



Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Isolamento e genética de populações de genes associados à resistência a inseticidas em
***Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae),**
vetor da Leishmaniose Visceral Americana

Rachel Mazzei Moura de Andrade Lins

Dissertação apresentada como requisito para obtenção
do título de Mestre em Ciências, com área de
concentração em Biologia Celular e Molecular
ao Instituto Oswaldo Cruz, Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Alexandre Afranio Peixoto

Rio de Janeiro, 2006



Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Isolamento e genética de populações de genes associados à resistência a inseticidas em
***Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae),**
vetor da Leishmaniose Visceral Americana

Rachel Mazzei Moura de Andrade Lins

Orientador: Dr. Alexandre Afranio Peixoto

Banca Examinadora:

Dr. Reginaldo Peçanha Brazil – Presidente da banca examinadora

FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz / Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Dra. Gisele Lobo-Hajdu – Revisora do texto

UERJ / Instituto de Biologia / Departamento de Biologia Celular e Genética

Dr. Cicero Brasileiro de Mello Neto

UFF / Instituto de Biologia / Departamento de Biologia Geral

Dra. Nataly Araújo Souza

FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz / Departamento de Entomologia

Dr. Alberto Martín Rivera Dávila

FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz / Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Data da defesa: 14 de Julho de 2006

Rio de Janeiro, 2006

Dedico esta dissertação a meus pais,
avós, irmãs e ao meu noivo, Thiago.

Agradecimentos

Ao final deste trabalho, tenho a agradável sensação de mais uma etapa finalizada no processo de minha formação. Ao longo destes dois anos pude vivenciar diversas experiências nos campos profissional e emocional, que contribuíram para meu crescimento e amadurecimento de uma forma geral. No decorrer deste meu aprendizado, muitas pessoas estiveram ao meu redor, umas mais presentes, outras, acompanhando, e as demais talvez como meras expectadoras e até mesmo as de convivência no ambiente profissional. Mestres, pais, avós, irmãs, noivo, parentes, amigos, conhecidos, desconhecidos... Todos formam a população de indivíduos que pertenceram a este momento tão importante, experimentado ao longo de alguns meses e que tem seu desfecho na conclusão de um de meus importantes projetos, o Mestrado.

Dessa forma, detalhando as tais participações, agradeço em primeiro lugar a Deus, o grande arquiteto do universo, a origem primária de todas as coisas, a energia cósmica e universal.

Agradeço a meus pais Jorge e Lívia, por quem tenho um enorme sentimento de gratidão, sendo os responsáveis pela minha formação não apenas como profissional, mas cujos ensinamentos se consolidaram na formação de meu caráter. Aos meus avós Haroldo e Alayde, pelo incentivo incondicional, pelos conselhos, pelas palavras de consolo. Às minhas irmãs, Mariana e Bianca, companheiras de casa e de saídas, por seu companheirismo e, por compreender minhas explosões de nervosismo ocasionais. Ao meu sobrinho e afilhado Iuri que, mesmo rabiscando meus artigos e materiais, desligando o computador quando eu estava trabalhando, me fez sorrir muitas vezes com suas colocações inteligentes, engraçadas e, muitas vezes inocentes.

Gostaria de agradecer de forma especial ao meu orientador, Alexandre Peixoto, por ser muito mais que o “chefe do laboratório”, mas por agir de forma a valorizar a individualidade de cada um de seus alunos, sendo um modelo, no qual muitos de nós nos espelhamos. Agradeço pela oportunidade de ser orientada por ele desde o começo da faculdade até o final do Mestrado. Agradeço pela confiança, pela compreensão, pelo apoio e principalmente pela paciência. Agradeço por fazer parte da minha vida acadêmica, esses momentos foram mais suaves graças à sua tolerância, amizade e orientação.

Agradeço aos meus Mestres, professores com os quais tive contato nas diversas disciplinas, em especial ao professor Antonio Mateo Sole-Cava, que, mais do que um mero professor é um exemplo para seus alunos, formador de opinião e motivador para as coisas corretas e postura adequada de profissional de caráter. Suas frases ficarão impressas em

minha vida: “A análise crítica, acima de tudo de nosso próprio trabalho, mas também das maneiras que a ciência vem sendo construída particularmente nos últimos anos é fundamental. Ciência sem filosofia é como a vida sem o amor. É na filosofia que encontramos a explicação para a ciência. É nela que vemos o vínculo entre o que fazemos e o mundo. Senão fica sendo só PCR, seqüenciamento, publicações, dinheiro, projetos, competição... tudo muito vazio”. À professora Gisele Lobo, que com sua forma meiga e carinhosa cativa a todos os seus alunos, não abstraindo que seu vasto conhecimento em diversas áreas e na sua própria nos estimula a estudar cada vez mais e mais.

Não poderia deixar de citar alguns amigos especiais que, não apenas pela simples convivência, mas também pelo apoio, me ajudaram, me ensinaram e me compreenderam durante esse período: Felipe Gomes (Gogô), pelos bons momentos que convivemos no laboratório, fora dele, nas viagens e aventuras; Ronaldo, bom amigo desde o tempo da faculdade; Tamara, pela amizade e carinho; Rachel Canto (Rachelzinha), pela amizade e paciência, por me motivar quando eu estive desanimada, por chamar minha atenção quando eu mereci e por toda sua ajuda nas análises de genética de populações, obrigado chel, por sua paciência; e à Ingrid, irmã, amigona de longa data, pelos bons momentos de convivência. Quanto aos amigos externos, agradeço a Tati e Cota, Priscilla Leão, Antonio Lawand, Rodolfo Jr e Luis (Mico Branco) pelo apoio e pelas inúmeras conversas sobre questões acadêmicas.

Muito obrigada aos profissionais que estiveram envolvidos de alguma forma com meu trabalho, onde não posso deixar de citar: Paulo, Rosa e Erico pelos seqüenciamentos, Carla pelos artigos e dicas de protocolo, Saori pela troca de experiência com nossas populações, Camila Mazzoni pela ajuda com os *softwares*, Robson, pela amizade e ajuda ao longo destes 8 anos de Fiocruz e por ser um grande incentivador e não poderia deixar de citar o amigo Ademir, companheiro de estudos de resistência desde a faculdade, pessoa com quem troquei muitas idéias e por quem tenho um grande carinho.

Finalmente, meu enorme agradecimento ao meu noivo Thiago, por seu apoio incondicional, seu carinho, sua amizade, seu incentivo e, por não me deixar recuar quando o estresse me consumia, e não desanimar, estando ao meu lado sempre.

RESUMO

Flebotomíneos são os insetos vetores das leishmanioses e *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) o principal transmissor da *Leishmania infantum chagasi*, agente etiológico da Leishmaniose Visceral Americana (LVA). Devido a sua importância como vetor, diversos estudos foram conduzidos de forma a verificar o real status taxonômico de *L. longipalpis*. A existência de um complexo de espécies crípticas entre populações brasileiras ainda é conflituosa. No presente trabalho, foram isolados fragmentos de três genes associados à resistência a inseticidas, os genes *paralytic* (*para*), *Acetylcholinesterase* (*Ace*) e *Resistant to dielrin* (*Rdl*). Foi escolhida uma região do gene *para* onde algumas mutações para resistência a piretróides e DDT ocorrem em outras espécies de insetos, para ser utilizada como marcador para estudar populações brasileiras de *L. longipalpis* e para investigar a ocorrência de mutações potencialmente associadas à resistência a inseticidas neste vetor. Amostras das localidades de Sobral (CE), Pancas (ES), Lapinha (MG), Jacobina (BA), Estrela de Alagoas (AL) e Nísia Floresta, Grande Natal (RN) foram analisadas. Os resultados obtidos com o gene *para*, corroboram resultados anteriores mostrando que em Sobral, machos com os fenótipos de uma (1S) e duas (2S) pintas abdominais pertencem a duas espécies crípticas vivendo em simpatria. A ocorrência de diferenças fixas no fragmento estudado entre os dois tipos de machos, torna *para* um marcador molecular muito útil para identificar fêmeas dessas duas espécies em estudos futuros. Os dados apresentados também sugerem que Pancas, Sobral 2S e Natal pertencem à mesma espécie, enquanto Sobral 1S, Lapinha, Jacobina e Estrela 1S, provavelmente representariam quatro outras espécies no Brasil. Os resultados obtidos estão de acordo com estudos anteriores utilizando outros marcadores moleculares, experimentos de cruzamentos, feromônio e análise de som de cópula, e sugerem fortemente a existência de um complexo de espécies entre populações brasileiras de *L. longipalpis*. Esse estudo também representa uma primeira análise do uso de genes de resistência a inseticidas com esse importante vetor da leishmaniose.

ABSTRACT

Sandflies are the vectors of leishmaniasis and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) is the main vector of *Leishmania infantum chagasi*, the causative agent of American Visceral Leishmaniasis (AVL). Because of its importance as a vector, several studies have been carried out to verify the real taxonomic status of *L. longipalpis* and the existence of cryptic sibling species among Brazilian populations is still a controversial issue. Fragments of three genes associated with insecticide resistance were isolated: *paralytic (para)*, *Acetylcholinesterase (Ace)* and *Resistant to dielrin (Rdl)*. In addition, a region of the *para* gene where many pyrethroid and DDT resistance mutations occur in other insect species, was used as a molecular marker to study Brazilian populations of *L. longipalpis* and to investigate the occurrence of mutations potentially associated with insecticide resistance in this vector. Samples from the Brazilian localities of Sobral (CE), Pancas (ES), Lapinha (MG), Jacobina (BA), Estrela de Alagoas (AL) and Nisia Floresta, Great Natal (RN) were analyzed. The results obtained with the *para* gene support previous results showing that in Sobral *L. longipalpis* males carrying one (1S) and two (2S) abdominal spots belong to two sympatric sibling species. The occurrence of fixed differences in the studied gene fragment between the two types of males makes *para* a very useful molecular marker to identify females of these two species in future studies. Data presented here also suggests that Pancas, Sobral 2S and Natal belong to the same sibling species, while Sobral 1S, Lapinha, Jacobina and Estrela 1S probably represent four other sibling species in Brazil. These results are in agreement with previous studies using other molecular markers, crossing experiments, pheromone and copulation song analysis, and strongly support the existence of a species complex among Brazilian populations of *L. longipalpis*. The present study also represents the first analysis of insecticide resistance genes in this important leishmaniasis vector.

ÍNDICE

	Página
1. Introdução.....	01
1.1 O complexo <i>Lutzomyia longipalpis</i>	01
1.2 Resistência a inseticidas.....	05
1.3 Genes de Resistência em <i>L. longipalpis</i>	08
2. Objetivos.....	12
3. Material e Métodos.....	13
3.1 Amostras.....	13
3.2 Preparação de DNA e cDNA.....	13
3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e purificação dos fragmentos.....	14
3.4 Clonagem dos produtos de PCR.....	16
3.5 Sequenciamento.....	17
3.6 Análise dos dados.....	17
4. Resultados.....	19
4.1 Clonagem dos fragmentos dos genes de resistência.....	19
4.2 Genética de populações do gene <i>para</i>	21
5. Discussão.....	39
5.1 Clonagem dos fragmentos dos genes associados à resistência a inseticidas.....	39
5.2 Genética de populações do gene <i>para</i>	40
6. Anexo.....	44
7. Referências Bibliográficas.....	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 O complexo *Lutzomyia longipalpis*

Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) são os vetores das leishmanioses (Tesh & Guzmam, 1996; Munstermann, 2005) e *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) é o principal transmissor da *Leishmania infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937), agente etiológico da Leishmaniose Visceral Americana (LVA). Este vetor possui uma distribuição ampla, porém descontínua, que se estende desde o México (20° Latitude Norte) até o Norte da Argentina (28° Latitude Sul) (Young & Duncan, 1994), existindo um grau considerável de isolamento entre as numerosas populações devido a sua baixa mobilidade assim como às barreiras geográficas e climáticas (Lanzaro *et al*, 1993; Alexander *et al*, 1998).

Após a publicação (post mortem) por Mangabeira (1969) do primeiro artigo sugerindo que este vetor deveria fazer parte de um complexo de espécies, numerosos estudos foram conduzidos de forma a verificar o grau de diferenciação entre populações deste vetor. Mangabeira encontrou diferenças no fenótipo de pintas nos tergitos abdominais de populações de *L. longipalpis* (Figura 1.1). Machos coletados no Estado do Ceará (Nordeste) possuíam duas pintas, uma no terceiro e outra no quarto tergitos abdominal (sendo este fenótipo chamado de 2S)

enquanto machos coletados no Pará (Norte) possuíam apenas uma pinta no quarto tergitos abdominal (fenótipo chamado de 1S). Nesse trabalho também se ressaltou o fato das duas

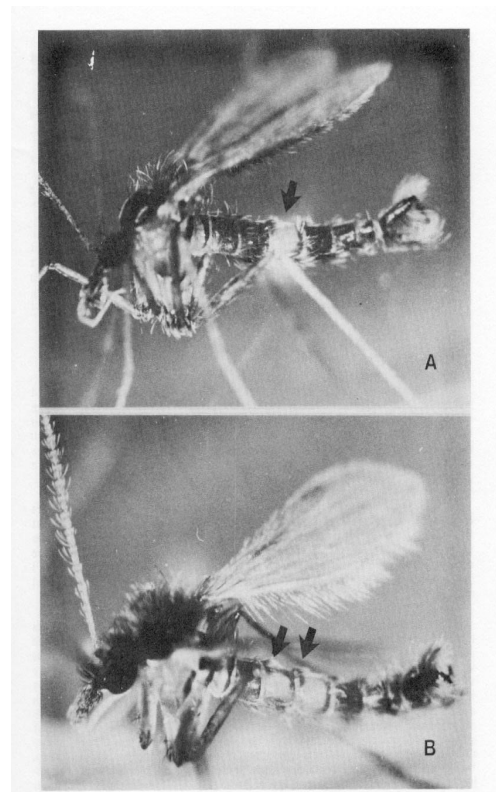


Fig 1.1: Variação no número de pintas nos tergitos abdominais de machos de *L. longipalpis* (retirado de Ward *et al*, 2003)

formas serem encontradas em condições ecológicas distintas e, assim, se especulou que elas poderiam representar diferentes espécies ou variedades.

