



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



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

**PROSPECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE CITOCROMO P450
CYP12A2 RELACIONADAS À RESISTÊNCIA AOS
INSETICIDAS PIRETROIDES EM MOSCA-DOS-ESTÁBULOS**

Samuel Francisco

**CAMPO GRANDE, MS
2024**



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



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

**PROSPECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE CITOCROMO P450
CYP12A2 RELACIONADAS À RESISTÊNCIA AOS
INSETICIDAS PIRETROIDES EM MOSCA-DOS-ESTÁBULOS**

Samuel Francisco

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Alves do Egito

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



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Certificado de aprovação

SAMUEL FRANCISCO

**PROSPECÇÕES DE MUTAÇÕES NO GENE CITOCROMO P450 CYP12A2 EM MOSCA-DOS-
ESTÁBULOS RELACIONADAS A RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS PIRETROIDES**
**DNA MUTATIONS PROSPECTION RELATED TO PYRETHROID INSECTICIDES RESISTANCE IN THE
STABLE FLY CYTOCHROME P450 CYP12A2 GENE**

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

Aprovado em: 30-08-2024

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Andréa Alves do Egito
(EMBRAPA) – Presidente

Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos
(UFMS)

Dra. Paula Adas Pereira Suniga
(EMBRAPA)

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Paula Adas Pereira Suniga, Usuário Externo**, em 03/09/2024, às 15:04, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Alberto do Nascimento Ramos, Professor do Magisterio Superior**, em 03/09/2024, às 15:30, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Alves do Egito, Usuário Externo**, em 05/09/2024, às 10:03, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5079903** e o código CRC **F33D2725**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



*“Direi isto suspirando
Em algum lugar, daqui a muito e muito tempo:
Duas estradas bifurcavam numa árvore,
Eu trilhei a menos percorrida,
E isto fez toda a diferença.”*

(Robert Frost)



AGRADECIMENTOS

Sobretudo a Deus é meu guia espiritual por me iluminar nessa caminhada com perseverança e por me conceder saúde para empreender no mestrado.

À minha mãe ANA FERREIRA DA COSTA pelo apoio e compreensão pelos momentos ausentes para a realização deste trabalho. E para meu pai PEDRO FRANCISCO NETO (*in memoriam*) por ter me ensinado a nunca desistir.

Aos meus irmãos, pela compreensão, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. À orientadora Dra. ANDRÉA ALVES DO EGITO pelo exemplo, que me possibilitou o crescimento profissional e pessoal e por ter me aceito como aluno, obrigado por tudo.

À Embrapa Gado de Corte, pela infraestrutura laboratorial do Laboratório de Genômica e Melhoramento Animal (GEMA) e do Laboratório Multiusuário para Biossegurança para a Pecuária (BIOPEC), bem como pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho e por disponibilizar veículos para nos conduzir diariamente.

Agradeço Laboratório de Parasitologia Veterinária Aplicada (PAVAP) por ter conduzido os bioensaios, ao Dr. PAULO CANÇADO, Dr. ANTONIO THADEU BARROS, ao JOÃO, aos técnicos CATARINO, ISAURA e à colega MARIA EDUARDA.

As colegas do GEMA, KELRY CAMYLLY, JULIA, FERNANDA e LARA, obrigado por tudo meninas.

Agradeço ao setor de transporte da Embrapa Gado de Corte, aos motoristas Gilson Picinin, Marcos Amaral, Ademilson e toda galera da famosa VANZINHA da linha sul.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e aos seus professores pelo conhecimento adquirido durante o curso.



RESUMO

FRANCISCO, S. Prospecção de mutações no gene citocromo P450 CYP12A2 relacionadas à resistência aos inseticidas piretroides em mosca-dos-estábulo. 2024.
Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2024.

A mosca-dos-estábulo é um parasito hematófago que causa grandes prejuízos às cadeias produtivas sucroenergética e pecuária. Sabe-se que a resistência a pesticidas em insetos é um fenômeno evolutivo e existem diferentes tipos de mecanismos genéticos que podem causar uma redução da sensibilidade aos inseticidas, devido a alterações no código genético (mutações) que podem afetar o sítio-alvo dos inseticidas e/ou o seu metabolismo. O estudo objetivou prospectar mutações no gene citocromo P450 CYP12A2 que possam estar relacionadas à resistência aos inseticidas, visando contribuir para o manejo efetivo e controle desta praga. No total foram genotipadas 157 moscas, sendo estas distribuídas em dois experimentos independentes. Os primers utilizados em ambos os experimentos foram desenhados a partir da sequência referência NW_013173580. No primeiro estudo utilizou-se a metodologia de Sanger para avaliar a existência de mutações na região delimitada pelos três primeiros éxons do gene. O DNA de moscas resistentes (16) e susceptíveis (20), obtidas a partir de bioensaio, bem como o DNA de amostras controle oriundas da colônia permanente do CNPQC (6) e amostras susceptíveis oriundas da colônia de Kerville – USA (3) foram extraídos, amplificados, sequenciados e genotipados individualmente. Foram observadas três mutações na região avaliada, sendo um SNP no segundo éxon (g.330343T>G), uma inserção de uma timina em um mononucleotídeo composto por oito timinas (g.330531-330532insT) no primeiro íntron e um SNP no 1º éxon (g.330702G>C). Não houve diferença significativa entre as populações genotipadas ($p < 0,05\%$) não sendo possível associar as mutações observadas ao fenótipo avaliado. No segundo experimento avaliou-se se a ausência do quarto éxon no transcrito da variante X2 da espécie também existia ao nível de DNA. Foram genotipadas 157 moscas distribuídas em populações naturais oriundas do estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul, bem como, as amostras utilizadas no primeiro estudo. Utilizou-se PCR-específico para amplificar as regiões em estudo e não houve diferença entre os genótipos amplificados, demonstrando que todos os espécimes avaliados possuíam os éxons 4 e 5. Esta análise demonstrou que a diferença entre as variantes deve ser oriunda provavelmente de *splicing* alternativo do RNA, não havendo diferença ao nível do DNA.

Palavras- Chaves: SNP, *Stomoxys calcitrans*, resistência genética



ABSTRACT

FRANCISCO, S. DNA mutations prospection related to pyrethroid insecticides resistance in the stable fly cytochrome P450 CYP12A2 gene. 2024. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2024.

The stable fly is a hematophagous parasite that causes great damage to the sugarcane and livestock production chains. It is known that pesticide resistance in insects is an evolutionary phenomenon and there are different types of genetic mechanisms that can cause a reduction in sensitivity to insecticides, due to changes in the genetic code (mutations) that can affect the target site of insecticides and/or their metabolism. The study aims to prospect mutations in the cytochrome P450 CYP12A2 gene that may be related to insecticide resistance in order to contribute to the effective management and control of this pest. A total of 157 flies were genotyped and distributed in two independent experiments. The primers used in both experiments were designed from the reference sequence NW_013173580. In the first study, the Sanger methodology was used to evaluate the existence of mutations in the region delimited by the first three exons of the gene. The DNA of resistant (16) and susceptible (20) flies obtained by bioassay, as well as the DNA of control samples from the permanent colony of CNPGC (6) and susceptible samples from the colony of Kerville – USA (3) were extracted, amplified, sequenced and genotyped individually. Three mutations were observed in the evaluated region, being a SNP in the second exon (g.330343T>G), an insertion of a thymine in a mononucleotide composed of eight thymines (g.330531-330532insT) in the first intron and a SNP in the 1st exon (g.330702G>C). There was no significant difference between the genotyped populations ($p < 0.05\%$), and it was not possible to associate the observed mutations with the evaluated phenotype. In the second experiment, it was evaluated whether the absence of the fourth exon in the transcript of the X2 variant of the species also existed at the DNA level. A total of 157 flies distributed in natural populations from the states of São Paulo and Mato Grosso do Sul, as well as the samples used in the first study, were genotyped. Specific PCR was used to amplify the regions under study and there was no difference between the amplified genotypes, demonstrating that all specimens evaluated had exons 4 and 5. This analysis demonstrated that the difference between the variants must probably originate from alternative splicing, with no difference at the DNA level.

Keywords: SNP, *Stomoxys calcitrans*, genetic resistance



LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPITULO 1 Revisão Bibliográfica

Figura 1.	Características morfológicas da mosca-dos-estábulo (<i>Stomoxys calcitrans</i>).....	13
Figura 2.	Ciclo biológico da mosca-dos-estábulo (<i>Stomoxys calcitrans</i>).....	14
Figura 3.	Figura gráfica do gene citocromo P450 <i>CYP12A2-like</i> obtida do NCBI, mostrando as variantes X1 e X2 e a localização dos éxons e íntrons deste gene.....	18

CAPITULO 2 Prospecção de mutações de DNA no gene citocromo P450 *CYP12A2*, em mosca-dos-estábulo, relacionadas à resistência aos inseticidas piretroides

Figura 1.	Padrão de amplificação dos <i>primers</i> SC_CYP12A2_P1 (a) e SC_CYP12A2_P2 (b). As setas indicam o tamanho aproximado dos amplicons de acordo com o ladder de 1kb plus da Invitrogen (L). Os números sequenciais são as amostras amplificadas.....	31
Figura 2.	Exemplo da qualidade das amostras e <i>layout</i> , demonstrando a região sequenciada pelos <i>primers</i> F e R, ao redor de 700bp em relação a sequência referência. A região marcada na representação do local dos sequenciado indica a região do eletroferograma. A seta indica o SNP1.....	32
Figura 3.	Eletroferograma mostrando o SNP g.330343T>G. Pode-se observar amostras homozigotas para os dois alelos e heterozigotas.....	33
Figura 4.	Mutações observadas nos fragmentos sequenciados das amostras de <i>S. calcitrans</i> susceptíveis e resistentes obtidas nos bioensaios realizados neste estudo. (a) inserção de uma T no mononucleotídeo composto por 8 repetições e (b) a substituição de uma G por uma C. Nas figuras a e b é possível visualizar amostras homozigotas e heterozigotas.....	33
Figura 5.	Representação gráfica do SNP do 2º éxon e a possível alteração do aminoácido predito devido à alteração do códon CAA para CAC.....	34

Figura 6.	Árvore filogenética baseada nas sequências obtidas com todas as amostras avaliadas neste estudo.....	38
Figura 7.	Padrão do PCR multiplex com os <i>primers</i> CYP12A2E4 (600pb) e CYP12A2E5 (1kb) demonstrando a amplificação dos dois fragmentos que identificam a presença dos dois éxons. Na primeira linha o padrão de peso molecular usado de 1kb. Nas setas os amplicons.....	39



