

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**DETECÇÃO DA MUTAÇÃO *kdr-his* (*knockdown resistance*), ASSOCIADA À  
RESISTÊNCIA A INSETICIDAS PIRETROIDES, E PROSPECÇÃO DE NOVOS  
POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA NO GENE DOS CANAIS DE SÓDIO DE  
MOSCAS-DOS-ESTÁBULOS (*Stomoxys calcitrans*)**

**FRANCIELE DA SILVA OLIVEIRA**

**CAMPO GRANDE, MS  
2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**DETECÇÃO DA MUTAÇÃO *kdr-his* (*knockdown resistance*), ASSOCIADA À  
RESISTÊNCIA A INSETICIDAS PIRETROIDES, E PROSPECÇÃO DE NOVOS  
POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA NO GENE DOS CANAIS DE SÓDIO DE  
MOSCAS-DOS-ESTÁBULOS (*Stomoxys calcitrans*)**

**Detection of *kdr-his* (*knockdown resistance*), associated with to pyrethroid insecticides,  
and prospecting for new single base polymorphisms on the sodium channel gene in  
stable flies (*Stomoxys calcitrans*)**

**FRANCIELE DA SILVA OLIVEIRA**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Andréa Alves do Egito**

**Coorientador: Dr. Antonio Thadeu Medeiros de Barros**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

**CAMPO GRANDE, MS 2019**

*A Deus, aos meus  
pais e às pessoas  
preciosas que me  
apoíaram e  
incentivaram*

## AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus por me abençoar e fortalecer para conclusão de mais uma etapa.

Agradeço aos meus pais Jorge de Oliveira Araújo e Sonia Maria da Silva Araújo por serem o meu porto seguro e referencial; pelos princípios, amor, incentivo e ensinamentos investidos durante todas as fases da minha vida.

Ao meu noivo Fábio Ferreira Nunes e a seus pais Osdinei Ferreira Nunes e Ambrolina Ferreira Nunes pelo apoio, carinho e paciência para finalização desse ciclo.

Sou grata a Dr<sup>a</sup>. Andrea Alves do Egito, não só pela paciência, confiança, incentivos e cobranças durante a orientação, mas também pela caminhada de aprendizados e crescimento. Agradeço também ao meu co-orientador Dr. Antonio Thadeu Medeiros de Barros por me corrigir, direcionar e apoiar, contribuindo com o meu aprimoramento intelectual e pessoal.

A todos os meus colegas de jornada, em especial aos meus amigos: Thalles Policarpo, Catherine Walker, Andressa Fernandes, Ricardo Santos, Isaura Naka e a minha (gema) amiga irmã Isadora Inácio muito obrigada pelo incentivo, pelas conversas, pelas risadas, pela parceria e pelo compartilhamento de conhecimento.

A CAPES, pela concessão de bolsa de estudos e à Embrapa Gado de Corte, pela infraestrutura laboratorial.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFMS, pela oportunidade oferecida e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFMS, pelos conhecimentos ministrados durante o curso.

A todos que contribuíram de alguma forma para o êxito do trabalho.

Muito obrigada!

## Resumo

Oliveira, F. S. **Detecção da mutação *kdr-his* (*knockdown resistance*), associada à resistência a inseticidas piretroides, e prospecção de novos polimorfismos de base única no gene dos canais de sódio de moscas-dos-estábulos (*Stomoxys calcitrans*).** 2019. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2019.

A mosca-dos-estábulos (*Stomoxys calcitrans*) atualmente é considerada um dos ectoparasitos de maior impacto econômico à pecuária brasileira, com aumento populacional associado à implantação de usinas sucroalcooleiras. Para que os prejuízos causados por essa mosca sejam reduzidos, são necessárias medidas de manejo sanitário associadas a um controle químico. Entretanto, o uso indiscriminado dos agentes químicos, principalmente os da classe piretroide, tem acarretado na seleção de indivíduos resistentes. A resistência aos piretroides pode estar associada a mutações do tipo *kdr* (*knockdown resistance*) no gene do canal de sódio sensível à voltagem (*Vssc*), as quais reduzem a sensibilidade do canal de sódio à ação dos inseticidas dessa classe. O presente estudo teve por objetivo avaliar a ocorrência e frequência da mutação *kdr-his* em diferentes populações e/ou regiões do Estado, visando contribuir para o manejo efetivo e controle desta praga. Amostras de mosca-dos-estábulos foram obtidas em duas colônias e duas populações silvestres. Avaliou-se 117 indivíduos, provenientes das amostras das colônias CNPGC-1 (n= 31) e Kerrville (suscetível)-USA (n= 20), e das populações de campo de Angélica-MS (n= 26) e Chapadão do Céu-GO (n= 40). A extração de DNA foi realizada de modo individual utilizando um protocolo inorgânico adaptado e a amplificação de um fragmento contendo 300 pb do gene *Vssc* foi realizada por PCR, com *primers* desenhados a partir da sequência de referência (HQ010283). Este fragmento foi sequenciado pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxinucleotídeos marcados com fluorocromos. Após alinhamento e edição, obteve-se um fragmento contendo 230 pb no qual foi possível confirmar em 23 indivíduos a existência da mutação c.103T>A, associada à resistência aos piretroides, sendo destes 83% heterozigotos e 17% homozigotos para a mutação *kdr* (AA). A frequência do alelo *kdr-kis* foi de 0,032, 0,308 e 0,300 para as populações da colônia CNPGC-1, Angélica e Chapadão do Sul, respectivamente. Testes de diferenciação baseados no índice  $F_{ST}$  demonstraram que a colônia CNPGC-1 é geneticamente diferente para o loco estudado, em relação às populações de campo, as quais não são estatisticamente distintas. Também foi possível nesse estudo, prospectar três novos SNPs cuja possível associação com a resistência aos piretroides deverá ser avaliada em estudos futuros.

**Palavras-chave:** ectoparasito, controle parasitário, resistência a inseticidas, SNP.

## Abstract

Oliveira, F. S. **Detection of *kdr-his* (knockdown resistance), associated with resistance to pyrethroid insecticides and prospecting for new single base polymorphisms on the sodium channel gene in stable flies (*Stomoxys calcitrans*)**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2019.

The stable fly (*Stomoxys calcitrans*) is currently one of the ectoparasites with the greatest economic impact on the livestock production chain. In order to reduce the damage caused by the stable fly, sanitary management measures are implemented associated with chemical control based on the use of insecticides. However, the continued use of insecticides has led to the emergence of resistant individuals. In the case of pyrethroid class insecticides, this resistance has been associated with a *kdr* (knockdown resistance) in the voltage-sensitive sodium channel gene (*Vssc*), where the fly's nervous system becomes insensitive to the action of this class insecticide. The present study aimed to evaluate the occurrence and frequency of the *kdr-his* mutation in different populations and/or regions of the state, aiming to contribute to the effective management and control of this pest. Stable fly samples were obtained from two colonies and two wild populations. It was evaluated 117 individuals from the colonies samples CNPCG-1 (n=31), Kerrville-susceptible (n=20), field populations from Angelica-MS (n=26) and Chapadão do Céu-GO (n=40). The DNA extraction was performed individually using an adapted inorganic protocol and amplification of a 300 pb containing the *Vssc* gene was performed by PCR, drawn from the reference sequence (HQ010283). This fragment was sequenced by the chain termination method using fluorochrome labeled dideoxynucleotides. After alignment and editing, a fragment containing 230 pb was obtained, in which it was possible to confirm in 23 individuals the existence of the mutation c.103T> A, associated with pyrethroid resistance, 83% heterozygous and four 17% homozygous for the *kdr* (AA) mutation. The frequency of the *kdr-his* allele was 0.032, 0.308 and 0.300 for the populations of the colony CNPGC-1, Angelica and Chapadão do Sul respectively. Differentiation tests based on the  $F_{ST}$  index demonstrated that the CNPGC-1 colony is genetically different for the studied locus, at 5% level, compared to the field populations ( $P<0.5$ ), which are not statistically distinct. It was also possible in this study to prospect three new SNPs whose association with pyrethroid resistance should be evaluated in further studies.

**Keywords:** control measures, ectoparasite, insecticide resistance, SNP.

## Lista de Ilustrações

### 1. INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Características morfológicas da mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*).....12
- Figura 2.** Exemplos dos surtos da mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) em diferentes hospedeiros.....12
- Figura 3.** Ciclo biológico da mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*).....13
- Figura 4.** Distribuição dos surtos de *Stomoxys calcitrans* em 2018, associados a usinas sucroalcooleiras.....14
- Figura 5.** Estrutura do neurônio de um inseto.....15
- Figura 6.** Representação esquemática da ação de um inseticida piretroide (cipermetrina) como modulador do canal de sódio em um neurônio.....17
- Figura 7.** Código genético, expresso por trincas de bases nitrogenadas (códon).....19
- Figura 8.** Diagrama da estrutura transmembrana do canal de sódio e identificação e localização das mutações relacionadas à resistência *kdr* nas diferentes classes de insetos.....20

### 2. DETECÇÃO DA MUTAÇÃO KDR-HIS, ASSOCIADA À RESISTÊNCIA A PIRETROIDES, EM POPULAÇÕES DA MOSCA-DOS-ESTÁBULO (*Stomoxys calcitrans*).

- Figura 1.** Eletroferograma de amostras de moscas dos estábulo com genótipos HH (homozigotas para o alelo *kdr-his*, mosca resistente, AA), LL (homozigotas com o alelo selvagem, susceptíveis, TT) e LH (heterozigotas, código IUPAC W representando os nucleotídeos T e A na mesma posição) alinhadas à sequência de referência (HQ010283).....34
- Figura 2.** Alinhamento das sequências obtidas com a sequência de referência do GenBank - HQ010283. Além do SNP detectado em indivíduos homozigotos resistentes (AA) e heterozigotos, representados pelo código da IUPAC W (AT), nessa posição.....35
- Figura 3.** Frequência genotípica para a mutação *kdr-his* das amostras oriundas das colônias mantidas na Embrapa e de usinas sucroalcooleiras nos municípios de Angélica-MS e Chapadão do Céu-GO.....35
- Figura 4.** Frequência alélica para a mutação *kdr-his* das amostras oriundas da colônia CNPGC-1 e das amostras provenientes das usinas sucroalcooleiras dos municípios de Chapadão do Céu-GO e Angélica-MS.....38

**Figura 5.** Frequência genotípica da mutação encontrada no íntron das amostras oriundas da colônia CNPGC-1 e das amostras provenientes das usinas sucroalcooleiras dos municípios de Chapadão do Céu-GO e Angélica-MS.....41



## Lista de Tabelas

2. DETECÇÃO DA MUTAÇÃO *KDR-HIS*, ASSOCIADA À RESISTÊNCIA A PIRETROIDES, EM POPULAÇÕES DA MOSCA-DOS-ESTÁBULOS (*Stomoxys calcitrans*).

**Tabela 1.** Frequência alélica encontrada nos SNPs prospectados no fragmento sequenciado de 230pb para as três populações estudadas e a frequência alélica média do conjunto amostral avaliado.....40

**Tabela 2.** Sumário das mutações observadas em uma sequência de 230bp do gene dos canais de sódio contendo o sítio mutacional do alelo *kdr-his* (c,103T>A), suas localizações em relação a sequência codificante, posição do SNP observado na sequência referência HQ010283, do aminoácido em relação a mutação L1014H, o tipo de mutação e os genótipos obtidos em relação a original, em cada população e no total.....42

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Considerações Gerais.....	11
1.2. Sistema nervoso dos insetos.....	15
1.3. Mecanismo de resistência aos piretroides.....	16
1.4. Base genética do mecanismo de resistência <i>kdr</i> .....	18
REFERÊNCIAS.....	22
2. DETECÇÃO DA MUTAÇÃO KDR-HIS, ASSOCIADA À RESISTÊNCIA A PIRETROIDES, EM POPULAÇÕES DA MOSCA-DOS ESTÁBULOS <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	28
2.1. Introdução.....	30
2.2. Material e Métodos.....	31
2.3. Resultados e Discussão.....	33
2.4. Conclusões.....	43
2.5. Referências.....	44

## INTRODUÇÃO

### 1.1. Considerações Gerais

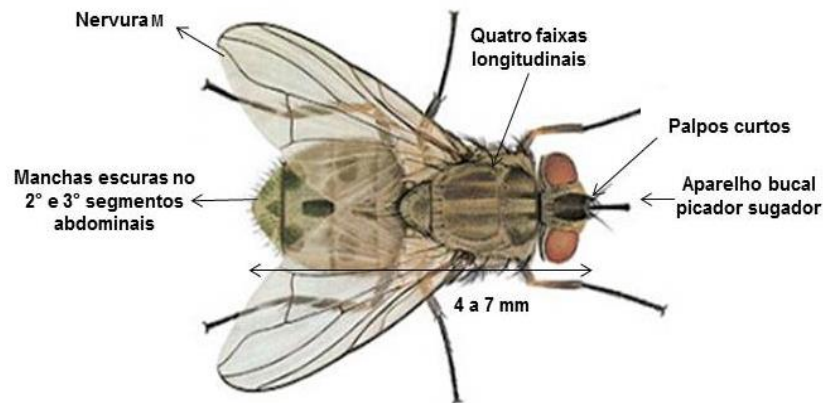
Com a expansão da indústria sucroalcooleira no início deste século, foram instaladas várias usinas para o processamento da cana-de-açúcar em regiões tradicionais de pecuária, o que proporcionou benefícios socioeconômicos a diversas regiões do país (Oliveira, 2009). Entretanto, como em muitas situações pode haver a associação com o aumento populacional da mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*), a implantação dessas usinas, tem acarretado graves impactos à atividade pecuária em suas imediações (BARROS *et al.*, 2010; DOMINGHETTI *et al.*, 2015).

