about 5 years, without treatment with any MLs in the laboratory, prior to RNA extraction for *GluClα* characterization and bioassay evaluation. The NWS larvae used for *GluClα* characterization and in the bioassay were from the same laboratory strain.

2.2 Bioassay with IVM

The bioassay was carried out in February 2011 in the laboratory at the University of Campinas. It was performed in triplicates using 120 larvae in each replicate and a control-group of 30 larvae, totaling 390 L2 screwworm larvae, all from the same generation. Four IVM doses were used, with 30 larvae in each IVM dose replicate, resulting in 90 larvae per dose triplicate. The sample size of each replicate in the bioassay

was chosen based on Robertson et al. (1984) recommendations. The commercial formulation of IVM 1% used in this study is a mixture of C22, C23-dihydroavermectin B1a and B1b, in the proportion of about 90 and 10%, respectively (IVOMEC®, Merial Saúde Animal, Brazil). The control-group had the same characteristics of the replicates with IVM, but without IVM. The IVM concentrations of 0.32 ppm (3.2 µL of IVOMEC® solution in 100 g of culture medium), 1.0 ppm, 3.2 ppm and 10 ppm, were prepared mixing the respective IVM dose, separately, with a blood and water (2:1) mixture (30 mL) into plastic conic tubes (50 mL) capped with a lid, for about 20 s. The respective IVM mixture was subsequently mixed with ground meat (70 g) in a container (11 cm diameter, 4 cm high) capped with a screen lid, to allow for air and moisture exchange. The containers were subsequently put in dark room, due to IVM instability under light, at room temperature (~25°C). The L2 NWS larvae used were randomly chosen, removed from the rearing diet medium and subsequently held into the respective containers with (IVM-groups) or without (control-group) IVM. After 24 hours of incubation, 15 larvae that died in the lowest concentration (ChSusc) and 15 surviving larvae in the highest concentration (ChIVR) were randomly chosen and removed with tweezers from the bioassay containers, cleaned and dried on paper towels, put into plastic conic tubes and immediately stored at -70°C. Only the larvae that showed some locomotion was considered alive. The incubation period used to assess the bioassay mortality was based on IVM-bioassays carried out by Klafke et al. (2006). The POLO PLUS software (LeOra software, 2003) was used to calculate the lethal concentrations (LC) for 50 and 90%, with their respective confidence intervals (CI95%), and a paired t-test to testing the significance of the slope of the regression line (Supplementary Table S1).

2.3 RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from 4 L3 and 30 L2 larvae both using TRIZOL treatment (Life Technologies™) according to manufacturer's protocol. After the RNA extraction, the genomic DNA residues were removed using TURBO™ DNase (Life Technologies™) and the first-strand of the cDNA was constructed by reverse transcription of total RNA (RT-PCR) carried out using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas).

2.4 Cloning and sequence analysis

The PCR amplifications of the coding sequence were carried out using three pairs of primers, the

F1/R3, amplifying the 5'-end region, the F3/R4, amplifying the 3'-end region, and the F1/R4, amplifying the full-length coding sequence. The amplification by PCR of the *GluClα* coding sequence in order to characterize this gene in *C. hominivorax* was carried out using the pairs of primers F1/R3 and F3/R4. The amplification by PCR of the *GluClα* coding sequence of the bioassay larvae with the aim of genotype was performed using the pairs of primers F1/R3, F3/R4 and F1/R4 and carried out in 10 larvae of both groups, ChSusc and ChIVR. The 5 remaining bioassay larvae from each of these groups had only a smaller fragment amplified by the pair of primers F2/R3. All primers sequences are in the Supplementary Table S2.

The F1, F2, F3 and R3 primers were designed based on the Ch*GluClα* partial sequence obtained from the *C. hominivorax* transcriptome (Carvalho et al., 2010), while the R4 primer was designed considering the conservation of stop codon region among the sequences of *GluClα* genes from *L. cuprina* (GenBank Accession No. **AF081674.1**), *M. domestica* (Genbank Accession No. **AB177546.1**) and *D. melanogaster* (PI isoform; FlyBase Accession No. **FBtr0335417**) (Supplementary Fig. S1). Found the conserved region, the primer R4 was designed based on the *L. cuprina* *GluClα* gene sequence. The primer F1 was located in the 5'-end of the previously published *GluClα* partial sequence from *C. hominivorax* (Carvalho et al., 2010), 2 nucleotides downstream from the ATG initiation codon, homologous to the corresponding position in the *L. cuprina* sequence. All PCR amplifications were carried out in a 25 µL reaction volume and had 1.5 U of *Taq* DNA Polymerase and 1 µL of cDNA. The others reagents for the pair of primers F1/R3 were 14 µM of dNTPs, 2.8 mM of MgCl₂ and 0.4 µM of primers. For the pair of primers F3/R4 the reaction concentrations were 10 µM of dNTPs, 2.4 mM of MgCl₂ and 0.16 µM of primers. The pairs of primers F1/R4 and F2/R3 had the same reagent concentrations with 56 µM of dNTPs, 2.8 mM of MgCl₂ and 0.4 µM of primers. The PCR reagents had concentrations according to manufacturer's protocols. The PCR thermocycler conditions for the pairs of primers F1/R3 and F3/R4 were an initial denaturation step of 95°C (3 min), followed by 35 cycles of 95°C (30 s), x°C (30 s, annealing temperature - Supplementary Table S2) and 72°C (1 min), finalizing with an extension step of 72°C (15 min). For the pairs of primers F1/R4 and F2/R3 the specific conditions were a denaturation step of 95°C (5 min), followed by 35 cycles of 95°C (1 min), x°C (1 min, annealing temperature - Supplementary Table S2) and 72°C (1 min 30 s), with a final extension step of 72°C (10 min).

The PCR products amplified by the pair of primers F1/R3 were purified directly from the amplification reaction and the PCR products amplified by the pairs of primers F3/R4, F1/R4 and F2/R3 had the fragments of the expected size purified after running in a 1% agarose gel (w/v) and staining with 0.5 µg/mL ethidium bromide. The purification was carried out using the Invisorb® Fragment CleanUp kit

(Invitex) or illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare). After purification the fragments were ligated into a pGEMT-Easy vector (Promega) and the transformation was carried out into DH5α cells. Three clones of each fragment amplified by the pairs of primers F1/R3, F3/R4, F1/R4 and F2/R3, were sequenced.

The plasmid inserts were bidirectionally sequenced using the forward M13+ primer and the reverse M13- primer (Supplementary Table S3) on a 96-capillary ABI-3730xl or ABI-3500xl (Life Technologies™) sequencers. The sequences were analyzed using the software Sequence Scanner version 1.0 (Life Technologies™). The 5' and 3' coding sequences were assembled and a consensus baseline nucleotide sequence was obtained using the software CAP3 (Huang and Madan, 1999) for the *ChGluClα* characterization. The alignment of the nucleotide and amino acid (AA) sequences from the bioassay larvae for the search of polymorphisms was conducted by the software ClustalX (Thompson et al., 1997) and the frequencies of polymorphisms were statistically analyzed using the Fisher exact test. The software PROMALS3D (Pei et al., 2008) was used to align the AA sequences of cys-loop LGIC receptors from not related species with mutations associated to resistance to IVM and residues predicted to bind to IVM. All nucleotide sequences obtained were translated into AA sequences by the software NCBI-ORF Finder (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf). The analysis of alternative splicing and size of the transcript variants were carried out only with the *ChGluClα* coding sequences amplified by the pair of primers F1/R4. From the 20 NWS larvae of the bioassay groups that had the *ChGluClα* full-length coding sequence analyzed, 16 had the *ChGluClα* coding sequence amplified using the pair of primers F1/R4, which resulted in 48 clones analyzed.

The database searches for orthologues relationships were performed using NCBI-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) and FlyBase (www.flybase.org).

3. Results

3.1 GLUCLα subunit characterization

The consensus coding sequence of the *GluClα* gene obtained from four L3 larvae of *C. hominivorax* (Genbank Accession No. **KF214912**) by assembling the 5'- and 3'-end fragments had 1352 nucleotides. This sequence, together with the five remaining nucleotides upstream of the F1 primer obtained from the *C. hominivorax GluClα* partial sequence (Carvalho et al., 2010) and the 2 nucleotides of the termination codon,

downstream from the R4 primer, had 1359 bp and encoded a predicted amino acid (AA) sequence of 452 AA. The coding sequence presented here has high identity to the open reading frame (ORF) of the *GluCl α* genes in *D. melanogaster* (82%) (*Rl* transcript variant - FlyBase Accession No. **FBtr0335417**), *M. domestica* (89%) (Genbank Acession No. **AB177546.1**) and *L. cuprina* (96%) (Genbank Acession No. **AF081674.1**). The higher nucleotide identity with *L. cuprina* was expected given that the two species belong to the same family (Calliphoridae). The predicted 452 AA sequence in *C. hominivorax* showed even higher identity to the AA sequences of the orthologues genes, presenting 94, 95 and 99% identity to the *D. melanogaster* (*Pl* isoform), *M. domestica* and *L. cuprina* GLUCL α AA sequences, respectively, differing only at one amino acid position from the latter sequence (Fig. 1).