Devido a sua importância como vetor, diversos estudos morfológicos, comportamentais, bioquímicos, isoenzimáticos e genéticos envolvendo populações de *L. longipalpis* de diferentes localidades foram realizados com a finalidade de esclarecer o status taxonômico desta espécie (Uribe, 1999). Em uma recente revisão feita por Bauzer e colaboradores (Bauzer *et al*, 2007), onde um resumo dos principais trabalhos envolvendo esta espécie foi realizado, todos os estudos comparando amostras da América Central com a América do Sul sugerem que *L. longipalpis* de fato seja um complexo de espécies (e.g. Lanzaro *et al*, 1993; Arrivilaga *et al*, 2003). Contudo, em populações brasileiras, até recentemente a controvérsia com relação à existência de um complexo ainda era grande, já que os resultados obtidos com a análise de cruzamentos e feromônios de um lado (e.g. Ward *et al*, 1983, 1988) e isoenzimas do outro (Mukhopadhyay *et al*, 1998; Mutebi *et al*, 1999; Azevedo *et al.*, 2000) eram contraditórios.

De acordo com os autores contrários a idéia da existência de um complexo, os seus estudos falharam em detectar uma divergência genética suficiente para indicar a presença de uma ou mais espécies no Brasil (Mukhopadhyay *et al*, 1998; Mutebi *et al*, 1999; Azevedo *et al.*, 2000). Contudo, as evidências obtidas com diferentes análises (cruzamentos, feromônios, sinais acústicos e marcadores moleculares), são hoje, a favor da existência de um complexo no Brasil (Bauzer *et al*, 2007).

Ward e colaboradores (1983) testaram, por análise de cruzamentos, populações brasileiras simpátricas e alopátricas que diferiam pelo número de pintas abdominais. Eles observaram que entre duas colônias oriundas de Sobral (Estado do Ceará) com machos possuindo uma (1) e duas (2) pintas havia baixa taxa de inseminação, sugerindo que elas poderiam representar diferentes espécies crípticas em simpatria. Também se verificou uma baixa taxa de inseminação entre colônias contendo machos com duas pintas (2S) de Morada

Nova (CE) e machos contendo uma pinta (1S) de Lapinha (Estado de Minas Gerais) e entre machos 1S da Ilha de Marajó e machos 1S de Lapinha. Esses resultados foram confirmados posteriormente, incluindo outras populações, (Ward *et al*, 1988) e validaram a hipótese de que *L. longipalpis* representa um complexo de espécies no Brasil. Nesse último estudo, Ward e colaboradores também verificaram a presença de uma forma intermediária entre o fenótipo 1S e 2S (uma pequena pinta no terceiro tergito e uma pinta no quarto) em altas frequências em algumas localidades, principalmente na região Nordeste, indicando um polimorfismo que também era verificado entre cruzamentos de estirpes 1S e 2S (sugerindo ser este um caráter semidominante). Ainda que este fenótipo não seja espécie-específico, ele pode ser útil para identificar espécies simpátricas em localidades onde os fenótipos intermediários sejam raros, como em Sobral (Ward *et al*, 1988).

Ao examinar os feromônios produzidos por machos de diferentes populações, Ward e colaboradores encontraram uma correlação positiva entre estes e o isolamento reprodutivo observado em alguns cruzamentos (Ward *et al*, 1988). Análises posteriores mostraram que machos da localidade de Lapinha (MG) produzem o feromônio 9-metilgermacreno-B (Hamilton *et al*, 1996a), de Jacobina (Estado da Bahia) produzem o 3-metil- α -himacaleno (Hamilton *et al*, 1996b) e de Natal (Rio Grande do Norte) produzem cembreno (Souza *et al.*, 2002), também observado em populações do Norte e Nordeste, assim como na Ilha de Marajó (Ward *et al*, 1988). Recentemente um novo tipo de cembreno foi descoberto na população de Jaíba, MG (Hamilton *et al* 2004).

Uma outra evidência corroborando os dados a favor da existência de um complexo de espécies foi obtida analisando o som de cópula produzido por machos de *L. longipalpis* (Souza *et al*, 2002). Em *Drosophila*, durante a corte os machos vibram suas asas produzindo um sinal acústico (Hall, 1994). Esta serenata de amor aumenta a receptividade das fêmeas e foi descrito como um dos sinais que elas usam para reconhecer os machos da própria espécie (Kyriacou & Hall, 1982, 1986). Deste modo, variações neste som de corte são importantes no

isolamento reprodutivo entre espécies próximas de *Drosophila* (Kyriacou & Hall, 1982, 1986; Ritchie *et al*, 1999). Em populações brasileiras de *L. longipalpis*, os dados de som e de feromônio estão correlacionados, sendo dois sinais que podem ter um papel importante no isolamento reprodutivo de espécies próximas (Souza *et al*, 2004; Bauzer *et al*, 2007).

O estudo da especiação críptica é um dos temas mais interessantes em evolução e a sua ocorrência em flebotomíneos tem importantes conseqüências epidemiológicas já que a divergência genética causada pela deriva gênica e/ou seleção natural pode modificar a capacidade vetorial, resultando em algumas populações mais eficientes como vetores que outras (Lanzaro *et al*, 1993; Lanzaro & Warburg, 1995).

Desta maneira, a utilização de marcadores genéticos que possam estar diretamente associados ao processo de especiação se torna particularmente importante. Dentre os marcadores mais interessantes neste aspecto, estão os genes envolvidos no controle do comportamento sexual que foram identificados no inseto modelo para estudos genéticos, *Drosophila melanogaster*.

Alguns genes de *Drosophila* que controlam o som de corte já foram identificados e clonados (Hall, 1994) e dentre estes se destacam *period* e *cacophony*. O gene *period* está envolvido no controle do ritmo circadiano e no som de corte de *Drosophila*. O gene *cacophony* codifica a subunidade α -1 de um canal de cálcio dependente de voltagem e também está envolvido no controle do som de corte de *Drosophila* (Smith *et al*, 1998; Peixoto & Hall, 1998). Estes são, potencialmente, excelentes marcadores genéticos no estudo do processo de especiação não só de *Drosophila* como também de outros insetos que utilizam sinais acústicos durante a corte, como é o caso de flebotomíneos vetores (Ward *et al*, 1988; Souza *et al*, 2002, 2004), e por este motivo eles foram isolados em *L. longipalpis* (Peixoto *et al*, 2001).

Estudos prévios utilizando a região IVS6 do gene *cacophony* mostraram que esta região do gene serviria como um ótimo marcador molecular em estudos de genética de

populações e especiação em flebotomíneos, pois inclui um íntron com alta variabilidade e divergência entre espécies próximas (Lins *et al*, 2002). Isto veio a se confirmar com a análise de populações naturais de *L. longipalpis* (Bottecchia *et al*, 2004), que juntamente com os resultados obtidos com o estudo dos sons de cópula (Souza *et al*, 2002; 2004) e com a análise molecular do gene *period* (Bauzer *et al*, 2002a,b), indicaram a existência de um complexo de espécies crípticas. Estes resultados foram corroborados também com análise de microsátélites (Maingon *et al*, 2003; Watts *et al*, 2005). No entanto, os dados obtidos tanto com *cacophony* como com *period* sugerem a ocorrência de introgressão entre os membros do complexo. Esta observação tem importantes conseqüências epidemiológicas já que torna possível não só a passagem de genes envolvidos na competência vetorial entre uma espécie e outra, como também a disseminação de genes controlando a resistência a inseticidas (Weill *et al*, 2000) que estão sendo ou poderão ser utilizados no controle de *L. longipalpis* (e.g. De Silans *et al*, 1998).

Curiosamente, diversos outros genes que controlam aspectos do som codificam também canais iônicos (Peixoto & Hall, 1998). Estes por suas vez podem estar relacionados à resistência a inseticidas o que os torna marcadores moleculares particularmente importantes no estudo de insetos vetores.

1.2 Resistência a inseticidas

A resistência a inseticidas é uma das mais difundidas alterações genéticas causadas pela atividade humana e representa um dos mais interessantes exemplos da ação da seleção natural. Contudo, nós ainda compreendemos pouco sobre a origem e a distribuição de alelos resistentes em populações naturais de insetos (Daborn *et al*, 2002). A resistência pode ser mediada tanto por mudanças na sensibilidade de alvos de inseticidas no sistema nervoso

central quanto pelo metabolismo dos inseticidas antes que eles atinjam esses alvos (French-Constant *et al*, 1998).

Na resistência do tipo sítio-alvo, as causas mais comuns de resistência são as mutações pontuais não silenciosas em genes estruturais. Para que a seleção da mutação venha a ocorrer, a mudança de aminoácido resultante deve reduzir a ligação do inseticida sem causar a perda de sua função primária (Hemingway & Ranson, 2000). Nesse exemplo de resistência podemos citar os casos da Acetilcolinaesterase (*Ace*), dos receptores GABA (ácido gama amino butírico) e dos canais de sódio. Os organofosfatos e os carbamatos são alvo da acetilcolinaesterase, que hidrolisa o neurotransmissor excitatório acetilcolina na membrana nervosa pós-sináptica (Hemingway & Ranson, 2000). Alterações na acetilcolinaesterase em insetos resistentes a organofosfatos e carbamatos resultam em um decréscimo na sensibilidade à inibição da enzima por esses inseticidas (Ayad & Georghiou, 1975). Em insetos, o receptor GABA é um canal iônico de cloro heteromultimérico, um canal de neurotransmissão inibitória no sistema nervoso e nas junções neuromusculares (Bermudez *et al*, 1991). Esse receptor está envolvido como sítio de ação para piretróides e avermectinas, assim como para ciclodienos. Esses inseticidas exercem seu efeito ao interagir com o ionóforo de cloro associado ao receptor GABA (Bloomquist, 1994). No caso dos canais de sódio, o efeito farmacológico do DDT e do piretróide é de causar uma ativação persistente do canal, adiando o mecanismo de voltagem-dependente normal de inativação (Soderlund & Bloomquist, 1989).

Na resistência metabólica, há um aumento da expressão de enzimas capazes de promover uma detoxificação frente aos inseticidas ou a substituição de aminoácidos nestas enzimas, que pode alterar a afinidade da enzima para o inseticida, podendo resultar em altos níveis de resistência a inseticidas. Um aumento da expressão de genes codificando as principais enzimas que metabolizam xenobióticos são a causa mais comum da resistência a inseticidas em mosquitos. O aumento da produção dessas enzimas pode ter um menor custo

adaptativo do que aquele associado a alterações em genes estruturais porque a função primária da enzima não é perdida (Hemingway & Ranson, 2000).

Três grandes grupos de enzimas são responsáveis pela resistência metabólica: as DDT-dehidroclorinasas (anteriormente conhecidas como glutathione S-transferase), conferindo resistência a inseticidas da classe dos organoclorados, organofosfatos, carbamatos e piretróides; as esterases, conferindo resistência aos organofosfatos, carbamatos e, em menor escala aos piretróides e as monooxigenases, envolvidas no metabolismo de piretróides, na ativação e/ou detoxificação de organofosfatos e em menor escala aos carbamatos (Hemingway & Ranson, 2000).

Os inseticidas desempenham um papel central no controle dos principais vetores de doenças tais como: mosquitos, flebotomíneos, pulgas, piolhos, moscas tsé-tsés e triatomíneos. Contudo, desde a introdução de potentes inseticidas sintéticos em programas de saúde, o principal problema técnico foi o desenvolvimento de resistência. O surgimento e o grau de resistência encontrado em populações de insetos vetores é dependente tanto do volume quanto da frequência das aplicações de inseticidas usados contra eles e as características do ciclo de vida das espécies de insetos envolvidas. Os mosquitos, por exemplo, possuem todas as características para o desenvolvimento rápido de resistência, incluindo ciclo de vida curto com progênie abundante (Hemingway & Ranson, 2000). Atualmente, uma maior ênfase em pesquisa associada à resistência é dada aos seus mecanismos moleculares, ao seu manejo racional, enfatizando o controle do desenvolvimento a dispersão de populações de vetores resistentes (Hemingway & Ranson, 2000).

1.3 Genes de Resistência em *L. longipalpis*

Em flebotomíneos, a resistência a inseticidas tem sido pouco estudada e poucos casos foram registrados. Dois deles envolvem a resistência a DDT em *Phlebotomus papatasi* na Índia (El-Sayed *et al*, 1989; Das Gupta *et al*, 1995) e um outro envolve o aumento de esterases e redução da sensibilidade da acetilcolinaesterase em *P. argentipes* (Surendran *et al*, 2005). Em *L. longipalpis* a ocorrência de resistência ainda não foi estabelecida e não está claro se isto se deve a sua inexistência ou ao pequeno número de estudos com este vetor nesta área.

Neste projeto propusemos isolar fragmentos de três genes envolvidos com essa característica: a) o gene *paralytic (para)*, que codifica a subunidade α de um canal de sódio (Loughney *et al*, 1989; Littleton & Ganetzky, 2000) e está envolvido não só no controle do som de corte (Peixoto & Hall, 1998) como também na resistência a inseticidas da classe dos piretróides (Pittendrigh *et al*, 1997). A região de maior interesse se localiza na sexta subunidade do segundo domínio (IIS6), onde uma das mutações que promove resistência já foi caracterizada e é conservada ao longo de vários táxons (L1029H) (Figura 1.2); b) o gene Acetilcolinaesterase (*Ace*), que codifica a enzima de mesmo nome e que participa na sinapse nervosa ao hidrolisar o neurotransmissor excitatório acetilcolina na membrana nervosa pós-sináptica (Hemingway & Ranson, 2000) e está envolvido na resistência a organofosfatos e carbamatos (Ayad & Georghiou, 1975). A Figura 1.3 mostra a localização aproximada do fragmento que contém uma das mutações conservadas (F368Y); c) o gene *resistant-to-dieldrin (Rdl)*, que codifica o receptor GABA em insetos (Bermudez *et al*, 1991) e está envolvido principalmente como sítio de ação para ciclodienos (Bloomquist, 1994). O fragmento que contém o sítio já descrito como responsável pelo fenótipo de resistência (A302S) está contido no exon 7 (Figura 1.4) que codifica o domínio transmembrana M2 do

canal (Figura 1.5). A Figura 1.6 mostra as mutações pontuais no sítio 302 (A → S) no gene *Rdl* que substituem o mesmo aminoácido ao longo de diferentes espécies de insetos

Em um segundo momento projetamos utilizar o gene *para* como marcador molecular para analisar a variação molecular na região IIS6 em populações de *L. longipalpis* e verificar a existência de mudanças de aminoácidos possivelmente associadas à resistência. Além disso, esta região seria utilizada para estudar a diferenciação entre algumas populações brasileiras do Complexo *L. longipalpis*.