LISTA DE TABELAS

CAPITULO 2

PROSPECÇÃO DE MUTAÇÕES DE DNA NO GENE CITOCROMO P450 *CYP12A2*, EM MOSCA-DOS-ESTÁBULOS, RELACIONADAS A RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS PIRETROIDES

Tabela 1.	Descrição das populações avaliadas no experimento 2 para amplificação dos dois últimos éxons do gene citocromo P450 <i>CYP12A2</i>	28
Tabela 2.	<i>Primers</i> utilizados para amplificação dos éxons do gene <i>CYP12A2</i>	29
Tabela 3.	Frequência alélica das mutações observadas nas distintas populações avaliadas no experimento 1.....	35
Tabela 4.	Genótipos observados nas amostras estudadas.....	37
Tabela 5.	Matriz de estimativa de divergência genética aos pares, pelo modelo de Kimura 2-parametros entre os três grupos avaliados...	39



SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
	2.1 Introdução.....	11
	2.2 Características morfológicas.....	12
	2.3 Ciclo biológico.....	14
	2.4 Resistência aos inseticidas piretroides.....	15
	2.5 Citocromos P450.....	16
	2.6. Referências Bibliográficas.....	19
3.	Artigo: PROSPECÇÃO DE MUTAÇÕES DE DNA NO GENE CITOCROMO P450 <i>CYP12A2</i> , EM MOSCA-DOS-ESTÁBULOS, RELACIONADAS A RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS PIRETROIDES.....	25
	3.1 Introdução.....	25
	3.2 Material e Métodos.....	26
	3.3 Resultados e Discussão.....	31
	3.4 Conclusões.....	40
	3.5 Referências Bibliográficas.....	41
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43

1.INTRODUÇÃO

Stomoxys calcitrans (L.) (Díptera: Muscidae), conhecida popularmente como mosca-dos-estábulo é um parasito hematófago que causa grandes prejuízos às cadeias produtivas sucroenergética e pecuária (BARROS *et al.*, 2019).

O aumento das áreas de plantio canavieiro e seus subprodutos, como a palhada e o uso da vinhaça para fertiirrigação, tem propiciado um habitat ideal para a propagação desta praga (SLADECEK *et al.*, 2017; DOUD *et al.* 2012).

Estudos relatam que o excesso de chuva e altas temperaturas também levam ao aumento da população destes parasitos, pois essas condições favorecem o seu ciclo evolutivo (TAYLOR *et al.* 2012; COOK *et al.*, 2018). Em bovinos as picadas doloridas e incômodas, levam ao estresse e afetam a produtividade de rebanhos localizados próximos a estes ambientes.

Assim sendo, surtos da mosca-dos-estábulo, têm sido um problema grave nos últimos anos, nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do país (BARROS *et al.*, 2010). Para controlar e amenizar os prejuízos causados pela mosca, a indústria sucroenergética tem investido no controle químico, principalmente pelo uso de inseticidas e/ou larvicidas, associado a técnicas de manejo dos resíduos orgânicos (DOMINGUETTI *et al.*, 2015).

Apesar de estratégias baseadas no uso de inseticidas serem as mais antigas e ainda as mais utilizadas, a escassez de informações sobre os efeitos dos inseticidas em *S. calcitrans* e a resistência aos inseticidas comerciais comprometem o controle dessa praga nas propriedades pecuárias e usinas sucroenergéticas (BARROS *et al.*, 2019).

Grisi *et al.*, (2014) estimaram que os prejuízos econômicos causados por esta praga na bovinocultura brasileira chegam a US\$ 335 milhões dólares por ano. Domingueti *et al.* (2015) citaram que, de acordo com a BioSul - Associação dos Produtores de Bioenergia do Mato Grosso do Sul (2014), cerca de US\$32.000 milhões dólares de toneladas de cana-de-açúcar colhidas são investidos anualmente para o controle da praga nos municípios onde já ocorreram surtos, representando um custo de US\$ 30 a 160 mil dólares por usina de cana-de-açúcar.

Somado a isto, sabe-se que a resistência a pesticidas em insetos é um fenômeno evolutivo e existem diferentes tipos de mecanismos genéticos que podem causar uma redução da sensibilidade aos inseticidas (SCOTT, 1995). A resistência é um fenômeno genético onde alterações no código genético (mutações) podem afetar as proteínas alvos dos inseticidas e/ou o seu metabolismo (LI *et al.*, 2007). Os indivíduos com mutações

vantajosas, relacionadas à resistência, possuem maior probabilidade de sobreviver ao inseticida, contribuindo com uma prole maior do que os outros.

Os trabalhos desenvolvidos por Barros *et al.* (2019) e Oliveira (2019) demonstram que, no Brasil, a mosca-dos-estábulo já possui resistência aos inseticidas piretroides e confirmam a presença da mutação *kdr*, que confere uma alteração no sítio alvo do pesticida. A maior preocupação, no entanto, é que os dados gerados sugerem que outros mecanismos genéticos, causados por diferentes mutações, podem estar envolvidos na resistência desta praga aos inseticidas piretroides.

Assim sendo, existe a necessidade de serem realizados estudos em outros genes de *S. calcitrans*, considerados candidatos a partir de estudos realizados em outras espécies correlatas. Neste trabalho objetivou-se prospectar mutações no gene *CYP12A2* da família do citocromo P450, conhecida por causar resistência aos inseticidas em outras espécies (HEMINGWAY, 2000) visando contribuir para o manejo efetivo e controle desta praga.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 INTRODUÇÃO

A partir da expansão da indústria sucroenergética no estado do Mato Grosso do Sul, várias usinas foram instaladas proporcionando benefícios socioeconômicos ao seu redor com aumento da capacidade de geração de empregos e renda (CENTENARO, 2015). Entre o ano de 2005 e o ano de 2012 verifica-se um aumento de 70% na área plantada (ASSUNÇÃO & SOUZA, 2016) e em 2022 o Estado foi considerado o quarto maior produtor de cana-de-açúcar do Brasil, atrás de São Paulo, Goiás e Minas Gerais (MAPA, 2022).

Esta alteração nos habitats anteriores trouxe consigo problemas inerentes à geração dos subprodutos provenientes das usinas de processamento de cana-de-açúcar, como a palha misturada à vinhaça ou aos dejetos de animais que, quando mal manejados, propiciam um substrato favorável à postura e desenvolvimento dos estágios imaturos da mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) (BITTENCOURT & BORJA, 2002; KOLLER *et al.*, 2009; CORRÊA *et al.*, 2013). Este fato, quando associado à alta capacidade de reprodução e dispersão da mosca, propicia sua disseminação massiva a propriedades pecuárias próximas às usinas e, conseqüentemente, a ocorrência de surtos (KASSAB, 2012; DOMINGHETTI *et al.*, 2015).

Surto populacionais da mosca estão, frequentemente, relacionados à presença de usinas que dispõem de extensas áreas favoráveis ao desenvolvimento deste díptero (BARROS *et al.*, 2010; DOMINGHETTI *et al.*, 2015). Esta mosca é considerada uma praga com distribuição quase mundial e que realiza postura em locais com resíduos orgânicos de origem vegetal, em processo de fermentação (MORAES & KORNDÖRFER, 2007; BARROS *et al.*, 2010).

1.1 Características morfológicas

A mosca-dos-estábulo (figura 1) mede em torno de 4 a 7 milímetros e tem coloração acinzentada com quatro listras escuras longitudinais. O abdômen curto e possui três manchas escuras arredondadas no segundo e terceiro segmentos. Seu aparelho bucal é do tipo picador e está localizado entre palpos curtos, tanto os machos, quanto as fêmeas

adultas são hematófagas, de hábito diurno e peculiar. Atacam preferencialmente as pernas e flancos, podendo ocasionar grande perda sanguínea, além de o estresse causado levar a redução no ganho de peso, na produção leiteira e até mesmo quebra do ciclo reprodutivo e perdas fetais (BITTENCOURT & BORJA, 2002; KOLLER *et al.*, 2009; PATRA *et al.* 2018).

Além de causar perda por estresse aos animais em virtude da sua picada dolorida (KOLLER *et al.*, 2009; GRISI *et al.* 2014), também pode atuar como vetor mecânico ou biológico de patógenos incluindo vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos (FOIL *et al.*, 1983; BALDACCHINO *et al.*, 2013) e atacam diferentes hospedeiros, como: bovinos, caprinos, equinos, ovinos, cães e, até mesmo, o homem.

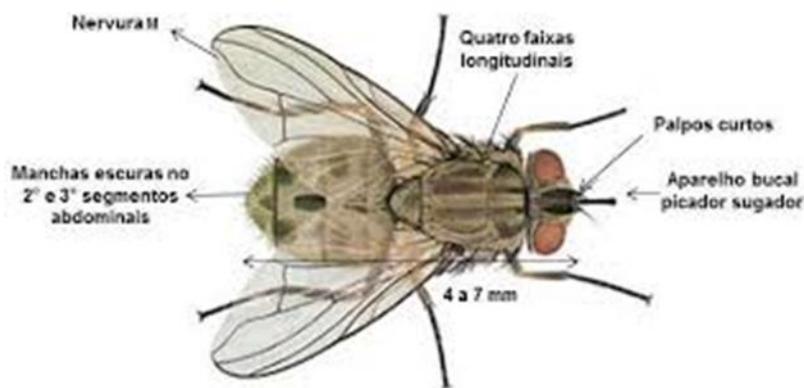


Figura 1: Características morfológicas da mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*). (adaptado de <http://www.nadsdiptera.org/FFP/stable.htm>).

1.2 Ciclo biológico

O ciclo biológico deste parasito está esquematizado na figura 2, onde a fêmea realiza a postura dos ovos em locais com acúmulo de materiais orgânicos sendo que o período larval tem uma variação média de 14 a 26 dias. O processo de pupação se dá quando as larvas de terceiro estágio iniciam lentamente o processo de estagnação para formar o pupário (KOLLER *et al.*, 2009).

Após cerca de 7-14 dias no estágio de pupa, as moscas emergem e saem à procura de abrigo e alimento, iniciando a vida parasitária. Entre o 3-5 dias, inicia a fase de acasalamento e cerca de dois dias após a copula as fêmeas fazem a oviposição em matérias orgânicas em decomposição (KOLLER *et al.*, 2009).