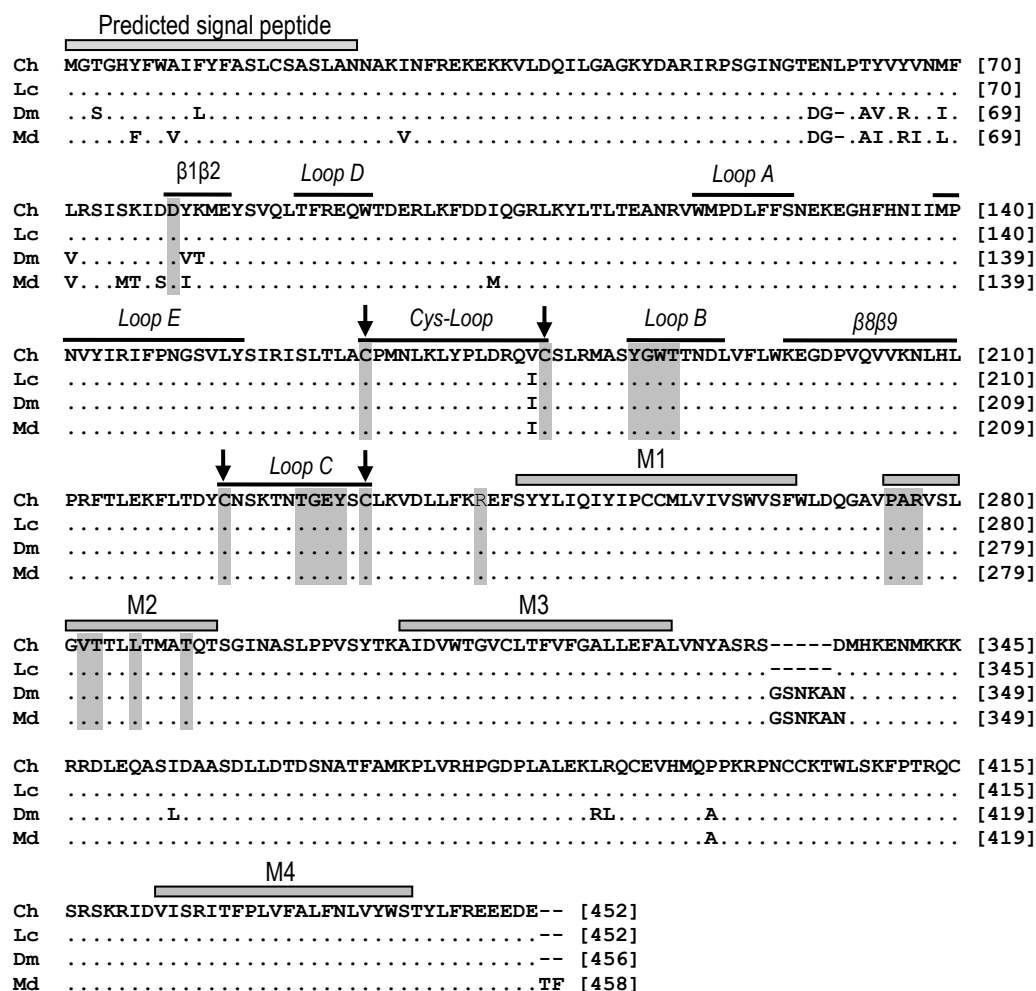


Fig. 1: Alignment generated by the software ClustalX of the ChGLUCL α (Ch) predicted amino acid consensus sequence of this study with the sequences of the *GluCl α* genes in *L. cuprina* (Lc), *M. domestica* (Md) and *D. melanogaster* (Dm-*Rl* variant). M1-M4=transmembrane domains. Arrows show residues of cysteine conserved in the superfamily cys-Loop LGIC (positions 164-178) and in some ligand-gated chloride channels (positions 223-234). YGWT and TGEY are predicted sites of binding of the L-glutamate. D and R are residues predicted as conserved in all members of the cys-Loop LGIC superfamily. PAR, VT, L and T in the M2 transmembrane are residues predicted as responsible for the selectivity by Cl⁻. Black lines represent extracellular loop domains conserved in the superfamily cys-Loop LGIC (Corringer et al., 2000).

The GLUCL α protein sequence in *C. hominivorax* possess all characteristic features of members of the cys-loop LGIC superfamily. These features include the four proposed transmembrane domains (M1-M4), an N-terminal extracellular domain containing distinct loops where are the predicted binding positions of the endogenous ligands (Corringer et al., 2000), the cys-loop formed by two disulphide-bond forming cysteines separated by 13 amino acids (Cederholm et al., 2009), an intracellular loop highly variable between the members of this superfamily and the residues aspartic acid (D) and arginine (R) (Fig. 1) (Sine and Engel, 2006). Besides that, the ChGLUCL α subunit AA sequence has features only found in the ligand-gated chloride channel family as the PAR, VT, L and T residues responsible for the chloride selectivity (Jensen et al., 2005), including the characteristic loop formed by a second disulphide-bond forming cysteines separated by 10 residues, that only happens in some chloride channels subunits in invertebrates (HISCL1, HISCL2, pHCL and GLUCL α) (Knipple and Soderlund, 2010) and vertebrates (GlyRa) (Betz and Laube, 2006). Two AA motifs (YGWT and TGEY), predicted to be the positions where the glutamate binds to perform the opening of the channel (Knipple and Soderlund, 2010), were still found.

3.2 Bioassay with IVM

After 24hs of incubation, used to perform the bioassay, five, five and eighth L2 larvae were selected (ChIVR) in each replicate of the highest IVM concentration triplicate (10 ppm), respectively, and 15, 10 and 10 L2 larvae died (ChSusc) in each replicate of the lowest concentration triplicate (0.32 ppm), respectively. From these larvae, 15 larvae of both of these groups, the ChIVR and ChSusc, were randomly chosen for analysis of AA substitutions in the cDNA of the *C. hominivorax GluCl α* gene.

The statistical analysis showed that the association between the IVM concentrations and the mortality was statistically significant ($P = 0.0013$; $t\text{-test} = 4.619$).

3.3 Analysis of the *GluCl α* sequences from the bioassay larvae

The cDNA analysis was initially carried out on ten L2 individual larvae of each group, the ChIVR and the ChSusc. The full-length *GluCl α* coding sequence from these 20 individual larvae was sequenced and the comparison of the predicted AA sequences by alignment showed the existence of 30 positions with AA substitutions in the coding sequence. Twenty positions with 21 AA substitutions were found only in the ChSusc group, while 9 AA substitutions were found exclusively in the ChIVR group (Fig.2). However, all of

these 30 coding SNPs were found only in one clone, and it's possible that it could be artefacts obtained during the amplification. There was only one AA substitution, R242K (AAG to AGG), that appeared in both groups in different frequencies. From the first 10 larvae analyzed from ChIVR group nine were homozygous for K/K (242) and one heterozygous, R/K. Among the 10 larvae from ChSusc group five were homozygous for K/K and five were heterozygous. No homozygous individuals were found for R/R.

The results of the analysis of SNPs in the full-length coding sequence from 10 individual NWS larvae and in the region spanning the position of the R242K substitution on five more individual larvae of both groups, ChSusc and ChIVR, are shown in Fig. 2.

AA substitutions ChSusc	SNP/Total ChSusc	AA substitutions ChIVR	SNP/Total ChIVR	Position in GLUCLα structure (ChIVR)
N149S	1/30	I138V	1/30	NTE
N149D	1/30	N141D	1/30	NTE, Loop E
S159T	1/30	V177I	1/30	NTE, Cys-Loop
M182T	1/30	F194S	1/30	NTE
V193I	1/30	E198G	1/30	NTE, Loop β 8 β 9
L215F	1/30	L239P	1/45	NTE, pre-M1
L219S	1/30	I252T	1/45	M1
N224S	1/30	E350G	1/30	M3-M4 Loop
S225G	1/30	Y443C	1/30	CTE
K236E	1/30	R242K	44/45	NTE, pre-M1
I250F	1/30			
Q251R	1/30			
W264R	1/30			
S279P	1/30			
V314I	1/30			
A322V	1/30			
E324V	1/30			
S333P	1/30			
I427V	1/30			
T428A	1/30			
A434V	1/30			
R242K	35/45			
R242*	1/45			

Fig. 2: Amino acid substitutions from 30 full-length *GluCL α* coding sequence clones of the ChSusc group and others 30 full-length *GluCL α* coding sequence clones of the ChIVR group and number of sequences analyzed (number of sequences with SNP/total number of sequences analyzed). The position of substitution R242K was genotyped from the same 60 full-length coding sequences of both groups and from more 15 clones of the 672 bp sequence of ChSusc group and others 15 clones of ChIVR group. The alignment between the predicted AA sequences of all 90 cDNA clones resulted in the visualization of the AA alterations. The AA alterations appearing in less individuals were considered mutant, exception made for the R242K substitution, where the amino acid K was considered mutant due to higher frequency in the ChIVR group and the close proximity to mutations related to resistance to IVM. NTE=N-terminal extracellular. CTE=C-terminal extracellular.

The region containing the R242K was amplified using primers (F2/R3) spanning this position, cloned and subsequently sequenced for verification of this mutation in 5 more L2 individual larvae of both groups. From these 10 larvae, nine were homozygous for K/K and only one larva from the ChSusc group was genotyped K/*.

- = Ile138Val, Asn141Asp, Val177Ile, Phe194Ser, Glu198Gly, Leu239Pro, Ile252Thr, Glu350Gly e Tyr443Cys in *Ch*.
- ↓ = Arg242Lys in *Ch*.
- ▼ = Positions of residues predicted to bind to IVM in the GLUCL α of *Ce*.
- ✦ = Mutations in *Hc* (G329S/A/F/D), *Hs* (A288T/F), *Tu* α 3 (G326E) and *Tu* α 1 (G323D), and one of the residues predicted to bind to IVM in GLUCL α of *Ce*.
- = Loop regions
- ▽ = Mutations in *Co* (L256F), *Hc* (L256F/W/Y/V), *Hc* (D220A, L222A), *Dm* (P299S), *Hc* (P316S/A/L), *Rn* (A225D, Q272V, T456V and C459Y).
- ↓ = Cysteins of Cys-Loop LGIC (positions 164-178) and cysteins of GLUCL α (positions 223-234)

<i>Ch</i>	M-----GTGH-----YFW-AIFYFASLC-----SASLANN-----	[24]
<i>Ce</i>	M-----ATWIV-----GKLIIASLILGIQAQQARTKSQDIFEDDNDNGTTTLESARLTSP-----	[51]
<i>Hc</i>	M-----RNSVP-----LATRIGPML-----ALICTVSTI-----	[24]
<i>Hs</i>	M-----YSFN-----TLRLYLWET-----IVFFSLAAS-----KEAEAA	[29]
<i>Co</i>	M-----RTSVP-----LATRIGPIL-----ALICIVITI-----	[24]
<i>Dm</i> α	M-----GSGH-----YFW-AIFYFASLC-----SASLANN-----	[24]
<i>Rn</i>	M-----C-----GRRGIWLA-----LAAALLHVS-----	[20]
<i>Tu</i> α 3	-----IYFSDFI-----IIPWLLNLP-----	[16]
<i>Tu</i> α 1	MLCLPGPKYHI-----TFY-LLIYFSDFI-----IIPWLLNLP-----	[32]

		<u>β1β2</u>	<u>Loop D</u>	
<i>Ch</i>	---AKINFREKEKKVL-DQILGAGKYDARIRPSGINGT---ENLPTYVYVNMFLRSISKIDDKMEYSVQLTFREQWTD			[96]
<i>Ce</i>	IHIPIEQPQTSKILAHLFTS---GYDFRVRPPTD---NGG-PVVVSVNMLLRTISKIDVNMMEYSAQLTLRESWID			[122]
<i>Hc</i>	MSAVEAKRKLKEQEII-QRIILN---NYDWRVRPRLNASWPD TGG-PVLVTVNIYLRISKIDVNMMEYSAHFTFREEWVD			[100]
<i>Hs</i>	RSAPKPMSPSDFLDKL-MGRTS---GYDARIRPNFK-----GP-PVNVSCNIFINSFGSIAETMDYRVNIFLRQQWND			[98]
<i>Co</i>	ISTVEGKRKLKEQEII-QRIILN---NYDWRVRPRLNASWPD TGG-PVLVTVNIYLRISKIDVNMMEYSAQFTFREEWVD			[100]
<i>Dm</i> α	---AKINFREKEKKVL-DQILGAGKYDARIRPSGINGT---DG-PAIVRINLFVRSIMTISDIKMEYSVQLTFREQWTD			[95]
<i>Rn</i>	-----LQGEFQRRLY-KELVK---NYNPLERP VAN-----DSQ-PLTVYFSLSLQIMDVDEKNQVLT T NIWLQMSWT			[84]
<i>Tu</i> α 3	FTSGSASFREQKKIL-DSIIGQAYDRRIRPSGLNAS-AEGDG-PCIVSINIYLRISKISDLDMEYSVQITFREEWKD			[93]
<i>Tu</i> α 1	FTSGSASFREQKKIL-DSIIGQAYDRRIRPSGLNAS-AEGDG-PCIVSINIYLRISKISDLDMEYSVQITFREEWKD			[109]