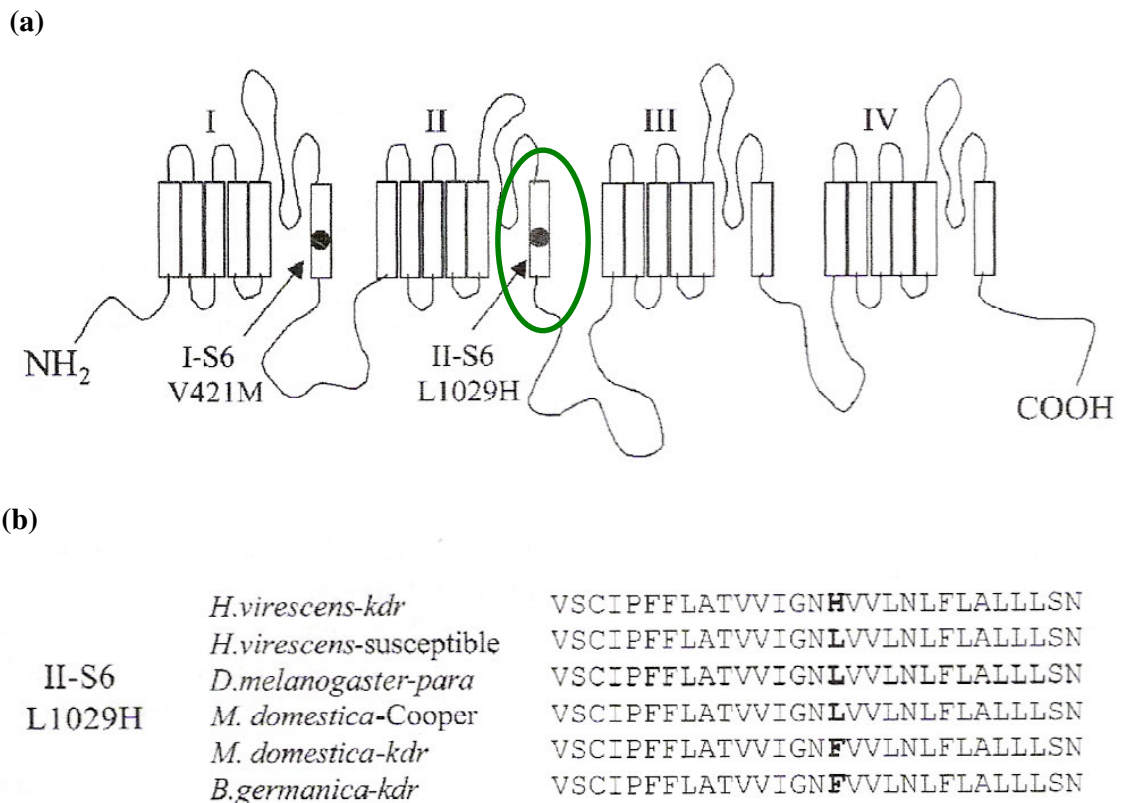


Figura 1.2: (a) Subunidade α do canal de sódio codificado pelo gene *para*. A região envolvida pelo círculo em verde (II-S6) posiciona o local do fragmento obtido incluindo o sítio onde a mutação (L → H) para resistência ocorre ao longo de vários táxons (b) (retirado de Zhao *et al*, 2000).

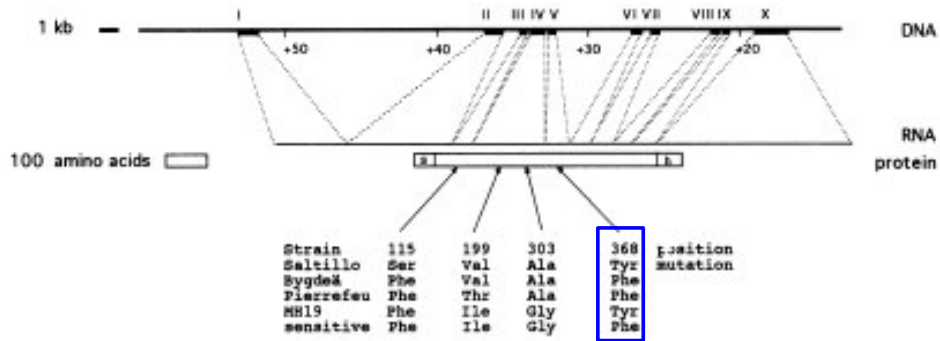


Figura 1.3: Localização aproximada da mutação (F → Y) conservada no gene *Ace* que confere resistência a inseticidas. O retângulo azul evidencia a posição conservada da ocorrência da mutação em diversas linhagens de *Drosophila*. Na figura, a linha de cima mostra as regiões genômicas que codificam a proteína madura, os exons estão numerados de I-X. A parte inferior esquematiza a sequência da proteína com as posições das mutações mostradas abaixo (retirado e de Mutero *et al*, 1994, com adaptações)

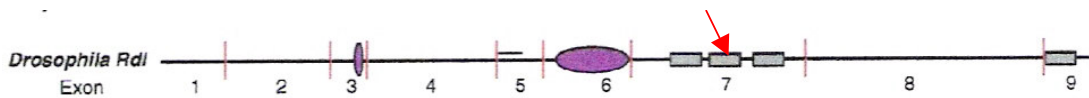


Figura 1.4: Localização do exon que codifica a região M2 onde a mutação para resistência no gene *Rdl* ocorre (exon 7, seta em vermelho) (adaptado de Hosie *et al*, 1997).

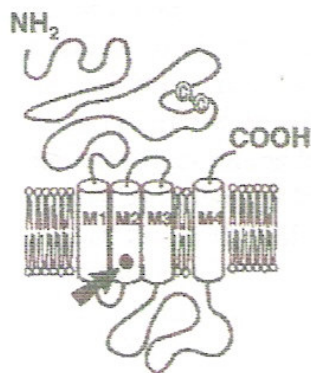


Figura 1.5: Esquema do canal de cloro codificado pelo gene *Rdl* e a localização do domínio transmembrana M2 onde a mutação conservada (A → S) para resistência ocorre (seta em preto) (retirado de ffrench-Constant, 1999).

	Amino acid	L	N	R	N	A	T	P/L	A	R	V	S/G	L	G	V	T	T
<i>D. melanogaster</i>	S	CTC	AAT	CGC	AAT	GCA	ACG	CCG	GCG	CGT	GTG	GCG	CTC	GGT	GTG	ACA	ACC
<i>D. simulans</i> allele 1	R	CTC	AAT	CGC	AAT	GCA	ACG	CCG	GCG	CGT	GTG	T CG	CTC	GGT	GTG	ACA	ACC
												↑ S					
<i>D. simulans</i> allele 2	S	CTC	AAT	CGC	AAT	GCA	ACG	CCG	GCG	CGT	GTG	GCG	CTC	GGT	GTG	ACA	ACC
	R	CTC	AAT	CGC	AAT	GCA	ACG	CCG	GCG	CGT	GTG	G GG	CTC	GGT	GTG	ACA	ACC
												↑ G					
Housefly	S	CTT	AAT	CGT	AAT	GCT	ACA	CCA	GCC	CGT	GTA	GCT	TTA	GGT	GTC	ACC	ACT
	R	CTT	AAT	CGT	AAT	GCT	ACA	CCA	GCC	CGT	GTA	T CT	TTA	GGT	GTC	ACC	ACT
												↑ S					
Red flour beetle	S	CTG	AAT	CGT	AAC	GCT	ACT	CTC	GCC	AGA	GTG	GCT	CTG	GGG	GTC	ACC	ACC
	R	CTT	AAT	CGT	AAT	GCT	ACA	CCA	GCC	CGT	GTR	T CT	TTA	GGT	GTC	ACC	ACT
												↑ S					
German cockroach	S	CTG	AAC	CGC	AAY	GCG	ACG	CCC	GCC	CGA	GTC	GCC	CTC	GGG	GTT	ACC	ACT
	R	CTS	AAC	CGC	AAT	GCG	ACG	CCC	GCC	CGA	GTC	T CC	CTC	GGG	GTT	ACC	ACT
												↑ S					
Yellow fever mosquito	S	CTA	AAT	AGA	GAT	GCT	ACA	CCA	GCA	CGT	GTT	GCA	TTA	GGT	GTA	ACC	ACT
	R	CTA	AAT	AGA	GAT	GCT	ACA	CCA	GCA	CGT	GTT	T CA	TTA	GGT	GTA	ACC	ACT
												↑ S					

TRENDS in Genetics

Figura 1.6: Mutações pontuais no gene *Rdl* que substituem o mesmo aminoácido ao longo de várias espécies de insetos. A resistência está associada com a substituição da alanina na posição 302 por serina (maior frequência) ou glicina. As setas indicam as posições onde as substituições ocorrem (retirado de ffrench-Constant *et al*, 2004).

2. OBJETIVOS

- 2.1 Isolar e sequenciar em *L. longipalpis* fragmentos homólogos aos genes *paralytic (para)*, *Acetilcolinaesterase (Ace)* e *resistant-to-dieldrin (Rdl)*.
- 2.2 Analisar a variação molecular na região IIS6 do gene *para* em populações de *L. longipalpis* para verificar a existência de mudanças de aminoácidos possivelmente associadas à resistência.
- 2.3 Utilizar o gene *para* como marcador molecular para estudar a diferenciação entre algumas populações brasileiras do Complexo *L. longipalpis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Amostras

Neste trabalho, foram analisadas as populações da localidade de Sobral - CE (40,5^o O; 3,7^o S) onde estudos com cruzamentos, feromônios, som de cópula, *period* e *cacophony* (Ward *et al*, 1988; Souza e Peixoto; resultados não publicados; Bauzer *et al*, 2002b; Bottecchia *et al* 2004) indicam a ocorrência em simpatria de duas espécies do complexo que diferem no padrão de manchas abdominais dos machos (um ou dois pares de pintas). Estudamos também, a população de Pancas – ES (40,8^o O; 19,2^o S), onde já foram utilizados inseticidas da classe dos piretróides (Dr. Aloísio Falqueto, comunicação pessoal) para se determinar a existência ou não de alelos carregando mutações semelhantes àquelas identificadas em outros insetos. Também foram incluídas as populações da gruta da Lapinha (Lagoa Santa - MG) (43,9^o O; 19,6^o S), Jacobina – BA (40,6^o O; 11,1^o S), Estrela de Alagoas - AL (36,8^o O; 9,4^o S) e Nisia Floresta - Grande Natal, RN (35,2^o O; 6^o S). As amostras usadas são provenientes de captura diretamente do campo, mantidas em álcool 96 % ou congeladas a -20^o C até a análise.

3.2 – Preparação de DNA e cDNA

Na obtenção dos fragmentos iniciais do gene *Ace* de *Drosophila*, foi utilizado DNA genômico de *L. longipalpis* preparado com o kit *Genomic Prep – Cells and Tissue DNA Isolation Kit* (Amersham Biosciences) seguindo o protocolo do fabricante. Devido às dificuldades iniciais encontradas na obtenção dos fragmentos dos demais genes estudados, optamos por utilizar cDNA ao invés de DNA genômico, com o objetivo de reduzir os sítios de ligação possíveis para os oligos dos genes *para* e *Rdl*. Na preparação do cDNA, utilizamos o kit *Quick prep Micro mRNA Purification Kit* (Amersham Biosciences) para o isolamento do

RNA e o kit *First Strand cDNA Synthesis kit* (Amersham Biosciences) para a síntese do cDNA.

Para as demais análises, o DNA genômico individual foi preparado com um método rápido semelhante ao descrito por Jowett (1998). O espécime inteiro foi macerado em 50µl de Buffer Sq (Triton X-100 0,2%, Tris-HCl 10 mM pH 8,2, EDTA 2 mM), adicionando-se, ao final, 1µl de proteinase K (20 mg/mL). As amostras ficaram incubando por 1 h, sendo posteriormente aquecidas a 95^oC por cerca de 10 minutos para a completa inativação da proteinase K antes do seu uso no PCR.

3.3- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Purificação dos fragmentos

A amplificação dos fragmentos iniciais deste trabalho foi obtida com a técnica de PCR com oligos degenerados. As soluções para a reação incluíam: 4,0 µl de tampão 10X (10 mM Tris-HCl pH 8,5; KCl 50 mM e MgCl₂ 1,5 mM), 0,4 µl de Taq DNA polimerase (5 unidades / µl, AB gene), 0,8 µl de dNTPs (10 mM cada), 8 µl de cada oligo (10 µM), 4 µl de DNA genômico (no caso do gene *Ace*) ou 4 µl de cDNA (no caso dos genes *para* e *Rdl*) (concentrações exatas desconhecidas em ambos os casos), 3 µl de MgCl₂ (25 µM) e água mili-Q até completar o volume de 40 µl. Na obtenção destes fragmentos houve a necessidade de reamplificação, onde os componentes foram mantidos, exceto a substituição do DNA / cDNA por 5 µl da primeira reação de PCR. As condições de temperatura foram idênticas para os genes *Ace* e *Rdl* na amplificação e reamplificação: desnaturação inicial de 95° C por 3 minutos; 30 ciclos de 95° C por 30 segundos de desnaturação, 50° C de anelamento por 30 segundos e 72° C por 30 segundos de extensão; ao final, a temperatura era reduzida a 4° C até que as amostras fossem retiradas do termociclador. Devido ao insucesso inicial ao tentar amplificar fragmentos do gene *para* usando essas condições de temperatura, recorremos ao método *touchdown* na amplificação e reamplificação segundo as condições: 94° C por 3 minutos de desnaturação inicial; 15 ciclos de 94° C por 1 minuto de desnaturação, 50° C por

90 segundos de anelamento (com o decréscimo de 1 grau por ciclo) e 72° C por 1 minuto de temperatura de extensão; seguidos de 20 ciclos de 94° C por 1 minuto, 50° C por 90 segundos e 72° C por 1 minuto; ao final, reduzindo a temperatura a 4° C até que as amostras fossem retiradas do termociclador.