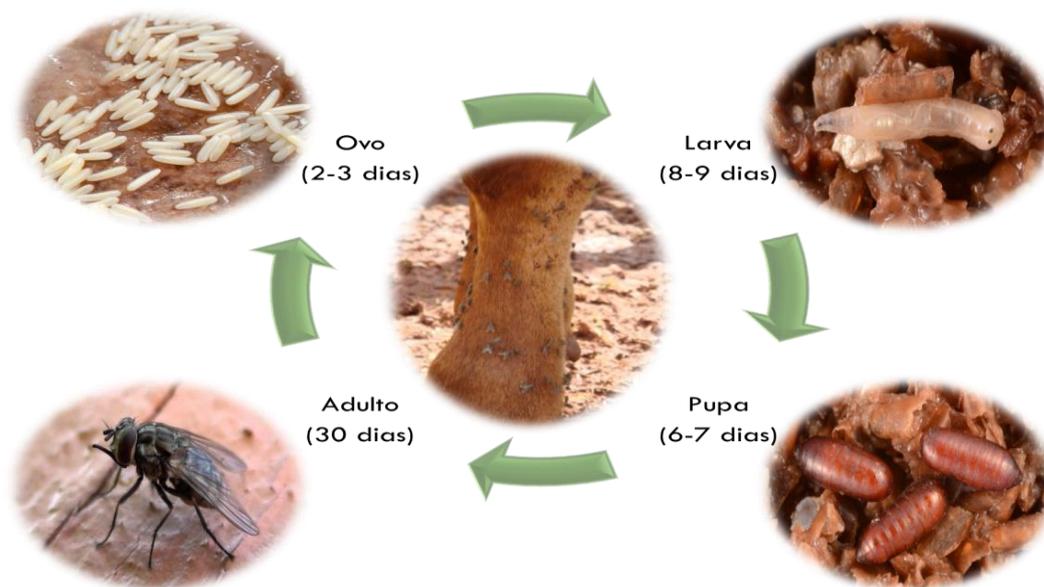


Figura 2: Ciclo biológico da mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*). (Fonte: <https://www.embrapa.br/DOC175.pdf>).

Para a redução dos efeitos negativos gerados por este inseto nas cadeias produtivas atingidas, tanto usinas quanto produtores rurais utilizam práticas de manejo sanitário para a remoção das fases larvais, através da mudança de hábitos culturais, bem como o controle químico dos adultos (LUI *et al.*, 2012; DOMINGHETTI *et al.*, 2015). Infelizmente, esta estratégia de controle tende a tornar-se menos eficiente ao longo do tempo devido à redução da suscetibilidade da mosca aos inseticidas em função do desenvolvimento de resistência (BARROS *et al.*, 2019).

1.3 Resistência aos inseticidas piretroides

O uso de pesticidas está tão amplamente difundido nos dias atuais que estes são utilizados massivamente desde o combate a pragas em residências até os ambientes industriais, sendo comercializados em diferentes formulações ou princípios ativos. Esta necessidade do controle de pragas indesejadas e a pressão de seleção gerada por sua utilização levou a preocupação crescente com a contaminação ambiental, a resistência das pragas aos inseticidas e, portanto, redução da eficácia dos mesmos (CILEK & GREENE, 1994; PITZER *et al.*, 2010; DONAHUE *et al.*, 2017).

A resistência aos inseticidas, consequência previsível do uso frequente dos inseticidas, limita a capacidade de controle das pragas. Byford (1993) define esta

resistência como "a capacidade desenvolvida em uma cepa de insetos para sobreviver a doses de substâncias tóxicas que seriam letais para a maioria dos indivíduos em uma população normal da mesma espécie".

Em função deste uso massivo de pesticidas, a resistência a um ou mais inseticidas evoluiu em todo o mundo e foi documentada em mais de 450 espécies de insetos e ácaros (SPARKS *et al.*, 1985; CILEK & GREENE, 1994; KUNZ & KEMP, 1994), com custos de resistência estimados em US\$ 1 bilhão por ano (GEORGHIOU & TAYLOR, 1986).

A atual limitação técnica, econômica e ambiental do controle larvar com produtos inseticidas reforça a percepção de que medidas preventivas são de grande importância (CANÇADO *et al.*, 2013), uma vez que o controle químico nos locais de desenvolvimento (palha com vinhaça) tende a ser caro e pouco eficiente, além de ter risco ambiental desconhecido.

A resistência é um fenômeno genético onde alterações no código genético (mutações) podem afetar as proteínas alvos dos inseticidas e/ou o seu metabolismo (LI *et al.*, 2007). Os indivíduos com mutações vantajosas, relacionadas à resistência, possuem maior probabilidade de sobreviver ao inseticida, contribuindo com uma prole maior do que os indivíduos suscetíveis, levando ao aumento da frequência do alelo que confere a resistência nas próximas gerações (MOREIRA *et al.*, 2012).

Essa habilidade desenvolvida é o resultado da seleção de indivíduos com capacidade hereditária para resistir ao princípio ativo; e não se deve à ação do inseticida no inseto individual. Assim, o desenvolvimento de resistência é dependente da variabilidade genética já presente em uma população ou surgida durante o período de seleção/adaptação e pode ser prejudicial ao controle no campo (GEORGHIOU & TAYLOR, 1986), gerando a necessidade da formulação de novas estratégias ou produtos.

Apesar de existir uma grande diversidade química de inseticidas e a diversidade biológica de insetos-praga, o número de mecanismos de resistência não é grande. Os mecanismos conhecidos podem ser divididos em três classes: (a) redução na penetração cuticular, associada a modificações na sua composição (STONE & BROWN, 1969); (b) resistência metabólica, por aumento da capacidade de metabolização desses produtos, através de enzimas de detoxificação (HEMINGWAY, 2000); e (c) modificação nos sítios alvos dos inseticidas (RINKEVICH *et al.*, 2013).

Vale ressaltar que, a maioria dos mecanismos afeta a toxicidade de mais de uma classe de inseticidas e a seleção para resistência por um composto tem o potencial de conferir resistência cruzada a outros compostos (SODERLUNG, 1997). Além disso, a

ocorrência de dois ou mais mecanismos de resistência na mesma população tem o potencial de produzir níveis elevados de resistência.

Considerados de baixa toxicidade, os piretroides são compostos sintetizados a partir de extrato de piretro com a capacidade inseticida de ação por contato muito ativa, não são voláteis sobre as superfícies, mas são prontamente degradados pelos sistemas de metabolizantes, principalmente em mamíferos e microrganismo do solo. Segundo (SUCEN, 2001) os piretroides agem interferindo na sinapse entre os neurônios, sendo que esta interferência pode ser causada por dois mecanismos: (a) por ação sobre os canais de sódio, causando o efeito *kdr* (*knockdown resistance*) ou (b) ação como antagonistas do GABA nos receptores gabaérgicos.

1.4 Citocromos P450

Os genes da família P450, também conhecidos como citocromos P450 constituem uma grande família de genes que codificam enzimas que estão envolvidas em uma ampla variedade de funções metabólicas (NELSON, 2018). Em insetos desempenham um papel fundamental na metabolização de compostos tóxicos, incluindo pesticidas. Quando expostos repetidamente a esses inseticidas, os insetos podem desenvolver mecanismos de resistência, incluindo o aumento da atividade do CYP450 (NAUEN *et al.*, 2021).

Estudos relatam que a resistência aos inseticidas pode ocorrer por diferentes mecanismos e, um dos mais importantes é o aumento detoxificação mediada pelas enzimas da família citocromo P450 (NARHI *et al.*, 1986). A resistência mediada pela monooxigenase é devida ao aumento da detoxificação ou diminuição da ativação. Esta resistência pode ser resultado de uma mudança na atividade catalisadora da enzima P450 envolvida levando a uma alteração no nível de expressão da proteína (WHEELLOCK, *et al* 1992)

Portanto, resistência aos inseticidas nestes casos ocorre porque os insetos podem produzir mais enzimas do CYP450 ou produzir variantes dessas enzimas que são mais eficientes na metabolização do inseticida (BASS *et al* 2011). Isso permite que os insetos eliminem mais rapidamente a substância antes que ela possa causar danos ao seu organismo.

A seleção inadequada e o uso excessivo de inseticidas têm sido fatores importantes no desenvolvimento da resistência. A resistência causada pelas enzimas CYP450 aos inseticidas tem trazido um desafio significativo no controle de parasitos (SCOTT *et al.*, 1998). Assim é fundamental adotar estratégias de manejo integrado de

pragas que incluam o uso racional e inseticidas, rotação de produtos químicos com diferentes modos de ação e implementação de outras táticas de controle, como armadilhas, controle biológico e uso de variedades resistentes de culturas. Isso ajuda a reduzir a pressão de seleção e retardar o desenvolvimento de resistência nos *CYP450* dos insetos (RANSON *et al.* 2002).

A resistência causada por alterações na *CYP450* pode ser resultado de várias modificações genéticas e adaptativas nas enzimas. Por exemplo, mutações pontuais podem alterar a estrutura da enzima, tornando a mais ou menos eficiente na metabolização de uma determinada substância (WEEDALL *et al.*, 2019). Além disso, a amplificação dos genes da família *CYP450*, duplicações genômicas ou mutações gênicas que deem origem a resistência podem levar ao aumento da atividade enzimática e, conseqüentemente, à resistência (ZIMMER *et al.*, 2018).

Nebert *et al.* (1989) cita que uma variedade de produtos químicos diferentes pode induzir enzimas P450 específicas, e muitos indutores de enzimas P450 são conhecidos em insetos (HODGSON 1983; AGOSIN 1985; SCOTT *et al.*, 1998), e com isso vários desses indutores podem alterar a expressão das diferentes P450s (SCOTT *et al.*, 1998) Além disso, a indução tem sido associada ao aumento da tolerância/resistência aos inseticidas.

No genoma de referência da *S. calcitrans* disponibilizado no NCBI (NW_013171937.1 Reference Stomoxys_calcitrans-1.0.1 de 25/03/2022) obtido a partir da combinação de sequenciamento de genoma de alta qualidade e análises de RNA-Seq em múltiplos estágios de desenvolvimento e tecidos depositados por Olafson *et al.* (2021) e outras sequências codificantes depositadas no GenBank, foi possível minerar o gene citocromo P450 *CYP12A2-like* (figura 3), o qual foi descrito para esta espécie. O referido gene está localizado entre as posições 327316 até 330753 e possui duas variantes X1 que possui 5 éxons e a X2, que não possui o 4º éxon. Dada a falta de informações referente aos possíveis mecanismos e mutações envolvidas na resistência da mosca-dos-estábulos aos inseticidas piretroides, buscamos neste trabalho prospectar possíveis mutações que pudessem estar relacionadas com a mesma mediante a associação de bioensaios para obtenção dos indivíduos resistentes e susceptíveis e o uso de técnicas de biologia molecular.