		<u>Loop A</u>		<u>Loop E</u>	
<i>Ch</i>	ERLKFDI IQGR-----LKYLTLT EANRVWMPDLFFSNEKEGHFHNII MPNVYIRIFPNGSVLYSIRISLT LACPM				[166]
<i>Ce</i>	KRLSYGVKGDG-----QPDFVILT VGHQI WMPDTFFPNEKQAYKHTID KPNVLIRIHNDGT VLYSVRISLV LSCPM				[193]
<i>Hc</i>	ARLAYGRFEDEST E V PPFVVLATSENADQSQQI WMPDTFFQNEKEARRHLID KPNVLIRIHKDGSILYSVRLSLV LSCPM				[180]
<i>Hs</i>	PRLAYNEYPD-----DSL DLDPSMLDSIWKPD LFFAN EKAHFHEITD NKLLRISRNGNVLYSIRIT LTLACPM				[168]
<i>Co</i>	ARLAYGRFEDEST E V PPFVVLATSENADQSQQI WMPDTFFQNEKEARRHLID KPNVLIRIHKDGSILYSVRLSLV LSCPM				[180]
<i>Dm</i> α	ERLKFDI IQGR-----LKYLTLT EANRVWMPDLFFSNEKEGHFHNII MPNVYIRIFPNGSVLYSIRISLT LACPM				[165]
<i>Rn</i>	HYLQWNMSEYP-----GVKNVRFPDQIWKPD ILLYNSADERFDATF---HTNVLVNASGHCQYLP PGIFKSCYI				[152]
<i>Tu</i> α 3	SRLVYRDPSEK-----IRYLT L TDPDRIWKPDVFF TNEKEGHFHNII MPNVLLRIGSDGGVLYSIRLSL LSCPM				[163]
<i>Tu</i> α 1	SRLVYRDPSEK-----IRYLT L TDPDRIWKPDVFF TNEKEGHFHNII MPNVLLRIGSDGGVLYSIRLSL LSCPM				[179]

	<u>Cys-Loop</u>	● ↓	<u>Loop B</u>	● ●	<u>β8β9</u>	▽ ▽	<u>Loop C</u>	↓	● ▽
<i>Ch</i>	NLKLYPLDRQCSLRMASYGWTTNDLVFLWKEGDP-VQ--VVKNLHLPRFTLEKFLTDY-CNSKTNT--GEYSCLKVDLL								[240]
<i>Ce</i>	YLQYYPMDVQCSIDLASYATTKDIEYLWKEHSP-LQLKVLGSSSLPSFQLTNTSTTY-CTSVTNT--GIYSLCRTIQ								[269]
<i>Hc</i>	SLEFYPLDRQCLIDLASYATTDQIKYEWKEQNP-VQKKDGLRQSLPSFELQDVVTKY-CTSKTNT--GEYSCARVKLL								[256]
<i>Hs</i>	DLKNFPMDVQCSIMQLESFGYTMNDLFEWQEGGA-VQ--VADGLTLPQFILKEEKDLRYCTKHNT--GKFTCI E ARFH								[243]
<i>Co</i>	SLEFYPLDRQCLIDLASYATTDQIKYEWKEQNP-VQKKDGLRQSLPSFELQDVVTKY-CTSKTNT--GEYSCARVKLL								[256]
<i>Dm</i> α	NLKLYPLDRQCSLRMASYGWTTNDLVFLWKEGDP-VQ--VVKNLHLPRFTLEKFLTDY-CNSKTNT--GEYSCLKVDLL								[239]
<i>Rn</i>	DVRWPFDPVQCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADI-----SSYIPNGEWDLMGIPGKR-NEKFYECCKEYPDPVTTYTVT								[225]
<i>Tu</i> α 3	NLKYYPLDKQNCYIKMASYGYTTEDLVFMWKTDP-VQ--VTKQLHLPTFALADYITEY-CTSRNTNT--GEYSCVQVKLI								[237]
<i>Tu</i> α 1	NLKYYPLDKQNCYIKMASYGYTTEDLVFMWKTDP-VQ--VTKQLHLPTFALADYITEY-CTSRNTNT--GEYSCVQVKLI								[253]

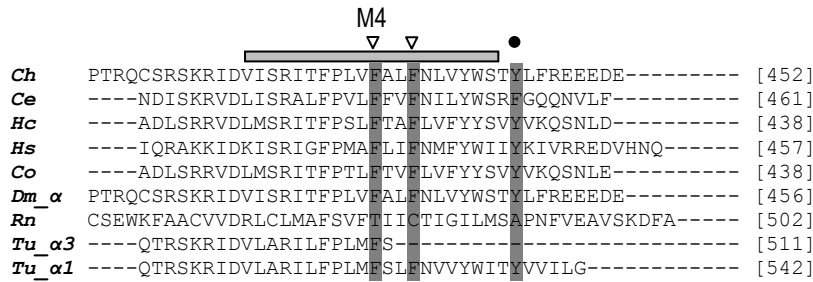


Fig. 3: Alignment generated by the software PROMALS3D of the ChGLUCLα (Ch) predicted amino acid consensus sequence (GenBank Accession No. [KF214912](#)) with the amino acid sequences of cys-Loop LGIC members which presented residues related with binding (*C. elegans*) and mutations related with resistance and insensibility to IVM: GLUCLα from *C. elegans* (Ce; GenBank Accession No. [U14524.1](#)), GLUCLα3B from *H. contortus* (Hc; GenBank Accession No. [Y14234.1](#)), GLYRa1 from *H. sapiens* (Hs; GenBank Accession No. [NM_001146040.1](#)), GLUCLα3 from *C. oncopora* (Co; GenBank Accession No. [AY372756](#)), GLUCLα - PI isoform from *D. melanogaster* (Dm_α ; FlyBase Accession No. [FBtr0335417](#)), nAchRa7 from *R. norvegicus* (Rn; GenBank Accession No. [NM_012832.3](#)), GLUCLα1 and GLUCLα3 from *T. urticae* (Tu_α1; GenBank Accession No. [AB567687.1](#) and Tu_α3; GenBank Accession No. [JQ738193](#), respectively). M1-M4=transmembrane domains from ChGLUCLα . In grey are all residues cited here.

The statistical analysis of the homozygous frequency for K242 in the ChSusc and ChIVR groups, showed that there is a significant difference between the frequencies in both groups ($P = 0.08$), considering the significance level of $\alpha = 0.1$. The homozygous frequency for K/K changed from 0.6 in ChSusc to 0.93 in ChIVR. Moreover, comparing the frequency of the clones with the K242, R242 and the premature termination codon *242 SNPs (Fig. 2), it was found a significant difference between the respective frequencies ($P = 0.007$).

From the 9 AA substitutions only described in the ChIVR group, five were located in regions which are related to conformational changes that result to channel gating and opening (Bartos et al., 2009). The AA substitutions N141D, V177I, E198G were located in loop regions, while the L239P and R242K were in the pre-M1 region and the I252T was located in the transmembrane domain M1 (Fig. 3). The positions of the substitutions L239P and R242K are very close to mutation L256F, associated with MLs resistance in *C. oncopora* and *H. contortus*, and the mutation L256W/Y/V. The pre-M1 domain, where are the mutations L239P and R242K, is important to bridge the extracellular loops to the channel pore, also resulting in the channel opening (Bartos et al., 2009).

In the present study, 13 cDNA sequences from the bioassay groups that were longer and shorter than the transcript characterized with 1359 bp, and this transcript variant, were also identified. Sequencing of the 48 full-length clones of the bioassay groups, amplified using the pair of primers F1/R4, resulted in cDNA sequences that had amplicon sizes of 1117, 1120, 1236, 1281, 1295, 1304, 1307, 1316, 1319, 1340, 1349, 1352, 1361 and 1364 bp (Supplementary Fig. S2). The cDNA variants having amplicon size of 1349

and 1352 bp showed, each one, two different sequences, probably resulted by different splicing positions (variant A and B). The cDNA variant having amplicon size of 1352 bp (variant A) was the most represented with 31% of the 48 full-length clones, while the cDNA variants having amplicon size of 1117, 1236, 1281, 1295, 1319, 1340, 1361 and 1364 bp were only present at one clone. The other cDNA variants were present at more than one clone. The cDNA sequences of 1117, 1281, 1295 and 1352 bp (variant B) were described only in the ChIVR group. Although the cDNA sequences of 1120 bp were found in both bioassay groups, the most of these sequences were described in the ChIVR group. After alignment of the cDNA sequences and comparison with the *C. hominivorax GluCla* coding region characterized, premature stop codons were identified in the cDNA sequences of 1117, 1120, 1236, 1281, 1295 and 1352 bp (variant B), although in different positions (Supplementary Fig. S2). The premature stop codons of the cDNA sequences of 1117 and 1120 bp were at corresponding positions, while the premature termination codons of the cDNA sequences of 1236, 1281 and 1295 bp were at another different corresponding position (Supplementary Fig. S2). Only one cDNA sequence with premature termination codon, the cDNA sequence of 1236 bp, was described in the ChSusc group. Moreover, in the cDNA sequences were found sequences that showed some degree of match with motifs predicted to be associated with pre-mRNA splicing (Fig.4)

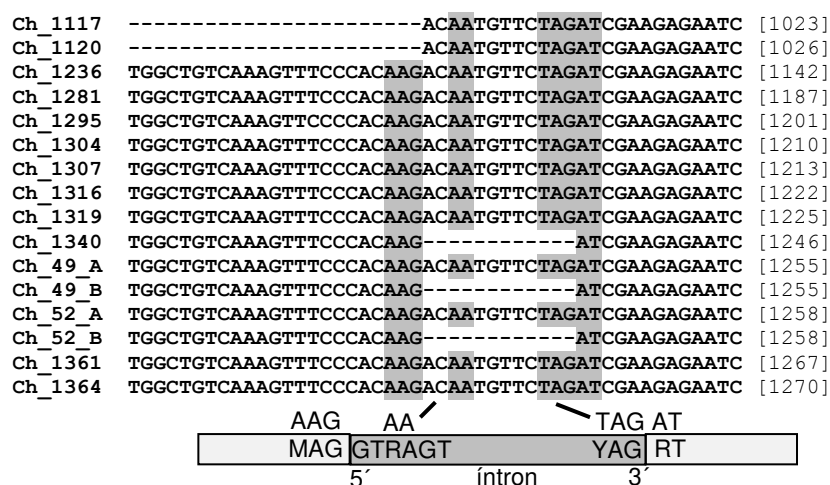


Fig. 4: Alignment of portion of the *GluCla* gene cDNA sequences obtained in *C. hominivorax* in this study. In grey are showed nucleotides of motifs predicted to be conserved in splicing positions in *D. melanogaster* and vertebrates pre-mRNAs (Mount et al., 1992; Irimia et al., 2007). Ch = *Cochliomyia hominivorax*. The N° in the sequences in the left represents the respective amplicon size in bp. The complete alignment is showed in Supplementary Fig. S2.