A região Centro-Oeste do Brasil, além de possuir o maior rebanho bovino do país (IBGE, 2016), é considerada a segunda maior produtora de etanol e açúcar (UNICADATA, 2017). Em 15 anos, no estado de Mato Grosso do Sul, foi observado um crescimento superior a 500% no ramo sucroalcooleiro, o que favoreceu a capacidade de geração de empregos e renda das indústrias de processamento de cana-de-açúcar, comprovada pelo crescimento populacional das regiões onde as mesmas estão instaladas (CENTENARO, 2015).

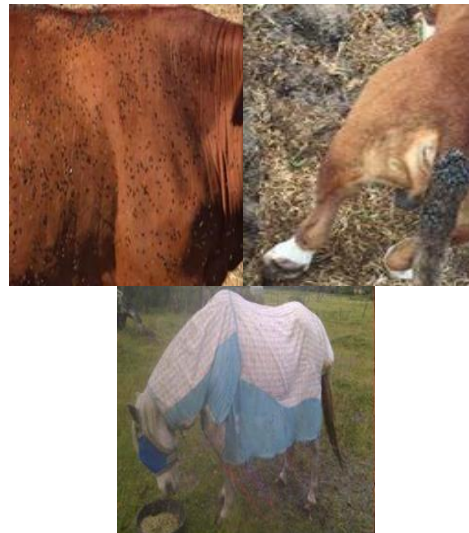
No Brasil, *Stomoxys calcitrans*, popularmente conhecida como “mosca-dos-estábulo” ou “mosca-da-vinhaça”, atualmente é considerada um dos ectoparasitos de maior impacto econômico à cadeia produtiva da pecuária, nos estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, São Paulo, Goiás e Minas Gerais (MACEDO *et al.*, 2005; GRISI *et al.*, 2014; DOMINGHETTI *et al.*, 2015).

Suas características morfológicas (Figura 1) incluem um tamanho que pode variar de 4 a 7 mm; quatro faixas longitudinais escuras no tórax; três manchas escuras no segundo e no terceiro segmentos abdominais; os palpos são curtos, medindo cerca de um quarto do comprimento da probóscide, e o aparelho bucal do tipo picador sugador projetado para frente (TUCCI *et al.*, 2001; BITTENCOURT & BORJA, 2002). As infestações por esta mosca afetam a produção de carne e leite (CAMPBELL *et al.*, 2001), com perdas anuais superiores a US\$ 2 bilhões à bovinocultura nos Estados Unidos (TAYLOR *et al.*, 2012) e US\$ 100 milhões no Brasil (GRISI *et al.*, 2002).

De hábito hematófago e picada dolorida, tanto os machos quanto as fêmeas dessa espécie atacam preferencialmente as pernas e flancos e são responsáveis por causar estresse aos animais (KOLLER *et al.*, 2009). Além disso, podem atuar como vetores mecânicos de diversos agentes patogênicos, acometendo diferentes hospedeiros (Figura 2), como: bovinos, caprinos, equinos, ovinos, cães e o homem (BITTENCOURT & BORJA, 2002).



**Figura 1.** Características morfológicas da mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*). (Figura adaptada de: <http://www.nadsdiptera.org/FFP/stable.htm>).



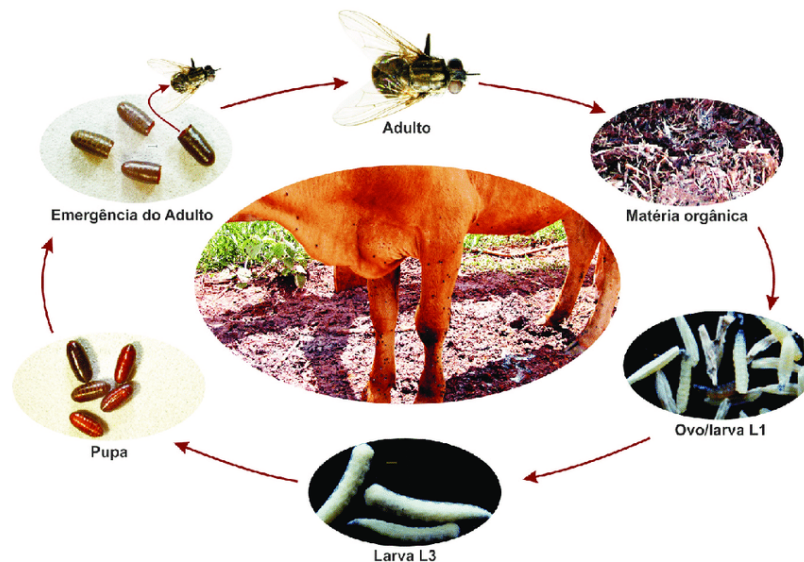
**Figura 2.** Exemplo dos surtos da mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) nos diferentes hospedeiros (Fonte: International Stable Fly Workshop, 2011).

Em climas quentes, o ciclo biológico da mosca-dos-estábulo (Figura 3) ocorre em aproximadamente quatro semanas, podendo variar de três a sete semanas, dependendo da temperatura. Durante o início da primavera e do verão há maior incidência de adultos parasitando os hospedeiros, com redução da população no fim do verão e outono, atingindo os níveis mais baixos no inverno (TUCCI *et al.*, 2001; BATISTA *et al.*, 2005).

A mosca-dos-estábulo apresenta ampla distribuição geográfica, e realiza postura em locais com resíduos orgânicos de origem vegetal, em processo de fermentação (Moraes & Korndörfer, 2007; Barros *et al.*, 2010) Desta forma, os subprodutos provenientes das usinas

de processamento de cana-de-açúcar, a palha misturada à vinhaça ou aos dejetos de animais, torna-se um substrato favorável à postura e desenvolvimento dos estádios imaturos dessa mosca (KOLLER *et al.*, 2009).

Na Figura 4 observa-se a distribuição espacial dos surtos da mosca-dos-estábulo associados a usinas de cana-de-açúcar registrados até 2018 (PAULO CANÇADO – informação pessoal). A capacidade de reprodução e multiplicação desse parasito nas áreas canavieiras fertirrigadas por vinhaça acarretam explosões populacionais e, conseqüentemente, graves problemas a ambos os setores envolvidos (CORRÊA *et al.*, 2013; DOMINGHETTI *et al.*, 2015).



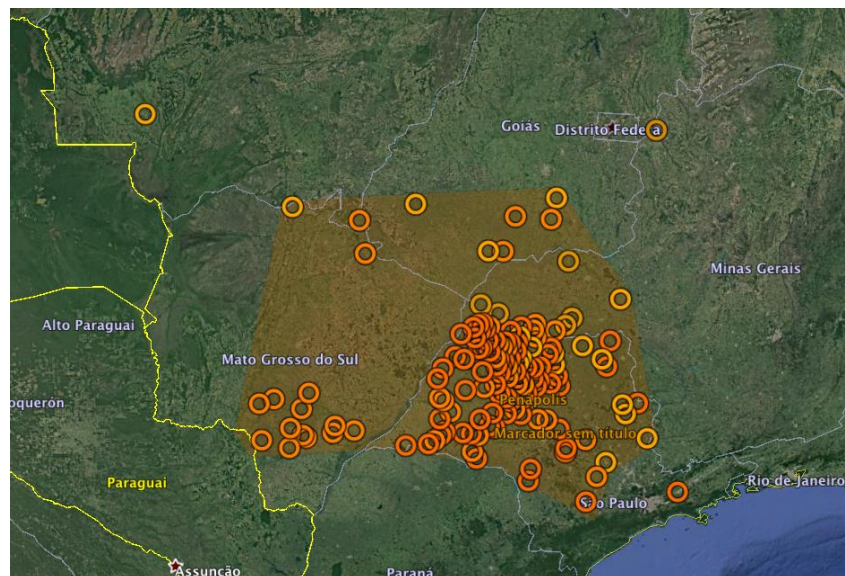
**Figura 3.** Ciclo biológico da mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*). (Fonte: <https://www.embrapa.br/DOC175.pdf>).

A partir de 2009, as usinas sucroalcooleiras passaram a ser frequentemente responsabilizadas pelos pecuaristas como a fonte primária dos surtos (KOLLER *et al.*, 2009). Foi relatada uma alta frequência de explosões populacionais em municípios do MS, incluindo Angélica, Dourados e Maracajú, em 2009 e Caarapó, Nova Alvorada do Sul, Nova Andradina, Ponta Porã e Rio Brillhante em 2010 e 2011 (KOLLER *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2010; KASSAB *et al.*, 2012; DOMINGHETTI *et al.*, 2015).

Para redução dos efeitos negativos causados pela mosca na cadeia produtiva pecuária, é necessário que seja realizado um controle fundamentado em um manejo sanitário, associado

ao controle químico empregando inseticidas de diversas classes. Embora as estratégias baseadas no uso de inseticidas para controle de pragas e insetos sejam as mais antigas, ainda são as mais utilizadas (MOREIRA *et al.*, 2012; KASSAB *et al.*, 2012; MENEZES *et al.*, 2016).

Infelizmente, o uso frequente dos agentes químicos no controle parasitário tem reduzido a eficácia dos inseticidas, principalmente os da classe piretroide; e essa realidade tem sido evidenciada em virtude do aparecimento de indivíduos resistentes nas diferentes populações de moscas, especialmente na mosca-doméstica (*Musca domestica*) e na mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) (SODERLUND & KNIPPLE, 2003; PITZER *et al.*, 2010).



**Figura 4.** Distribuição dos surtos dos surtos de *Stomoxys calcitrans* em 2018, associados a usinas sucroalcooleiras (círculos alaranjados). (Fonte: Dominghetti *et al.* (2015), modificada por Paulo Caçado e Thadeu Barros).

Os inseticidas são agentes químicos neurotóxicos que podem atuar como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), análogos da acetilcolina (ACh), antagonistas de canais de cloro mediados por GABA (ácido gama-aminobutírico) e moduladores de canais de sódio no sistema nervoso do inseto (MOREIRA *et al.*, 2012).

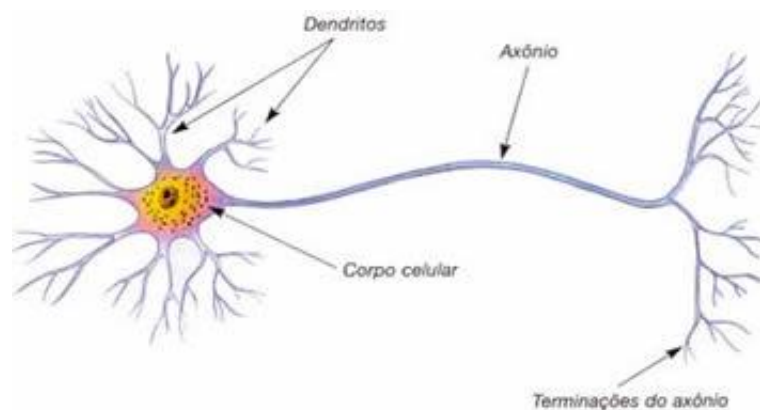
Na América do Sul, até 2016 não existiam informações sobre a ocorrência de resistência aos piretroides em *S. calcitrans*, principal classe de inseticida utilizada atualmente para controle das moscas-dos-estábulo. As primeiras informações sobre a ocorrência de resistência da mosca-dos-estábulo no Brasil foram obtidas no âmbito do projeto “Avaliação

de Inseticidas Comerciais e Prospecção de Bioinseticidas para Controle da Mosca-dos-Estábulos” tendo sido detectadas populações resistentes a piretroides em Mato Grosso do Sul (BARROS, 2017 - informação pessoal).