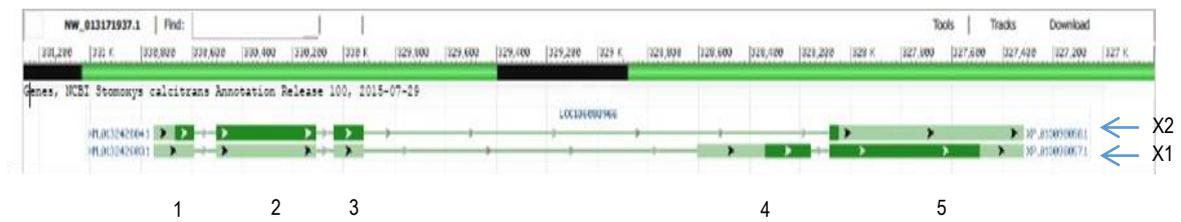


Figura 3: Figura gráfica do gene citocromo P450 *CYP12A2-like* obtida do NCBI, mostrando as suas variantes X1 e X2 e a localização dos íntrons (linha mais fina da figura acima) e éxons (números sequenciais de 1 a 5 na figura acima).

2. REFERÊNCIAS

- BALDACCHINO, F. MUENWORN, V. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*, v.20. 2013.
- BARROS, A. T. M. D., RODRIGUES, V. D., CANÇADO, P. H. D., DOMINGUES, L. N. Resistance of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), to cypermethrin in outbreak areas in Midwestern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 28, 802-806. 2019.
- BASS, C., FIELD, L.M. Amplificação genética e resistência a inseticidas. Gerenciamento de pragas. *Ciência*, v. 67, 886–890. 2011.
- CANÇADO, P. H., FERREIRA, T., PIRANDA., E.M., SOARES, C.O. Sugarcane stems as larval habitat for the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) in sugarcane plantations. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, 741-744. 2013.
- CASSOL, D. M. S., SANDOVAL, G. A. F., HENRIQUE, C. H., GIL, P. C. N., ORTOLAN, M. D. D. V. Controle integrado da *Stomoxys calcitrans*, a mosca dos estábulos. *A Hora Veterinária*, n. 174, 2010.
- COOK, D.F., TELLFER, D.V., LINDSERY, J.J., DEYL, R.A. Substrates across horticultural and livestock industries that support the development of stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae): Substrates that support stable fly. *Austral Entomol.* v.57, 344-348. 2018.
- COURI, M. S. Manual of central american diptera. *Revista Brasileira de Entomologia*, v.55, n. 4, p. 624-624, dez. 2011.
- DOMINGHETTI, T. F. D. S., BARROS, A.T.M., 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, 387-395. 2015.
- DONG, K. RINKEVICH, F., NOMURA, Y., XU, P., WANG, L., SILVER, K., ZHOROV, B., Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.50, 1-17. 2014.
- FOIL L.D. Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*C. flavidus*) and stable flies (*S. calcitrans*). *Am. J. Vet. Research*, v.44, 155-156.1983.
- GRISI, L. CERQUEIRA, L. R., DE SOUSA, M. J.R., BARROS, A.T.M., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P. H. D., Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v.23, 2, 150-6. 2014.
- HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem.Mol. Biol.* v.30, 1009-1015. 2000.
- 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, em Mato Grosso do Sul: novo problema para as cadeias produtivas da carne e sucoalcooleira. *Documentos 175*, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 31p. 2009.

LI, X. MARY, A. S., MAY, R.B., Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*. v.52, 231-253, 2007.

LIU, S.S. LI, A.Y., LOHMEYER, K.H., DE LEÓN, A.A.P. Effects of pyriproxyfen and buprofezin on immature development and reproduction in the stable fly. *Medical and Veterinary Entomology*. v.26, 4, 379-385, 2012.

NARHI, L.O., FULCO, A.J. Caracterização de uma monooxigenase cataliticamente autossuficiente de citocromo P-450 de daltons induzida por barbitúricos em *Bacillus Megaterium*. *J. Biol. Química*. 261, 7160-7169. 1986.

NAUEN, R. BASS, C., FEYEREISEN, R., VONTAS, J. O papel do citocromo p450s na toxicologia e resistência de insetos. *Anu. Rev. Entomol.* v.67, 105–124. 2021.

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, 250-257, 2011.

OLAFSON, P.U. AKSOY, S., ATTARDO, G.M., BUCKMEIER, G., CHEN, X., COATES, C.J. The genome of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, reveals potential mechanisms underlying reproduction, host interactions, and novel targets for pest control. *BMC Biology*. v.19, 41. 2021

PETRA, G., BEHERA, P. *Stomoxys calcitrans* and its importance in livestock: a review. *Int J. Agric. Res.*, v.6, 30-37, 2018.

RANSON, H. CLAUDIANOS, C., ORTELLI, F., ABGRAIL, C., HEMINGWAY, J., SHARAKHOVA, M.V., UNGER, M.F., COLLINS, F.H., FEYEISEN, R. Evolução de famílias supergênicas associadas à resistência a inseticidas. *Ciência*. v.298,179–181, 2002.

RINKEVICH, F. D. DU, Y., DONG, K. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pest. Biochem. Physiol.* v.106, 3, 93-100, 2013.

SCOTT, J.G., LIU, N., WEN, Z.M. Citocromos de insetos P450: diversidade, resistência a inseticidas e tolerância a toxinas de plantas. *Bioquímica e Fisiologia Comparada*. v.121, 147–155, 1998.

SLADECEK, F. X. J. SEGAR, S.T., LEE, C., WALL, R., ANDE KONICKA, M. Temporal segregation between dung-inhabiting beetle and fly species. *PLoS ONE* 12, 2017.

SODERLUND, D. M. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *The Journal of Pest Management Science* v.64, 610-616, 2008.

SODERLUND, D.M. e KNIPPLE, D.C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* v.33, 563-577, 2003.

TAYLOR, D. B., MOON, R.D., AND, D., MARK, R. Economic impact of stable flies (Diptera: Muscidae) on cattle production. *J. Med. Entomol*, v.49, 198-205, 2012.

WEEDALL G.D., MUGENZI, L.M.J., MENZE, B., TCHOUAKUI, M., IBRAHIM, S.S. Um alelo do citocromo P450 confere resistência aos piretroides a um importante vector africano da malária, reduzindo a eficácia dos mosquitos tratados com inseticida. *Ciência. Trad. Med.* v.11, 73.86, 2019.

WHEELLOCK, G.D., SCOTT, J.G. O anti-soro anti-P450lpr inibe atividades específicas de monooxigenase em microsomas de mosca doméstica LPR. *J. Exp. Zool*, v.264, 153–158. 1992.

ZIMMER C.T., GARROOD, W.T., SINGH, K.S., RANDALL, E., LUEKE, B.A. neofuncionalização de genes P450 duplicados impulsiona a evolução da resistência aos inseticidas na cigarrinha marrom. *Curr . Biol.* v.28, 269-7, 2018.

CAPÍTULO 2

ARTIGO I

PROSPECÇÃO DE MUTAÇÕES DE DNA NO GENE CITOCROMO P450 *CYP12A2*, EM MOSCA-DOS-ESTÁBULOS, RELACIONADAS A RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS PIRETROIDES

PROSPECTION FOR DNA MUTATIONS IN THE STABLE FLY CYTOCHROME P450 *CYP12A2* GENE RELATED TO PYRETHROID INSECTICIDES RESISTANCE

Resumo: A mosca-dos-estábulos é um parasito hematófago que causa grandes prejuízos às cadeias produtivas sucroenergética e pecuária. Sabe-se que a resistência a pesticidas em insetos é um fenômeno evolutivo e existem diferentes tipos de mecanismos genéticos que podem causar uma redução da sensibilidade aos inseticidas, devido a alterações no código genético (mutações) que podem afetar o sítio-alvo dos inseticidas e/ou o seu metabolismo. O estudo objetivou prospectar mutações no gene citocromo P450 *CYP12A2* que possam estar relacionadas à resistência aos inseticidas, visando contribuir para o manejo efetivo e controle desta praga. No total foram genotipadas 157 moscas, sendo estas distribuídas em dois experimentos independentes. Os primers utilizados em ambos os experimentos foram desenhados a partir da sequência referência NW_013173580. No primeiro estudo utilizou-se a metodologia de Sanger para avaliar a existência de mutações na região que compreendia os três primeiros éxons do gene. O DNA de moscas resistentes (16) e susceptíveis (20), obtidas a partir de bioensaio, bem como o DNA de amostras controle oriundas da colônia permanente do CNPGC (6) e amostras susceptíveis oriundas da colônia de Kerville – USA (3) foram extraídos, amplificados, sequenciados e genotipados individualmente. Foram observadas três mutações na região avaliada, sendo um SNP no segundo éxon (g.330343T>G), uma inserção de uma timina em um mononucleotídeo composto por oito timinas (g.330531-330532insT) no primeiro íntron e um SNP no 1º éxon (g.330702G>C). Não houve diferença significativa entre as populações genotipadas ($p < 0,05\%$) não sendo possível associar as mutações observadas ao fenótipo avaliado. No segundo experimento avaliou-se se a ausência do quarto éxon no transcrito da variante X2 da espécie também existia ao nível de DNA. Foram genotipadas 157 moscas distribuídas em populações naturais oriundas do estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul, bem como, as amostras utilizadas no primeiro estudo. Utilizou-se PCR-específico para amplificar as regiões em estudo e não houve diferença entre os genótipos amplificados, demonstrando que todos os espécimes avaliados

possuíam os éxons 4 e 5. Esta análise demonstrou que a diferença entre as variantes deve ser oriunda provavelmente de *splicing* alternativo, não havendo diferença ao nível do DNA.