The exon-intron boundary sequence motifs, MAG-GTRAGT and YAG-RT (M=A or C; R=A or G; Y=C or T), are found to be conserved and responsible for the signaling of the pre-mRNA splicing positions in *D. melanogaster* and vertebrate transcripts (Mount et al., 1992; Irimia et al., 2007). Similar sequence

motifs matching with these conserved sequence motifs were found in the boundary of gaps in the alignment of the whole cDNA sequences in this study, suggesting that these boundaries are possible positions of alternative splicing in the transcript variants of these cDNA sequences (Fig. 4; Supplementary Fig. S2).

3. Discussion

The results demonstrated that the amino acid sequence of the GLUCL α subunit in *C. hominivorax*, reported here for the first time, have high identity with the amino acid sequences of *L. cuprina*, *D. melanogaster* and *M. domestica* GLUCL α subunits, showing that the coding sequences of the GLUCL α gene in these dipteran species are highly conserved. Moreover, the high identity scores suggest orthologues relationships between the ChGLUCL α and others dipteran GLUCL α subunits. All domains and residues considered important to the gene cys-loop LGIC superfamily (Corringer et al., 2000; Sine and Engel, 2006; Cederholm et al., 2009) were found in the subunit ChGLUCL α , as well as specific residues of the ligand-gated chloride channel family (Jensen et al., 2005) and the glutamate-gated chloride channel subfamily (Kniple and Soderlund et al., 2010), demonstrating that the sequence found in this study is a member of the these groups.

The *GluCl α* gene is considered to be the major target of macrocyclic lactones (Wolstenholme and Rogers, 2005) and mutations in the coding sequence of the glutamate-gated chloride channel receptor subfamily have been associated with resistance to this insecticides in the model especies *D. melanogaster* (Kane et al., 2000) and *C. elegans* (Dent et al., 2000), as well as parasites like the nematodes *C. oncophora* (Njue et al., 2004) and *H. contortus* (Wolstenholme, 2010; Yamaguchi et al., 2012), and the economic important arthropod *T. urticae* (Kwon et al., 2010; Dermauw et al., 2012). Besides the existence of mutations predicted to be associated with resistance and insensibility to IVM in invertebrates, site-directed mutagenesis have been carried out to find residues possible related to insensibility to this insecticide in the human glycine-gated chloride channel GlyR α (Lynagh and Lynch, 2010a, 2010b) and the nicotinic acetylcholine-gated cation channel nAChR α 7 in *R. norvegicus* (Collins and Millar, 2010), both members of the cys-loop LGIC superfamily.

Considering the importance of the *GluCl α* gene in mediating macrocyclic lactones mode of action (Cully et al., 1996) and resistance in invertebrates (Kane et al., 2000; Dent et al., 2000), finding mutations in this gene that could lead to resistance in the screwworm parasite *C. hominivorax* helping in manage the use of insecticides of the class of macrocyclic lactones, possible reducing the use of these chemicals.

No mutation, considered associated to IVM resistance/insensitivity, already known in the cys-loop LGIC members of the invertebrates and vertebrates (Fig. 3), was found in the NSW larvae in the present study. The larger number of mutations exclusively found in the ChSusc group (21 mutations) compared with the ChIvR group (9 mutations), suggests that the gene *GluCl α* in *C. hominivorax* could possibly be under selection by the IVM, or some locus linked with it, although a control gene was not assessed. However, due to the small frequency of appearance of the ChIvR group polymorphisms, we cannot conclude they are responsible for IVM resistance, considering only their frequencies. Only one mutation, Arg242Lys (R242K), was found in both groups, ChSusc and ChIvR, in a frequency higher in the ChIvR group. The position of this mutation is in close proximity to residues predicted to bind by means of van der Waals and H-bond forces to IVM in the *C. elegans* GLUCL α subunit (Hibbs and Gouaux, 2011), to mutation L256F found in *C. oncophora* (Njue et al., 2004) and *H. contortus* (McCavera et al., 2009), and to mutations L256W/Y/V found in *H. contortus* (Yamaguchi et al., 2012). The mutation R242K, changes the conserved residue arginine (Fig. 3) to a lysine, and it could lead to a change in the dynamic of binding between the molecule of IVM and the subunits of the receptor, resulting in low opening the channel and consequently not killing the NWS. With this in mind, the statistical analysis still suggests that the higher frequency of homozygous for arginine (K/K) in the ChIvR group could be involved in some level of resistance. It is possible that increasing the sample size would reinforce the statistical analysis, allowing to reach a more statistically significant result. The analysis of the clone frequencies, given a significant increase of the K242 SNP in ChIvR group compared to the ChSusc group, is one more evidence of a probably participation of lysine in this position to some insensitivity to IVM. It is worth noting that at the corresponding position of *GluCl α* gene in *D. melanogaster* (241 position in *Dm*), the AA lysine is changed to arginine due to RNA editing, that changes the genomic adenosine to guanosine in the transcript (AAG to AGG) (Semenov and Pak, 1999). This evidence suggests that the Arg242 in the NWS *GluCl α* gene could occur by RNA editing, and that the larger number of the Lys242 in the larvae submitted to the higher IVM concentration, could be occurred by some IVM interference in the mechanism of RNA editing.

The domains of the R242K (pre-M1 region) substitution and of the others 5 mutations exclusively found in the ChIvR group, N141D (Loop E), V177I (Cys-Loop), E198G (Loop β 8 β 9), L239P (pre-M1 region) and I252T (M1) are related to conformational changes to channel opening (Bartos et al., 2009). Moreover, mutations in loop domains of the *H. contortus* GLUCL α 3 subunit resulted in reduction (D220A) or loss (L222A) of binding, indicating the potentially participation of conformational changes in MLs binding (Yamaguchi et al., 2012). Thus, it is possible that these alterations have participation on leading to some

insensitivity to binding to IVM or to modifying the subunits structural conformation for opening the GLUCL α channel by this insecticide.

Investigating the differences in properties between the wild and mutants amino acids associated to IVM resistance/insensitivity in invertebrates and mammals cited here, we found out that the two properties, size (small, medium or large; Pommié et al., 2004) and aliphatic/not aliphatic, are important to differ the wild amino acids from the mutants ones, responsible for the resistance/insensitivity. From the 22 mutations presented here in invertebrates and mammals (Fig. 3), 14 have differences in the property aliphatic/not aliphatic. When the wild amino acid is aliphatic the corresponding mutant is not and vice versa. The same occurs for the size property, with the side chains of the wild and mutant amino acids differing between small, medium or large in 18 of the 22 mutations. This suggests that the size of side chains could interfere in the accommodation of the IVM molecule between the subunits. This possibility is suggested in the work with *H. contortus*. In this case, changing from the small side chain of the amino acid glycine in the position G329 to others, with larger sizes, could result in the constraint of the crevice in this location, preventing IVM to bind (Yamaguchi et al., 2012). The same argument is used in *C. elegans* GLUCL α , suggesting that changing the corresponding position of the small amino acid glycine in the 342 position could alter the conformation in the binding of IVM to the receptor (Lynagh and Lynch, 2012). In the 5 mutations, N141D, V177I, E198G, L239P and I252T, exclusively of the ChIVR group, found in domains considered directly or indirectly associated to conformational changes, all changed the side chain size between the wild and mutants amino acids. This suggests the possible importance of the size property.

No unique mutation, that could be a marker to ivermectin resistance in this laboratory strain of *C. hominivorax*, was found in all surviving larvae, given the necessity of testing if each of the mutations exclusively found in ChIVR have any participation in resistance/insensitivity. In this way, future qualitative experiments have to be done using the technique of two-electrode voltage clamp electrophysiology, extensively used to access the level of importance of different mutations in opening or not the receptors when in contact with insecticides, especially ivermectin (Kane et al., 2000, Eguchi et al., 2006; Lynagh and Lynch, 2010a). The absence of a unique definitive marker in all survivors means that each of the 6 mutations, N141D, V177I, E198G, L239P, I252T and R242K, individually, found in positions related to opening the channel, could probably result in surviving. If it exists any molecular marker mediating target-site resistance in this strain its possible to be in other member of cys-loop LGIC, that, together with mutations in GLUCL α subunit, could potentiates the resistance.

Thereby, we can suggest that the mutations found in the present research, in specific positions of the subunit, are possibly related to participation in the mechanism of conformational changing in the channel due to its positions. To verify this, electrophysiology experiments with homomeric GLUCL α receptors carrying the 5 exclusive ChIVR group mutations and the R242K mutation need to be done to confirm whether the association between these mutations and survival of larvae is really causal and in which level. Once others receptors can be targets of ivermectin, the search for mutations in more than one receptor of the cys-loop LGIC superfamily, known as targets of ivermectin, in the same strain, is strongly recommended.

The sequence motifs encountered between the boundaries of the exons in the transcript variants found in this study (Fig. 4; Supplementary Fig. S2) are similar to motifs signaling splicing in the exon-intron boundaries of pre-mRNA in *D.melanogaster* and vertebrates (Mount et al., 1992), and strongly support that the ChGluCl α gene has the alternative splicing mechanism working in the pre-mRNA, that could results in alternative isoforms. This evidence is strengthened by the fact that others GluCl α genes also have transcript variants, found in *C. oncophora* (El-Abdellati et al., 2011), *C. elegans* (Dent et al., 2000), *T. castaneum* (Jones and Sattelle, 2007) *A. mellifera* (Jones and Sattelle, 2006) and *D. melanogaster* (Semenov and Pak, 1999; www.flybase.org). Thereby, this result suggests that alternative splicing is probably conserved in all GluCl α homologues genes through invertebrates. The presence of most of the transcript variants sequences with premature termination codons in the ChIVR group suggests that splice variants could have some association to resistance to IVM. When compared with the *C. hominivorax* GluCl α sequence and the predicted amino acid sequence characterized in this study, the premature stop codon in the sequences of 1117, 1120 and 1352 bp (variant B) resulted in the absense of transmembrane domain M4 and part of the M3-M4 loop. In the case of *C. elegans*, the splice variant A, GluCl α 3A, with a premature termination codon, which eliminates the transmembrane domain M4 and part of the M3-M4 loop, is insensitive to IVM, although the splice variant B, with all common domains, respond to the insecticide (Dent et al., 2000). For these reasons, splice variants which have lost important domains, could be related to insensibility and, consequently, to survival to IVM. In the cDNA sequences of 1236, 1281 and 1295 bp the same comparison showed that the stop codon could results in amino acid sequences possessing only the N-terminal extracellular domain. However, as transcript variants could arise through different transcription initiation/termination sites, the transcript variant of these cDNA sequences could also have different translation initiation/termination sites, positioned in other exons. The predicted AA sequence of the cDNA sequence of 1120 bp has 349 AA, respectively, which are similar to the 349 AA encoded by the GluCl α - RF

transcript coding region in *D. melanogaster*. Similarity still occurs between the cDNA sequence of 1364 bp, and the transcript variants *GluCl α* – RI, RM and RP in *D. melanogaster*, all predicted to encode sequences of 456 AA.

To determine the positions and numbers of exons and introns of Ch*GluCl α* gene, which exons are used and where are the specific positions of alternative splicing sites in each exon, the genomic DNA sequence of the Ch*GluCl α* gene has to be sequenced in a future study.