Os piretroides atuam como moduladores dos canais de sódio, provocando a paralisia no inseto, seguida de morte, devido a interferências nesses canais regulados por voltagem, alterando o equilíbrio entre sódio e potássio e impedindo a sinapse nervosa normal (MOREIRA *et al.*, 2012). Uma possível causa de resistência aos inseticidas dessa classe pode ser devido a mutações no gene dos canais de sódio das células nervosas, que promovem uma modificação nos sítios alvos dos inseticidas (VAIS *et al.*, 1996; SODERLUND & KNIPPLE, 2003). Essa modificação resulta em um efeito conhecido como *kdr* (*knockdown resistance*), onde o sistema nervoso da mosca torna-se insensível à ação do inseticida (SODERLUND, 2008).

## 1.2. Sistema nervoso dos insetos

O sistema nervoso tem por função transmitir informações ao corpo por meio de impulsos elétricos, nos insetos o mesmo é formado por neurônios (Figura 5), constituído por uma região denominada corpo celular, a qual possui terminações nervosas ramificadas receptoras dos estímulos nervosos (dendritos), e uma região alongada que possui arborizações terminais por onde são transmitidos os estímulos nervosos, denominada axônio (FREITAS *et al.*, 1978).



**Figura 5.** Estrutura do neurônio de um inseto. (Fonte: <https://images.app.goo.gl/P78TdbXS1KUdMHL06>).

Localizado na cabeça do inseto, o sistema nervoso central possui um gânglio-esofagiano que atua como a principal rede de transmissão dos impulsos nervosos para o restante do

corpo. Já o sistema nervoso periférico não possui gânglios, é formado por células nervosas sensoriais e motoras, além das células nervosas que as conectam ao sistema nervoso central e ao sistema nervoso autônomo (MATIAS, 2016). Os neurônios são responsáveis pela transmissão do impulso nervoso e estão presentes em quase toda a extensão do corpo do inseto. Para que o impulso nervoso se propague de um neurônio para outro é necessária a liberação de neurotransmissores em sua membrana (DOWSON, 1977).

Neurotransmissores são mensageiros químicos do sistema nervoso e possuem a função de enviar informações entre neurônios, necessárias para propagar o impulso nervoso ao longo do corpo (MATIAS, 2016). Logo, os neurotransmissores podem ser inibidos ou potencializados mediante a interação do sistema nervoso do inseto com os inseticidas, causando uma superexcitação da junção mioneural e paralisia neuromuscular (BLOOMQUIST, 1996).

Os canais de sódio localizados nas membranas plasmáticas dos neurônios são sensíveis a variações nos gradientes elétricos através da membrana e respondem permitindo ou bloqueando a passagem destes íons. Esses canais, normalmente são mais sensíveis ao sódio e possuem uma velocidade no fluxo muito alta (HILLE, 1978).

Mediante o uso da tecnologia molecular, Catterall (2000) observou a existência de uma proteína contendo uma grande  $\alpha$ - subunidade de polipeptídeo no canal de sódio. Essa  $\alpha$ -subunidade é formada por quatro domínios de repetição (I-IV), cada domínio contendo seis segmentos (S1-S6) que atravessam a membrana para formar o sítio seletivo no canal de sódio, os quais possuem uma alta densidade de resíduos carregados positivamente (SINGER, 1971).

Acredita-se que a inativação do canal ocorra por um mecanismo de bola-e-corrente. Neste caso, um domínio proteico na superfície da membrana do canal de sódio, ligado por um segmento curto do polipeptídeo, é livre para mover-se quando o canal de sódio está fechado, mas um sítio na face interna do canal torna-se disponível para ligar-se à bola quando ele se abre, bloqueando o canal. O comprimento da corrente parece determinar quanto tempo um canal iônico permanece aberto; quanto maior a corrente, maior o período de abertura. A inativação de outros canais iônicos pode ocorrer por mecanismos semelhantes (TOMBOLA *et al.*, 2006).

### **1.3. Mecanismo de resistência aos piretroides**

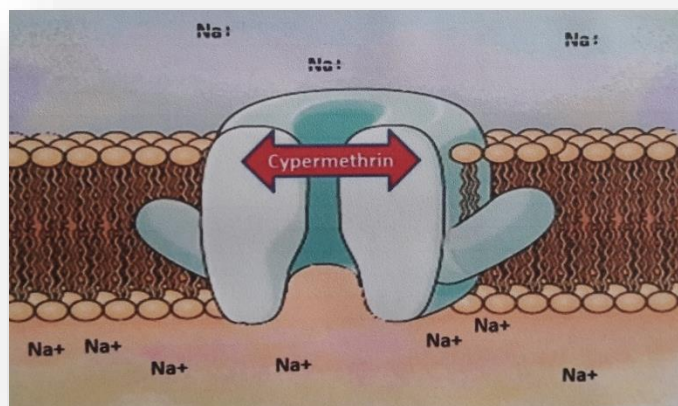
A resistência é definida como o desenvolvimento da capacidade de um organismo tolerar diferentes doses de agentes tóxicos, que seriam letais para a maioria da população da mesma espécie (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1981).



Estratégias de controle pelo uso de inseticidas podem se tornar pouco eficaz ao longo do tempo em função de uma redução da sensibilidade aos inseticidas por parte dos insetos que pode ser causada por diferentes mecanismos, tais como: (a) modificações comportamentais, onde o inseto reconhece a presença do inseticida reduz ou evita o contato (SPARKS *et al.*, 1989; ZYZAK *et al.*, 1996); (b) redução na penetração cuticular, associada a modificações na sua composição (STONE & BROWN, 1969); (c) resistência metabólica, por aumento da capacidade de metabolização desses produtos, através de enzimas de detoxificação (HEMINGWAY, 2000); e (d) modificação nos sítios alvos dos inseticidas (FFRENCH-CONSTANT *et al.*, 2004).

Os inseticidas da classe piretroide são moléculas que agem nos canais de sódio, apresentando uma rápida absorção e um elevado efeito instantâneo nos insetos “*knockdown*”, apesar de um curto período residual (VALENTINE, 1990).

Os piretroides atuam no sistema nervoso mediante sua ligação a uma das subunidades dos canais de sódio presentes nos neurônios dos insetos. Essa ligação modifica os canais individualmente e os mantém abertos (Figura 6) por um período mais prolongado (TAYLOR, 2001).



**Figura 6.** Ação do piretroide (cipermetrina) como modulador do canal de sódio. (Fonte: <https://www.youtube.com/watch?v=8X31U9xyqDw>).

De acordo com Eto (1990), em um indivíduo suscetível, os piretroides se ligam aos canais de sódio alterando sua conformação e aumentando seu tempo de abertura, fazendo com que haja um aumento no fluxo de sódio para o interior da membrana e prolongando a fase de despolarização após o pico do potencial de ação que é atingido normalmente. A consequência desse processo é a hiperexcitação e posterior morte do organismo.

Segundo Dong et al. (2014) a maioria dos insetos possui apenas um gene nos canais de sódio que devido a mecanismos pos-transcripcionais, como o *splicing* alternativo e a edição de RNA, possuem uma grande diversidade de funcionalidades.

A resistência aos piretroides é um fenômeno genético onde alterações no código genético podem afetar as proteínas alvos dos inseticidas e/ou o seu metabolismo (SODERLUND & KNIPPLE, 2003). Essas alterações como possível causa de resistência aos inseticidas dessa classe ocasionam mutações no gene dos canais de sódio das células nervosas, que resultam em um dos mais importantes mecanismos de resistência, “*knockdown*” (*kdr*), onde o sistema nervoso da mosca torna-se insensível a ação do inseticida (VAIS *et al.*, 1996; GUERRERO *et al.*, 1997; SODERLUND & KNIPPLE, 2003; SODERLUND, 2008).

#### 1.4. Base genética do mecanismo de resistência *kdr*

Em termos genéticos, a resistência é uma característica herdável, em que os alelos aumentam de frequência na população, como um resultado direto dos efeitos seletivos de um dado inseticida (CROW, 1957).

O mecanismo de resistência envolvendo alterações nos genes relacionados aos canais de sódio no sistema nervoso dos insetos é bem conhecido, bem como sua biologia molecular. Essas alterações consistem em variações individuais, resultantes de mutações, levando à substituição de um nucleotídeo por outro ou à adição ou supressão de um ou mais nucleotídeos, e podem ser detectadas a partir de marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (BEUZEN *et al.*, 2000; REGITANO & COUTINHO, 2001).

As mutações mais frequentes são as transições de uma purina por outra purina (A ↔ G) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C ↔ T), em contrapartida as transversões caracterizadas pela troca de uma purina por uma pirimidina ou pirimidina por uma purina (C ou T ↔ A ou G) ocorrem, mas são menos comuns, apesar do maior número de combinações possíveis (VIGNAL, 2002; CAETANO, 2009).

Embora a resistência aos piretroides esteja amplamente documentada em várias espécies de insetos (CLIEK & GREENE, 1994; MARON *et al.*, 1997), estudos moleculares envolvendo os mecanismos de resistência em *Stomoxys calcitrans* são poucos.

Na mosca-dos-estábulo, o mecanismo de resistência aos piretroides “*knockdown*”, mediado pelo alelo *kdr* – “*knockdown resistance*” foi identificado (OLAFSON *et al.*, 2011) e associado a mudanças na estrutura genética dos canais de sódio a partir de outras espécies, incluindo a mosca-doméstica (*Musca domestica*), mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*)

e a mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*), dentre outros (WILLIAMSON *et al.*, 1996; OLAFSON *et al.*, 2011).

Essa mutação é caracterizada por uma alteração estrutural na proteína codificada pelo gene, ou seja, a troca de um nucleotídeo na região codificadora do gene que pode resultar em uma alteração na codificação do aminoácido e, conseqüentemente, uma alteração na seqüência da proteína, resultando ou não em um quadro de resistência ao inseticida (SCOTT, 1995). Na figura 7, observa-se o código genético do DNA expresso por trinças de bases nitrogenadas (códon). Cada códon, formado por três letras, corresponde a dado aminoácido. O código genético também é degenerado, ou seja, existem aminoácidos que podem ser codificados por mais de uma trinca.

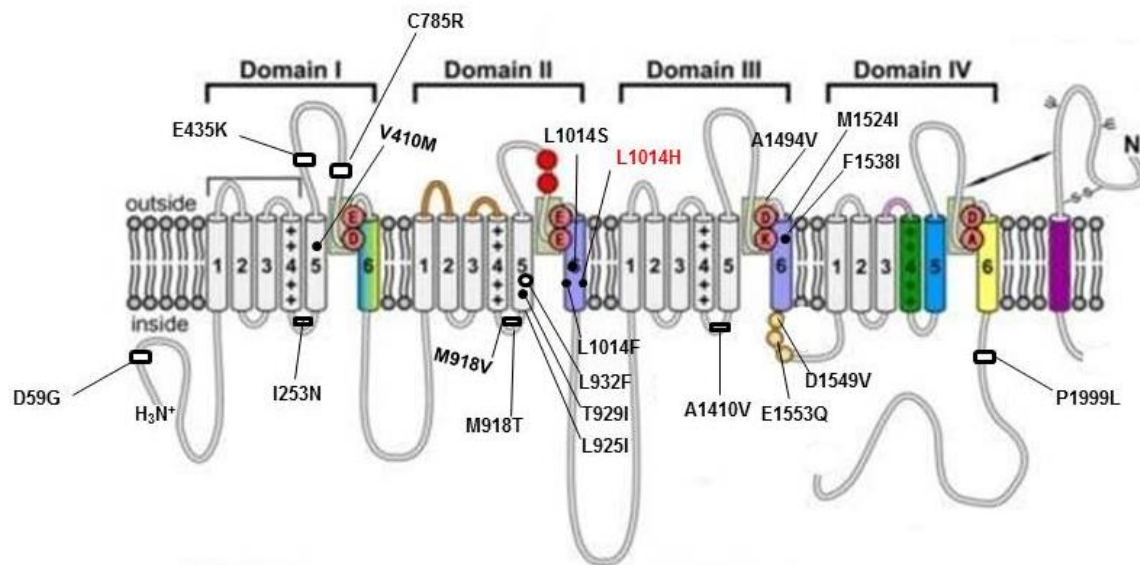
		SEGUNDO NUCLEOTÍDEO									
		U		C		A		G			
		Código	Aminoácido	Código	Aminoácido	Código	Aminoácido	Código	Aminoácido		
PRIMEIRO NUCLEOTÍDEO	U	UUU	Fenilalanina	UCU	Serina	UAU	Tirosina	UGU	Cisteína	U	
		UUC		UCC		UAC		UGC		C	
		UUA	Leucina	UCA		UAA	PARADA	UGA	PARADA	A	
		UUG		UCG		UAG	PARADA	UGG	Triptofano	G	
	C	CUU	Leucina	CCU	Prolina	CAU	Histidina	CGU	Arginina	U	
		CUC		CCC		CAC		CGC		C	
		CUA		CCA		CAA	CGA	A			
		CUG		CCG		CAG	CGG	G			
	A	AUU	Isoleucina	ACU	Trionina	AAU	Asparagina	AGU	Serina	U	
		AUC		ACC		AAC		AGC		C	
		AUA		ACA		AAA	Lisina	AGA	Arginina	A	
		AUG		Metionina		ACG		AAG		AGG	G
	G	GUU	Valina	GCU	Alanina	GAU	Ácido aspártico	GGU	Glicina	U	
		GUC		GCC		GAC		GGC		C	
		GUA		GCA		GAA	Ácido glutâmico	GGA		G	
		GUG		GCG		GAG		GGG			

**Figura 7.** Código genético, expresso por trinças de bases nitrogenadas (códon). Cada códon, formado por três letras, corresponde a certo aminoácido. (Fonte: <https://images.app.goo.gl/YE7drURLjH3hTcVV8>).