Palavras- Chave: SNP, *Stomoxys calcitrans*, resistência genética

Abstract: The stable fly is a hematophagous parasite that causes great damage to the sugarcane and livestock production chains. It is known that pesticide resistance in insects is an evolutionary phenomenon and there are different types of genetic mechanisms that can cause a reduction in sensitivity to insecticides, due to changes in the genetic code (mutations) that can affect the target site of insecticides and/or their metabolism. The study aims to prospect mutations in the cytochrome P450 *CYP12A2* gene that may be related to insecticide resistance in order to contribute to the effective management and control of this pest. A total of 157 flies were genotyped and distributed in two independent experiments. The primers used in both experiments were designed from the reference sequence NW_013173580. In the first study, the Sanger methodology was used to evaluate the existence of mutations in the region comprising the first three exons of the gene. The DNA of resistant (16) and susceptible (20) flies obtained by bioassay, as well as the DNA of control samples from the permanent colony of CNPGC (6) and susceptible samples from the colony of Kerville – USA (3) were extracted, amplified, sequenced and genotyped individually. Three mutations were observed in the evaluated region, being a SNP in the second exon (g.330343T>G), an insertion of a thymine in a mononucleotide composed of eight thymines (g.330531-330532insT) in the first intron and a SNP in the 1st exon (g.330702G>C). There was no significant difference between the genotyped populations ($p < 0.05\%$), and it was not possible to associate the observed mutations with the evaluated phenotype. In the second experiment, it was evaluated whether the absence of the fourth exon in the transcript of the X2 variant of the species also existed at the DNA level. A total of 157 flies distributed in natural populations from the states of São Paulo and Mato Grosso do Sul, as well as the samples used in the first study, were genotyped. Specific PCR was used to amplify the regions under study and there was no difference between the amplified genotypes, demonstrating that all specimens evaluated had exons 4 and 5. This analysis demonstrated that the difference between the variants must probably originate from alternative splicing, with no difference at the DNA level.

Keywords: SNP, *Stomoxys calcitrans*, genetic resistance

2.1 INTRODUÇÃO

A mosca-dos-estábulo é um parasito hematófago que causa grandes prejuízos às cadeias produtivas sucroenergética e pecuária (BARROS *et al.*, 2019). O aumento das áreas de plantio canavieiro e seus subprodutos, como a palhada e o uso da vinhaça para fertirrigação, tem propiciado um habitat para a propagação desta praga (DOUD *et al.* 2012; SLADECEK *et al.*, 2017).

Estudos demonstram que o excesso de chuva e altas temperaturas também levam ao aumento da população destes parasitos, pois essas condições favorecem o seu ciclo evolutivo (TAYLOR *et al.* 2012; COOK *et al.*, 2018). Em bovinos as picadas doloridas e incômodas, levam ao estresse e afetam a produtividade de rebanhos localizados próximos a estes ambientes.

Assim sendo, surtos da mosca-dos-estábulo, têm sido um problema grave nos últimos anos, nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do país (BARROS *et al.*, 2010). Para controlar e amenizar os prejuízos causados pela mosca, a indústria sucroenergética tem investido no controle químico, principalmente pelo uso de inseticidas e/ou larvicidas, associado a técnicas de manejo dos resíduos orgânicos (DOMINGUETTI *et al.*, 2015).

Apesar de estratégias baseadas no uso de inseticidas serem as mais antigas e ainda as mais utilizadas, a escassez de informações sobre os efeitos dos inseticidas em *S. calcitrans* e a resistência aos inseticidas comerciais comprometem o controle dessa praga nas propriedades pecuárias e usinas sucroenergética (BARROS *et al.*, 2019).

Grisi *et al.* (2014) estimaram que os prejuízos econômicos causados por esta praga na bovinocultura brasileira chegam a US\$ 335 milhões dólares por ano (DOMINGUETTI *et al.* 2015) citaram que, de acordo com a BioSul - Associação dos Produtores de Bioenergia do Mato Grosso do Sul (2014), cerca de US\$32.000 milhões dólares de toneladas de cana-de-açúcar colhidas são investidos anualmente para o controle da praga nos municípios onde já ocorreram surtos, representando um custo de US\$ 30 a 160 mil por usina de cana-de-açúcar.

Somado a isto se sabe que a resistência a pesticidas em insetos é um fenômeno evolutivo e existem diferentes tipos de mecanismos genéticos que podem causar uma redução da sensibilidade aos inseticidas (SCOTT, 1995). A resistência é um fenômeno genético onde alterações no código genético (mutações) podem afetar as proteínas alvos dos inseticidas e/ou o seu metabolismo Li *et al.* (2007). Os indivíduos com mutações

vantajosas, relacionadas à resistência, possuem maior probabilidade de sobreviver ao inseticida, contribuindo com uma prole maior do que os outros.

A maior preocupação, oriunda dos resultados obtidos por BARROS et al. (2019) e OLIVEIRA (2019) é que, além da existência no Brasil da mutação *kdr* que confere uma alteração no sítio alvo do pesticida, outros mecanismos ou mutações também podem estar envolvidos na resistência desta praga aos inseticidas piretroides. O objetivo no estudo foi prospectar mutações em *S. calcitrans* no gene citocromo *CYP12A2*, já relacionado a resistência aos inseticidas em outras espécies, por metodologias de biologia molecular, visando contribuir para o manejo efetivo e controle desta praga.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido na Embrapa Gado de Corte utilizando moscas oriundas da colônia permanente existente no Laboratório de Parasitologia Veterinária Aplicada (PAVAP) e de coletas à campo em distintas regiões dos estados de Mato Grosso do Sul e de São Paulo. Os trabalhos de biologia molecular foram desenvolvidos no Laboratório de Genômica e Melhoramento Animal (GEMA) e no Laboratório Multiusuário de Biossegurança para a Pecuária (BIOPEC).

Foram conduzidos dois experimentos distintos buscando prospectar mutações que pudessem ser relacionadas com a resistência aos inseticidas piretroides, sendo estes:

- (1) Sequenciamento dos três primeiros éxons do gene citocromo *CYP12A2* pela metodologia de Sanger com o intuito de avaliar a existência de mutações nesta região.
- (2) PCR-específica, em sistema multiplex, dos éxons 4 e 5 do gene citocromo *CYP12A2* com objetivo de validar a existência de variantes deste gene na espécie ao nível de DNA.

a. Bioensaio

Moscas-dos-estábulos, oriundas da 3^a. geração da colônia permanente da Embrapa Gado de Corte (CNPGC3), foram submetidas a um bioensaio visando a obtenção de indivíduos resistentes e susceptíveis ao ingrediente ativo cipermetrina, da classe dos piretroides. Utilizou-se o produto comercial Cipermetrina Nortox 250 EC, registrado no Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA sob o número 3101.

Seguindo a recomendação do fabricante, o produto comercial foi diluído a uma concentração de 25% a partir de uma concentração inicial de 250g/L, sendo esta considerada a solução mãe. Foram feitas diluições seriadas em um volume final de 200ml a partir da solução mãe sendo obtidas diluições 1/10, 1/100, 1/500, 1/1000 e 1/2000. Aproximadamente 20 moscas adultas foram distribuídas de forma aleatória em cada placa de petri contendo um pedaço de TNT embebido em 2 ml das soluções acima descritas, sendo feitas duas repetições para cada diluição.

A taxa de mortalidade foi determinada após 1 h de exposição. Como ainda não há determinação da LC₅₀ (concentração letal para 50% da população) em *S. calcitrans* estabeleceu-se que, moscas sobreviventes nas maiores concentrações (mãe, 1/10 e 1/100) seriam as “resistentes”, enquanto moscas mortas após este mesmo período nas menores concentrações (1/500, 1/1000 e 1/2000) seriam as “susceptíveis” (CANÇADO, informação pessoal, 2023).

b. Amostragem e extração de DNA

A partir do bioensaio foram obtidas um total de 18 moscas resistentes e 26 susceptíveis. Além destas foram utilizadas amostras da colônia CNPGC3 da 1ª geração, e amostras oriundas do campo, sendo estas de duas regiões do Mato Grosso do Sul e três regiões de São Paulo. Todas já foram alvo de surtos de moscas-dos-estábulo.

O DNA genômico de um total de 157 moscas foi extraído de modo individual a partir do tórax macerado, após congelamento com nitrogênio líquido. Para tanto utilizou-se o kit *Dneasy® Blood & Tissue* (Qiagen) com algumas modificações no tempo de lise da amostra. O número de amostras utilizadas em cada uma das análises pode ser observado na Tabela 1.

A quantidade, qualidade e integridade do DNA foram avaliadas em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific) e em gel de agarose 0,8% corado com *Syber Gold* e visualizado sob luz.

c. Amplificação dos éxons do gene citocromo P450 *CYP12A2*

Os *primers* desenhados para o gene citocromo P450 *CYP12A2* foram desenhados a partir da mineração de genes da família citocromo P450 no Genoma de referência do NCBI *Stomoxys calcitrans*-1.0.1 (GCF_001015335.1), que estava disponível em março de 2022 (EGITO, informação pessoal). O gene localiza-se entre as posições 327.316 e 330.753, com 3.438bp da sequência NW_013171937 depositada no GenBank que possui

1.433.716bp. A tabela 2 contém a sequência dos *primers* desenhados para amplificar as regiões codificantes do gene *CYP12A2*.

Na padronização dos mesmos foram avaliadas distintas temperaturas e concentrações de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), sendo consideradas ótimas a temperatura de anelamento de $57^\circ C$ e a concentração final de $1,5mM$ de $MgCl_2$.

Tabela 1: Populações e número de moscas avaliada por experimento

População	N amostral	
	Experimento 1	Experimento 2
Colônia CNPCG. Geração 1 – MS	6	48
Colônia CNPCG. Geração 3 – Resistente	16	18
Colônia CNPCG. Geração 3 – Suscetível	20	26
Nova Alvorada do Sul/MS	-	22
Angélica/MS	-	10
Nova independência/SP	-	10
Pereira Barreto/SP	-	10
Buritizal/SP	-	10
Kerville – USDA – USA	3	-
Total	45	154

As reações de PCR foram feitas com um volume final de $20\mu l$, utilizando-se $3ng$ de DNA molde; tampão 1X; $1,5mM$ de cloreto de magnésio; $200\mu M$ de cada dNTP; $0,05\mu M$ de primer; $1,0UI$ de Taq DNA polimerase. O protocolo para amplificação dos amplicons foi de $95^\circ C/10'$, seguido por 30 ciclos de $95^\circ C/45''$ temperatura de desnaturação; $57^\circ C/45''$ temperatura de anelamento e $72^\circ C/45''$ temperatura de extensão, com extensão final de $72^\circ C/5'$.