In conclusion, the highly identity among the Ch*GluCl α* gene coding sequence in this study and the *GluCl α* genes in *D. melanogaster*, *M. domestica* and *L. cuprina*, suggests orthologues relationships. The position of the R242K substitution in the pre-M1 domain, a domain related to conformational changes leading to channel opening, the proximity of this substitution to the L256F/W/Y/V mutations and to residues predicted to bind to IVM, suggest that this SNP could be important to the channel structure, probably changing the dynamic of binding between IVM and the GLUCL α channel. The low frequency of AA substitutions found in this study can not allow to conclude they confer IVM resistance, although there are SNPs found in important positions, which change the side chain size of the AA replaced, a property that happens in 18/22 AA substitutions related to IVM resistance found in different species. Future investigations are needed to establish if the truncated AA sequences found, which lost domains, are potentially related to some resistance mechanism, although allowing for the larvae survival. Further electrophysiological studies are needed to assess the role of R242K SNP and others SNPs found here in important positions.

Acknowledgements

This study has been funded by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- #2011/01030-5). The authors would like to thank Rosângela Rodrigues for the technical assistance in the laboratory work and Salete Couto Campos for the help with performing the bioassay and screwworm strain maintenance. We are very grateful Dr. Thiago Mastrângelo for reading the manuscript.

References

- Bartos, M.; Corradi, J.; Bouzat, C., 2009. Structural Basis of Activation of Cys-Loop Receptors: the extracellular-transmembrane Interface as a Coupling Region. *Mol. Neurobiol.* 40, 236-252.
- Betz, H.; Laube, B., 2006. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J. Neurochem.* 97, 1600-1610.

- Cederholm, J.M.E.; Schofield, P.R.; Lewis, T.M., 2009. Gating mechanisms in Cys-Loop receptors. *Eur. Biophys. J.* 39, 37-49.
- Cleland, T.A., 1996. Inhibitory glutamate receptor channels. *Mol. Neurobiol.* 13, 97-136.
- Collins, T.; Millar, N.S., 2010. Nicotinic Acetylcholine Receptor Transmembrane Mutations Convert Ivermectin from a Positive to a Negative Allosteric Modulator. *Mol. Pharmacol.* 78, 198-204.
- Corringer, P.J.; Le Novère, N.; Changeux, J.P., 2000. Nicotinic receptors at the aminoacid level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 431 - 458.
- Cully, D.F.; Pareiss, P.S.; Liu, K.K.; Schaeffer, J.M.; Arena, J.P., 1996. Identification of a *Drosophila melanogaster* Glutamate-gated Chloride Channel Sensitive to the Antiparasitic Agent Avermectin. *J. Biol. Chem.* 271, 20187-20191.
- Dent, J.A.; Smith, M.M.; Vassilatis, D.K.; Avery, L., 2000. The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, 2674–2679.
- Dermauw, W.; Ilias, A.; Riga, M.; Tsagkarakou, A.; Grbi, M.; Tirry, L.; Van Leeuwen, T.; Vontas, J., 2012. The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Tetranychus urticae*: Implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 455-465.
- Eguchi, Y.; Ihara, M.; Ochi, E.; Shibata, Y.; Matsuda, K.; Fushiki, S.; Sugama, H.; Hamasaki, Y.; Niwa, H.; Wada, M.; Ozoe, F.; Ozoe, Y., 2006. Functional characterization of *Musca* glutamate- and GABA-gated chloride channels expressed independently and coexpressed in *Xenopus* oocytes. *Insect. Mol. Biol.* 15, 773-783.
- El-Abdellati, A.; De Graef, J.; Van Zeveren, A.; Donnan, A.; Skuce, P.; Walsh, T.; Wolstenholme, A. Tait, A.; Vercruysse, J.; Claerebout, E.; Geldhof, P., 2011. Altered avr-14B gene transcription patterns in ivermectin-resistant isolates of the cattle parasites, *Cooperia oncophora* and *Ostertagia ostertagi*. *Int. J. Parasitol.* 41, 951-957.
- Hall, M.; Wall, R., 1995. Myiasis of humans and domestic animals. *Adv. in Parasitol.* 35.
- Hibbs, R.E.; Gouaux, E., 2011. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nat.* 474, 54-60.
- Hosie, M.; Buckingham, S.D.; Presnail, J.K.; Sattelle, D.B., 2001. Alternative splicing of a *Drosophila* gaba receptor subunit gene identifies determinants of agonist potency. *Neurosci.* 102, 709-714.
- 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.

- Irimia, M.; Penny, D.; Roy, S.W., 2007. Coevolution of genomic intron number and splice sites. *Trends. Genet.* 23, 321-325.
- Jensen, M.L.; Schousboe, A.; Ahring, P.K., 2005. Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels. *J. Neurochem.* 92, 217-225.
- Jones, A.K.; Sattelle, D. B., 2006. The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the honeybee, *Apis mellifera*. *Invert. Neurosci.* 6, 123-132.
- Jones, A.K.; Sattelle, D. B., 2007. The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics.* 8
- Jones, A.K.; Bera, A.N.; Lees, K.; Sattelle, D.B., 2010. The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the parasitoid wasp, *Nasonia vitripennis*. *Heredity.* 104, 247-259.
- Kane, N.S.; Hirschberg, B.; Qian, S.; Hunt, D.; Thomas, B.; Brochu, R.; Ludmerer, S.W.; Zheng, Y.; Smith, M.; Arena, J.P.; Cohen, C.J.; Schmatz D.; Warmke, J.; Cully, D.F., 2000. Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulisporic acid and ivermectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, 13949-13954.
- Knipple, D.C.; Soderlund, D.M., 2010. The ligand-gated chloride channel gene family of *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 97, 140-148.
- Kwon, D.H.; Yoon, K.S.; Clark, J.M.; Lee, S.H., 2010. A point mutation in a glutamate-gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Insect Mol. Biol.* 19, 583-591.
- LeOra Software, 2003. In: Robertson, J.L., Preisler, H.K., Russel, R.M. (Eds.), *Polo Plus Probit and Logit Analysis, User's Guide*. Berkeley, p. 36.
- Ludmerer, S.W.; Warren, V.A.; Williams, B.S.; Zheng, Y.; Hunt, D.C.; Ayer, M.B.; Wallace, M.A.; Chaudhary, A.G.; Egan, M.A.; Meinke, P.T.; Dean, D.C.; Garcia, M.L.; Cully, D.F.; Smith, M.M., 2002. Ivermectin and Nodulisporic Acid Receptors in *Drosophila melanogaster* Contain Both γ -Aminobutyric Acid-Gated Rdl and Glutamate-Gated GluClR Chloride Channel Subunits. *Biochem.* 41, 6548-6560.
- Lynagh, T.; Lynch, J.W., 2010a. An Improved Ivermectin-activated Chloride Channel Receptor for Inhibiting Electrical Activity in Defined Neuronal Populations. *J. Biol. Chem.* 285, 14890-14897.
- Lynagh, T.; Lynch, J.W., 2010b. A glycine residue essential for high ivermectin sensitivity in Cys-loop ion channel receptors. *Int. J. Parasitol.* 40, 1477-1481.

- Lynagh, T.; Lynch, J.W., 2012. Ivermectin binding sites in human and invertebrate Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* v. 33, 432-441.
- McCavera, S.; Rogers, A.T.; Yates, D.M.; Woods, D.J.; Wolstenholme, A.J., 2009. An Ivermectin-Sensitive Glutamate-Gated Chloride Channel from the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. *Mol. Pharmacol.* 75, 1347-1355.
- Mount, S.M.; Burks, C.; Hertz, G.; Stormo, G. D.; White, O; Fields, C., 1992. Splicing signals in *Drosophila*: intron size, information content, and consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* 20, 4255-4262.
- Njue, A.I.; Hayashi, J; Kinne, L.; Feng, X.P.; Prichard, R.K., 2004. Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel $\alpha 3$ and β subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. *J. Neurochem.* 89, 1137-1147.
- OIE (World Organisation for Animal Health), 2012. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 1, 265-275.
- Omura, S.; Crump, A., 2004. The life and times of ivermectin-a success story. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 984-989.
- Ortells, M.; Lunt, G.G., 1995. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci.* 18, 121-127.
- Pommié, C.; Levadoux, S.; Sabatier, R.; Lefranc, G.; Lefranc, M-P., 2004. IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino acid properties. *J. Mol. Recognit.* 17, 17-32.
- Prichard, R.; Ménez, C.; Lespine, A., 2012. Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. *Int. J. Parasitol.* 2, 134-153.
- Robertson, J.L.; Smith, K.C.; Savin, N.E., Lavigne, R.J., 1984. Effects of dose selection and sample size on the precision of the lethal dose estimates in dose-mortality regression. *J. Econ. Entomol.* 77, 833-837.
- Schnizler, K.; Saeger, B.; Pfeffer, C.; Gerbaulet, A.; Ebbinghaus-Kintscher, U.; Methfessel, C.; Franken, E.M.; Raming, K.; Wetzel, C.H.; Saras, A.; Pusch, H.; Hatt, H.; Gisselmann, G., 2005. Novel Chloride Channel in *Drosophila melanogaster* Is Inhibited by Protons. *J. Biol. Chem.* 280, 16254-16262.
- Semenov, E.P.; Pak, W.L., 1999. Diversification of *Drosophila* chloride channel gene by multiple posttranscriptional mRNA modifications. *J. Neurochem.* 72, 66-72.

- Sine, S.M.; Engel, A.G., 2006. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nat.* 440, 448-455.
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Vargas-Terán, M.; Hofmann, H. C.; Tweddle, N. E., 2005. Impact of screwworm eradication programmes using the sterile insect Technique. In: *Sterile Insect Technique: principles and practice in area-wide integrated pest management-FAO.* 629-650.
- Wyss, J., 2000. Screwworm Eradication in the Americas. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 186 - 193.
- Yamaguchi, M.; Sawa, Y.; Matsuda, K.; Ozoe, F.; Ozoe, Y., 2012. Amino acid residues of both the extracellular and transmembrane domains influence binding of the antiparasitic agent milbemycin to *Haemonchus contortus* AVR-14B glutamate-gated chloride channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419, 562-566.
- Wolstenholme, A.J., 2010. Recent progress in understanding the interaction between avermectins and ligand-gated ion channels: putting the pests to sleep. *Invert. Neurosci.* 10, 5-10.
- Wolstenholme, A.J.; Rogers, A.T., 2005. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitol.* 31, S85-S95.
- Woodward, K. N., 2012. Macrocyclic Lactone Endectocides. In: Marrs, T.C. (Org.), *Issues in Toxicology N°12: mammalian Toxicology of Insecticides.* Royal Society of Chemistry, London, pp. 427 - 467.

ANEXOS: Figuras Suplementares S1 e S2.