Em diferentes insetos as mutações associadas aos fenótipos *kdr* e *super-kdr* foram encontradas a partir do segundo domínio no canal de sódio (SODERLUND & KNIPPLE, 2003). Mais de 50 mutações nesta região foram identificadas como responsáveis ou associadas à resistência *kdr* aos piretroides em diferentes artrópodes e vetores de doenças (DONG *et al.*, 2014). A combinação de dois sítios mutacionais leva a uma redução da

sensibilidade aos piretroides, caracterizando a mutação *super-kdr* (*s-kdr*), a qual é capaz de conferir uma resistência 100x maior aos piretroides que a mutação *kdr* (DAVIES *et al.*, 2008).

Nos muscídios, a primeira mutação relacionada à resistência *kdr* foi observada no segmento transmembrana S6 do II domínio no canal de sódio (Figura 8) de *M. domestica*, onde a substituição do aminoácido leucina por uma fenilalanina ocasionou um aumento significativo na resistência aos piretroides (WILLIAMSON *et al.*, 1993; 1996; 1997).



**Figura 8.** Diagrama da estrutura transmembrana do canal de sódio e identificação e localização das mutações relacionadas à resistência *kdr* nas diferentes classes de insetos (Figura adaptada de: Olafson 2011 e bibliotecadigital.ufmg.br).

Na mosca-dos-estábulo a mutação relacionada à resistência aos piretroides foi encontrada, mediante o isolamento dessa mesma região no gene do canal de sódio, onde foi observada na posição 1014 do transcrito, uma mutação caracterizada pela substituição de uma leucina por uma histidina (OLAFSON *et al.*, 2011), e equivale a mutação observada em outras classes de insetos (OLAFSON *et al.*, 2011; DONG *et al.*, 2014). Até o momento apenas a mutação *kdr* foi descrita (OLAFSON *et al.*, 2011) e segundo os autores que a descobriram, o número de colônias ou populações resistentes de *Stomoxys calcitrans* reportadas é relativamente baixo, o que têm inviabilizado a busca por maiores informações a respeito da ocorrência de outras mutações.

Segundo Davies et al. (2008) a mutação *kdr* é recessiva, ou seja, a característica se expressa apenas quando o indivíduo é homocigoto. Este fato implica na permanência da resistência relacionada a este efeito em baixos níveis em uma população sem que seja detectada, mesmo havendo pressão de seleção. Este fato por si só demonstra a importância da detecção por metodologias moleculares de mutações relacionadas à resistência a inseticidas em *Stomoxys calcitrans*. Os métodos de tecnologia molecular, além de possibilitar a distinção genotípica da resistência, em heterocigotos (SR), homocigoto susceptível (SS) e homocigoto resistente (RR), permitem a detecção da resistência mesmo a uma baixa frequência (ARONSTEIN et al., 1994).

Dada a detecção de resistência a inseticidas piretroides na mosca-dos-estábulo em Mato Grosso do Sul em 2016 (A. T. M. BARROS – informação pessoal) e a ausência de informações sobre os mecanismos envolvidos, este estudo teve como objetivo avaliar a existência de mutações do tipo “*knockdown resistance*” (*kdr*) no gene que codifica os canais de sódio dependentes de voltagem, bem como, avaliar sua ocorrência e frequência em diferentes populações e/ou regiões do Estado visando contribuir para o manejo efetivo e controle desta praga.

## REFERÊNCIAS

- AMICHOT, M.; CASTELLA, C.; CUANY, A.; BERJE, J.B.; PAURON, D. Target modification as a molecular mechanism of pyrethroid resistance in *Drosophila melanogaster*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 44, n. 3, p. 183-190, 1992.
- ARONSTEIN, K.; ODE, P.; FFRENCHCONSTANT, R. H. Direct comparison of PCR-based monitoring for cyclodiene resistance in *Drosophila* populations with insecticide bioassay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 48, n. 3, p. 229-233, 1994.
- BARROS, A. T. M.; KOLLER, W. W.; CATTO, J. B.; SOARES, C. O. Surtos por *Stomoxys calcitrans* em gado de corte no Mato Grosso do Sul. **Revista Brazilian Journal of Veterinary Research**, 30(11): 945-952, 2010.
- BARROS, T. M.; SOUZA, T. F.; CANÇADO, P. H. D. Metodologia para bioensaios com imaturos de *Stomoxys calcitrans*. **Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 2014.
- BATISTA, Z.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R.; LOPES, C.M.L.; BORGES, L.M.F. Populational dynamics of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus) (Diptera: Muscidae) in three biocenosis, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 130, n. 3-4, p. 343-346, 2005.
- BEUZEN, N. D.; STEAR, M. J.; CHANGM, K. C. Molecular markers and their use in animal breeding. **The Veterinary Journal**, v.160, n.1, p.42-52, 2000.
- BITTENCOURT, A. J.; BORJA, G. E. M. *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae): preferência por locais do corpo de bovinos para alimentação. **Revista Brasileira de Zootecias**, Juiz de Fora, v. 4, n. 1, p. 75-83, 2002.
- BLOOMQUIST, J. R. Ion channel as targets for insecticides. **Annual Review of Entomology**, v.41, n. 1, p.163-190, 1996.
- CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 8, p. 64-71, 2009.
- CAMPBELL, J. B.; SKODA, S. R.; BERKEBILE, D. R.; BOXLER, D. J.; THOMAS, G. D.; ADAMS, D. C.; DAVIS, R. Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gains of grazing yearling cattle. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, n. 3, p. 780-783, 2001.
- CATTERALL, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v. 26, n.1, p. 13-25, 2000.
- CENTENARO, M. Análise da evolução da indústria sucroenergética do Estado de Mato Grosso do Sul. **Anais do Encontro Científico de Administração, Economia e Contabilidade**, v. 1, n. 1, p. 15, 2011.

- CHO, R. J. MINDRINOS, M.; RICHARDS, D. R.; SAPOLSKY, R. J.; ANDERSON, M.; DRENKARD, E.; THEOLOGIS, A. Genome-wide mapping biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Genetics**, v. 23, n.2, p. 203-207, 1999.
- CILEK, J. E.; GREENE, G. L. Stable fly (Diptera: Muscidae) insecticide resistance in Kansas cattle feedlots. **Journal of Economic Entomology**, v. 87, n. 2, p. 275- 279, 1994.
- CROW, J. F. Genetics of resistance to chemicals. **Annual Review of Entomology**, v. 2, n. 1, p. 227-246, 1957.
- DAVIES, T. G.; O'REILLY, A. O.; FIELD, L. M.; WALLACE, B. A.; WILLIAMSON, M. S. Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modelling. **Pest Management Science**, v. 64, n. 11, p. 1126-1130, 2008.
- DOMINGHETTI, T. F. D. S., BARROS, A. T. M. D., SOARES, C. O., CANÇADO, P. H. D. *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) outbreaks: current situation and future outlook with emphasis on Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 4, p. 387-395, 2015.
- DONG, K. E.; SCOTT, J. G. Linkage of *kdr*-resistance and the homologous sodium channel gene in German cockroaches (*Blattella germanica*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 24, n.7, p. 647-654, 1994.
- DOWSON, R. J. An introduction to the principles of neurophysiology. **Pesticide Science**, v. 8, n. 6, p. 651-660, 1977.
- ETO, M. Biochemical mechanisms of insecticidal activities. In: **Controlled Release, Biochemical Effects of Pesticides, Inhibition of Plant Pathogenic Fungi**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 65-107, 1990.
- FFRENCH, C. R. H; DABORN, P. J.; LE, G. G. The genetics and genomics of insecticide resistance. **TRENDS in Genetics**, v. 20, n. 3, p. 163-170, 2004.
- FREITAS, M. O. **Entomologia e Acarologia Médica e Veterinária**, Rabelo e Brasil, 1978.
- GRISI L., MASSARD C. L., MOYA BORJA C. E.; PERREIRA J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. A **Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.
- GRISI, L., LEITE, R. C., MARTINS, J. R., BARROS, A. T., ANDREOTTI, R., CANCADO, P. H., LEON, A. A., PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, n. 2, p.150-6, 2014.
- GUERRERO, F. D.; JAMROZ, R. C.; KAMMLAH, D.; KUNZ, S. E. Toxocological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*:

- Identification of *kdr* and *super-kdr* point mutations. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 8-9, p. 745-755, 1997.
- HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 11, p. 1009-1015, 2000.
- HILLE, B. Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. **Biophysical Journal**, v. 22, n. 2, p. 283-294, 1978.
- IBGE. Pesquisa da pecuária municipal 2016. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>. Acesso em 10/07/2019.
- KASSAB, S.O.; GAONA, J.C.; LOUREIRO, E.S.; MOTA, T. A.; FONSECA, P. R. B., ROSSONI, C. Novos surtos populacionais de mosca-dos-estábulo no Mato Grosso do Sul: medidas de controle e prevenção. **Revista Agrarian**, v. 5, n. 15, p. 84-88, 2012.
- KOLLER, W. W.; CATTO, J. B.; BIANCHIN, I.; SOARES, C. O.; PAIVA, F.; TAVARES, L. E. R.; GRACIOLLI, G. Surtos da mosca-dos-estábulo, *Stomoxys calcitrans*. **Mato Grosso do Sul: novo problema para as cadeias produtivas da carne e sucoalcooleira. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte**, 2009.
- KUNZ, S.E.; KEMP, D.H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 13, n. 4, p. 1249-1986, 1994.
- MACEDO, D. M.; CHAABAN, A.; MOYA-BORJA G. E. Desenvolvimento pós-embrionário de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) criadas em fezes de bovinos tratados com diferentes avermectinas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 45-50, 2005.
- MARON, P. C.; THOMAS, G. D.; SIEGFRIED, B.; CAMPBELL, J. B. Susceptibility of Stable Flies (Diptera: Muscidae) from southeastern Nebraska beef cattle feedlots to selected insecticides and comparison of 3 bioassay techniques. **Journal of Economic Entomology**, v. 90, n. 2, p. 293- 297, 1997.
- MENEZES, C.C.P.; TUCCI, E.C.; DUARTE, F.C. **Grupo técnico incumbido de estudar a razão da proliferação e os prejuízos causados pela mosca-dos-estábulo e propor soluções para esse problema**, 2015. Disponível em: [https://www.agricultura.sp.gov.br/media/13382-relatorio\\_final-pdf-1.pdf](https://www.agricultura.sp.gov.br/media/13382-relatorio_final-pdf-1.pdf). Acesso em: 15/03/2019.
- MIYASAKI, M. K.; OHYAMA, K.; DUNLAP, D. Y.; MATSUMURA, F. Cloning and sequencing of the paratype sodium channel gene from susceptible and *kdr*-resistant



- German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). **Molecular and General Genetics**, v. 252, n. 1-2, p. 61-68, 1996.
- MORAES, A. P. R.; *Stomoxys calcitrans*: estabelecimento de colônias e efeitos de *Metarhizium anisopliae* sobre seus estágios imaturos, 2007. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Seropédica, 2007.
- MOREIRA, M. F.; MANSUR, J. F.; FIGUEIRA-MANSUR, J. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular**, v. 15, p. 1-23, 2012.
- OLAFSON, P. U.; PITZER, J. B.; KAUFMAN, P. E. Identification of a Mutation Associated With Permethrin Resistance in the *Para*-Type Sodium Channel of the Stable Fly (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 1, p. 250-257, 2011.
- OLIVEIRA, J. N. Mosca vira praga e ataca animais. Disponível em: <<http://www.suino.com.br/SanidadeNoticia.aspx?...>>. Acesso em: 02/05/2018.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. The technical basis for coordinated action against insecticide resistance: preserving effectiveness of modern malaria vector control. Geneva, 2011.
- PERRY, T.; BATTERHAM, P.; DABORN, P. J. The biology of insecticidal activity and resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 411-422, 2011.
- PITZER, J. B.; KAUFMAN, P. E.; TENBROECK, S. H.; MARUNIAK J. E. Host blood meal identification by multiplex polymerase chain reaction for dispersal evidence of stable fly (Diptera: Muscidae) between livestock facilities. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 1, p. 53-60, 2014.
- REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. Biologia molecular aplicada à produção animal. **Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**, 2001.
- SABATINI, G.A.; *Haematobia irritans irritans* no Brasil, estudos moleculares sobre a resistência aos piretróides e estudo populacional (RAPD), 2007. **Tese (Relação Patógeno Hospedeiro)**, Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 2007.
- SCOTT, J.A. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. **Florida Entomologist**, v. 78, n. 3, p. 399, 1995.
- SINGER, S.J. The molecular organization of biological membranes. In: **Structure and function of biological membranes**, p. 145-222, 1971.