A amplificação dos fragmentos foi verificada por eletroforese horizontal em géis de agarose 1%, corados com *Syber Gold* (InvitrogenTM). O tamanho dos fragmentos foi determinado pela comparação com um marcador, padrão de peso molecular de 1 kb plus (InvitrogenTM), sendo a imagem de cada gel obtida por um sistema digital de foto documentação.

Tabela 2: *Primers* utilizados para amplificação dos éxons do gene *CYP12A2*.

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	Tamanho esperado (pb)	Experimento
SC_CYP12A2_P1F	CAC AAC GCT AAC ACT GCC AC	576	1
SC_CYP12A2_P1R	TGC CCC CAT TTC TCACCA GAC		
SC_CYP12A2_P2F	AGGGTTATGCTGCCCAAGTC	233	1
SC_CYP12A2_P2R	TGTGTTTCGATTCCAGTTACGTTTG		
SC_CYP12A2_E5F	AGTTGCGTATCAAACGGGCTA	579	2
SC_CYP12A2_E5R	GCAGGGGTGGATACGGTC		
SC_CYP12A2_E4F	ATTCGCGACCCACAAACTCT	353	2
SC_CYP12A2_E4R	TCGCTCTCTGGCTTTTCTGG		

d. Experimento 1 – Sequenciamento dos éxons 1 a 3

Os amplicons obtidos nas PCRs com os *primers* P1 e P2 foram purificados de acordo com Werle *et al.* (1994) utilizando as enzimas Exonuclease I (*ExoI*) e Fosfatase Alcalina de Camarão (*sAP*). A *ExoI* digere o excesso de *primers* da reação enquanto a *sAP* desfosforila 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/30', seguido de 20'a 80° C.

A reação de sequenciamento foi realizada pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxynucleotídeos marcados com fluorocromos (SANGER, 1977). Foi utilizado o kit *BigDye® Terminator v3.1* da (*Applied Biosystems*) seguindo as condições especificadas pelo fabricante. A amplificação foi realizada no termociclador Veriti® *Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*), utilizando o seguinte programa: 96° C/1', 25 ciclos a 96° C/10", 50° C/5" e 60° C/4'.

Por fim, foi realizada uma nova etapa de purificação utilizando-se EDTA (125mM, pH 8,0), etanol 70% e etanol absoluto. As reações foram ressuspensas em 10µl 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 editados e alinhados à sequência referência utilizada para o desenho dos *primers* específicos para a prospecção de mutações relacionadas à resistência/susceptibilidade. Só foram considerados os SNPs que tiveram os dois homozigotos genotipados, bem como, mutações que apareceram em mais de uma amostra. Amostras que apresentaram um baixo padrão de qualidade no sequenciamento foram eliminadas deste estudo.

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, bem como 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. O programa MEGA v.11 (TAMURA et al., 2021) também foi utilizado para gerar uma árvore filogenética e avaliar a variabilidade genética existente nas sequências avaliadas.

e. Experimento 2 – Amplificação de multiplex

Após a padronização das reações de PCR de forma individual conforme descrito na padronização, optou-se por utilizá-los em sistema multiplex uma vez que ambos possuíam protocolos bem semelhantes. O conjunto de *primers* CYP12AE4 delimita uma região que caracteriza a variante X1 pois amplifica apenas o éxon 4, que é ausente na variante X2. Já o conjunto de *primers* CYP12AE5, amplifica um fragmento maior que contendo o éxon 5.

As reações de PCR precisaram ser padronizadas novamente sendo realizadas em um volume final de 20µl, utilizando-se 3 ng de DNA molde; tampão 1X; 1,5mM de cloreto de magnésio; 200µM de cada dNTP; 0,25µM de primer; 1,0UI de *Taq* DNA polimerase. O protocolo utilizado no termociclador para amplificação foi de 95°C/10', seguido por 30 ciclos de 95°C/1' temperatura de desnaturação; 57°C /1' temperatura de anelamento e 72°C/1' temperatura de extensão, com extensão final de 72°C/5'.

Os produtos amplificados foram separados em gel agarose 1% e corados com *Syber-Gold* (Invitrogen®). O tamanho dos fragmentos foi estabelecido mediante a comparação com um marcador de peso molecular 1Kb *plus*. Os géis foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados para posterior análise.

As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir do genoma de referência da *S. calcitrans* disponibilizado no NCBI (OLAFSON *et al.*, 2021) e outras sequências codificantes depositadas no GenBank foi possível realizar a mineração de dados e a comparação do genoma da *S. calcitrans* com outras espécies correlatas. Até onde se sabe este é o primeiro trabalho onde se avalia a existência de polimorfismos neste gene na espécie, visando correlacionar os mesmos com a resistência ou susceptibilidade aos inseticidas piretroides.

A. Experimento 1 – Sequenciamento da região dos 3 primeiros éxons

No experimento 1 sequenciou-se uma região de 690pb onde estão localizados os três primeiros éxons. Na figura abaixo (figura 1) podem ser visualizados os amplicons obtidos com os primers SC_CYP12A2_P1 e SC_CYP12A2_P2. Embora os tamanhos observados no gel de agarose a 1% estejam em uma posição acima do esperado, os tamanhos dos fragmentos sequenciados equivalem ao tamanho original. Este fato já foi observado por outros colegas e se comprovou que o corante utilizado para visualização (*Syber Gold*) tem alterado o padrão de corrida do fragmento amplificado, possivelmente devido a um aumento da densidade do mesmo ou por algum outro motivo ainda não descrito na literatura.

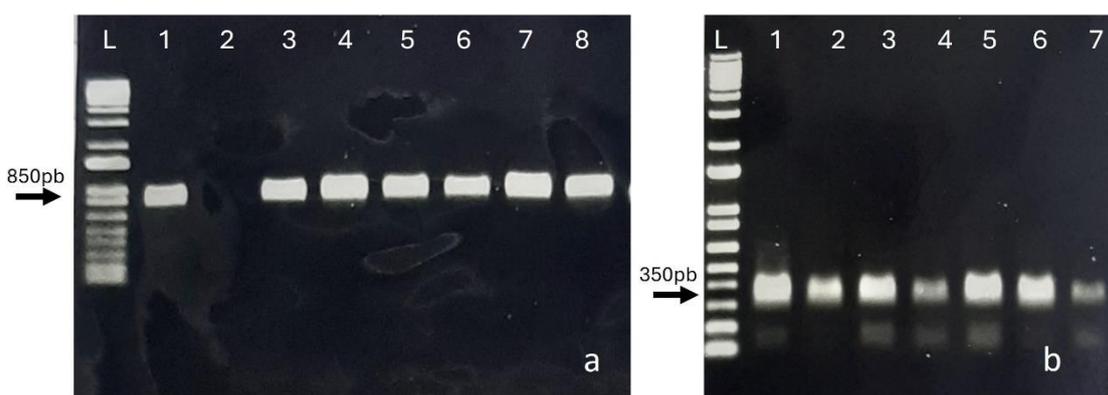


Figura 1. Padrão de amplificação dos primers SC_CYP12A2_P1 (a) e SC_CYP12A2_P2 (b). As setas indicam o tamanho aproximado dos amplicons de acordo com o ladder de 1kb plus da Invitrogen (L). Os números sequenciais são as amostras amplificadas.

Na sequência analisada de aproximadamente 700pb (figura 2) foi possível observar três mutações (figuras 3 e 4): (a) um SNP caracterizado por uma transição no

segundo éxon de uma timina por uma guanina (g.330343T>G), que gera a uma mutação não silenciosa, levando a substituição de uma glutamina (CAA) por uma histidina (CAC) na enzima que será produzida (figura 5); (b) uma inserção de uma timina em um mononucleotídeo composto por oito timinas (g.330531-330532insT) no final do primeiro íntron e, por último, (c) um SNP no 1º éxon onde há a transversão de uma guanina por uma citosina (g.330702G>C), mas não foi possível averiguar qual o tipo de mutação, se existe substituição do aminoácido ou se a mutação é silenciosa, pois não existe no NCBI algum cDNA associado a esta região.



Figura 2. Exemplo da qualidade das amostras e *layout*, demonstrando a região sequenciada pelos primers F e R, ao redor de 700bp em relação a sequência referência. A região marcada na representação do local dos sequenciado indica a região do eletroferograma. A seta indica o SNP1.



Figura 3. Eletroferograma mostrando o SNP g.330343T>G. Pode-se observar amostras homocigotas para os dois alelos e heterocigotas.

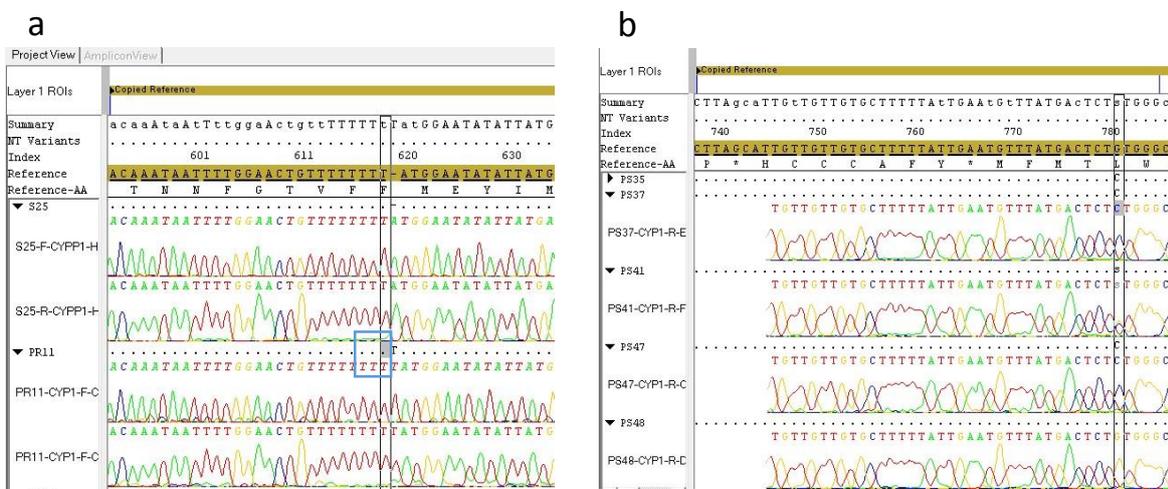


Figura 4. Mutações observadas nos fragmentos sequenciados das amostras de *S. calcitrans* suscetíveis e resistentes obtidas nos bioensaios realizados neste estudo. (a) inserção de uma T no mononucleotídeo composto por 8 repetições e (b) a substituição de uma G por uma C. Nas figuras a e b é possível visualizar amostras homocigotas e heterocigotas.