Figura Suplementar S1

“Primer” F1

Ch_V138_K242	ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA	70
Ch_D141_K242	ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA	70
Ch_I177_K242	ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA	70
Ch_S194_K242	ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA	70
Ch_G198_R242	ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA	70
Ch_P238_K242	ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA	70
Ch_T252_K242	ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA	70
Ch_G350_C443_K	ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA	70
Ch_V138_K242	ATGCCAAAATAAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAAATATGA	140
Ch_D141_K242	ATGCCAAAATAAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAAATATGA	140
Ch_I177_K242	ATGCCAAAATAAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAAATATGA	140
Ch_S194_K242	ATGCCAAAATAAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAAATATGA	140
Ch_G198_R242	ATGCCAAAATAAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAAATATGA	140
Ch_P238_K242	ATGCCAAAATAAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAAATATGA	140
Ch_T252_K242	ATGCCAAAATAAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAAATATGA	140
Ch_G350_C443_K	ATGCCAAAATAAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAAATATGA	140
Ch_V138_K242	TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAATGGAACGGGAAATTTACCCACGTATGTCTATGTCAACATGTTTC	210
Ch_D141_K242	TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAATGGAACGGGAAATTTACCCACGTATGTCTATGTCAACATGTTTC	210
Ch_I177_K242	TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAATGGAACGGGATGGTCCAGCCGTT---GTGCGCGTCAACATTTTC	207
Ch_S194_K242	TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAATGGAACGGGATGGTCCAGCCGTTATA---GTCAGAATCAATCTTTTT	207
Ch_G198_R242	TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAATGGAACGGGATGGTCCAGCCGTT---GTGCGCGTCAACATTTTC	207
Ch_P238_K242	TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAATGGAACGGGATGGTCCAGCCGTT---GTGCGCGTCAACATTTTC	207
Ch_T252_K242	TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAATGGAACGGGAAATTTACCCACGTATGTCTATGTCAACATGTTTC	210
Ch_G350_C443_K	TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAATGGAACGGGATGGTCCAGCCGTTATA---GTCAGAATCAATCTTTTT	207
Ch_V138_K242	CTACGGTCAATCTCAAAGATCGACGATTACAAAATGGAATACAGTGTACAGCTGACATTCGGTGAACAGT	280
Ch_D141_K242	CTACGGTCAATTTCAAAGATCGACGATTACAAAATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT	280
Ch_I177_K242	GTAAGAAGTATTTCAAAGATCGATGATGTTACTATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT	277
Ch_S194_K242	GTACGAAGTATTTATGACGATTAGTGACATTAATAATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT	277
Ch_G198_R242	GTAAGAAGTATCTCAAAGATCGATGATGTTACTATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT	277
Ch_P238_K242	GTAAGAAGTATTTCAAAGATCGATGATGTTACTATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT	277
Ch_T252_K242	CTACGGTCAATTTCAAAGATCGACGATTACAAAATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT	280
Ch_G350_C443_K	GTACGAAGTATTTATGACGATTAGTGACATTAATAATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT	277
Ch_V138_K242	GGACTGATGAACGTTTGAAATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	350
Ch_D141_K242	GGACTGATGAACGTTTGAAATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	350
Ch_I177_K242	GGACTGATGAACGTTTGAAATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	347
Ch_S194_K242	GGACTGATGAACGTTTGAAATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	347
Ch_G198_R242	GGACTGATGAACGTTTGAAATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	347
Ch_P238_K242	GGACTGATGAACGTTTGAAATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	347
Ch_T252_K242	GGACTGATGAACGTTTGAAATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	350
Ch_G350_C443_K	GGACTGATGAACGTTTGAAATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	347
Ch_V138_K242	TCGTGTTTGGATGCCTGATTGTTTTCTCCAATGAAAAAGAGGGTCATTTCACAATATCATTATGCCG	420
Ch_D141_K242	TCGTGTTTGGATGCCTGATTGTTTTCTCCAATGAAAAAGAGGGTCATTTCACAATATCATTATGCCG	420
Ch_I177_K242	TCGTGTTTGGATGCCTGATTGTTTTCTCCAATGAAAAAGAGGGTCATTTCACAATATCATTATGCCG	417
Ch_S194_K242	TCGTGTTTGGATGCCTGATTGTTTTCTCCAATGAAAAAGAGGGTCATTTCACAATATCATTATGCCG	417
Ch_G198_R242	TCGTGTTTGGATGCCTGATTGTTTTCTCCAATGAAAAAGAGGGTCATTTCACAATATCATTATGCCG	417
Ch_P239_K242	TCGTGTTTGGATGCCTGATTGTTTTCTCCAATGAAAAAGAGGGTCATTTCACAATATCATTATGCCG	417
Ch_T252_K242	TCGTGTTTGGATGCCTGATTGTTTTCTCCAATGAAAAAGAGGGTCATTTCACAATATCATTATGCCG	420
Ch_G350_C443_K	TCGTGTTTGGATGCCTGATTGTTTTCTCCAATGAAAAAGAGGGTCATTTCACAATATCATTATGCCG	417
Ch_V138_K242	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	490
Ch_D141_K242	GATGTTTATATACGTATTTTTCCAAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	490
Ch_I177_K242	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	487
Ch_S194_K242	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	487
Ch_G198_R242	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	487
Ch_P238_K242	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	487
Ch_T252_K242	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	490
Ch_G350_C443_K	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	487

Ch_V138_K242 GTCCCATGAATTTGAAATTATATCCTTTGGATCGTCAAGTCTGTTCACTACGTATGGCCAGTTATGGCTG 560

Ch_D141_K242 GTCCCATGAATTTGAAATTATATCCTTTGGATCGTCAAGTCTGTTCACTACGTATGGCCAGTTATGGCTG 560

Ch_I177_K242 GTCCCATGAATTTGAAATTATATCCTTTGGATCGTCAAAATCTGTTCACTACGTATGGCCAGTTATGGCTG 557

Ch_S194_K242 GTCCCATGAATTTGAAATTATATCCTTTGGATCGTCAAGTCTGTTCACTACGTATGGCCAGTTATGGCTG 557

Ch_G198_R242 GTCCCATGAATTTGAAATTATATCCTTTGGATCGTCAAGTCTGTTCACTACGTATGGCCAGTTATGGCTG 557

Ch_P238_K242 GTCCCATGAATTTGAAATTATATCCTTTGGATCGTCAAGTCTGTTCACTACGTATGGCCAGTTATGGCTG 557

Ch_T252_K242 GTCCCATGAATTTGAAATTATATCCTTTGGATCGTCAAGTCTGTTCACTACGTATGGCCAGTTATGGCTG 560

Ch_G350_C443_K GTCCCATGAATTTGAAATTATATCCTTTGGATCGTCAAGTCTGTTCACTACGTATGGCCAGTTATGGCTG 557

Ch_V138_K242 GACTACAAATGATCTTGTCTTCTGTGGAAAGAAGGTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA 630

Ch_D141_K242 GACTACAAATGATCTTGTCTTCTGTGTGGAAAGAAGGTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA 630

Ch_I177_K242 GACTACAAATGATCTTGTCTTCTGTGTGGAAAGAAGGTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA 627

Ch_S194_K242 GACTACAAATGATCTTGTCTTCTGTGTGGAAAGAAGGTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA 627

Ch_G198_R242 GACTACAAATGATCTTGTCTTCTGTGTGGAAAGAAGGTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA 627

Ch_P238_K242 GACTACAAATGATCTTGTCTTCTGTGTGGAAAGAAGGTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA 627

Ch_T252_K242 GACTACAAATGATCTTGTCTTCTGTGTGGAAAGAAGGTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA 630

Ch_G350_C443_K GACTACAAATGATCTTGTCTTCTGTGTGGAAAGAAGGTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA 627

Ch_V138_K242 CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTTCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT 700

Ch_D141_K242 CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTTCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT 700

Ch_I177_K242 CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTTCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT 697

Ch_S194_K242 CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTTCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT 697

Ch_G198_R242 CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTTCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT 697

Ch_P238_K242 CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTTCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT 697

Ch_T252_K242 CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTTCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT 700

Ch_G350_C443_K CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTTCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT 697

↓

Ch_V138_K242 GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTCTCATATTACTTAATTCAAATTTATATCCCATGCTG 770

Ch_D141_K242 GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTCTCATATTACTTAATTCAAATTTATATCCCATGCTG 770

Ch_I177_K242 GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTCTCATATTACTTAATTCAAATTTATATCCCATGCTG 767

Ch_S194_K242 GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTCTCATATTACTTAATTCAAATTTATATCCCATGCTG 767

Ch_G198_R242 GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTCTCATATTACTTAATTCAAATTTATATCCCATGCTG 767

Ch_P238_K242 GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTCTCATATTACTTAATTCAAATTTATATCCCATGCTG 767

Ch_T252_K242 GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTCTCATATTACTTAATTCAAATTTATATCCCATGCTG 770

Ch_G350_C443_K GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTCTCATATTACTTAATTCAAATTTATATCCCATGCTG 767

Ch_V138_K242 TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCTTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACCAGCTCGTGTATCATTTG 840

Ch_D141_K242 TATGCTGGTAATCGTCTCATGGGTGTCTTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACCAGCTCGTGTATCATTTG 840

Ch_I177_K242 TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCTTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACCAGCTCGTGTATCATTTG 837

Ch_S194_K242 TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCTTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACCAGCTCGTGTATCATTTG 837

Ch_G198_R242 TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCTTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACCAGCTCGTGTATCATTTG 837

Ch_P238_K242 TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCTTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACCAGCTCGTGTATCATTTG 837

Ch_T252_K242 TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCTTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACCAGCTCGTGTATCATTTG 840

Ch_G350_C443_K TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCTTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACCAGCTCGTGTATCATTTG 837

Ch_V138_K242 GGTGTAACACTCTCCTAACAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 910

Ch_D141_K242 GGTGTAACACTCTCCTAACAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 910

Ch_I177_K242 GGTGTAACACTCTCCTAACAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 907

Ch_S194_K242 GGTGTAACACTCTCCTAACAATGGCCACGCAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 907

Ch_G198_R242 GGTGTAACACTCTCCTAACAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 907

Ch_P238_K242 GGTGTAACACTCTCCTAACAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 907

Ch_T252_K242 GGTGTAACACTCTCCTAACAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 910

Ch_G350_C443_K GGTGTAACACTCTCCTAACAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 907

Ch_V138_K242 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTTGACGTTTCGTATTGGTGCGCTGCTCGAATTCGC 980

Ch_D141_K242 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTTGACGTTTCGTATTGGTGCGCTGCTCGAATTCGC 980

Ch_I177_K242 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTTGACGTTTCGTATTGGTGCGCTGCTCGAATTCGC 977

Ch_S194_K242 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTTGACGTTTCGTATTGGTGCGCTGCTCGAATTCGC 977

Ch_G198_R242 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTTGACGTTTCGTATTGGTGCGCTGCTCGAATTCGC 977

Ch_P238_K242 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTTGACGTTTCGTATTGGTGCGCTGCTCGAATTCGC 977

Ch_T252_K242 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTTGACGTTTCGTATTGGTGCGCTACTCGAATTCGC 980

Ch_G350_C443_K ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTTGACGTTTCGTATTGGTGCGCTGCTCGAATTCGC 977