- SODERLUND, D. M.; KNIPPLE, D. C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 6, p. 563-577, 2003.
- SODERLUND, D. M. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. **Pest Management Science**, v. 64, n. 6, p. 610-616, 2008.
- SPARKS, T. C.; LOCKWOOD, J. A.; BYFORD, R. L.; GRAVES, J. B.; LEONARD, B. R. The role of behavior in insecticide resistance. **Pesticide Science**, v. 26, n. 4, p. 383-399, 1989.
- STONE, B. F.; BROWN, A. W. Mechanisms of resistance to fenthion in *Culex pipiens fatigans* Wied. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 40, n. 3, p. 401, 1969.
- TAYLOR, M. A. Recent developments in ectoparasites. **The Veterinary Journal**, v. 161, n. 3, p. 253-268, 2001.
- TAYLOR, J. L. S. Towards the scientific validation of traditional medicinal plants. **Plant growth regulation**, v. 34, n. 1, p. 23-37, 2012.
- TOMBOLA, F.; PATHAK, M. M.; ISACOFF, E. Y. How does voltage open an ion channel? **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 23-52, 2006.
- UNICADATA. Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol – safra 2017/2018. Disponível: <http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem>. Acesso em: 10/07/2019.
- VAIS, H. M. S.; WILLIAMSON, M. S.; MARTINEZ-TORRES, D.; HICK, C. A.; DEVONSHIRE, A. L. Identification of mutations in the *House fly* para-type sodium channel gene associated with *knockdown resistance (kdr)* to pyrethroid insecticides. **Molecular and General Genetics**, v. 252, n. 1-2, p. 51-60, 1996.
- VALENTINE, W. M. Pyrethrin and Pyrethroid Insecticides. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 20, n. 2, p. 375-382, 1990.
- VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBALA, M.; EGGENB, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, n. 3, p. 275, 2002.
- ZYZAK, M. D.; BYFORD, R. L.; CRAIG, M. E.; LOCKWOOD, J. A. Behavioral responses of the horn fly (Diptera: Muscidae) to selected insecticides in contact and noncontact environments. **Environmental entomology**, v. 25, n. 1, p. 120-129, 1996.
- WILLIAMSON, M. S.; DENHOLM, I.; BELL, C. A.; DEVONSHIRE, A. L. Knockdown resistance (*kdr*) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). **Molecular and General Genetics**, v. 240, n. 1, p. 17-22, 1993.

WILLIAMSON, M.S.; MARTINEZ-TORRES, D.; HICK, C.A.; DEVONSHIRE, A. L. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knock-down resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. **Molecular and General Genetics**, v. 252, n. 1-2, p. 51-60, 1996.

WILLIAMSON, M.S., MARTINEZ-TORRES, D.; DEVEONSHIRE, A. L. Molecular genetic studies of knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroids. **Journal of Pesticide Science**, v. 51, 1997.

DETECÇÃO DA MUTAÇÃO *kdr-his* (*knockdown resistance*), ASSOCIADA À RESISTÊNCIA A PIRETROIDES, EM POPULAÇÕES DA MOSCA-DOS-ESTÁBULOS (*Stomoxys calcitrans*)

DETECTION OF THE *kdr-his* (*knockdown resistance*) MUTATION ASSOCIATED TO RESISTANCE OF PYRETHROIDS IN THE STABLE FLY (*Stomoxys calcitrans*) POPULATIONS

**Resumo:** A mosca-dos-estábulos (*Stomoxys calcitrans*) causa elevado impacto econômico à pecuária. Seu controle baseia-se principalmente no manejo sanitário e utilização de produtos inseticidas, o que tem levado à seleção de indivíduos resistentes. Este estudo objetivou avaliar a ocorrência e frequência do mecanismo *kdr* (*knockdown resistance*) associado à resistência aos piretroides, e prospectar outros polimorfismos que possam estar relacionados à resistência. Avaliou-se 117 indivíduos provenientes das colônias CNPGC-1 (n= 31) e Kerrville-suscetível (n= 20), e das populações de campo de Angélica – MS (n= 26) e Chapadão do Céu - GO (n= 40). Após extração de DNA e amplificação por PCR, foi sequenciado um fragmento do gene do canal de sódio. Após alinhamento e edição foi confirmada em 23 indivíduos a mutação c.103T>A (*kdr-his*), sendo 19 (83%) heterozigotos e quatro (17%) homozigotos. A frequência do alelo *kdr-his* foi de 0,032, 0,308 e 0,300 nas populações da colônia CNPGC-1, Angélica e Chapadão do Sul, respectivamente. Três SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), ainda não descritos, foram prospectados em éxons (c.253G>A; c.265T>A) e íntron (c.158G>T). Os indivíduos foram heterozigotos para a maioria dos SNPs analisados. O presente estudo consiste no primeiro registro de ocorrência do mecanismo *kdr-his* em mosca-dos-estábulos no Brasil.

**Palavras- chave:** canal de sódio, controle químico, mosca, mutação, inseticida.

**Abstract:** Stable fly (*Stomoxys calcitrans*) has a high economic impact on livestock. Its control is based mainly on sanitary management and use of insecticide products, which has led to the selection of resistant individuals. This study aimed to evaluate the occurrence and frequency of the *kdr* (*knockdown resistance*) mechanism associated with pyrethroid resistance, and to prospect other polymorphisms that may be related to resistance. It was evaluated 117 individuals from the colonies samples CNPCG-1 (n=31), Kerrville-susceptible (n=20), field populations from Angelica-MS (n=26) and Chapadão do Céu-GO (n=40). After DNA extraction and PCR amplification, a fragment of the sodium channel gene was sequenced. After alignment and editing, the c.103T> A (*kdr*-his) mutation was confirmed in 23 individuals, being 19 (83%) heterozygous and four (17%) homozygous. The frequency of the *kdr*-his allele was 0.032, 0.308 and 0.300 in the populations of the colony CNPGC-1, Angélica and Chapadão do Sul, respectively. Three SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), not yet described, were prospected in exons (c.253G> A; c.265T> A) and intron (c.158G> T). Subjects were heterozygous for most SNPs analyzed. The present study is the first record of the occurrence of the *kdr*-his mechanism in stable fly in Brazil.

**Keywords:** control measures, ectoparasite, insecticide resistance, livestock, sodium channel.

## INTRODUÇÃO

Comumente conhecida como mosca-dos-estábulo, *Stomoxys calcitrans*, é um dos parasitos mais importantes para a pecuária brasileira. Os prejuízos provocados já foram estimados em US\$335 milhões por ano às criações de bovinos de leite e corte, seja em sistema de confinamento ou extensivo (Taylor et al., 2001; Grisi et al., 2014). Mais recentemente o prejuízo dos surtos foi calculado para um município de São Paulo, SP.

De hábito hematófago e picada dolorida, as infestações por esta mosca causam incômodo aos animais, podendo afetar o ganho de peso e a produção de leite (Campbell et al., 2001). Além disso, a mosca-dos-estábulo pode atuar como vetor mecânico de diversos patógenos (Baldacchino et al., 2013), podendo acometer diferentes hospedeiros, tais como: bovinos, caprinos, equinos, ovinos, caninos e até mesmo o homem (Bittencourt & Borja, 2002; Moya-Borja, 2002; Foil & Gorham, 2004).

Com a expansão da indústria sucroalcooleira, o estado do Mato Grosso do Sul (MS) tem ocupado um lugar de destaque nos cenários nacional e internacional do agronegócio sucroalcooleiro, em virtude do aumento do potencial de expansão e benefícios socioeconômicos do setor (CONAB, 2015). Todavia, a implantação dessas usinas em regiões tradicionalmente pecuárias tem sido associada ao aumento populacional da mosca-dos-estábulo e a ocorrência de surtos, causando graves impactos à atividade pecuária em suas imediações (Koller et al., 2009; Barros et al., 2010; Dominghetti, 2015).

Visando minimizar os efeitos negativos causados pela *S. calcitrans* na cadeia produtiva bovina, medidas de manejo sanitário associadas a um controle químico fundamentado na utilização de inseticidas de diversas classes têm sido implementadas (Kassab et al., 2012), e são de eficiência questionável.

Além disso, o frequente uso desses agentes químicos no controle de vários insetos tem diminuído sua eficácia devido ao aparecimento de indivíduos resistentes (Byford et al., 1999; Soderlund & Knipple, 2003; Pitzer et al., 2010).

Diferentes mecanismos podem causar a redução da sensibilidade do sistema nervoso aos inseticidas, dentre eles verifica-se uma alteração genética na região do gene do canal de sódio, que devido a mutações, torna o sítio alvo insensível à ação dos inseticidas piretroides (Soderlund & Knipple, 2003; Soderlund, 2008).

Liu e Pridgeon (2002) detectaram a mutação *kdr-his*, caracterizada pela troca de um aminoácido leucina por uma histidina na posição 1014 no gene dos canais de sódio (L1014H); segundo Scott et al. (2013), a mutação *kdr-his* confere uma resistência mais baixa que outras

associadas à resistência ao efeito “knock-down”, tais como “*kdr*” e “*super-kdr*”, Na mosca-dos-chifres, Guerreiro et al. (1997) encontraram a mutação *kdr* (L1014F) no segundo domínio do fragmento da transmembrana S6. Olafson et al., (2011), após isolarem essa mesma região no gene dos canais de sódio em populações de moscas-dos-estábulo dos EUA, identificaram a mutação *kdr-his* na posição 1014, onde uma leucina é substituída por uma histidina (L1014H). Soderlund e Knipple (2003) relataram a ocorrência de mutações associadas ao efeito *kdr* no segundo domínio dos canais de sódio em outros insetos.

Diante do exposto, esse estudo teve por objetivo verificar a ocorrência e determinar a frequência da mutação causativa L1014H (*kdr-his*) no gene dos canais de sódio, associada ao mecanismo de resistência *kdr* (*knockdown resistance*), e prospectar outros polimorfismos na região amplificada que também possam estar relacionados à resistência aos piretroides, visando subsidiar as decisões de controle químico da *Stomoxys calcitrans*, em áreas afetadas por surtos no Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado na Embrapa Gado de Corte, tendo sido desenvolvidos os estudos moleculares no Laboratório de Genômica e Melhoramento Animal (GEMA).

Foram analisados um total de 117 indivíduos, provenientes das colônias CNPGC-1 (n= 31) e Kerrville-suscetível (n= 20), e das populações de campo de Angélica (n= 26) e Chapadão do Céu (n= 40).