Na amplificação do gene *Ace* testamos diversos pares de oligos correspondentes a regiões já estudadas em outros modelos e que contem mutações associadas à resistência, entretanto, apenas o par de oligos descrito a seguir amplificou um dos fragmentos desejados: 5acedegC (5' - ACNATGAAAYGCNCCNTG - 3') cujo fragmento traduzido corresponde a seqüência de aminoácidos "TMNAPW" e 3acedegC (5' - CNCCRTCDATNGTNGG - 3') correspondente ao fragmento traduzido "PTIDGA". Para o gene *para* usamos: 5paraIdegC (5' - TGGAAYYTYACNGAYTT - 3') cujo fragmento traduzido corresponde a "WNFTDF" e 3paraIdegB (5' - TTRTTNGTRTCRTTRTC - 3') correspondente ao fragmento traduzido "DNDTNK"; na amplificação do fragmento do gene *Rdl* foram usados os oligos: 5rdl degB (5' - TGGGTNWSNTTYTGGYT - 3') equivalente ao fragmento traduzido "WVSFWL" e 3rdldegA (5' - GCRAANACCATNACRAA - 3') equivalente a "FVMVFA".

A partir do fragmento inicial do gene *para* gerado pela técnica de PCR com oligos degenerados, foi desenhado um par de oligos específicos que foram utilizados para amplificar fragmentos deste gene em todas as populações estudadas, sendo eles: 5lpara2 (5' - ACGGACTTCATGCATTCATTC - 3') e 3lpara1 (5' - TGGTGCTGATAAACTTGACG - 3'). Para essas análises utilizamos o PCR Master Mix (Promega), por ser mais prático e diminuir as chances de contaminação, com as seguintes quantidades por amostra: 25 µl de PCR Master Mix, 5 µl de cada oligo (10 µM), 4 µl de DNA genômico (concentração desconhecida) e 11 µl de água mili-Q para completar os 50 µl de volume final. Nesse caso, as condições de temperatura foram: 95° C por 3 minutos de desnaturação inicial; 35 ciclos de 95° C por 30 segundos, 60° C por 30 segundos e 72° C por 30 segundos; ao final, a temperatura

era reduzida a 4° C até que as amostras fossem retiradas do termociclador. Foram feitos controles negativos em todas as reações.

A eletroforese das reações de PCR (em média foram usados 10 µl) foi realizada em gel de agarose a 2% com brometo de etídio (0,05 µg / 100 ml), utilizando-se TAE 1X (Tris-Borato EDTA 1X) como tampão de corrida a aproximadamente 120V. Como marcador de peso molecular foi usado o *100 Base-Pair Ladder* (Amersham Biosciences) e como corante de corrida o *Gel loading solution* (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%, sacarose 40%). Os géis foram posteriormente fotografados em transiluminador UV.

Os fragmentos iniciais foram purificados com o kit *Wizard PCR Preps DNA Purification System* (Promega). Os fragmentos do gene *para* usados nas análises posteriores foram purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean System* (Promega) ambos de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.4 – Clonagem dos produtos de PCR

Todos os fragmentos gerados foram ligados a vetor plasmidial com o kit *pMosblue blunt-ended cloning kit* (Amersham Biosciences) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante com redução dos volumes à metade nas análises de populações. As ligações foram usadas na transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5-α e colocadas para crescer em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg / µl), X-gal (2%) e IPTG (100 mM). As colônias brancas e / ou azul claras foram inoculadas em meio LB líquido (1,5 a 3 ml) ou meio SOC (80 µl para cada 20 µl de célula) com ampicilina (75 µg / µl) e colocadas sob agitação (cerca de 200 RPM) por 16-22 horas a 37° C. As células foram centrifugadas e os *pellets* foram guardados a -20° C até o isolamento do DNA plasmidial, onde foi utilizado o kit *Flexiprep* (Amersham Biosciences) ou utilizando o método de mini-preparação em microplacas de 96 poços, com o uso da técnica da lise alcalina (Sambrook & Russel, 2001) e filtrados em placa Millipore (Multiscreen – filter plates).

O DNA plasmidial dos fragmentos isolados previamente (10 µl) e de amostras das placas (5 µl) foi digerido em 20 µl com 0,5 µl das enzimas EcoRI (12 u / µl, Promega) e PstI (10 u / µl, Promega) seguindo as instruções dos fabricantes. As digestões foram separadas em eletroforese de gel de agarose conforme descrito acima para verificar a presença do fragmento de interesse. Os clones com inserto foram seqüenciados.

3.5 – Seqüenciamento

Os primeiros fragmentos homólogos aos genes de resistência de *Drosophila* foram seqüenciados através de uma colaboração com a Universidade de Leicester, Reino Unido.

As demais reações de seqüenciamento foram feitas utilizando o kit *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.0 e v3.1* (Applied Biosystems) juntamente com o oligo M13 forward (New England Biolabs). Foram utilizados dois seqüenciadores, o ABI Prism 337 DNA Sequencer com géis de acrilamida a 4,75% e o ABI 3730 de 48 capilares.

Para amostras seqüenciadas no ABI Prism 377 foram utilizados 25 ciclos na reação e 40 ciclos para amostras seqüenciadas no ABI 3730. As condições dos ciclos são: 96° C por 10 segundos, 50° C por 5 segundos e 60° C por 4 minutos. Os produtos seqüenciados foram purificados seguindo o método de precipitação por etanol, sendo, ao final, ressuspendidos em *Blue Dextran* com formamida (na proporção de 1:5) ou formamida HiDi (Applied Biosystem) e desnaturados a 95° C.

3.6 – Análise dos dados

As seqüências geradas foram editadas e alinhadas com o auxílio do pacote de programas GCG (Wisconsin Package Version 9.1, Genetic Computer Group, Madison – Wisconsin, USA).

Para os fragmentos dos genes de resistência isolados inicialmente, somente no caso do gene *Ace* obtivemos apenas uma seqüência. No caso do gene *para*, utilizamos as seqüências obtidas para elaborar um consenso que serviu de molde para que oligos específicos fossem desenhados para uso posterior.

Para o estudo de genética de populações utilizando o gene *para* como marcador, foram construídos alinhamentos de no mínimo 3 e no máximo 8 seqüências por indivíduo a fim de se obter um consenso e, sempre que possível, se determinar os dois alelos (chamados de haplótipos A e B).

A análise dos polimorfismos e estruturação populacional foi realizada usando o programa DnaSP versão 4.10.4 (Rozas & Rozas, 1999) e com o programa Proseq versão 2.9 (Filatov & Charlesworth, 1999). As análises filogenéticas foram realizadas com o programa Mega 3.1 (Kumar et al, 2001).

A análise da correlação entre as distâncias genéticas medidas pelos valores de F_{st} entre os genes *para* e o gene *period* (Araki, 2005; Bauzer *et al*, 2002a, b e c) foi realizada através da utilização do teste de Mantel, disponível no programa *Mantel version 2.0 – Mantel nonparametric test calculator* (Liedloff, 1999).

4. RESULTADOS

4.1 – Clonagem dos fragmentos dos genes de resistência

Foram obtidos diversos clones com insertos dos genes *para* e *Rdl*. As seqüências dos fragmentos gerados foram alinhadas para cada gene e o consenso destes alinhamentos foi utilizado para as análises subseqüentes.

No caso do gene *Ace*, foram testados diversos pares de oligos em diferentes regiões onde as mutações já caracterizadas e associadas à resistência ocorrem em posições conservadas em diversos táxons. Diversos clones foram seqüenciados, entretanto, desses, apenas um (1) obteve fragmento homólogo a uma das regiões do gene *Ace*. Esse fragmento foi utilizado para as análises subseqüentes.

A homologia dos fragmentos dos genes de resistência gerados, foi confirmada com a utilização do banco de dados BlastX (www.ncbi.nlm.nih.gov), que compara a seqüência nucleotídica de entrada traduzida em todos os quadros de leitura com um banco de dados de seqüências protéicas. O programa fornece também, os valores de similaridade e identidade entre as duas seqüências, conforme pode ser observado nas figuras abaixo mencionadas.

A Figura 4.1 mostra um dos resultados obtidos com a utilização do programa BlastX usando a seqüência consenso do fragmento do gene *para* obtido em *L. longipalpis* com *D. melanogaster*. Como observado, a similaridade entre as duas seqüências é de 98% e a identidade é também de 98%.

A Figura 4.2 mostra um dos alinhamentos gerados pelo programa Blastx através da comparação entre a seqüência do fragmento do gene *Ace* gerado de *L. longipalpis* e *D. melanogaster*. O valor médio de similaridade é de 91,7% (66/72) e o de identidade é de 79,2% (57/72).

A Figura 4.3 mostra um dos alinhamentos obtidos com a utilização do programa BlastX entre a seqüência consenso do fragmento do gene *Rdl* de *L. longipalpis* e *D. melanogaster*. O valor de similaridade é de 98% e de identidade é de 98%.

Para uma comparação mais detalhada as seqüências dos fragmentos gerados foram traduzidas e as respectivas proteínas foram alinhadas com as seqüências protéicas de *D. melanogaster* já conhecidas.

O alinhamento da proteína gerada pelo fragmento traduzido do gene *para* de *L. longipalpis* com *D. melanogaster* é mostrado na Figura 4.4. Conforme observado, este fragmento é bastante conservado, havendo apenas uma substituição de aminoácido (posição 30, Y → L) quando comparado com *Drosophila*. A posição do íntron em relação a *Drosophila* também é conservada.

Conforme citado anteriormente, através do alinhamento das seqüências obtidas inicialmente do gene *para*, e a geração de uma seqüência consenso, foram desenhados oligos específicos para as análises de genética de populações na segunda parte do trabalho. A seqüência destes *oligos* específicos pode ser visualizada na seção de Materiais e Métodos.

A Figura 4.5 mostra o alinhamento da proteína do gene *Ace* de *D. melanogaster* e daquela obtida através da tradução do fragmento desse gene em *L. longipalpis*. Algumas substituições de aminoácidos podem ser observadas nas regiões próximas a posição do intron, como mostra a figura. Resultados semelhantes foram obtidos quando este fragmento traduzido de *L. longipalpis* foi alinhado com a proteína conhecida de *Anopheles gambiae*. O fragmento nucleotídico do gene *Ace* de *L. longipalpis* apresenta um íntron de cerca de 200 pb e sua posição também é conservada quando comparada com *D. melanogaster*.

A Figura 4.6 mostra o alinhamento do fragmento traduzido do gene *Rdl* obtido em *L. longipalpis* com a seqüência conhecida de *D. melanogaster*. Como mostrado na figura, esta região é bastante conservada, havendo também, apenas uma substituição de aminoácido (posição 3, S → R).

Nas Figuras 4.4, 4.5 e 4.6, os oligos degenerados estão destacados com cores diferentes. A posição do íntron, quando é o caso, está indicada por um triângulo invertido (▼). Também se encontram destacadas em cinza, as posições conservadas onde as mutações associadas à resistência ocorrem.

4.2 – Genética de populações do gene *para*

No estudo de genética de populações foram analisadas 707 seqüências com cerca de 417 pares de base (pb) do gene *para* em *L. longipalpis*. Este fragmento inclui um intron com cerca de 215 pb.

Foram obtidas 155 seqüências consenso de diferentes populações de *L. longipalpis* (representando um ou dois alelos por indivíduo) sendo 27 seqüências correspondentes à população de Sobral 1S, 22 de Sobral 2S, 21 de Lapinha, 18 de Jacobina, 24 de Natal, 14 de Estrela 1S com dois indivíduos com o fenótipo de pintas intermediário (Estint1A e Estint2A) e 29 de Pancas.

Foram analisados 377 sítios, onde 50 (13,26 %) foram variáveis. A Figura 4.7 mostra um alinhamento dos sítios polimórficos observados nos diferentes haplótipos gerados. A maior parte da variação é encontrada no intron que possui também diversas regiões com bases cuja repetição variava em diversas populações, gerando seqüências com tamanhos diferentes.

Constatou-se também um pequeno número de substituições sinônimas e não – sinônimas. A Figura 4.8 mostra um alinhamento da seqüência de aminoácidos do primeiro (a) e segundo (b) exons. Conforme pode ser observado nas figuras 4.7 e 4.8, há quatro substituições sinônimas (três no primeiro exon, posição 5: t → c; 7: c → t; 31: g → a, e uma (1) no segundo exon, posição 41: t → c) e duas substituições não-sinônimas (uma no primeiro exon, posição 38: t → c, gerando a substituição de N → K apenas no haplótipo sob2s17B e uma no segundo exon, posição 58: t → a, havendo a substituição de N → K nos haplótipos

sob2s14A e B). A maior parte das substituições ocorre em terceira base, com exceção da segunda substituição sinônima (Leu: CTG → TTG) que ocorre em primeira base.

A Tabela 4.1 mostra o número de sítios segregantes (S), a diversidade nucleotídica (π), o parâmetro neutro (θ) e o valor calculado do teste de Tajima, D_T (1989), que contrasta a diversidade nucleotídica (π) com o parâmetro neutro (θ). Os valores de π e θ encontrados traduzem um baixo grau de polimorfismo encontrado nas seqüências analisadas, sendo Lapinha a menos polimórfica ($S = 2$, $\pi = 0,0017$ e $\theta = 0,0015$) e Estrela 1S a com valores mais representativos ($S = 5$, $\pi = 0,0056$, $\theta = 0,0043$). Esta população foi uma das mais polimórficas analisadas por Araki (2005).

Os valores do teste de Tajima (D_T) não indicaram desvios significativos ao modelo neutro para a maioria das populações, exceto para a população de Sobral 1S cujo valor do teste foi significativo (ver Tabela 4.1).

A Tabela 4.2 mostra as estimativas de diferenciação par-a-par entre as populações de *L. longipalpis* estudadas. Os valores de F_{st} encontrados foram altos em geral, indicando uma diferenciação genética significativa na maioria das comparações realizadas, exceto para o grupo de populações formado por Pancas, Natal e Sobral 2S. Os resultados obtidos através das análises com estas populações indicam uma diferenciação menor ou não significativa, estando de acordo com os resultados obtidos por Araki (2005) ao comparar a população de Pancas com àquelas analisadas anteriormente por Bauzer e colaboradores (2002 a, b). Foi verificada ainda, uma grande diferenciação ao se comparar este grupo de populações com as de Lapinha, Sobral 1S, Jacobina e Estrela 1S.