Ch_V138_K242	CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGTACATGAAAAAGAAACGT	1038
Ch_D141_K242	CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAG-----	1006
Ch_I177_K242	CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAGATCGGGCCGCAGACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGT	1047
Ch_S194_K242	CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAGATCGGGCCGCAGACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGT	1047
Ch_G198_R242	CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAG-----	1003
Ch_P238_K242	CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGT	1035
Ch_T252_K242	CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGT	1038
Ch_G350_C443_K	CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAGATCGGGCCGCAGACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAACGT	1047
Ch_V138_K242	AGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTG	1108
Ch_D141_K242	-----	1006
Ch_I177_K242	AGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTG	1117
Ch_S194_K242	AGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTG	1117
Ch_G198_R242	-----	1003
Ch_P238_K242	AGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTG	1105
Ch_T252_K242	AGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTG	1108
Ch_G350_C443_K	AGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACATTTG	1117
Ch_V138_K242	CAATGAAACCTTTGGTACGTCAATCCGGGTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAGTTCA	1178
Ch_D141_K242	-----	1006
Ch_I177_K242	CAATGAAACCTTTGGTACGTCAATCCGGGTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAGTTCA	1187
Ch_S194_K242	CAATG-----TTGAGACAATGTGAAGTTCA	1142
Ch_G198_R242	-----	1003
Ch_P238_K242	CAATG-----TTGAGACAATGTGAAGTTCA	1130
Ch_T252_K242	CAATG-----TTGAGACAATGTGAAGTTCA	1133
Ch_G350_C443_K	CAATGAAACCTTTGGTACGTCAATCCGGGTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAGTTCA	1187
Ch_V138_K242	TATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATGTTCT	1248
Ch_D141_K242	-----ACAATGTTCT	1016
Ch_I177_K242	TATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATGTTCT	1257
Ch_S194_K242	TATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATGTTCT	1212
Ch_G198_R242	-----ACAATGTTCT	1013
Ch_P238_K242	TATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATGTTCT	1200
Ch_T252_K242	TATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATGTTCT	1203
Ch_G350_C443_K	TATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAG-----	1248
Ch_V138_K242	AGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTGGTCT	1318
Ch_D141_K242	AGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTGGTCT	1086
Ch_I177_K242	AGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTGGTCT	1327
Ch_S194_K242	AGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTGGTCT	1282
Ch_G198_R242	AGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTGGTCT	1083
Ch_P238_K242	AGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTGGTCT	1270
Ch_T252_K242	AGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTGGTCT	1273
Ch_G350_C443_K	--ATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTGGTCT	1315
Ch_V138_K242	ACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1359
Ch_D141_K242	ACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1127
Ch_I177_K242	ACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1368
Ch_S194_K242	ACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1323
Ch_G198_R242	ACTGGAGTACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1124
Ch_P238_K242	ACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1311
Ch_T252_K242	ACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1314
Ch_G350_C443_K	ACTGGAGCACCTGGCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1356

“Primer” R4

Figura Suplementar S1: Alinhamento das sequências nucleotídicas codificantes do Ch*GluCl* α obtidas neste estudo dos indivíduos sobreviventes ao bioensaio definitivo que apresentaram mutações e seus respectivos códons. Ch_V138_K242: alelo contendo a Val138 e a Lys242; Ch_D141_K242: alelo contendo o Asp141 e a Lys242; Ch_I177_K242: alelo contendo a Ile177 e a Lys242; Ch_S194_K242: alelo contendo a Ser194 e a Lys242; Ch_G198_R242: alelo contendo a Gly198 e Arg242; Ch_P239_K242: alelo contendo a Pro239 e a Lys242; Ch_T252_K242: alelo contendo a Thr252 e a Lys242; Ch_G350_C443_K: alelo contendo a Gly350, a Cys443 e a Lys242. Em cinza as posições dos “primers” F1 e R4 usados nas amplificações. Em preto os 5 nucleotídeos com o códon ATG da sequência parcial do Ch*GluCl* α obtida por Carvalho *et al.* (2010a) e os dinucleotídeos AA restantes da região do “stop codon”. Em marrom claro, as posições dos códons para as mutações exclusivas das larvas sobreviventes. Seta representa a posição do códon para K242 encontrada em maior frequência nos indivíduos sobreviventes, em cinza.

Figura suplementar S2

1 5 "Primer" F1

Ch_1124 ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_1127 ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_1243 ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_1288 ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_1302 ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_1311 ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_1314 ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_1323 ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_1326 ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_1347 ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_56_A ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_56_B ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_59_A ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_59_B ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_1368 ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_1371 ATGGGAACCGGCCATTATTTCTGGGCGATATTCTACTTTGCCAGTTTATGTAGTGCTTCACTAGCTAATA 70

Ch_1124 ATGCCAAAGTAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_1127 ATGCCAAATAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_1243 ATGCCAAATAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_1288 ATGCCAAAGTAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_1302 ATGCCAAAGTAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_1311 ATGCCAAATAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_1314 ATGCCAAATAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_1323 ATGCCAAAGTAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_1326 ATGCCAAAGTAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_1347 ATGCCAAATAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_56_A ATGCCAAAGTAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_56_B ATGCCAAATAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_59_A ATGCCAAATAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_59_B ATGCCAAATAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_1368 ATGCCAAATAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_1371 ATGCCAAATAAATTTCCGAGAAAAGGAGAAAAAAGTCTTAGATCAAATTTTAGGTGCAGGCAAATATGA 140

Ch_1124 TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACGGATGGTCCAGCCGT---TGTGCGCGTCAACATTTTC 207

Ch_1127 TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACGGAAATTTACCCACGTATGTCTATGTCAACATGTTTC 210

Ch_1243 TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACCGG----- 175

Ch_1288 TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACCGG----- 175

Ch_1302 TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACCGG----- 174

Ch_1311 TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACGGATGGTCCAGCCGT---TGTGCGCGCAACATTTTC 207

Ch_1314 TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACGGAAATTTACCCACGTATGTCTATGTCAACATGTTTC 210

Ch_1323 TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACGGATGGTCCCGCTATA---GTCAGAATCAATCTTTTT 207

Ch_1326 TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACGGATGGTCCAGCCGT---TGTGCGCGTCAACATTTTC 207

Ch_1347 TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACGGAAATTTACCCACGTATGTCTATGTCAACATGTTTC 210

Ch_56_A TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACGGATGGTCCAGCCGT---TGTGCGCGTCAACATTTTC 207

Ch_56_B TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACGGATGGTCCCGCTATA---GTCAGAATCAATCTTTTT 207

Ch_59_A TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACGGAAATTTACCCACGTATGTCTATGTCAACATGTTTC 215

Ch_59_B TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACGGAAATTTACCCACGTATGTCTATGTCAACATGTTTC 210

Ch_1368 TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACGGATGGTCCAGCCGT---TGTGCGCGTCAACATTTTC 207

Ch_1371 TGCAAGAATACGACCATCCGGTATTAAATGGAACGGAAATTTACCCACGTATGTCTATGTCAACATGTTTC 210

Ch_1124 GTAAGAAGTATCTCAAAAATCGATGATGTTTACTATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 277

Ch_1127 CTACGGTCAATTTCAAAGATCGACGATTACAAAATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 280

Ch_1243 -----GAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 209

Ch_1288 -----GAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 209

Ch_1302 -----GAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 208

Ch_1311 GTAAGAAGTATTTCAAAAATCGATGATGTTTACTATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 277

Ch_1314 CTACGGTCAATTTCAAAGATCGACGATTACAAAATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 280

Ch_1323 GTACGAAGTATTATGACGATTAGTGACATTTAAATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 277

Ch_1326 GTAAGAAGTATTTCAAAGATCGATGATGTTTACTATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 277

Ch_1347 CTACGGTCAATTTCAAAGATCGACGATTACAAAATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 280

Ch_56_A GTAAGAAGTATTTCAAAAATCGATGATGTTTACTATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 277

Ch_56_B GTACGAAGTATTATGACGATTAGTGACATTTAAATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 277

Ch_59_A CTACGGTCAATTTCAAAGATCGACGATTACAAAATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 280

Ch_59_B CCACGGTCAATTTCAAAGATCGACGATTACAAAATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 280

Ch_1368 GTAAGAAGTATTTCAAAAATCGATGATGTTTACTATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 277

Ch_1371 CTACGGTCAATTTCAAAGATCGACGATTACAAAATGGAATACAGTGTACAGCTGACGTTCCGTGAACAGT 280

Ch_1124	GGACTGATGAACGTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	347
Ch_1127	GGACTGATGAACGCTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	350
Ch_1243	GGACTGATGAACGTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	350
Ch_1288	GGACTGATGAACGTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	279
Ch_1302	GGACTGATGAACGTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	278
Ch_1311	GGACTGATGAACGCTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	347
Ch_1314	GGACTGATGAACGTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	350
Ch_1323	GGACTGATGAACGTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	347
Ch_1326	GGACTGATGAACGTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	347
Ch_1347	GGACTGATGAACGCTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	350
Ch_56_A	GGACTGATGAACGTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	347
Ch_56_B	GGACTGATGAACGTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	347
Ch_59_A	GGACTGATGAACGTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	350
Ch_59_B	GGACTGATGAACGCTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	350
Ch_1368	GGACTGATGAACGTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	347
Ch_1371	GGACTGATGAACGTTTGA AATTTGATGATATACAAGGTCGTCTAAAATATTTGACATTGACAGAAGCGAA	350

Ch_1124	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	487
Ch_1127	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	490
Ch_1243	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	419
Ch_1288	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	419
Ch_1302	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	418
Ch_1311	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	487
Ch_1314	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	490
Ch_1323	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	487
Ch_1326	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	487
Ch_1347	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	490
Ch_56_A	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	487
Ch_56_B	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	487
Ch_59_A	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	490
Ch_59_B	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	490
Ch_1368	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	487
Ch_1371	AATGTTTATATACGTATTTTTCCAGATGGTTCAGTCTGTACAGTATTCGTATTTCACTGACATTGGCAT	490