Moscas da colônia CNPGC-1 foram obtidas a partir de bioensaios *in vitro* conduzidos com o objetivo de avaliar a eficácia de inseticidas piretroides a imaturos da mosca-dos-estábulo nos quais foram adicionados cipermetrina ou deltametrina ao meio de criação larvar. Ao final dos testes, foram coletadas as moscas que emergiram nas maiores concentrações empregadas, respectivamente, 0,9 a 18 mg e 0,09 a 6 mg/50 g de meio e armazenadas em álcool 70% para posterior extração de DNA.

Foram também obtidas amostras de duas populações de campo, coletadas em usinas sucroalcooleiras afetadas por surtos de mosca-dos-estábulo, nos municípios de Angélica (MS) e Chapadão do Céu (GO).

Moscas provenientes da colônia suscetível, mantida pelo Knipping-Bushland US Livestock Insects Research Laboratory (Kerrville, Texas, USA), serviram como controle para as possíveis mutações detectadas.

A extração de DNA de cada indivíduo foi realizada utilizando o protocolo adaptado de Olafson et al. (2011), onde mediante a utilização de 200 µl de tampão (10 mM Tris- HCl, pH

8,0, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl e 400 µg/ ml proteinase K) em cada individuo macerado, seguido da homogeneização e incubação das amostras a 37°C por 60 minutos, 95°C por 3 minutos, centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos, foi possível a obtenção do sobrenadante contendo o DNA que a *posteriori* foi amplificado pela técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

A amplificação de um fragmento contendo 300 pb do gene do canal de sódio foi realizada por PCR, mediante a utilização dos *primers* f-5'-GTGGGCGATGTCTCCTGTAT-3' e r-5'-CTAGATGAACCGAAATTGGAC-3', desenhados a partir da sequência de referência (HQ010283).

As reações de PCR foram feitas com um volume final de 20 µl, utilizando-se 10 ng de DNA molde; tampão 1X; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de cada dNTP; 0,4 µM de primer; 1,0 UI de Taq DNA polimerase. O protocolo utilizado no termociclador para amplificação foi de 95°C/15', seguido por 40 ciclos de 95°C/1' temperatura de desnaturação; 61°C /1' temperatura de anelamento e 72°C/1' temperatura de extensão, com extensão final de 72°C/7'.

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese horizontal em géis de agarose 1%, corados com *Syber Gold* (Invitrogen™). O tamanho do fragmento de 300 pb foi determinado pela comparação com um marcador, padrão de peso molecular de 1 kb plus (Invitrogen™) A imagem de cada gel foi obtida por um sistema digital de foto documentação e do sistema L-Pix (*Loccus Biotechnologies*) para posterior análise.

Após esta primeira amplificação as amostras foram purificadas de acordo com Werle *et al.*, (1994) utilizando as enzimas éxonuclease I (*exoI*) e fosfatase alcalina de camarão (*SAP*). A *exoI* digere o excesso de *primers* da reação enquanto a *SAP* defosforila o excesso de dNTPs. As enzimas foram adicionadas à reação de amplificação na proporção de 1:1 (0,5 UI de cada uma) e incubadas a 37° C por 30 minutos, seguido de 20 minutos a 80° C.

A reação de sequenciamento foi realizada pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxineotídeos marcados com fluorocromos (Schlenk, 1988). Foi utilizado o kit *BigDye® Terminator v3.1* da *Applied Biosystem* seguindo as condições especificadas pelo fabricante. A amplificação foi realizada no termociclador Veriti® *Thermal Cycler* da *Applied Biosystems*, utilizando o seguinte programa: 96° C por 1 minuto, 25 ciclos a 96° C por 10 segundos, 50° C por 5 segundos e 60° C por 4 minutos.

Por fim, foi realizada uma nova etapa de purificação utilizando-se EDTA (125 mM, pH 8,0), etanol 70% e etanol absoluto. As reações foram ressuspensas em 10 µl de formamida e injetadas em um sequenciador automático ABI-3130® (*Applied Biosystems*).



As sequências geradas por eletroforese capilar mediante o uso do sequenciador foram exportadas no formato FASTA e analisadas por meio do programa SeqScape® Software v2.1 (*Applied Biosystems*), onde os eletroferogramas foram alinhados a uma sequência referência do GenBank (HQ010283) e editados.

As frequências alélica e genotípica foram obtidas por contagem direta e checadas mediante a utilização do programa Fstat versão 2.9.3.2, no qual foram avaliados índices de diversidade genética das populações e também se realizou um teste de diferenciação aos pares utilizando o índice de  $F_{ST}$  de Wright. Este teste gera uma matriz de valores de p correspondentes a cada cálculo de  $F_{ST}$  pareado, bem como um nível de significância do valor p ajustado (ao nível de 5%) após uma correção de Bonferroni para comparações múltiplas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Mutação *kdr-his*

Após o alinhamento e edição das 117 sequências obteve-se um fragmento contendo 230pb no qual foi possível confirmar, em 23 indivíduos, a existência da mutação c.103T>A (*kdr-his*), associada à resistência aos piretroides, previamente descrita nos EUA por Olafson et al. (2011). As 20 amostras oriundas das colônias suscetíveis, mantidas pelo Knippling-Bushland US Livestock Insects Research Laboratory (Kerrville, Texas, USA), não apresentaram nenhum polimorfismo no fragmento sequenciado. Como foram utilizadas como controle negativo para as possíveis mutações observadas, as mesmas não foram computadas nos resultados apresentados, evitando assim, vieses que não refletiriam a realidade observada na amostra de interesse.

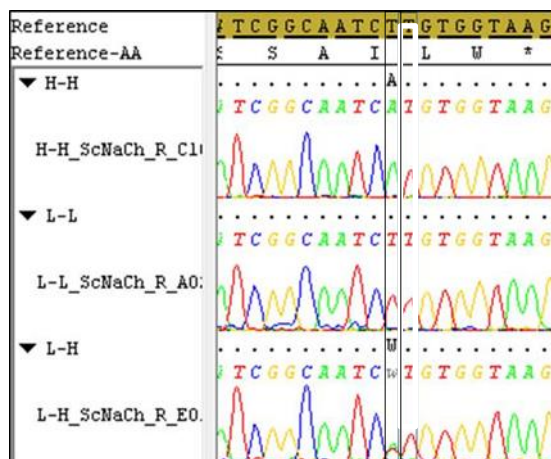
Dos 97 indivíduos avaliados das três populações (colônia CNPGC, Angélica e Chapadão do Céu), foi possível observar a mutação *kdr-his* em 23 indivíduos, sendo 19 (83%) heterozigotos e quatro (17%) homozigotos para o alelo *kdr-his* (Figura 2). A frequência genotípica total observada foi de 0,639 para homozigoto TT, 0,289 para o heterozigoto TA e 0,072 para o homozigoto AA. Na figura 1 podem ser visualizados eletroferogramas para os três genótipos observados para o sitio onde se localiza o alelo *kdr*.

A heterozigosidade total observada foi de 0,283 e a esperada de 0,308, sendo a diversidade gênica para o loco na população da colônia a menor obtida (0,063), enquanto as populações de Angélica e Chapadão do Céu apresentaram uma diversidade gênica de 0,435 e 0,426, respectivamente. As frequências genotípicas para as três populações em análise podem ser visualizadas na Figura 3, onde é possível verificar no grupo avaliado a existência de

moscas homozigotas para o alelo de resistência apenas nas populações silvestres. Estes resultados indicam que existe maior variabilidade deste alelo nas populações de campo, do que na colônia.

Pela matriz aos pares, baseada no índice de diferenciação populacional ( $F_{ST}$ ), foi possível observar ao nível de 5% que as populações de campo e a população da colônia são geneticamente distintas entre si, para o loco avaliado, enquanto que as populações de campo (Angélica e Chapadão do Sul) não se diferenciam estatisticamente.

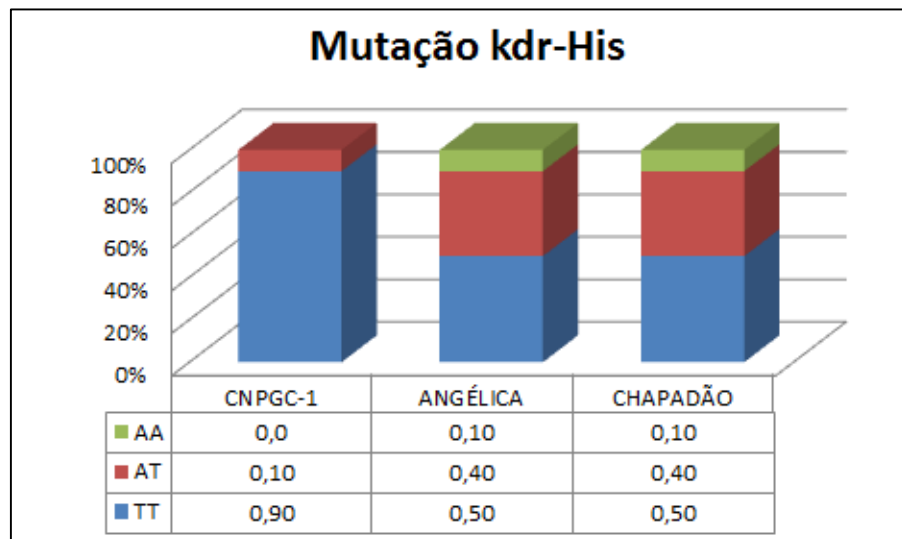
A maior variabilidade e a diferenciação populacional puderam ser confirmadas ao se avaliar as frequências alélicas destes três grupos (Figura 4), onde a frequência do alelo *kdr-his* foi de 0,032, 0,308 e 0,300 para as populações da colônia do CNPGC, para Angélica e Chapadão do Sul, respectivamente.



**Figura 1.** Eletroferograma de amostras de moscas dos estábulos com genótipos HH (homozigotas para o alelo *kdr-his*, mosca resistente, AA), LL (homozigotas com o alelo selvagem, susceptíveis, TT) e LH (heterozigotas, código IUPAC W representando os nucleotídeos T e A na mesma posição) alinhadas à sequência de referência (HQ010283). Histidina foi representada por H e Leucina por L.

Layer 1 ROIs	Copied Reference
Summary	( C A A T c w T G T G G t
NT Variants	.....
Index	101
Reference	( C A A T C T T G T G G T
Reference-AA	A I L W
▶ H-H	..... A .....
▶ L-L	.....
▶ L-H	..... W .....
▶ CNPGC1-30	..... W .....
▶ CNPGC1-24	..... W .....
▶ Angélica - 2	..... W .....
▶ Angélica - 3	..... w .....
▶ C. Do céu - 14	..... W .....
▶ C. Do céu - 16	..... w .....
▶ C. Do céu - 17	..... A .....
▶ C. Do céu - 18	..... w .....
▶ C. Do céu - 19	..... w .....
▶ C. Do céu - 1	..... W .....
▶ C. Do céu - 22	..... W .....
▶ C. Do céu - 23	..... A .....
▶ C. Do céu - 24	..... W .....
▶ C. Do céu - 27	..... w .....
▶ C. Do céu - 31	..... A .....
▶ C. Do céu - 32	..... w .....
▶ C. Do céu - 36	..... w .....
▶ C. Do céu - 38	..... w .....
▶ C. Do céu - 3	..... W .....
▶ C. Do céu - 2	..... W .....
▶ C. Do céu - 6	..... W .....
▶ C. Do céu - 8	..... W .....
▶ C. Do céu - 9	..... A .....

**Figura 2.** Alinhamento das sequências obtidas com a sequência de referência do GenBank - HQ010283. Além do SNP detectado em indivíduos homocigotos resistentes (AA) e heterocigotos, representados pelo código da IUPAC W (AT), nessa posição.



**Figura 3.** Frequência genotípica para a mutação *kdr-his* das amostras oriundas das colônias mantidas na Embrapa e de usinas sucroalcooleiras nos municípios de Angélica-MS e Chapadão do Céu-GO.

É possível observar na figura 4, que entre as populações de campo a frequência genotípica para a mutação *kdr-his* foi relativamente alta, tal fato corrobora os resultados observados por Soderlund e Knipple (2003), que comprovaram através da seleção por bioensaios com diferentes concentrações de inseticidas *in vitro*, que o uso contínuo de inseticidas piretroides tem resultado no aparecimento de resistência nas diferentes populações de insetos.