As comparações entre os dois tipos morfológicos da população de Sobral, revelam uma diferenciação muito grande entre os tipos 1S e 2S ($F_{st} = 0,7657$, $N_m = 0,0765$, $p < 0,001$), sendo semelhante ao resultado encontrado por Bauzer e colaboradores (2002b) ao analisar estas mesmas populações utilizando o gene *period* como marcador ($F_{st} = 0,3952$, $N_m = 0,3827$, $p < 0,001$). De fato, o teste de Mantel (Ledloff, 1999) indicou uma correlação positiva

e significativa ($r = 0,8269$, $p < 0,05$) entre os valores de F_{st} do gene *period* (Araki, 2005; Bauzer *et al*, 2002a, b e c) e do gene *para* com todas populações de *L. longipalpis* estudadas.

A Figura 4.9 mostra uma análise das populações simpátricas da localidade de Sobral, Sobral 1S e Sobral 2S, realizada mediante a construção de uma árvore através do programa Mega 3.1 (Kumar *et al*, 2001) e as seqüências consenso dessas populações, utilizando-se a distância p (que mede a proporção de diferenças encontradas por sítio em relação ao total de sítios analisados na comparação de pares de seqüências) e o método de Evolução Mínima (nesse método, a soma (S) de todos os tamanhos de braços estimados é computada para todas as topologias plausíveis [ou testadas na procura heurística], e a topologia que tiver o menor valor de S é escolhida como a melhor árvore). Seguindo o mesmo perfil que agrupamentos descritos anteriormente por Araki (2005) e Bauzer e colaboradores (2002 b e c) utilizando o gene *period* como marcador molecular, estas populações foram separadas com um alto valor de *bootstrap* (análise estatística de reamostragem que indica a confiabilidade de um determinado agrupamento), de 87%.

A Figura 4.10 mostra uma outra árvore construída com as seqüências de todas as populações deste trabalho e utilizando a distância p e o método de Evolução Mínima. Para a construção dessa árvore foi utilizado o alinhamento das 155 seqüências consenso obtidas para cada amostra conforme mencionado anteriormente. Uma quantidade razoável de valores de *bootstrap* foi inferior a 50%, provavelmente devido ao alto número de seqüências e ao pequeno número de sítios polimórficos, porém, os agrupamentos refletem resultados consistentes com análises realizadas anteriormente envolvendo essas populações e outros marcadores genéticos.

Nesta árvore, seguindo o mesmo perfil encontrado por Bauzer (2002c) e Araki (2005), é possível observar um agrupamento entre as seqüências de Natal, Sobral 2S e Pancas de um lado (em amarelo) e, de outro formado pelas seqüências de Lapinha, Jacobina, Sobral 1S e a maior parte das seqüências de Estrela 1S.

Um aspecto interessante que deve ser ressaltado é o fato de quatro seqüências (estint1A, estint2A, est1s8A e B) referentes à população de Estrela 1S terem se agrupado ao grupo que contém Sobral 2S, Natal e Pancas. As seqüências estint1A e estint2A como mencionado anteriormente, são referentes a indivíduos homozigotos que possuem o fenótipo intermediário de pintas e o fato delas terem se agrupado com Sobral 2S, Natal e Pancas está de acordo com os resultados obtidos por Araki (2005), que incluiu em suas análises a comparação entre os três tipos morfológicos da população de Estrela (1S, 2S e intermediário) e os dados de Bauzer e colaboradores (2002a, b).

A Figura 4.11a mostra a relação entre todas as populações através de uma árvore construída utilizando os valores de Dxy (divergência bruta) e o método de Neighbour-Joining (Saitou & Nei, 1987), (que a partir de um algoritmo gera uma árvore igual à obtida pelo método de Evolução Mínima quando o número de seqüências não é muito grande). Pode ser observada claramente a presença de dois grupos marcantes, um contendo as populações de Pancas, Natal e Sobral 2S e outro contendo as demais. Resultados semelhantes foram obtidos para a árvore construída com o mesmo método e os valores de Fst (Figura 4.11b). Novamente, este agrupamento está em consonância com os resultados obtidos por Araki (2005) com estas e outras populações.

[gi|403447|gb|AAB59195.1|](#) sodium channel alpha subunit [Drosophila melanogaster]
Length=2131

Score = 164 bits (415), Expect = 1e-39
Identities = 78/79 (98%), Positives = 78/79 (98%), Gaps = 0/79 (0%)
Frame = -1

```
Query 237  WNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVVLNLFALLL 58
          WNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCM VGDVSCIPFFLATVVIGNLVVLNLFALLL
Sbjct 981  WNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVVLNLFALLL 1040

Query 57    SNFGSSSLAAPTADNDTNK 1
          SNFGSSSLAAPTADNDTNK
Sbjct 1041  SNFGSSSLAAPTADNDTNK 1059
```

Figura 4.1: Alinhamento do fragmento traduzido do gene *para* de *L. longipalpis* com *D. melanogaster* gerado através do programa BlastX.

[gi|113036|sp|P07140|ACES_DROME](#) Acetylcholinesterase precursor (AChE)
[gi|7536|emb|CAA29326.1|](#) unnamed protein product [Drosophila melanogaster]
Length=649

Score = 70.5 bits (171), Expect(2) = 1e-23
Identities = 32/39 (82%), Positives = 35/39 (89%), Gaps = 0/39 (0%)
Frame = +2

```
Query 209  SPVLVMECMQNVDKATISVQQWNSYSGILGFPSAPTIDG 325
          +P VM CM++VDKATISVQQWNSYSGIL FPSAPTIDG
Sbjct 338  NPAHVMSCMRSVDKATISVQQWNSYSGILSFPSAPTIDG 376
```

Score = 61.6 bits (148), Expect(2) = 1e-23
Identities = 25/33 (75%), Positives = 31/33 (93%), Gaps = 0/33 (0%)
Frame = +1

```
Query 1    TMNAPWSHMTGERATKIGKALIDDCNCNSSLQ 99
          TMNAPWSHMT E+A +IGKALI+DCNCN+S+L+
Sbjct 304  TMNAPWSHMTSEKAVEIGKALINDCNCNASMLK 336
```

Figura 4.2: Alinhamento do fragmento traduzido do gene *Ace* de *L. longipalpis* homólogo ao de *D. melanogaster* gerado através do programa BlastX.

```

gi|24661416|ref|NP_523991.2| G Resistant to dieldrin CG10537-PA, isoform A
[Drosophila melanogaster]
gi|7294983|gb|AAF50311.1| G CG10537-PA, isoform A [Drosophila melanogaster]
gi|30581023|sp|P25123|GBRB_DROME G Gamma-aminobutyric-acid receptor beta subunit
precursor (GABA(A)
receptor) (Protein cyclodiene resistance)
Length=606

Score = 116 bits (291), Expect = 3e-25
Identities = 57/58 (98%), Positives = 57/58 (98%), Gaps = 0/58 (0%)
Frame = -1

Query 174 WVRFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTILMSSTNAALPKISYVKSIDVYLGTCFVMVFA 1
WV FWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTILMSSTNAALPKISYVKSIDVYLGTCFVMVFA
Sbjct 286 WVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTILMSSTNAALPKISYVKSIDVYLGTCFVMVFA 343

```

Figura 4.3: Alinhamento do fragmento traduzido obtido em *L. longipalpis* homólogo ao gene *Rdl* de *D. melanogaster* gerado através do programa BlastX.

```

5paraIIdcgC
      >
D. melanogaster 1 WNFIDE MHSFMIVFRVLCGEWIESMWDVSCIPFFLATVVIGNLVVNLFLALL 60
L. longipalpis  WNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDVSCIPFFLATVVIGNLVVNLFLALL
*****

n3paraIIdcgB
      <
D. melanogaster 61 SNFGSSLSAPTA DNDTNK 79
L. longipalpis  SNFGSSLSAPTADNDTNK
*****

```

Figura 4.4: Alinhamento da sequência de aminoácido codificada pelo fragmento do gene *para* de *L. longipalpis* e *D. melanogaster*. As setas indicam a orientação dos oligos usados. A posição do intron encontrada nas sequências genômicas de *D. melanogaster* e *L. longipalpis* está indicada pelo triângulo invertido. A posição onde a mutação associada a resistência (L → H) ocorre em *D. melanogaster* está destacada em cinza.

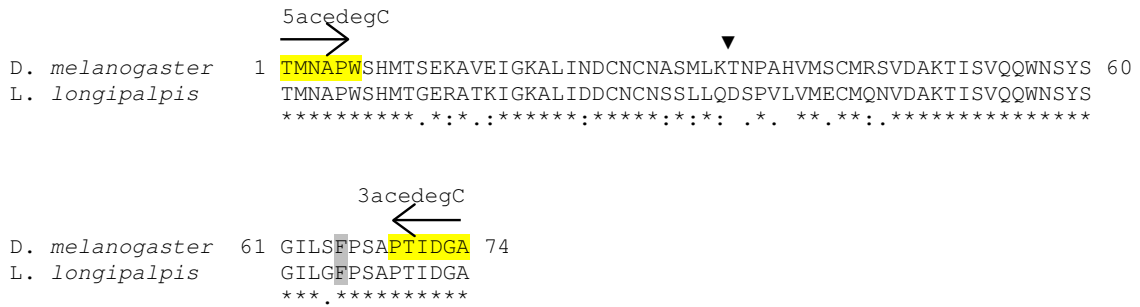


Figura 4.5: Alinhamento da seqüência de aminoácido codificada pelo fragmento do gene *Ace* de *L. longipalpis* e *D. melanogaster*. As setas indicam a orientação dos oligos usados. A posição do intron encontrada nas seqüências genômicas de *D. melanogaster* e *L. longipalpis* está indicada pelo triângulo invertido. A posição onde a mutação associada à resistência (F → Y) ocorre em *D. melanogaster* está destacada em cinza.

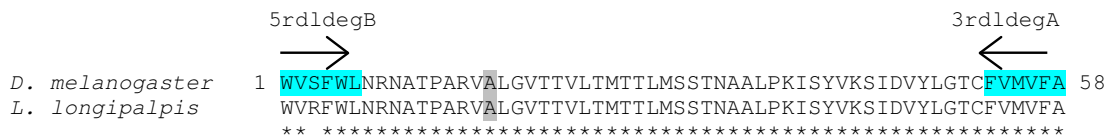


Figura 4.6: Alinhamento da seqüência de aminoácido codificada pelo fragmento do gene *Rdl* de *L. longipalpis* e *D. melanogaster*. As setas indicam a orientação dos oligos usados. A posição onde a mutação associada a resistência (A → S) ocorre em *D. melanogaster* está destacada em cinza.


```

pan15B .T.....T.--.....T.T.-G.....-T..GT--T...
pan15A .T.....T.--.....T.T.-G.....-T..T--...
pan12B .T.....T.--.....T.T.-G.....-T..T--...
pan12A .T.....T.--.....T.T.-G.....-T..GT--T...
pan11B .T.....T.--.....T.T.-G.....-T..T--...
pan11A .T.....T.--.....C..TAT.-G.....-T..T--...
natal9B .T.....T.--.....C..T.T.-G.....-T..AT--...
natal9A .T.....T.--.....C..T.T.-G...G.....-...
natal8B .T.....T.--.....T.T.-G.....-...
natal8A .T.....T.--.G.....T.T.-G.....-T..T--...
sob2s14B .T.....T.--.....T.T.-G.....-...A
sob2s14A .T.....T.--.....T.T.....-...T--...A
pan21B .T.....T.--.....T.T.....-...T--...
pan21A .T.....T.--.....T.T.-G.....-T.....-...
pan19B .T.....T.--.....T.T.....-...T--...
pan19A .T.....T.--.....T.T.....-...
pan13B .T.....T.--.....T.T.-G.....-...C..
pan13A .T.....T.--.....T.T.....-...T--...
natal1B .T.....T.--.....T.T.-G.....-T.T.T--...
natal1A .T.....T.--.....T.TC.A.....-...T...
natal12B .T.....T.--.....T.T.-G.....-T.....-...
natal12A .T.....T.--.....T.T.-G.....-...TT-T...
jac2s3A .....T.--.....A.....-...T--...
jac2s14A .....AT.--.....-...T--...
sob2s9A .T.....T.--.....T.T.-G.....-...TT-T...
jac2s10B .....T.--.....-...T--...
jac2s10A .....T.--.....A.....-...T--...
sob1s6B .....-...
sob1s6A .....A.G-...T--...
sob1s1B .....A.G-...T--...
sob1s1A .....T.....-...
lap1s2B .....-...
lap1s2A .....-...
jac2s1B .....AT.--.....-...T--...
jac2s1A .T.....T.--.....-...T--...
sob1s8B .....-...
sob1s8A .....T--...
sob1s2B .....A.....T--...
sob1s2A .....T--...
sob1s18B .....T--...
sob1s18A .....A.....T--...
sob1s17B .....A.....T--...
sob1s17A .....A.....G.....T--...
sob1s16B .....A.....G.....-...T--...
sob1s16A .....T.....-...T...
sob1s13A .....T--...
lap1s5B .....-...
lap1s5A .....T--...
lap1s12B .....-...
lap1s12A .....T--...
lap1s11B .....A.....T--...
lap1s11A .....A.....T--...
jac2s9A .....TT-...
jac2s7B .....TT-...
jac2s7A .....A.....TT-...
jac2s4A .T.....T.--.....TT-...
sob1s5B .....T--...
sob1s5A .....TT-...
sob1s4A .....T--...
sob1s15B .....A.....G.....-...T--...
sob1s15A .....T--...
sob1s14A .....TT-...
sob1s12B .....-...
sob1s12A .....C.....-...T--...