Ch_1124	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	627
Ch_1127	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	630
Ch_1237	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	559
Ch_1288	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	559
Ch_1302	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	558
Ch_1311	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	627
Ch_1314	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	630
Ch_1323	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	627
Ch_1326	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	627
Ch_1347	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	630
Ch_56_A	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	627
Ch_56_B	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCGTTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	627
Ch_59_A	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	630
Ch_59_B	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	630
Ch_1368	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	627
Ch_1371	GACTACAAATGATCTTTGTCTTCTCTGTGGAAGAAGGTTGACCCAGTACAAGTGGTAAAGAATTTACACCTA	630
Ch_1124	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	697
Ch_1127	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	700
Ch_1243	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	629
Ch_1288	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	629
Ch_1302	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	628
Ch_1311	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	697
Ch_1314	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	700
Ch_1323	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	697
Ch_1326	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	697
Ch_1347	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	700
Ch_56_A	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	697
Ch_56_B	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	697
Ch_59_A	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	700
Ch_59_B	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	700
Ch_1368	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	697
Ch_1371	CCTCGCTTTTACACTCGAAAAATTCCTTGACTGATTACTGCAACAGTAAAAACCAATACGGGTGAATACAGTT	700
Ch_1124	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	767
Ch_1127	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	800
Ch_1243	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	699
Ch_1288	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	699
Ch_1302	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	698
Ch_1311	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	767
Ch_1314	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	800
Ch_1323	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	767
Ch_1326	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	767
Ch_1347	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	800
Ch_56_A	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	767
Ch_56_B	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	767
Ch_59_A	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	800
Ch_59_B	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	800
Ch_1368	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	767
Ch_1371	GCCTCAAAGTCGATCTACTATTCAAGCGAGAATTTCTCATATTACTTAATTCAAATTTTATATCCCATGCTG	770
Ch_1124	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACACGCTCGTGTATCATTG	837
Ch_1127	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACACGCTCGTGTATCATTG	840
Ch_1243	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACACGCTCGTGTATCATTG	769
Ch_1288	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACACGCTCGTGTATCATTG	769
Ch_1302	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACACGCTCGTGTATCATTG	768
Ch_1311	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACACGCTCGTGTATCATTG	837
Ch_1314	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACACGCTCGTGTATCATTG	840
Ch_1323	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACACGCTCGTGTATCATTG	837
Ch_1326	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACACGCTCGTGTATCATTG	837
Ch_1347	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACACGCTCGTGTATCATTG	840
Ch_56_A	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACACGCTCGTGTATCATTG	837
Ch_56_B	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACACGCTCGTGTATCATTG	837
Ch_59_A	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACACGCTCGTGTATCATTG	840
Ch_59_B	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACACGCTCGTGTATCATTG	840
Ch_1368	TATGCTGGTAATTGTCTCATGGGTGTCATTCTGGCTTGATCAAGGTGCTGTACACGCTCGTGTATCATTG	837
Ch_1371	TATGCT	

Ch_1124 GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 907

Ch_1127 GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 910

Ch_1243 GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 839

Ch_1288 GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 839

Ch_1302 GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 838

Ch_1311 GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 907

Ch_1314 GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 910

Ch_1323 GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACGCAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 907

Ch_1326 GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 907

Ch_1347 GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 910

Ch_56_A GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 907

Ch_56_B GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 907

Ch_59_A GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 910

Ch_59_B GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 910

Ch_1368 GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 907

Ch_1371 GGTGTAAGTACTCTCCTAACAAATGGCCACACAAACATCGGGTATTAATGCTTCACTGCCGCCAGTCTCAT 910

Ch_1124 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 977

Ch_1127 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 980

Ch_1243 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 909

Ch_1288 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 909

Ch_1302 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 908

Ch_1311 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 977

Ch_1314 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 980

Ch_1323 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 977

Ch_1326 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 977

Ch_1347 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 980

Ch_56_A ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 977

Ch_56_B ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 977

Ch_59_A ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 980

Ch_59_B ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 980

Ch_1368 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 977

Ch_1371 ATACAAAAGCCATTGATGTTTGGACTGGTGTGTTGTTGACGTTTCGTATTTGGTGCGCTGCTCGAATTTCGC 980

Ch_1124 CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAG----- 1003

Ch_1127 CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAG----- 1006

Ch_1243 CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAA 964

Ch_1288 CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAA 964

Ch_1302 CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAGGTTTGAATAAAGCTAACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAA 978

Ch_1311 CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAA 1032

Ch_1314 CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAA 1035

Ch_1323 CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAGATCGGGCCGCAG---ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAA 1044

Ch_1326 CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAGGTTTGAATAAAGCTAACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAA 1047

Ch_1347 CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAA 1035

Ch_56_A CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAA 1032

Ch_56_B CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAGATCGGGCCGCAG---ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAA 1044

Ch_59_A CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAG-----ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAA 1035

Ch_59_B CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAGATCGGGCCGCAG---ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAA 1047

Ch_1368 CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAGATCGGGCCGCAG---ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAA 1044

Ch_1371 CTTGGTGAATTATGCTTCCCGCTCAGATCGGGCCGCAG---ACATGCACAAGGAGAACATGAAAAAGAAA 1047

Ch_1124 ----- 1003

Ch_1127 ----- 1006

Ch_1243 CGTAGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTACTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACA 1033

Ch_1288 CGTAGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACA 1033

Ch_1302 CGTAGGGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACA 1047

Ch_1311 CGTAGGGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACA 1101

Ch_1314 CGTAGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACA 1104

Ch_1323 CGTAGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACA 1113

Ch_1326 CGTAGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAGTGCAACA 1116

Ch_1347 CGTAGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACA 1104

Ch_56_A CGTAGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACA 1101

Ch_56_B CGTAGAGATTTGGGGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACA 1113

Ch_59_A CGTAGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACA 1104

Ch_59_B CGTAGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACA 1116

Ch_1368 CGTAGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACA 1113

Ch_1371 CGTAGAGATTTGGAGCAGGCCAGTATAGATGCTGCTTCAGATTTATTGGATACCGATAGTAATGCAACA 1116

Ch_1124 ----- 1003
Ch_1127 ----- 1006
Ch_1243 TTTGCAATG-----TTGAGACAATGTGAAG 1058
Ch_1288 TTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGGGTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAG 1103
Ch_1302 TTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGGGTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAG 1117
Ch_1311 TTTGCAATG-----TTGAGACAATGTGAAG 1126
Ch_1314 TTTGCAATG-----TTGAGACAATGTGAAG 1129
Ch_1323 TTTGCAATG-----TTGAGACAATGTGAAG 1138
Ch_1326 TTTGCAATG-----TTGAGACAATGTGAAG 1141
Ch_1347 TTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGGGTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAG 1174
Ch_56_A TTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGGGTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAG 1171
Ch_56_B TTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGGGTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAG 1183
Ch_59_A TTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGGGTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAG 1174
Ch_59_B TTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGGGTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAG 1186
Ch_1368 TTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGGGTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAG 1183
Ch_1371 TTTGCAATGAAACCTTTGGTACGTCATCCGGGTGATCCATTGGCATTGGAAAAGTTGAGACAATGTGAAG 1186

Ch_1124 -----ACAATG 1009
Ch_1127 -----ACAATG 1012
Ch_1243 TTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATG 1128
Ch_1288 TTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATG 1173
Ch_1302 TTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATG 1187
Ch_1311 TTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATG 1196
Ch_1314 TTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATG 1199
Ch_1323 TTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATG 1208
Ch_1326 TTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATG 1211
Ch_1347 TTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAG----- 1239
Ch_56_A TTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATG 1241
Ch_56_B TTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAG----- 1248
Ch_59_A TTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATG 1244
Ch_59_B TTCATATGCAGCCACCA[↑]TAA[↓]CGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAG----- 1251
Ch_1368 TTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATG 1253
Ch_1371 TTCATATGCAGCCACCAAAACGTCCAAACTGTTGTAAGACTTGGCTGTCAAAGTTTCCCACAAGACAATG 1256

Ch_1124 TTCTAGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1079
Ch_1127 TTCTAGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1082
Ch_1243 TTCTAGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1198
Ch_1288 TTCTAGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1243
Ch_1302 TTCTAGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1257
Ch_1311 TTCTAGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1266
Ch_1314 TTCTAGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAGTAACGTTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1269
Ch_1323 TTCTAGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1278
Ch_1326 TTCTAGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAGCAATTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1281
Ch_1347 -----ATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1302
Ch_56_A TTCTAGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1311
Ch_56_B -----ATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1311
Ch_59_A TTCTAGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1314
Ch_59_B -----ATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1314
Ch_1368 TTCTAGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1323
Ch_1371 TTCTAGATCGAAGAGAATCGATGTTATTTACGAATAACATTTCCTGGTCTTCGCCTTATTCAATTTG 1326

Ch_1124	GTCTACTGGAGTACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1124
Ch_1127	GTCTACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1127
Ch_1243	GTCTACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1243
Ch_1288	GTCTACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1288
Ch_1302	GTCTACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1302
Ch_1311	GTCTACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1311
Ch_1314	GTCTACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1314
Ch_1323	GTCTACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1323
Ch_1326	GTCTACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1326
Ch_1347	GTCTACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1347
Ch_56_A	GTCTACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1356
Ch_56_B	GTCTACTGGAGCACCTGCCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1356
Ch_59_A	GTCTACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1359
Ch_59_B	GTCTACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAATAA	1359
Ch_1368	GTCTACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1368
Ch_1371	GTCTACTGGAGCACCTACCTATTCCGTGAAGAGGAGGATGAGTAA	1371

"Primer" R4

I
AA

Figura Suplementar S2: Alinhamento das sequências nucleotídicas dos transcritos variantes obtidos neste estudo. Em cinza as posições dos "primers" F1 e R4 usados nas amplificações. Setas representam posições de "stop codon", em marrom. Em preto os 5 nucleotídeos com o códon ATG retirados da sequência parcial do Ch*GluCl α* obtida por Carvalho *et al.* (2010a) e os dinucleotídeos AA restantes do "stop codon". Ch_X_Y=tamanho da região codificante de cada transcrito variante obtido, onde X representa o número de nucleotídeos respectivos e Y o padrão do possível "splicing" alternativo em Ch_56 e Ch_59.

ANEXOS: Dificuldades no bioensaio

Embora o resultado do bioensaio tenha sido estatisticamente significativo, é preciso citar um condicionante que pode ter interferido nesse resultado. Um fator que pode ter alterado o resultado final seria o comportamento de escape das larvas, de locais no recipiente com maior concentração de IVM para locais com menor concentração, inclusive refugiando-se na tampa. Nos primeiros minutos de início do bioensaio, muitas larvas subiram rapidamente na parte interna da tampa nos recipientes que receberam IVM e, desse modo, reduziram o tempo que estiveram em contato com o inseticida. Além disso, embora o método de diluição tenha sido considerado eficaz, alguns pontos no recipiente podem ter recebido menor concentração, reduzindo a disponibilidade de IVM para atacar os sítios alvo em *C. hominivorax*. Portanto, para a realização de futuros bioensaios é importante a redução da área livre nos recipientes e a busca por métodos mais eficientes de diluição da IVM.

O comportamento de fuga das larvas de *C. hominivorax*, após o contato com inseticida, também pode ter ocorrido em bioensaio com organofosforados realizado por Carvalho (2006). Nesta ocasião, o inseticida foi aplicado diretamente sobre as feridas do animal infestadas por larvas de *C. hominivorax*, e as larvas, injuriadas, podem ter caído da ferida, interferindo, assim, na frequência dos SNPs das larvas coletadas. O comportamento de fuga do recipiente, das larvas de *C. hominivorax*, observado no *bioensaio definitivo*, poderia, desta forma, também interferir na frequência dos genótipos encontrados nas larvas analisadas. A redução do contato entre as larvas e a ivermectina poderia resultar em larvas que foram

coletadas vivas, mas que teriam morrido caso estivessem totalmente imersas no inseticida. A suscetibilidade à ivermectina, das larvas de *C. hominivorax* utilizadas nos *bioensaios testes*, pode, também, ter mudado entre uma geração e outra, uma vez que as larvas utilizadas nesses bioensaios são oriundas da população altamente endocruzada do laboratório e, assim, ter sofrido pressão da seleção natural. Isso pode ter interferido na mortalidade e, conseqüentemente, na mudança das doses testadas de um bioensaio para outro.