Além disso, a baixa frequência (Figura 5) do alelo *kdr* nas moscas da colônia CNPGC-1, obtidas em bioensaios de avaliação da ação larvicida de piretroides, sugere que as concentrações empregadas nos bioensaios tenham sido insuficientes para uma efetiva seleção de indivíduos resistentes ou ainda que, caso tenha havido uma efetiva seleção de indivíduos resistentes, outro mecanismo de resistência (que não o *kdr*) possa estar presente na população. Independente do caso, a real frequência de indivíduos *kdr* na colônia CNPGC-1 tende a ser menor que a observada, uma vez que alguma seleção tenha sido imposta pelos bioensaios. A maior frequência dessa mutação em moscas provenientes das usinas tende a ser uma consequência direta da maior pressão de seleção em desenvolvimento nas áreas de ocorrência de surtos devido ao uso intensivo de inseticidas nestes locais.

Resultado semelhante foi obtido a partir de estudos realizados por Sheppard (1995) em populações de mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*), onde a baixa frequência de indivíduos resistentes observada em populações positivas para o bioensaio possibilitou a afirmação de que existe pelo menos um mecanismo de resistência aos piretroides.

A questão relacionada à existência de outros mecanismos de resistência associados aos indivíduos da colônia também foi discutida por Brooke et al. (2008), onde os autores sugerem que a resistência pode ser multigênica e o genótipo *kdr* pode não explicar totalmente a variância fenotípica. Em *Aedes aegypti* Saavedra-Rodriguez et al. (2008) conseguiram atribuir o fenótipo *knockdown* a distintos efeitos genotípicos, encontrando que a variância do fenótipo é dada em 58,6% ao alelo V1016I (que caracteriza o alelo *kdr* nesta espécie) enquanto que 25,5% da variação remanescente é dada por outros seis QTLs. Apenas 23,1% da variância na sobrevivência eventual deveram-se ao alelo V1016I e 13,7% por outros três QTLs adicionais, demonstrando claramente a multiplicidade de genes e regiões envolvidas na resistência aos inseticidas.

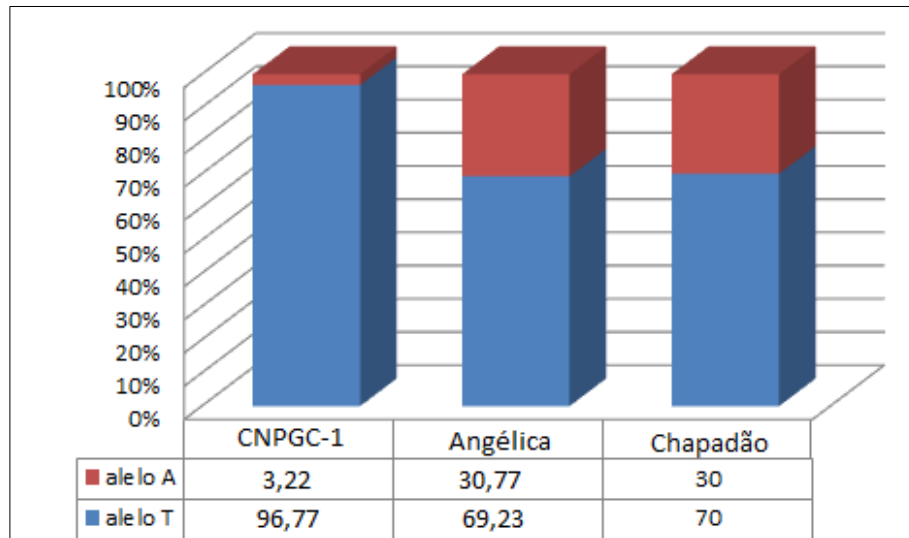
Outra questão que também pode ser levantada a respeito da maior incidência do alelo *kdr* nas populações naturais é destacada na revisão feita por Kliot & Ghanim (2012). Os autores descrevem diferentes exemplos relacionados à menor aptidão biológica (*fitness*) em insetos, de diferentes ordens, resistentes a inseticidas.

Os insetos utilizam diferentes mecanismos para lidar com os inseticidas, podendo ser estes comportamentais (Sparks et al., 1989; Zyzak et al., 1996), fisiológicos (Stone & Brown, 1969; Hemingway, 2000) ou genéticos (Ffrench-Constant et al., 2004). Dentro das alterações consideradas fisiológicas/genéticas pode-se considerar a super expressão de genes constitutivos codificando enzimas de detoxificação (Hemingway, 2000; Kliot & Ghanim, 2013) ou a indução de alterações mutacionais nos sítios alvo do inseticida (Ffrench-Constant et al., 2004). Estas ações possuem um custo elevado ao inseto e podem afetar a reprodução, prejudicar a capacidade de dispersão ou causar vários outros efeitos na aptidão do mesmo (Kliot & Ghanim, 2013).

Em seus estudos, Busvine (1951) relatou que o controle a base de inseticidas piretroides é bastante comum em casos de surtos de mosca-doméstica (*M. domestica*), e foi nessa espécie que houve a identificação da primeira resistência caracterizada pela mutação *kdr*.

Estudos comprovaram que moscas-domésticas apresentam diferenças fisiológicas entre moscas resistentes (com alelo *kdr*) e susceptíveis (alelo selvagem), sendo que as resistentes não apresentam preferência por gradientes de temperatura, enquanto as susceptíveis preferem temperaturas mais elevadas (Foster et al., 2003).

Sabe-se que temperaturas elevadas, associadas à umidade, promovem um encurtamento no ciclo de vida destes insetos. Em *S. calcitrans* foi comprovado que a temperatura impulsiona o desenvolvimento larval e em temperaturas mais altas as moscas se desenvolvem mais rapidamente (Florez-Cuadros, 2017). Caso as moscas-dos-estábulo apresentem o mesmo comportamento das moscas domésticas resistentes (Foster et al., 2003), pode-se aventar uma segunda hipótese a respeito da menor frequência do alelo *kdr-his* encontrado na população do CNPGC-1. O manejo conduzido nas colônias do CNPGC, com coleta de ovos no pico da postura, favorece a sobrevivência das moscas que se desenvolvem mais rapidamente, o que vem ocorrendo há cerca de 100 gerações (Barros, 2019 – informação pessoal); tal procedimento pode ter promovido uma diminuição do alelo mutante, em função de uma seleção a favor do alelo selvagem, conduzida indiretamente. Esse é o primeiro relato da mutação *kdr* em *Stomoxys calcitrans* no Brasil. Além dessa mutação foram observadas mais três novas mutações, posteriormente estudos serão realizados visando especular o valor adaptativo dessas mutações, uma vez que pelo menos um alelo dela existe em mais de 50% dos indivíduos genotipados, isso provavelmente confere algum valor adaptativo a mosca para que ela se mantenha nesse nível de frequência.



**Figura 4.** Frequência alélica para a mutação *kdr-his* das amostras oriundas da colônia CNPGC-1 e das amostras provenientes das usinas sucroalcooleiras dos municípios de Chapadão do Céu-GO e Angélica-MS.

## 2. Prospecção de novos SNPs

Através deste estudo, também foi possível prospectar três novos SNPs (Tabela 2), ainda não descritos na literatura. Duas dessas mutações estão localizadas em éxons, sendo uma silenciosa (c.253G>A) e a outra não (c.265T>A); enquanto o outro SNP (nc.158G>T) foi encontrado na maioria dos indivíduos e está localizados em uma região intrônica.

O SNP mais frequente em todas as populações foi o SNP localizado no íntron (nc.158G>T), sendo sua frequência alélica média observada de 0,258, variando de 0,188 em Chapadão do Céu e 0,323 na colônia CNPGC1, sendo a maior parte dos indivíduos, que continham a mutação, eram heterozigotos (Figura 5).

O SNP com alteração do aminoácido (c.265T>A), cuja mutação promove a alteração de uma asparagina (AAT) por uma leucina (AAA), foi observado apenas em um indivíduo da colônia CNPGC1 e em heterozigose, enquanto que o SNP silencioso (c.253G>A; TTG ou TTA, codificando uma leucina) ocorreu apenas na população a campo (dois indivíduos heterozigotos, um em cada localização).

O éxon é uma região codificadora do gene, o qual codifica o segmento de uma proteína maior, que possui múltiplos domínios, enquanto, em princípio, o íntron é uma região não codificadora que interrompe a região codificante do transcrito, sendo comumente utilizado para caracterização de indivíduos (Cox et al., 2012).

Entretanto, estudos tem comprovado que regiões intrônicas não devem ser consideradas não codificantes e sem função. Estas podem conter elementos funcionais (Coulombe-

Huntington & Majewski, 2007), como micro-RNAs que atuam na expressão gênica, além de poder contribuir na diversidade proteômica, facilitando o *splicing* alternativo (Stetefeld et al., 2005). Em recente revisão (Shaul, 2017) caracterizou a habilidade dos íntrons de elevarem a expressão gênica em diferentes espécies, incluindo insetos. Segundo levantado pelo autor, este aumento pode ocorrer, pois os íntrons podem afetar a taxa de transcrição, o transporte do mRNA para o núcleo e a estabilidade de transcrição, bem como podem aumentar a eficiência da tradução do mRNA.

O gene do canal de sódio é altamente conservado entre espécies, especialmente em relação à estrutura éxon – íntron (embora o comprimento do íntron não seja, Davies et al., 2007). A organização geral das proteínas do canal de sódio é conservada entre os invertebrados e vertebrados e consiste em quatro domínios homólogos (I – IV), cada um contendo seis segmentos transmembranares (S1 – S6) (Tan et al., 2002).

A primeira sequência obtida no processo de transcrição é o pré-RNA mensageiro, produzido a partir da leitura do DNA. O pré-mRNA é produzido no núcleo celular e mantém a mesma estrutura íntron-éxon do DNA. Os íntrons são removidos ainda no núcleo para a formação do RNA mensageiro o qual é transportado para o citoplasma onde ocorre a tradução (produção da proteína). Modificações pós transcricionais da sequência do pré-mRNA pode significar que a sequência proteica traduzida não é necessariamente a prevista a partir da leitura do DNA codificante (Donnelly et al., 2007). Segundo estes autores diferentes artigos já demonstraram a existência de evidências de modificação no precursor do mRNA (pré-mRNA) dos canais de sódio em diferentes insetos.

Em uma revisão bibliográfica realizada por Dong (2007) é possível verificar a existência de mecanismos de *splicing* alternativo e edição de RNA pós-transcricional pelos quais os insetos geram uma notável gama de variações estruturais e funcionais nos canais de sódio a partir de um único gene.

Tan et al. (2002) afirmaram que o *splicing* alternativo é o maior mecanismo nos quais uma diversidade de animais aumenta a diversidade funcional dos canais de sódio e potássio, sendo que em *Drosophila* sp. já foram descritos distintos *splicing* alternativos e distintos mecanismos de regulação dos mesmos. Estes autores descrevem três éxons alternativos na região IIS3-4 do gene dos canais de sódio da barata-germânica (*Blattella Germanica*), sendo que dois destes apresentavam diferenças sensíveis em relação à sensibilidade à deltametrina. A hipótese aventada neste estudo é que a mutação intrônica observada (nc.158G>T), pode estar relacionada com *splicing* alternativos associados à resistência, tendo em vista sua alta frequência tanto nas moscas da colônia como nas moscas coletadas a campo, não sendo,

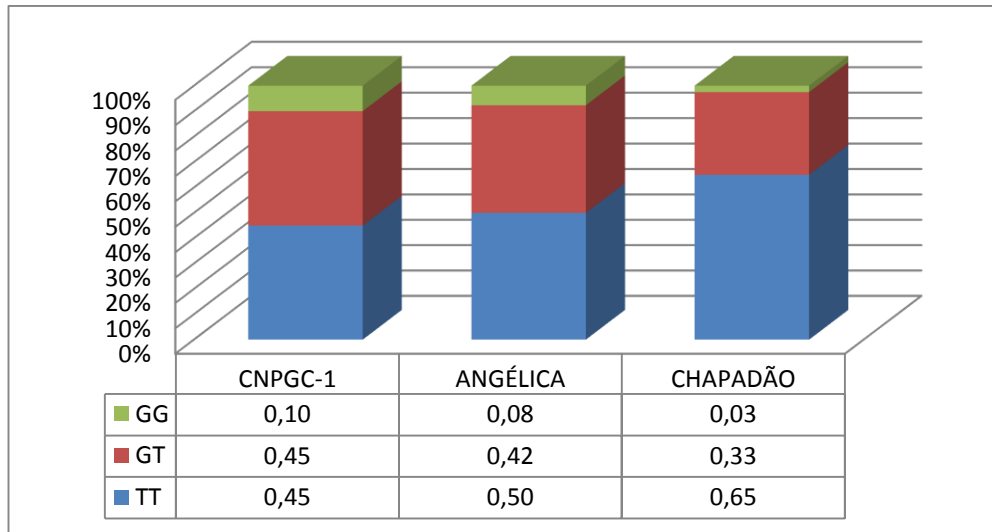
portanto, uma mutação ocasional que por não ser utilizada, facilmente seria descartada no processo seletivo natural. Na tabela 2 é possível observar que esta mutação não está em desequilíbrio de ligação com a mutação *kdr*, uma vez que a mesma ocorre independente do alelo observado (T ou A) na posição 15225 do gene dos canais de sódio da mosca-dos-estábulo.