```

```

sob1s10B .....TT-T...
sob1s10A .....T.....TT-...
lap1s9B .....A.....TT-...
lap1s9A .....TT-...
jac2s5B .T..C.....-...TT-...
sob1s11A .....---...
lap1s8A .....A.....TTT...
lap1s6A .....A.....TT-...
lap1s10B .....A.....TT-...
lap1s10A .....A.....TTT...
jac2s5A .T.....-...TTT...
jac2s2B .....G.....T--...
jac2s2A .....T--...
jac2s13B .....A.-...TT-...
jac2s13A .....G...T.--.....-...TTT...
jac2s11A .T.....-...TT-...
jac2s11B .....T.--.....-...TTT...
est1s8B .T.....T.--.....T.T.-.G.....-T.....-...
est1s8A .T.....T.--.....T.T.-.G.....-T.....-...
estint2A .T.....T.--.....T.T.-.G.....-T.....-...
estint1A .T.....T.--.....T.T.-.G.....-T.....-...
est1s7A .....T.--.....-...TTT...
est1s4A .....T.--.....-...TTT...
est1s6A .....T.--.....-...TTT...
est1s3A .....T.--.....-...TTT...
est1s9A .....T.--.....-...T--...
est1s5B .....T.--.....-...TTT...
est1s5A .....T.--.....-...T--...
est1s12A .....T.--.....-...TTT...
est1s11A .....T.--.....-...T--...
est1s10A .....T.--.....-...TTT...

```

Figura 4.7: Alinhamento dos sítios variáveis nas seqüências consenso do fragmento obtido do gene *para* de *L. longipalpis*. Em azul os sítios que ocorrem na região do íntron e em preto os sítios que ocorrem na região do exon. Os pontos indicam o mesmo nucleotídeo que o existente na primeira seqüência alinhada. Sobral uma pinta (sob1s), Sobral duas pintas (sob2s), Lapinha (lap1s), Jacobina (jac2s), Natal (natal), Estrela uma pinta (1s), Estrela fenótipo de pintas intermediário (estint) e Pancas (pan).

(a)

	10	20	30	40
	*	*	*	*
lap1s15A	MIVF	RLCGEWIESM	WDCMLVGDV	SCIPFFLATV
lap1s14B
lap1s14A
lap1s13A
lap1s17A
lap1s18A
lap1s16A
sob2s11A
pan8A
sob2s6A
sob2s5A
sob2s4B
sob2s4A
sob2s1A
sob2s18B
sob2s18A
sob2s17BK..
sob2s17A
sob2s15A
sob2s13A
pan4B
pan4A
pan2B
pan2A
pan18B
pan18A
pan14A
natal7B
natal7A
natal6B
natal6A
natal5B
natal5A
natal4B
natal4A
natal3B
natal3A
natal2B
natal2A
natal11B
natal11A
natal10B
natal10A
sob2s9B
sob2s8B
sob2s8A
sob2s7B
sob2s7A
sob2s16B
sob2s16A
sob1s9A
pan9B
pan9A
pan7A
pan6B
pan6A
pan17B
pan17A
pan16B
pan16A
pan15B
pan15A
pan12B
pan12A
pan11B
pan11A
natal9B
natal9A
natal8B
natal8A
sob2s14BK..
sob2s14AK..
pan21B

(b)

	41	54
	*	*
lap1s15A	VLNLF	LALLLSNFG
lap1s14B
lap1s14A
lap1s13A
lap1s17A
lap1s18A
lap1s16A
sob2s11A
pan8A
sob2s6A
sob2s5A
sob2s4B
sob2s4A
sob2s1A
sob2s18B
sob2s18A
sob2s17B
sob2s17A
sob2s15A
sob2s13A
pan4B
pan4A
pan2B
pan2A
pan18B
pan18A
pan14A
natal7B
natal7A
natal6B
natal6A
natal5B
natal5A
natal4B
natal4A
natal3B
natal3A
natal2B
natal2A
natal11B
natal11A
natal10B
natal10A
sob2s9B
sob2s8B
sob2s8A
sob2s7B
sob2s7A
sob2s16B
sob2s16A
sob1s9A
pan9B
pan9A
pan7A
pan6B
pan6A
pan17B
pan17A
pan16B
pan16A
pan15B
pan15A
pan12B
pan12A
pan11B
pan11A
natal9B
natal9A
natal8B
natal8A
sob2s14BK..
sob2s14AK..
pan21B

pan21A
pan19B
pan19A
pan13B
pan13A
natal1B
natal1A
natal12B
natal12A
jac2s3A
jac2s14A
sob2s9A
jac2s10B
jac2s10A
sob1s6B
sob1s6A
sob1s1B
sob1s1A
lap1s2B
lap1s2A
jac2s1B
jac2s1A
sob1s8B
sob1s8A
sob1s2B
sob1s2A
sob1s18B
sob1s18A
sob1s17B
sob1s17A
sob1s16B
sob1s16A
sob1s13A
lap1s5B
lap1s5A
lap1s12B
lap1s12A
lap1s11B
lap1s11A
jac2s9A
jac2s7B
jac2s7A
jac2s4A
sob1s5B
sob1s5A
sob1s4A
sob1s15B
sob1s15A
sob1s14A
sob1s12B
sob1s12A
sob1s10B
sob1s10A
lap1s9B
lap1s9A
jac2s5B
sob1s11A
lap1s8A
lap1s6A
lap1s10B
lap1s10A
jac2s5A
jac2s2B
jac2s2A
jac2s13B
jac2s13A
jac2s11A
jac2s11B
est1s8B
est1s8A
estint2A
estint1A
est1s7A
est1s4A
est1s6A
est1s3A
est1s9A

pan21A
pan19B
pan19A
pan13B
pan13A
natal1B
natal1A
natal12B
natal12A
jac2s3A
jac2s14A
sob2s9A
jac2s10B
jac2s10A
sob1s6B
sob1s6A
sob1s1B
sob1s1A
lap1s2B
lap1s2A
jac2s1B
jac2s1A
sob1s8B
sob1s8A
sob1s2B
sob1s2A
sob1s18B
sob1s18A
sob1s17B
sob1s17A
sob1s16B
sob1s16A
sob1s13A
lap1s5B
lap1s5A
lap1s12B
lap1s12A
lap1s11B
lap1s11A
jac2s9A
jac2s7B
jac2s7A
jac2s4A
sob1s5B
sob1s5A
sob1s4A
sob1s15B
sob1s15A
sob1s14A
sob1s12B
sob1s12A
sob1s10B
sob1s10A
lap1s9B
lap1s9A
jac2s5B
sob1s11A
lap1s8A
lap1s6A
lap1s10B
lap1s10A
jac2s5A
jac2s2B
jac2s2A
jac2s13B
jac2s13A
jac2s11A
jac2s11B
est1s8B
est1s8A
estint2A
estint1A
est1s7A
est1s4A
est1s6A
est1s3A
est1s9A

est1s5B	est1s5B
est1s5A	est1s5A
est1s12A	est1s12A
est1s11A	est1s11A
est1s10A	est1s10A

Figura 4.8: Alinhamento das seqüências de aminoácidos codificadas pelo fragmento do gene *para* estudado, em (a) exon 1 e (b) exon 2. Os pontos indicam o mesmo aminoácido que o indicado na posição da primeira seqüência alinhada. As letras indicam as substituições ocorridas na seqüência específica. Em verde o aminoácido onde ocorre substituição sinônima em alguma das seqüências e, em vermelho, a substituição não sinônima. Sobral uma pinta (sob1s), Sobral duas pintas (sob2s), Lapinha (lap1s), Jacobina (jac2s), Natal (natal), Estrela uma pinta (1s), Estrela fenótipo de pintas intermediário (estint) e Pancas (pan).

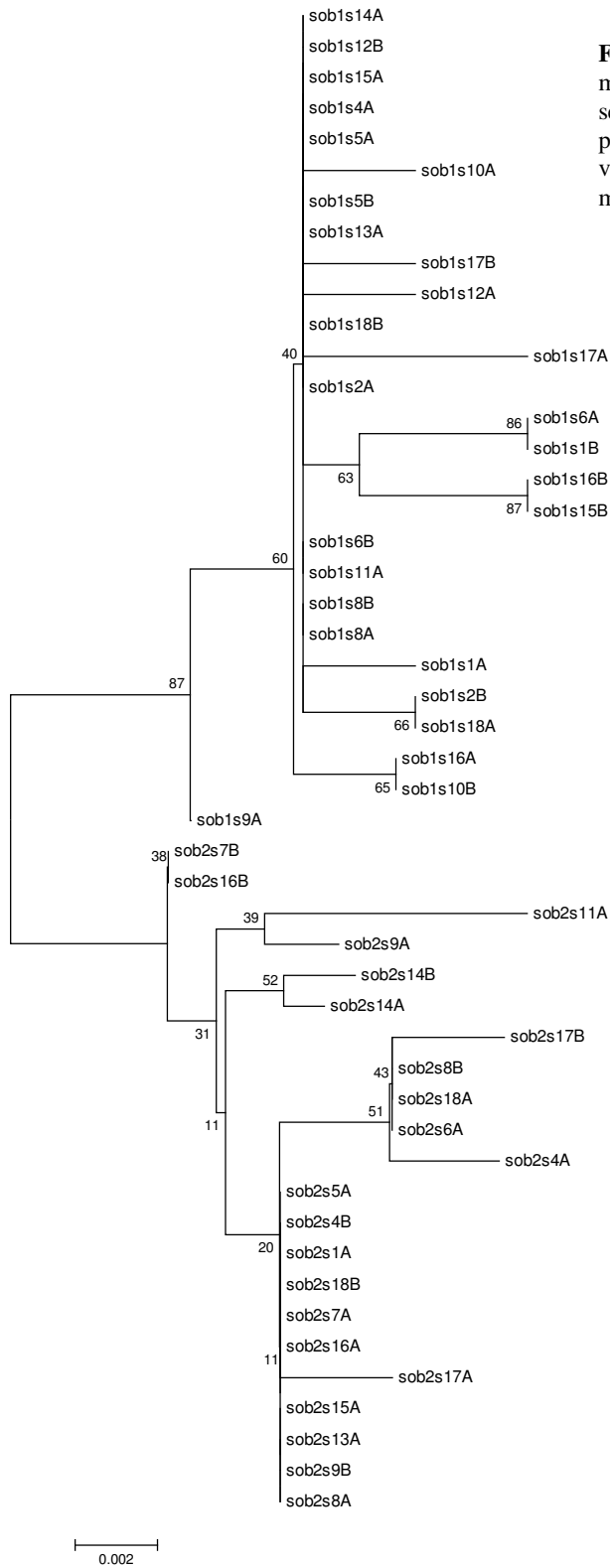
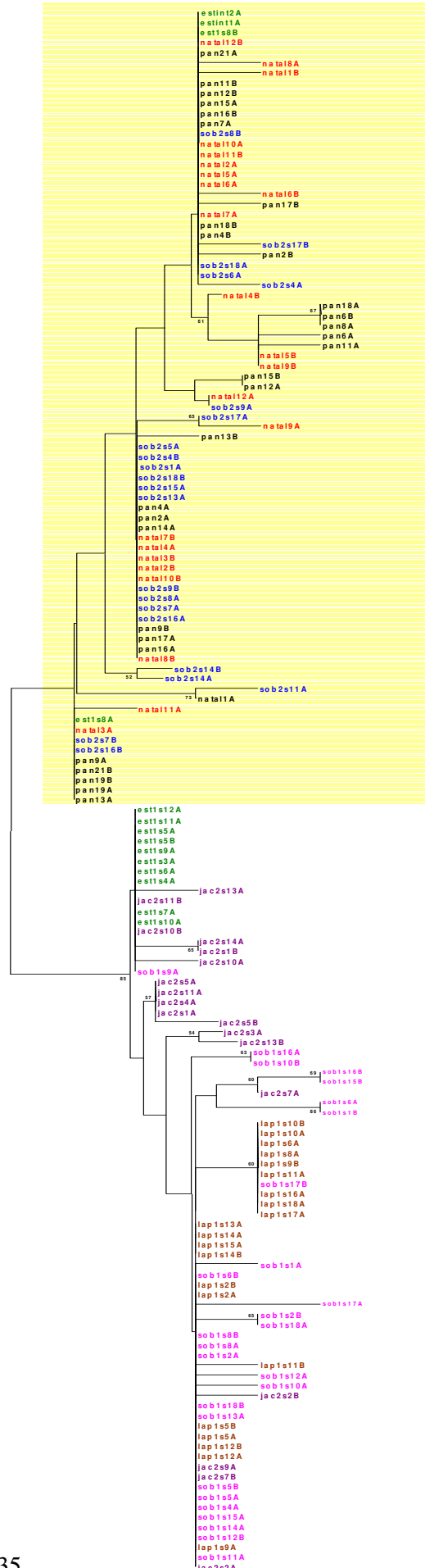


Figura 4.9: Árvore construída através do método de Evolução Mínima com as seqüências consenso do gene *para* das populações de Sobral 1S e Sobral 2S. Os valores de *bootstrap* foram obtidos mediante a 1000 permutações.

Figura 4.10: Árvore construída através do método de Evolução Mínima com as seqüências consenso do gene *para*. Os valores de *bootstrap* foram obtidos mediante a 1000 permutações. As diferentes cores separam as diferentes populações analisadas.