PREDICTED: Stomoxys calcitrans cytochrome P450 CYP12A2 (LOC106080966), transcript variant X1, mRNA

NCBI Reference Sequence: XM_013242603.2

GenBank FASTA

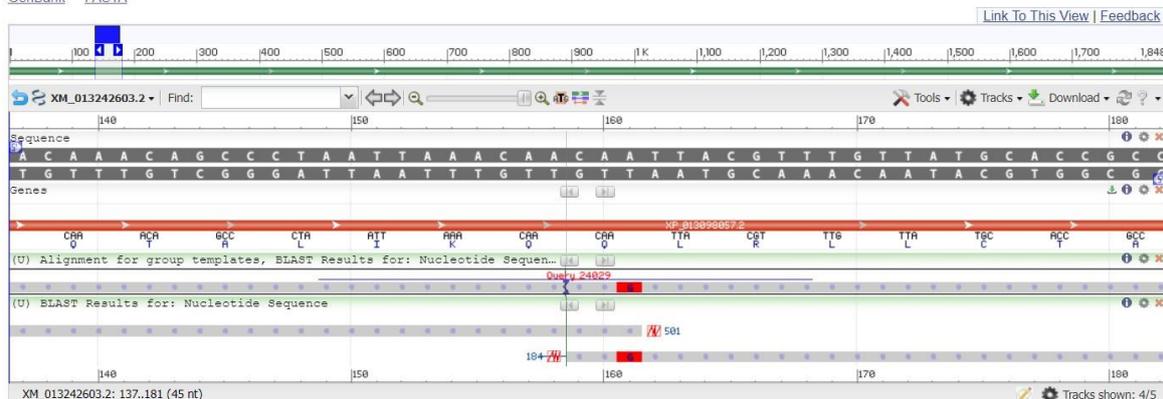


Figura 5. Representação gráfica do SNP do 2º éxon e a possível alteração do aminoácido predito devido à alteração do códon CAA para CAC.

Na tabela 3 verifica-se a frequência alélica dos locos observados na amostra avaliada. Pela frequência alélica dos locos analisados verifica-se que provavelmente o alelo G do SNP1, presente em 87% da amostra, seja o alelo selvagem, enquanto o alelo T, presente em menor frequência (13%). O alelo C do 2º SNP parece estar presente em maior proporção nas populações susceptíveis, apesar de não haver indicação estatística para isto.

O índice de diversidade dos locos demonstra que não há variação na população de Kerville, o que era esperado, uma vez que esta população é mantida há longo tempo e caracteriza uma linhagem geneticamente susceptível aos inseticidas piretroides. O indel caracterizado pela inserção de uma timina, só ocorreu na população do bioensaio sendo de 0,233 e 0,189 para resistentes e susceptíveis, respectivamente. Este fato pode ser oriundo do n amostral utilizado na população da 1ª geração da colônia, aqui representada no grupo CNPGC, em função da sua baixa frequência. O SNP1 que caracteriza a substituição nucleotídica apresenta uma maior diversidade na população da 1ª. geração (0,433) do que nas populações resistente (0,179) e susceptível (0,263). Como este índice de diversidade está relacionado a heterozigiosidade esperada, acredita-se que o n amostral possa ser sido um fator preponderante para esta diferença entre as gerações da colônia CNPGC3. O teste de diferenciação aos pares utilizando o índice de F_{ST} de Wright, que também leva em consideração os padrões de heterozigiosidade das populações indica que a população CNPGC diferencia-se das demais avaliadas ($p < 0,05$).

Tabela 3. Frequência alélica das mutações observadas nas distintas populações avaliadas no experimento 1.

População	N	SNP1		INDEL T		SNP2	
		G	T	T	G	C	
CNPGC	6	0,750	0,250	1,000	0,000	1,000	0,000
Resistente	16	0,906	0,094	0,875	0,125	0,406	0,594
Susceptível	20	0,850	0,150	0,900	0,100	0,250	0,750
Kerville	3	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000
Total	45	0,867	0,133	0,911	0,089	0,389	0,611

A tabela 4 mostra os genótipos obtidos em todas as amostras estudadas a partir do sequenciamento realizado. Observa-se pelos resultados que não existe uma divergência entre os genótipos obtidos entre as populações observadas, inclusive a inserção de uma base nucleotídica na sequência gênica, que poderia alterar de forma mais drástica por alterar toda a cadeia de leitura da proteína que será gerada, ocorre de forma semelhante na população considerada susceptível e na resistente.

Independente de não conseguirmos realizar associações entre a característica em estudo e as mutações observadas, ressalta-se aqui a importância da mutação observada dentro do primeiro íntron. Além de poder alterar toda a cadeia de leitura da proteína a ser formada, diferentes estudos vêm comprovando que os íntrons desempenham papel fundamental na expressão gênica, contendo elementos funcionais como micro-RNAs, (COULOMBE-HUNTINGTON & MAJEWSKI, 2007), bem como pode contribuir na diversidade proteômica, facilitando o *splicing* alternativo (STETEFELD *et al.*, 2005). SHAUL (2017) revisa a habilidade dos íntrons aumentarem a expressão gênica em diferentes espécies, incluindo insetos, pois 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.

Ao avaliarmos os índices de diversidade das populações estudadas utilizando o programa MEGA obteve-se um o coeficiente de diferenciação entre os grupos de $-0,401 \pm 0,197$, indicando que não há como inferir ou fazer associações com os genótipos avaliados. A matriz aos pares que estima a divergência genética aos pares, pelo modelo de Kimura 2-parametros Kimura M. (1980), confirma a baixa divergência entre os grupos (tabela 5), bem como a árvore filogenética construída para todas as amostras de forma individual (figura 6).

Se considerarmos as pequenas diferenças observadas na matriz de divergência genética, podemos observar que as populações resistentes e susceptíveis são as mais

próximas por possuírem uma menor divergência entre si na comparação aos pares. Isto provavelmente está relacionado ao fato destas amostras serem oriundas da 3ª geração da colônia CNPGC, enquanto a população CNPGC representa a 1ª geração da colônia. Ou seja, não houve nenhum processo de seleção imposto pelo modo que a colônia é mantida ao longo das gerações, fato este que pode levar a uma diferenciação das populações ao longo das gerações. Somado a isto, deve-se levar em conta também o n amostral da 1ª geração em relação as amostras oriundas do bioensaio.

A resistência aos inseticidas é uma característica com perfil quantitativo, pois apresenta níveis de graduação tendo uma variação contínua, assim sendo, uma das hipóteses aventadas é que não foi possível correlacionar às mutações observadas em função do n amostral utilizado.

Tabela 4: Genótipos observados nas amostras estudadas

AMOSTRA	Mutação 1	Mutação 2	Mutação 3
COL24	GG		GG
COL26	GG		GG
COL27	TG		GG
COL35	GG		GG
COL38	GG		GG
COL39	TT		GG
R5-1-100	GG		GG
R7-1-100	GG	TT	GG
R8-1-100	GG		OC
R6-1-100	GG		OC
R11-1-10	GG	TT	OC
R12-1-10	GG		OC
R13-1-10	GG		GG
R14-1-10	TT		GG
R15-1-10	GG		OC
R16-1-10	GG		GG
R17-1-10	GG		GG
R18-M	GG		OC
R19-M	GG		OC
R20-M	TG		GC
R21-M	GG		OC
R22-M	GG		OC
S23-1-500	GG		OC
S24-1-500	GG		OC
S25-1-500	GG		OC
S26-1-500	GG		OC
S27-1-500	GG	TT	OC
S29-1-500	GG		OC
S30-1-500	GG		OC
S33-1-1000	TG		GG
S34-1-1000	TG		GC
S35-1-1000	GG		OC
S37-1-1000	GG		OC
S38-1-1000	GG		OC
S39-1-1000	GG		OC
S40-1-1000	GG		GG
S41-1-1000	TG		GC
S44-1-2000	GG		GG
S45-1-2000	GG	TT	OC
S46-1-2000	TG		GC
S47-1-2000	GG		OC
S48-1-2000	TT		GG
Kerville S1	GG		OC
Kerville S2	GG		OC
Kerville S3	GG		OC

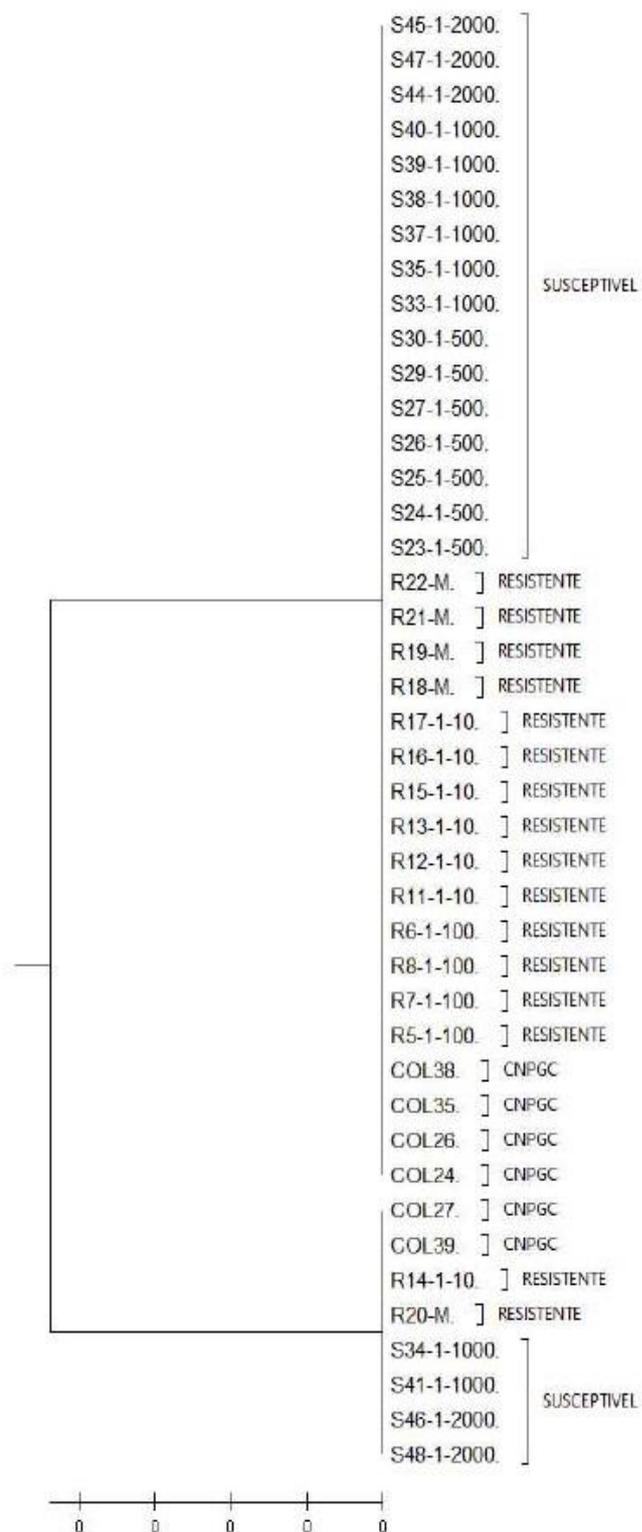


Figura 6. Árvore filogenética baseada nas sequências obtidas com todas as amostras avaliadas neste estudo.