Da mesma forma, de acordo com Kimchi-Sarfaty et al. (2007) os SNPs silenciosos podem afetar o dobramento das proteínas *in vivo* e conseqüentemente afetar sua função. Ainda não existem trabalhos relacionados à expressão gênica na mosca-dos-estábulo, entretanto, estudos realizados por Salgado et al. (1983); Rashatwar & Matsumura (1985) e Matsumura et al. (1995), visando especular a susceptibilidade em outras classes de insetos como barata-germânica (*Blattella Germanica*), mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*) e mosca-doméstica, detectaram mutações localizadas em íntrons ao invés de éxons e essas mutações foram correlacionadas com a expressão gênica e a resistência *kdr*.

**Tabela 1.** Frequência alélica encontrada nos SNPs prospectados no fragmento sequenciado de 230pb para as três populações estudadas e a frequência alélica média do conjunto amostral avaliado.

	SNP	n amostral	Frequência alélica	
			Alelo selvagem	Alelo mutante
Colônia CNPGCI	nc.158G>T	31	0,677	0,323
	c.253G>A		1,000	0,000
	c.265T>A		0,984	0,016
Angélica	nc.158G>T	26	0,712	0,288
	c.253G>A		0,981	0,019
	c.265T>A		1,000	0,000
Chapadão do Céu	nc.158G>T	40	0,813	0,188
	c.253G>A		0,988	0,013
	c.265T>A		1,000	0,000
Total	nc.158G>T	97	0,742	0,258
	c.253G>A		0,990	0,010
	c.265T>A		0,995	0,005





**Figura 5.** Frequência genotípica da mutação encontrada no íntron das amostras oriundas da colônia CNPGC-1 e das amostras provenientes das usinas sucroalcooleiras dos municípios de Chapadão do Céu-GO e Angélica-MS.

**Tabela 2** - Sumário das mutações observadas em uma sequência de 230 pb do gene dos canais de sódio contendo o sítio mutacional do alelo *kdr-his* (c,103T>A), suas localizações em relação a sequência codificante, posição do SNP observado na sequência referência HQ010283, do aminoácido em relação a mutação L1014H, o tipo de mutação e os genótipos obtidos em relação a original, em cada população e no total.

	SNPs OBSERVADOS				N	
	c.103 T>A	nc.158 G>T	c.253 G>A	c.265 T>A		
<b>Localização no gene</b>	Éxon	Íntron	Éxon	Éxon		
<b>Posição do SNP no gene</b>	g.15225T>A	g.15280G>T	g.15375G>A	g.15387T>A		
<b>Posição do aminoácido</b>	L1014H	não tem	L1023L	N1027L		
<b>Tipo de mutação</b>	Missense		Silenciosa	Missense		
Colônia CNPGC	Genótipos				12	
		TA			2	
			GG			3
			GT			13
			GT		TA	1
Total					31	
Angelica – MS	Genótipos				6	
		TA				4
		AA				3
			GG			2
			GT			5
		TA	GT			5
		TA	GT	GA		1
Total					26	
Chapadão do Céu – GO	Genótipos				14	
		TA				8
		AA				4
			GG			1
			GT			4
			GT	GA		1
		TA	GT			8
Total					40	
Todas as populações	Genótipos				32	
		TA				14
		AA				7
			GG			6
			GT			22
			GT	GA		1
			GT		TA	1
		TA	GT	GA		1
		TA	GT			13
Total					97	

## CONCLUSÃO

O presente trabalho revela a existência do alelo *kdr-his*, associado à resistência a inseticidas piretroides, em populações da mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) de dois municípios de Mato Grosso do Sul. Paralelamente, outros três SNPs, com funções ainda não conhecidas, foram prospectados na mesma região do gene dos canais de sódio, que podem estar envolvidos na expressão fenotípica desta característica.

## REFERÊNCIAS

- BARROS, A. T. M.; KOLLER, W. W.; CATTO, J. B.; SOARES, C. O. Surtos por *Stomoxys calcitrans* em gado de corte no Mato Grosso do Sul. *Revista Brazilian Journal of Veterinary Research*, 30(11): 945-952, 2010.
- BITTENCOURT, A. J.; BORJA, G. E. M. *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae): preferência por locais do corpo de bovinos para alimentação. *Revista Brasileira de Zootecias*, Juiz de Fora, v. 4, n. 1, p. 75-83, 2002.
- BREATHNACH, R.; CHAMBON, P. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annual review of biochemistry*, v. 50, n. 1, p. 349-383, 1981.
- BROOKE, B. D. Kdr: can a single mutation produce an entire insecticide resistance phenotype?. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, n. 6, p. 524-525, 2008.
- BUSVINE, J. R. Mechanism of resistance to insecticide in house flies. *Nature*, p. 193-5, 1951.
- BYFORD, R. L.; CRAIG, M. E.; DEROUEN, S. M.; KIMBALL, M. D.; MORRISON, D. G.; WYATT, W. E.; FOIL, L. D. Influence of permethrin, diazinon and ivermectin treatments on insecticide resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 1, p. 125-135, 1999.
- CAMPBELL, J. B.; SKODA, S. R.; BERKEBILE, D. R.; BOXLER, D. J.; THOMAS, G. D.; ADAMS, D. C.; DAVIS, R. Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gains of grazing yearling cattle. *Journal of Economic Entomology*, v. 94, n. 3, p. 780-783, 2001.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO: CONAB 2011.
- COULOMBE-HUNTINGTON, J.; MAJEWSKI, J. Characterization of intron loss events in mammals. *Genome research*, v. 17, n. 1, p. 23-32, 2007.
- COX, M. M. *Biologia Molecular: Princípios e Técnicas*. Ames: ISBN Press. p. 549 - 555, 2012.
- DAVIES, T. G. E.; FIELD, L. M.; USHERWOOD, P. N. R.; WILLIAMSON, M. S. A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect molecular biology*, v. 16, n. 3, p. 361-375, 2007.
- FOIL, L. D.; GORHAM, J. R. Mechanical transmission of disease agents by arthropods. In: *Medical entomology*. Springer, Dordrecht, p. 461-514, 2004.

- FLOREZ-CUADROS, M. Effects of temperature and diet in stable fly (Diptera: Muscidae) development. 2017. *Dissertations and Student Research in Entomology*. v. 48, p. 111. (<http://digitalcommons.unl.edu/entomologydiss/48>)
- GRISI, L., LEITE, R. C., MARTINS, J. R., BARROS, A. T., ANDREOTTI, R., CANCADO, P. H., LEON, A. A., PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, n. 2, p.150-6, 2014.
- GUERRERO, F. D.; JAMROZ, R. C.; KAMMLAH, D.; KUNZ, S. E. Toxocological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: Identification of *kdr* and *super-kdr* point mutations. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 8-9, p. 745-755, 1997.
- KASSAB, S.O.; GAONA, J.C.; LOUREIRO, E.S.; MOTA, T. A.; FONSECA, P. R. B., ROSSONI, C. Novos surtos populacionais de mosca-dos-estábulo no Mato Grosso do Sul: medidas de controle e prevenção. **Revista Agrarian**, v. 5, n. 15, p. 84-88, 2012.
- KOLLER, W. W.; CATTO, J. B.; BIANCHIN, I.; SOARES, C. O.; PAIVA, F.; TAVARES, L. E. R.; GRACIOLLI, G. Surto da mosca-dos-estábulo, *Stomoxys calcitrans*. **Mato Grosso do Sul: novo problema para as cadeias produtivas da carne e sucroalcooleira**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2009.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-4**. Artmed Editora, 2004.
- LIU, N.; PRIDGEON, J.W. Metabolic detoxication and the *kdr* mutation in pyrethroid resistant house flies, *Musca domestica* (L.). **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 73, n. 3, p. 157-163, 2002.
- MATSUMURA, F.; MIZUTANI, A.; KAKU, K.; MIYAZAKI, M.; INAGAKI, S.; DUNLAP, D. Y. Molecular biological investigations of the properties of sodium channels of *Blattella germanica*. In: Marshall Clark J (ed) Molecular actions of insecticides on ion channels. **American Chemical Society**, Washington, DC, p. 109 - 127, 1995.
- MIYASAKI, M. K.; OHYAMA, K.; DUNLAP, D. Y.; MATSUMURA, F. Cloning and sequencing of the paratype sodium channel gene from susceptible and *kdr*-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). **Molecular and General Genetics**, v. 252, n. 1-2, p. 61-68, 1996.
- OLAFSON, P. U.; PITZER, J. B.; KAUFMAN, P. E. Identification of a Mutation Associated With Permethrin Resistance in the *Para*-Type Sodium Channel of the Stable Fly (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 1, p. 250-257, 2011.

- PITZER, J. B.; KAUFMAN, P. E.; TENBROECK, S. H.; MARUNIAK J. E. Host blood meal identification by multiplex polymerase chain reaction for dispersal evidence of stable fly (Diptera: Muscidae) between livestock facilities. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 1, p. 53-60, 2014.
- RASHATWAR, S.; MATSUMURA, F. Reduced calcium sensitivity of the sodium channel and the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange system in the *kdr*-type, DDT and pyrethroid-resistant German cockroach *Blattella germanica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 81, n. 1, p. 97-103, 1985.
- RODRIGUEZ, A.; GRIFFITHS-JONES, S.; ASHURST, J. L.; BRADLEY, A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. **Genome research**, v. 14, n. 10a, p. 1902-1910, 2004.
- SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K.; STRODE, C.; SUAREZ, A. F.; SALAS, I. F.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J.; BLACK, W. C. Quantitative trait loci mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. **Genetics**, v. 180, n. 2, p. 1137-1152, 2008.
- SALGADO, V. L.; IRVING, S. N.; MILLER, T. A. Depolarization of motor nerve terminals by pyrethroids in susceptible and *kdr*-resistant house flies. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 20, n. 1, p. 100-114, 1983.
- SHAUL, O. How introns enhance gene expression. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 91, p. 145-155, 2017.
- SCHLENK, F. Early nucleic acid chemistry. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 67-69, 1988.
- SAWICKI, R.M. Unusual response of DDT-resistant house-flies to carbinol analogues of DDT. **Nature**, v. 275, n. 5679, p. 443, 1978.
- SCOTT, J. A.; PLAPP JR, F. W.; BAY, D. E. Pyrethroid resistance associated with decreased biotic fitness in horn flies (Diptera: Muscidae). **Southwestern Entomologist**, 1997.
- SCOTT, J. G.; LEICHTER, C. A.; RINKEVICH, F. D.; HARRIS, S. A.; SU, C.; ABEREGG, L. C. Insecticide resistance in house flies from the United States: resistance levels and frequency of pyrethroid resistance alleles. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 3, p. 377-384, 2013.
- SODERLUND, D. M. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 64, n. 6, p. 610-616, 2008.
- SPARKS, T. C.; LOCKWOOD, J. A.; BYFORD, R. L.; GRAVES, J. B.; LEONARD, B. R. The role of behavior in insecticide resistance. **Pesticide Science**, v. 26, n. 4, p. 383-399, 1989.

- STETEFELD, Jörg; RUEGG, Markus A. Structural and functional diversity generated by alternative mRNA splicing. **Trends in biochemical sciences**, v. 30, n. 9, p. 515-521, 2005.
- TAN, J.; LIU, Z.; NOMURA, Y.; GOLDIN, A. L.; DONG, K. Alternative splicing of an insect sodium channel gene generates pharmacologically distinct sodium channels. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 13, p. 5300-5309, 2002.
- TAYLOR, M. A. Recent developments in ectoparasites. **The Veterinary Journal**, v. 161, n. 3, p. 253-268, 2001.
- ZYZAK, M. D.; BYFORD, R. L.; CRAIG, M. E.; LOCKWOOD, J. A. Behavioral responses of the horn fly (Diptera: Muscidae) to selected insecticides in contact and noncontact environments. **Environmental entomology**, v. 25, n. 1, p. 120-129, 1996.
- WERLE, E.; SCHNEIDER, C.; RENNER, M.; VÖLKER, M.; FIEHN, W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 20, p. 4354, 1994.