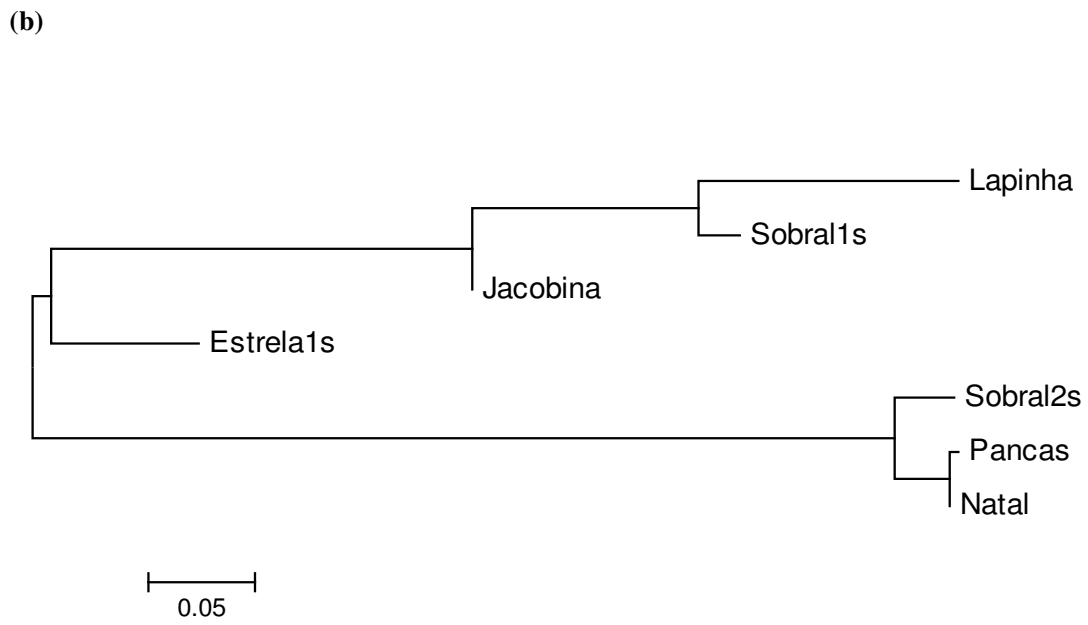
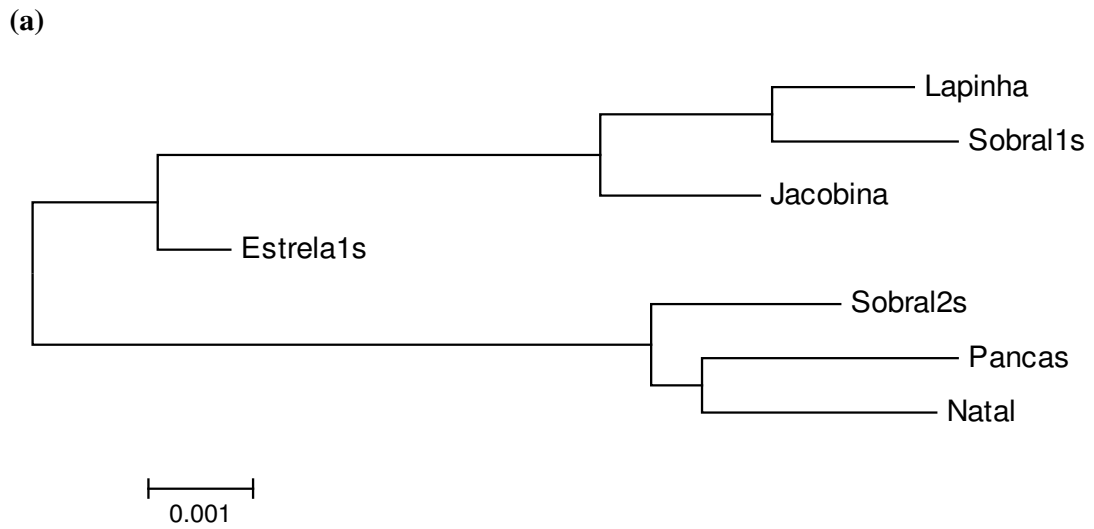


Figura 4.11: Árvores construídas utilizando o método *Neighbour-Joining* (Saitou & Ney, 1987) e os valores de D_{xy} (a) e F_{st} (b).

Tabela 4.1: Sumário dos polimorfismos no fragmento do gene *para* de *L. longipalpis*.

População	n	S	π	θ	D_T
Lapinha	21	2	0,0017	0,0015	0,22217
Sobral 2S	22	8	0,004	0,006	-1,08108
Pancas	29	10	0,0048	0,0069	-0,98104
Natal	24	11	0,0047	0,008	-1,40808
Sobral 1S	27	12	0,0037	0,0085	-2,014
Jacobina	18	9	0,0052	0,0071	-0,96784
Estrela 1S	14	5	0,0056	0,0043	1,03871

n, número de seqüências de DNA das amostras; **S**, número de sítios segregantes; **π** , diversidade nucleotídica; **θ** , parâmetro neutro baseado no número de sítios segregantes; **D_T** , D de Tajima (1989), que testa se as diferenças entre as medidas de π e θ são significativas. Com exceção para a população de Sobral 1S, os demais valores de Tajima não foram significativos $p > 0,10$.

Tabela 4.2: Estimativas de *Fst*, *Nm*, *Dxy* e *Da* entre as populações de *L. longipalpis*, e a distribuição de quatro categorias mutuamente exclusivas de sítios polimórficos.

Populações x / y	<i>Fst</i>	<i>p</i>	<i>Nm</i>	<i>Dxy</i>	<i>Da</i>	<i>Ss</i>	<i>Sf</i>	<i>Sx</i>	<i>Sy</i>
Lap x Sob 2S	0,8245	***	0,0532	0,0161	0,0133	0	4	2	8
Lap x Pan	0,8148	***	0,0568	0,0174	0,0142	0	4	2	10
Lap x Nat	0,8165	***	0,0562	0,0173	0,0141	0	4	2	11
Lap x Sob 1S	0,1365	***	1,5809	0,0031	0,0004	1	0	1	12
Lap x Jac	0,2356	***	0,811	0,0045	0,0011	0	0	2	9
Lap x Est 1S	0,5196	***	0,2311	0,0075	0,0039	0	1	2	5
Sob 2S x Pan	0,0768	*	3,0036	0,0048	0,0004	3	0	5	7
Sob 2S x Nat	0,0311	ns	7,7815	0,0045	0,0001	5	0	3	6
Sob 2S x Sob 1S	0,7657	***	0,0765	0,0165	0,0126	1	3	7	12
Sob 2S x Jac	0,681	***	0,1171	0,0144	0,0098	0	2	8	9
Sob 2S x Est 1S	0,5087	**	0,2415	0,0097	0,0049	2	0	6	3
Sob 1S x Pan	0,7606	***	0,0787	0,0178	0,0135	1	3	12	9
Sob 1S x Nat	0,7617	***	0,0782	0,0176	0,0134	1	3	12	10
Sob 1s x Jac	0,1068	**	2,0915	0,005	0,0005	2	0	11	7
Sob 1s x Est 1s	0,4139	***	0,354	0,0079	0,0033	0	0	13	5
Pan x Nat	-0,0148	ns	xxx	0,0047	-0,0001	4	0	6	7
Pan x Jac	0,6821	***	0,1165	0,0157	0,0107	0	2	10	9
Pan x Est 1S	0,5114	***	0,2388	0,0106	0,0054	2	0	8	3
Nat x Jac	0,6827	***	0,1162	0,0155	0,0106	0	2	11	9
Nat x Est 1S	0,5119	**	0,2383	0,0105	0,0054	2	0	9	3
Jac x Est 1S	0,2158	***	0,9085	0,0068	0,0015	1	0	8	4

Fst, índice de fixação par-a-par e **Nm**, número de migrantes por geração (Hudson et al., 1992). A significância dos valores de **Fst** foram testados mediante 1000 permutações (*** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$, ns = $p > 0,05$). **Dxy**, divergência bruta (número médio de substituições nulceotídicas por sítio entre as populações); **Da**, divergência líquida (número de substituições nucleotídicas líquida por sítio entre as populações) (Nei & Kumar, 2000). **Ss**, número de polimorfismos compartilhados entre as populações; **Sf**, número de diferenças fixas entre as populações; **Sx**, número de sítios polimórficos exclusivos da população "x"; **Sy**, número de sítios polimórficos exclusivos da população "y". **Lap**: Lapinha, **Sob 2S**: Sobral 2S, **Pan**: Pancas, **Nat**: Natal, **Sob 1S**: Sobral 1S, **Jac**: Jacobina e **Est 1S**: Estrela 1S.

5. DISCUSSÃO

5.1 – Clonagem dos fragmentos dos genes associados à resistência a inseticidas

A obtenção dos fragmentos iniciais de genes associados à resistência a inseticidas em *L. longipalpis* representa um importante passo inicial para estudos subseqüentes já que a maior parte dos trabalhos anteriores publicados, além de escassos, não tratam da questão molecular, estando esta, ainda não resolvida em *L. longipalpis*. A maior parte dos artigos publicados em flebotomíneos se concentra em *Phlebotomus* e, mesmo nesses trabalhos, poucos abordam a questão molecular (El-Sayed *et al*, 1989; Das Gupta *et al*, 1995; Surendran *et al*, 2005).

Uma vez que agora dispomos destes fragmentos, isolados em *L. longipalpis* dos principais genes envolvidos com a resistência a inseticidas listados na literatura, novas abordagens e grandes avanços poderão ser realizados dentro deste tema intrigante e com este importante vetor nas Américas.

Os alinhamentos gerados pela tradução dos fragmentos dos genes de resistência clonados em *L. longipalpis* mostram que, em geral, estas regiões são bastante conservadas, havendo poucas substituições de aminoácidos quando comparado com *D. melanogaster*. Isto fica mais evidente com as seqüências dos genes *para* e *Rdl* (canais iônicos), onde apenas uma única substituição é observada em cada caso. O fragmento do gene *Ace*, que codifica a enzima acetilcolinaesterase, por sua vez, mostra um número maior de alterações nas regiões próximas a posição do íntron.

A maior permissividade pela seleção quanto à ocorrência de mutações em alguns genes de resistência mais do que em outros, já fora tema de especulação e debate em diversos trabalhos anteriores (e.g. ffrench-Constant, 1999). Alguns estudos discutem o custo do valor adaptativo destas mutações e questionam porque um número maior de mutações associadas à resistência são encontradas no gene *Ace*. Esse gene possui várias mutações já caracterizadas

que, isoladamente, cada uma tem um efeito pequeno na resistência a inseticidas e, quando combinadas, têm seu efeito bastante amplificado, motivo pelo qual, na pressão de seleção pelo inseticida, são freqüentemente encontradas mais de uma mutação. Entretanto, no caso de *para* e *Rdl* poucas mutações são encontradas.

Uma das explicações reside no fato da acetilcolinaesterase ser uma enzima altamente eficiente, que degrada a acetilcolina na sinapse nervosa, e que essas mutações tenham um pequeno efeito no funcionamento normal da enzima, de forma que podem ser mantidas em populações naturais. Entretanto, mutações em *Rdl* e *para* podem estar associadas com uma grande disfunção do receptor ou canal (French-Constant, 1999).

Temas como a resistência a inseticidas são prioridades em saúde pública para a efetividade dos esforços empregados no controle de vetores de doenças. Isso inclui uma gama de estudos com diferentes insetos e áreas do conhecimento. Como mencionado anteriormente, em flebotomíneos existem poucos estudos envolvendo resistência, portanto, consideramos que a clonagem dos fragmentos desses genes associados à resistência citados, representa um importante passo inicial e contribui de forma ímpar para que novos trabalhos sejam realizados. Acreditamos, desta forma, que estes fragmentos poderão ser utilizados como eficientes marcadores moleculares em estudos de resistência envolvendo este vetor.

Uma vez isolados os fragmentos, o passo subsequente seria desenhar *oligos* específicos para que estudos mais detalhados, como de genética de populações sejam exeqüíveis.

O primeiro gene escolhido para a realização de tal abordagem foi o gene *para*, com o qual trabalhamos na segunda parte do presente estudo.

5.2 – Genética de populações do gene *para*

Inicialmente as análises nos mostraram que a região estudada, contida no domínio IIS6 (mostrado previamente), onde uma das mutações associadas à resistência ocorre (L1029H), é

uma região bastante conservada em todas as populações estudadas, havendo poucas substituições nas regiões codantes e uma maior quantidade na região do íntron, conforme citado anteriormente.

Ainda que as substituições de aminoácidos não sejam as previamente descritas como as responsáveis pela resistência promovida por este gene em outros modelos, esta região trouxe aspectos interessantes ao apontar diferenças fixas que suportam o agrupamento de populações descrito anteriormente por Bauzer (2002 a, b e c) e Araki (2005).

Seguindo a mesma tendência que outros marcadores usados em outros trabalhos, a diferenciação genética evidenciada com as análises de *para* entre as populações de *L. longipalpis* estudadas, não parece seguir um modelo simples de isolamento por distância, onde se constata que populações geograficamente próximas são mais divergentes que populações distantes. Ressalta-se que a coexistência de populações geneticamente divergentes vivendo em simpatria, como já fora reportado para Sobral e Estrela, suporta a idéia de *L. longipalpis* ser um complexo de espécies crípticas no Brasil. De fato, os dados obtidos para Sobral 1S, 2S e Estrela 1S deste presente estudo vão ao encontro dessa constatação. Interessantemente, os indivíduos intermediários (estint1A e estint2A) se assemelham e se agrupam com o grupo de Sobral 2S, e os indivíduos com o fenótipo de uma pinta de Estrela (com exceção do indivíduo 8, est1s8A e B) se agrupam com o de Sobral 1S, estando de acordo com os resultados de Araki (2005). Vale ressaltar que tanto Estrela (Hamilton *et al*, 2005) quando Sobral 2S (Ward *et al*, 1988) produzem o cembreno como tipo de feromônio. A discordância existe entre Estrela 1S e Sobral 1S que, mesmo agrupados, produzem feromônios de tipos diferentes, esta produz o germacreno (Ward *et al*, 1988) e aquela produz o cembreno (Hamilton *et al*, 2005). De fato, o valor de Fst entre essas últimas populações, da mesma forma que verificado por Araki (2005) com o gene *period*, é bastante alto (cerca de 41%). Torna-se curioso analisar os dados já obtidos mais ainda não processados, do morfótipo

2S de Estrela e sua comparação com Sobral 2S, a fim de verificar se são de fato próximos, como demonstrado por Araki (2005).

A análise da diferenciação do gene *para* entre Sobral 2S, Natal e Pancas revelou que são semelhantes geneticamente. As árvores da figura 4.11 construídas com os valores de D_{xy} e F_{st} sustentam essas análises ao agrupar essas populações. Vale ressaltar que esse grupo utiliza o mesmo tipo de feromônio, o cembreno (Ward *et al*, 1988; Souza *et al*, 2002; Reginaldo Brazil, comunicação pessoal) e diversos estudos corroboram a proximidade entre essas populações (e.g. Mukhopadhyay *et al*, 1998a; Mutebi *et al*, 1999; Azevedo *et al*, 2000), evidenciando uma proximidade entre as populações da costa do Nordeste, que se distribuem até o Sudeste em Pancas (ES). Outras populações serão analisadas posteriormente nesse *continuum* e, com os dados de outros marcadores esta hipótese poderá ser mais bem avaliada.