Tabela 5. Matriz de estimativa de divergência genética aos pares, pelo modelo de Kimura 2-parametros entre os três grupos avaliados.

	CNPGC	Resistente	Susceptível
CNPGC	-		
Resistente	0,000348	-	
Susceptível	0,000284	0,000157	-

B. Experimento 2 – PCR específico da região dos dois últimos éxons

No experimento dois foram amplificados *primers* específicos em sistema multiplex dos dois últimos éxons visando a caracterização das variantes X1 e X2 para verificar a hipótese das variantes observadas ao nível de RNA ocorrerem também ao nível do DNA.

Nas oito populações avaliadas (tabela 1) foi possível observar a existência dos dois éxons, demonstrando que se houver variação entre esta região, está deve ser ao nível de nucleotídeos.

Da mesma forma que as PCRs do experimento anterior, os fragmentos observados foram maiores do que o esperado (figura 11) . Alguns destes fragmentos foram sequenciados confirmando o tamanho original do fragmento em relação ao observado no gel de agarose.

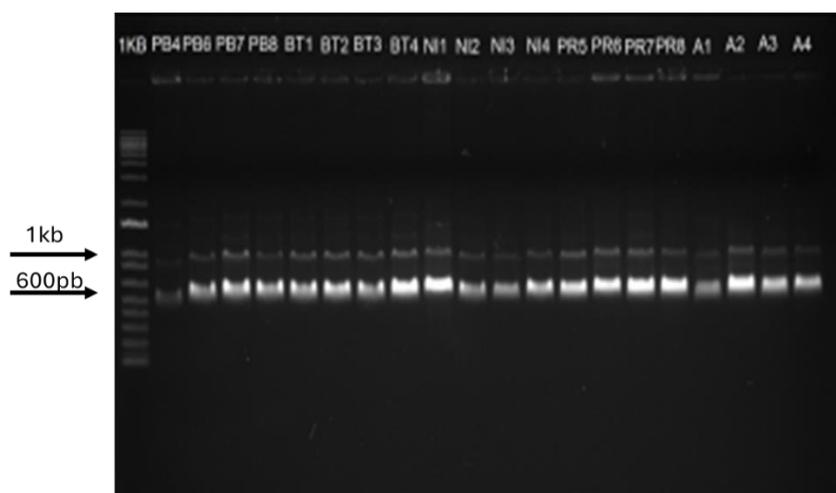


Figura 7. Padrão do PCR multiplex com os *primers* CYP12A2E4 (600pb) e CYP12A2E5 (1kb) demonstrando a amplificação dos dois fragmentos que identificam a presença dos dois éxons. Na primeira linha o padrão de peso molecular usado de 1kb. Nas setas os amplicons.

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que investiga a existência de um mecanismo metabólico enzimático relacionado à resistência aos inseticidas piretroides no

gene citocromo P450 CYP12A2. Apesar de existirem diferentes genes da família citocromo P450 relacionados à característica de resistência aos inseticidas em outras espécies, estudos relatam que há uma semelhança nas regiões estruturais e promotoras dos genes CYP450, descrevendo inclusive distintos *splicing* alternativos.

Tan et al. (2002) além da inversão de éxons/íntrons citam que o processamento do RNA também inclui modificações em ambas as partes das extremidades do transcrito de RNA e afirmam que o *splicing* alternativo é o maior mecanismo para manutenção da diversidade populacional.

Huntington & Majewski (2007) cita como os segmentos dos micros-RNAs atuam na expressão gênica, além de poder contribuir para diversidade proteômica, facilitando o *splicing* alternativo.

Estudos relatam que na mosca doméstica, a superexpressão constitutiva do *CYP6A1*, localizado no cromossomo 5, confere resistência ao inseticida diazinon, um organofosforado, mas essa demonstrou ser controlada por um ou mais genes localizados no cromossomo 2 (CARINO *et al.*, 1994). A duplicação e amplificação de genes demonstram que a duplicação estrutural ou amplificação dos genes P450 pode desempenhar um papel importante na evolução da resistência aos inseticidas.

Petrov & Hartl (1998) e Robin *et al.* (2000) descrevem que a *Drosophila simulans* possui um gene P450 que está obviamente inativado (*CYP6T2*) e em *D. melanogaster* existem três (*CYP12D3*, *CYP6T2* e *CYP6A15*), mas cada um desses genes existe como cópias funcionais conservadas em outras espécies, indicando que não são genes não funcionais que surgem e desaparecem sem a influência da purificação e da seleção natural.

2.3 CONCLUSÕES

Foi possível concluir que,

- Existem mutações ainda não descritas no gene *CYP12A2* em moscas-dos-estábulo,
- Foram descritos neste estudo 2 SNPs em regiões codificantes, um deles levando a alteração do aminoácido original e um indel em região intrônica e,
- Não foi possível associar estas mutações com a expressão do fenótipo estudado.

2.4 REFERÊNCIAS

- BARROS, A. T. M., GOMES, A., KOLLER, W.W. Surtos por *Stomoxys calcitrans* em gado de corte no Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* v.30, p. 945-952. 2010.
- BARROS, A. T. M. D., RODRIGUES, V. D., CANÇADO, P. H. D., DOMINGUES, L. N. Resistance of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), to cypermethrin in outbreak areas in Midwestern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.28, p. 802-806. 2019.
- CARINO F. A., KOENER, J.F., PLAPP, F., FERYEREISEN, R. Superexpressão constitutiva do gene CYP6A1 do citocromo P450 em uma cepa de mosca doméstica com resistência metabólica a inseticidas. *Bioquímica de insetos. Mol. Biol.* v.24, p. 411-18.1994.
- COOK, D.F., TELLFER, D.V., LINDSERY, J.J., DEYL, R.A. Substrates across horticultural and livestock industries that support the development of stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae): Substrates that support stable fly. *Austral Entomol.* 2017.
- 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. 549 - 555, 2012.
- GRISI, L. CERQUEIRA, L. R., DE SOUSA, M. J.R., BARROS, A.T.M., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P. H. D., Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v.23, p. 150-6. 2014.
- HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem.Mol. Biol.* v.30, p. 1009-1015, 2000.
- KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* .v.16, 111-120, 1980.
- 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*, em Mato Grosso do Sul: novo problema para as cadeias produtivas da carne e sucoalcooleira. *Documentos 175*, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, v.31 p. 2009.
- LI, X., SCHULER, M.A., BERENBAUM, M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev. entomol.* v.52, p. 231-253, 2007.
- NARHI, L.O., FULCO, A.J. Caracterização de uma monooxigenase cataliticamente autossuficiente de citocromo P-450 de daltons induzida por barbitúricos em *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Química.* v.261, p. 7160-7169. 1986.

- NAUEN, R. BASS, C., FEYEREISEN, R., VONTAS, J. O papel do citocromo p450s na toxicologia e resistência de insetos. *Anu. Rev. Entomol.* v.67, 105–124. 2021.
- 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, p. 250-257, 2011.
- OLAFSON, P.U. AKSOY, S., ATTARDO, G.M., BUCKMEIER, G., CHEN, X., COATES, C.J. The genome of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, reveals potential mechanisms underlying reproduction, host interactions, and novel targets for pest control. *BMC Biology*. v.19, p. 1, 41. 2021.
- PETRO, V. D.A., HARTL, D.L. Alta taxa de perda de DNA nos grupos de espécies *Drosophila mel anogaster* e *Drosophila virilis*. *Mol Biol Evol.* v.15, p. 293–302, 1998.
- ROBIN, G.C., RUSSELL, R.J., CUTLER, D.J., OAKESHOTT, J.G. The evolution of an alpha-esterase pseudogene inactivated in the *Drosophila melanogaster* lineage. *Mol Biol Evol.* v.17, p.563-575. 2000
- SANGER, F. Sequences, sequences, and sequences. *Annu Rev Biochem.* v.57, p. 1-28.1988.
- SCOTT, J.G., LIU, N., WEN, Z.M. Citocromos de insetos P450: diversidade, resistência a inseticidas e tolerância a toxinas de plantas. *Bioquímica e Fisiologia comparada* v.121, p. 147–155, 1.998.
- SHAUL, O. How introns enhance gene expression. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v.91, p. 145-155, 2017.
- SODERLUND, D. M. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *The Journal of Pest Management Science.* v.64, p. 610-616, 2008.
- SODERLUND, D.M., KNIPPLE, D.C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* v.33, p. 563-577, 2003.
- STETEFELD, J., RUEGG, M.A. Structural and functional diversity generated by alternative mRNA splicing. *Trends in biochemical sciences.*v.30, p. 515-521, 2005.
- TAMURA, K., STECHER, G., KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, *Molecular Biology and Evolution*, v.38 , p. 3022–3027. 2021
- TAN, J., LIU, Z., NOMURA, Y., GOLDIN, A.L. Alternative splicing of an insect sodium channel gene generates pharmacologically distinct sodium channels. *Journal of Neuroscience.* v.22, p.5300-5309, 2002.
- TAYLOR, D. B. MOON, R.D., AND, D., MARK, R. Economic impact of stable flies (Diptera: Muscidae) on cattle production. *J. Med. Entomol.* v.49, p. 198-205, 2012.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar nesse momento não ser possível associar a característica em questão de mutações observadas, sabe-se que as mesmas são as primeiras descritas na espécie em questão e especula-se que possam estar correlacionadas com outras características importante na biologia de insetos, podendo ser até mesmo na resistência a outra classe de inseticidas