Os dados que obtivemos através da comparação das diferentes populações utilizadas nesse estudo (Tabela 4.2) estão de acordo com os trabalhos anteriores que envolvem cruzamentos, som de cópula, feromônio, microssatélites e marcadores moleculares que indicam a existência de um complexo de espécies no Brasil. Nossos resultados contribuem, ainda, para reforçar o agrupamento das espécies que constituiriam o complexo brasileiro, proposto por Araki (2005). Dentre as populações que analisamos, um primeiro grupo seria formado por Sobral 2S, Natal e Pancas, representando uma espécie, com tipo de feromônio cembreno, de 20 carbonos em sua estrutura (incluindo Pancas, analisado recentemente, Reginaldo Brazil, comunicação pessoal) e som de cópula do tipo Burst (Ward *et al*, 1988; Souza *et al*, 2002, 2004; Vigoder F, dados não publicados) e, de outro lado teríamos Sobral 1S, Jacobina e Lapinha como outros representantes do complexo, com som de cópula do tipo pulsado e feromônio do tipo germacreno (Sobral 1S e Lapinha) e himacaleno (Jacobina) de 16 carbonos em sua estrutura (Ward *et al*, 1988; Hamilton *et al*, 1996a, b e 1999a, b; Souza *et al*, 2002; 2004). Estrela 1S, assim como sugerido por Araki (2005) parece representar uma outra espécie do complexo, com altos valores de F_{st} na comparação com as outras populações (ver

Tabela 4.2 para maiores detalhes). De fato, embora machos desta população exalem o feromônio do tipo cembreno (Hamilton *et al*, 2005) eles produzem um novo som de cópula do tipo pulsado não encontrado em outras populações.

Além de apontarem para a existência de um complexo no Brasil, nossos resultados com o gene *para* representam uma primeira análise do uso de genes de resistência como marcadores moleculares no estudo da genética de populações de *L. longipalpis*. Ainda que não tenham sido detectadas as mutações clássicas associadas à resistência, acreditamos que a análise das populações nos forneceu dados interessantes acerca da estrutura genética entre as populações que compõem esse complexo o que será de grande utilidade, pois, nos permitirá prever, o possível grau de dispersão de alelos resistentes, caso sejam detectados ou venham a surgir.

Acreditamos que seria de grande valor a análise conjunta deste e outros genes de resistência, como por exemplo, o uso dos fragmentos dos genes gerados nesse trabalho (*Ace* e *Rdl*) e a inclusão de outras populações de diversas localidades, inclusive daquelas onde o uso de inseticidas é freqüente, objetivando um perfil mais detalhado desses marcadores no complexo *L. longipalpis*, permitindo, dessa forma, estabelecer seu comportamento e as forças atuantes nesses tipos peculiares de marcadores, assim como a investigação das mutações associadas à resistência.


```

#natal10B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#natal10A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#sob2s9B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#sob2s8B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#sob2s8A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#sob2s7B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#sob2s7A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#sob2s16B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#sob2s16A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#sob1s9A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan9B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan9A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan7A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan6B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan6A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan17B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan17A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan16B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan16A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan15B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan15A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan12B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan12A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan11B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan11A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#natal9B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#natal9A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#natal8B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#natal8A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#sob2s14B --- --- --- --- --- --- --- --- A---
#sob2s14A --- --- --- --- --- --- --- --- A---
#pan21B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan21A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan19B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan19A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan13B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#pan13A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#natal11B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#natal11A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#natal12B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#natal12A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#jac2s3A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#jac2s14A --- --- --- --- --- --- --- --- jac2s14A ---
#sob2s9A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#jac2s10B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#jac2s10A --- --- --- --- --- --- --- --- jac2s10A ---
#sob1s6B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#sob1s6A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#sob1s1B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#sob1s1A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#lap1s2B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#lap1s2A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#jac2s1B --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```



```
#est1s6A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
#est1s3A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
#est1s9A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
#est1s5B --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
#est1s5A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
#est1s12A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
#est1s11A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
#est1s10A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
```


7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander B, Mutebi JP, Hearne D, Lanzaro GC, Ward RD, Hamilton JGC. Current Status of the *Lutzomyia longipalpis* Species Complex. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998;93:31-3.

Araki AS. Análise da diferenciação genética no gene *period* entre populações de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rio de Janeiro; 2005. Mestrado [Dissertação em Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz.

Arrivilaga J, Mutebi JP, Pinango H, Norris D, Alexander B, Feliciangeli MD, Lanzaro GC. The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. J Med Entomol 2003;40(5):615-627.

Ayad H, Georghiou GP. Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. J Econ Entomol 1975;68:295-7.

Azevedo ACR, Monteiro FA, Cabello PH, Souza NA, Rosa-Freita MG, Rangel EF. Studies on Population of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000;95:305-22.

Bauzer LGSR, Souza NA, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA. The *period* gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. Insect Mol Biol 2002a; 11:315-23.

Bauzer LGSR, Gesto JSM, Souza NA, Ward RD, Hamilton JGC, Kyriacou CP, et al. Molecular divergence in the *period* gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex. Mol Biol Evol 2002b;19:1624-7.

Bauzer LGSR. Análise da diferenciação genética entre populações de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) utilizando o gene *period* como marcador molecular. Rio de Janeiro; 2002c. Mestrado [Dissertação em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz.

Bauzer LGSR, Souza NA, Maingon RD, Peixoto AA. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102(1):1-12. Review.

Bermudez I, Hawkins CA, Taylor AM, Beadle DJ. Actions of insecticides on the insect GABA receptor complex. J Recept Res 1991;11:221-32.

Bloomquist JR. Cyclodiene resistance at the insect GABA receptor chloride channel complex confers broad cross-resistance to convulsants and experimental phenylpyrazole insecticides. *Arch Insect Biochem Physiol* 1994;26:69-79.

Bottecchia M, Oliveira SG, Bauzer LG, Souza NA, Ward RD, Garner KJ, et al. Genetic divergence in the *cacophony* IVS6 intron among five Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *J Mol Evol* 2004;58:754-61.

Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, et al. A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 2002;297:2253-6.

Das Gupta RK, Saxena NB, Joshi RD, Rao JS. DDT resistance in *P. papatasi* in Bihar. *J Commun Dis* 1995;27:124.

De Silans LN, Dedet JP, Arias JR. Field monitoring of cypermethrin residual effect on the mortality rates of the Phlebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis* in the state of Paraíba, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93(3):339-44.

El-Sayed S, Hemingway J, Lane RP. Susceptibility baselines for DDT metabolism and related enzyme systems in the sandfly *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) (Diptera: Psychodidae). *Bull Entomol Res* 1989;79:679-84.

ffrench-Constant RH, Pittendrigh B, Vaughan A, Anthony N. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philos Trans R Soc London Ser* 1998;B,353:1685-93.

ffrench-Constant RH. Target site mediated insecticide resistance: what questions remain? *Insect Biochem Mol Biol* 1999;29:397-403.

ffrench-Constant RH, Daborn PJ, Le Goff G. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet* 2004;20(3):163-70.

Filatov DA, Charlesworth D. DNA polymorphism, haplotype structure and balancing selection in the *Leavenworthia PgiC* locus. *Genetics* 1999;153:1423-34.

Hall JC. The mating of a fly. *Science* 1994;264(5166):1702-14.

Hamilton JGC, Dawson GW, Pickett JA. 9-Methylgermacrene-B: Proposed structure for novel homosesquiterpene sex pheromone glands of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Lapinha, Brazil. *J Chem Ecol* 1996a;22:1477-91.

Hamilton JGC, Dawson GW, Pickett JA. 3-Methyl-Himachalene: Proposed structure for novel homosesquiterpene sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jacobina, Brazil. *J Chem Ecol* 1996b;22:2331-40.

Hamilton JGC, Hooper AM, Mori K, Pickett JA, Sano S. 3-Methyl- α -himachalene confirmed, and relative stereochemistry defined, by synthesis as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Jacobina, Brazil. *Chem Commun* 1999a;355-6.

Hamilton JGC, Ibbotson HC, Hooper AM, Mori K, Pickett JA, Sano S. 9-Methylgermacrene-B confirmed by synthesis as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Lapinha, Brazil, and the absolute stereochemistry defined as 9S. *Chem Commun* 1999b;2335-6.

Hamilton JG, Brazil RP, Maingon R. A fourth chemotype of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jaibas, Minas Gerais, Brazil. *J Med Entomol* 2004;41:1021-6.

Hamilton JG, Maingon RD, Alexander B, Ward RD, Brazil RP. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. *Med Vet Entomol* 2005 Dec;19(4):480-8.

Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* 2000;45:371-91.

Hosie AM, Aronstein K, Sattelle DB, French-Constant RH. Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends Neurosc* 1997;20(12):578-83.

Jowett, T. (1998) Preparation of nucleic acids. In: Roberts, D.B., (Ed.). *Drosophila: A practical approach*. IRL press, Oxford. 347-71.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* 2001;17:1244-5.

Kyriacou CP, Hall JC. The function of courtship song rhythms in *Drosophila*. *Anim Behav* 1982; 30:784-801.

Kyriacou CP, Hall JC. Interspecific genetic control of courtship song production and reception in *Drosophila*. *Science* 1986;232:494-7.

Lampo M, Torgerson D, Márquez LM, Rinaldi M, Garcia CZ, Arab A. Occurrence of sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Venezuela: first evidence from reproductively isolated sympatric populations. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:1004-9.

Lanzaro GC, Ostrovska K, Herrero MV, Lawyer PG, Warburg A. *Lutzomyia longipalpis* is a Species Complex: Genetic Divergence and Interespecific Hybrid Sterility among Three Populations. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48(6):839-47.

Lanzaro GC, Warburg A. Genetic Variability in Phlebotominae Sandflies: Possible Implications for Leishmaniasis Epidemiology. *Parasitol Today* 1995;4:151.

Liedloff A. Mantel nonparametric test calculator for Windows, version 2.0. 1999.

Lins RMMA, Oliveira SG, Souza NA, de Queiroz RG, Justiniano SC, Ward RD, et al. Molecular evolution of the *cacophony* IVS6 region in sandflies. *Insect Mol Biol* 2002;11(2):117-22.

Littleton JT, Ganetzky B. Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* 2000;26(1):35-43.

Loughney K, Krreber R, Ganetzky B. Molecular analysis of the *para* locus, a sodium-channel gene in *Drosophila*. *Cell* 1989;58:1143-54.

Maingon RD, Ward RD, Hamilton JG, Noyes HA, Souza N, Kemp SJ, et al. Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceará State, Brazil. *Mol Ecol* 2003;12:1879-94.

Mangabeira, O. (1969). Sobre a sistemática e biologia dos flebótomos do Ceará. *Rev Bras Mal Doen Trop* 21:3-26.

Mukhopadhyay J, Ghosh K, Rangel EF, Mustermann L. Genetic variability in biochemical characters of Brazilian field populations of *Leishmania* vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 1998a;59:893-901.

Mukhopadhyay J, Ghosh K, Azevedo AC, Rangel EF, Munstermann LE. Genetic polymorphism of morphological and biochemical characters in a Natal, Brazil, population of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Am Mosq Control Assoc* 1998b;14:277-82.

Munstermann LE. Phlebotomine Sand Flies, the Psychodidae. In: Marquardt WC, editor. 2^a ed. *Biology of disease vectors*. Burlington: Elsevier Academic Press; 2005. p.141-151.

Mutebi JP, Alexander B, Sherlock I, Wellington J, Souza AA, Shaw J, et al. Breeding Structure of the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in Brasil. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(1):149-57.

- Mutero A, Pralavorio M, Bride JM, Fournier D. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:5922-6.
- Peixoto AA, Hall JC. Analysis of temperature-sensitive mutants reveals new genes involved in the courtship song of *Drosophila*. *Genetics* 1998;148(2):827-38.
- Peixoto AA, Gomes CA, Amoretty PR, Lins RMMA, Meireles-Filho ACA, Souza NA, et al. New molecular markers for Phlebotomine sand flies. *Int J Parasit* 2001;31:635-9.
- Pittendrigh B, Reenan R, French-Constant RH, Ganetzky B. Point mutations in the *Drosophila* sodium channel gene *para* associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Molec Gen Genet* 1997;256(6):602-10.
- Ritchie MG, Halsey EJ, Gleason JM. *Drosophila* song as a species-specific mating signal and the behavioural importance of Kyriacou & Hall cycles in *D. melanogaster* song. *Anim Behav* 1999;58:649-57.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 2003;19:2496-7.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-25.
- Sambrook D, Russell J. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor; 2001.
- Smith LA, Peixoto AA, Kramer EM, VILLELLA A, Hall JC. Courtship and visual defects of *cacophony* mutants reveal functional complexity of a calcium-channel alpha1 subunit in *Drosophila*. *Genetics* 1998;149:1407-26.
- Soderlund DM, Blomquist JR. Neurotoxic action of pyrethroid insecticides. *Annu Rev Entomol* 1989;34:77-96.
- Souza NA, Ward RD, Hamilton JGC, Kyriacou CP, Peixoto AA. Copulation songs in three siblings of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2002; 96:102-3.
- Souza NA, Vigoder FM, Araki AS, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA. Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. *J Med Entomol* 2004;41(5):906-13.

Surendran SN, Karunaratne SH, Adams Z, Hemingway J, Hawkes NJ. Molecular and biochemical characterization of a sand fly population from Sri Lanka: evidence for insecticide resistance due to altered esterases and insensitive acetylcholinesterase. *Bull Entomol Res* 2005;95(4):371-80.

Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 1989;123:585-95.

Tesh RB, Guzman H. Sand Flies and the agents they transmit. In: *The biology of disease vectors*. Colorado: University Press of Colorado; 1996. p.117-27.

Uribe S. The Status of the *Lutzomyia longipalpis* Species Complex and Possible Implications for Leishmania Transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1999;94(6):729-34.

Ward RD, Ribeiro AL, Ready PD, Murtagh A Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) the vector of *Leishmania donovani chagasi* (Cunha & Chagas) and its significance to Kala-azar distribution in South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1983;78:269-80.

Ward RD, Phillips A, Burnet B, Marcondes CB. The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. In: *Biosystematics of Haematophagous Insects*. Oxford: Oxford University Press; 1988. p.258-69.

Watts PC, Hamilton JGC, Ward RD, Noyes HA, Souza NA, Kemp SJ, et al. Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73(4):734-43.

Weill M, Chandre F, Brengues C, Manguin S, Akogbeto M, Pasteur N, et al. The kdr mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Mol Biol* 2000 Oct;9(5):451-5.

Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Ent Inst* 1994;54:1-881.

Zhao Y, Yoonseong P, Adams ME. Functional and Evolutionary Consequences of Pyrethroid Resistance Mutations in S6 Transmembrane Segments of a Voltage-Gated Sodium Channel. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:516-21.