

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

NATHALY ALEXANDRE DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA α -GLICOSIDASE Cqm1 DE *Culex quinquefasciatus* E O IMPACTO
DE SUAS MUTAÇÕES NA FISIOLOGIA DE LARVAS

RECIFE

2016

NATHALY ALEXANDRE DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA α -GLICOSIDASE Cqm1 DE *Culex quinquefasciatus* E O IMPACTO
DE SUAS MUTAÇÕES NA FISILOGIA DE LARVAS**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha

Coorientadora: Dra. Lígia Maria Ferreira

RECIFE

2016

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

N244a Nascimento, Nathaly Alexandre do.

Avaliação da α -glicosidase Cqm1 de *Culex quinquefasciatus* e o impacto de suas mutações na fisiologia de larvas / Nathaly Alexandre do Nascimento. - Recife: [s.n.], 2016.

92 p. : il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Maria Helena Neves Lobo Silva Filha; coorientadora: Lígia Maria Ferreira.

1. *Culex* – efeitos de drogas. 2. *Culex* - genética. 3. Receptores da superfície celular - metabolismo. 4. Resistência a inseticidas - genética. 5. *Bacillus* - patogenicidade. 6. Toxinas bacterianas. 7. alfa-Glicosidases. 8. Mutações. I. Silva Filha, Maria Helena Neves. II. Ferreira, Lígia Maria. III. Título.

CDU 614.449

NATHALY ALEXANDRE DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA α -GLICOSIDASE Cqm1 DE *Culex quinquefasciatus* E O IMPACTO
DE SUAS MUTAÇÕES NA FISIOLOGIA DE LARVAS**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia Em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 19/02/2016

BANCA EXAMINADORA

Dra. Milena de Paiva Cavalcanti
Depto. de Imunologia/CPqAM-FIOCRUZ

Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
Depto. de Bioquímica/UFPE

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira
Depto. de Entomologia/CPqAM-FIOCRUZ

Dr. Gabriel da Luz Wallau
Depto. de Entomologia/CPqAM-FIOCRUZ

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Depto. de Entomologia/CPqAM-FIOCRUZ

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Renata e Francisco, por sempre terem sido a minha base e contribuído de maneira muito significativa na minha formação acadêmica e pessoal, e por sempre me darem todo o amor do mundo. Ao meu irmão Thiago, pelo carinho e disposição para ajudar nos momentos necessários. Ao mais novo membro da família, Algodão, meu lindo companheiro de quatro patas que chegou em um momento muito turbulento profissional e familiar para trazer alegria e ajudar a encarar a vida com mais leveza.

À toda minha família, que sempre demonstrou seu amor e preocupação com o meu bem estar e sempre esteve disposta a ajudar.

Ao meu noivo Artur, principalmente por todo amor e paciência que foram necessários para me ajudar quando eu mais precisei e por sempre estar ao meu lado.

À minha orientadora, Dra. Maria Helena, pela oportunidade dada desde a iniciação científica, sua paciência, exigência e compartilhamento de conhecimento, fatores essenciais para a minha formação acadêmica.

À minha coorientadora, Dra. Lígia Ferreira, pela sua ajuda no laboratório, no desenvolvimento deste trabalho e pelos bons conselhos.

À Dra. Tatiany Romão, por sempre estar disposta a ajudar e tirar dúvidas e por suas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

À Duka, Marcelo e Nadja pelo auxílio no início dos experimentos de PCR em tempo real e por me ajudarem a me nortear nesta nova etapa.

À Dra. Milena Paiva pela contribuição essencial na etapa de PCR em tempo real, desde os primeiros testes e otimização da reação à análise dos resultados.

À Dra. Cláudia Oliveira, pela disponibilidade em ser parecerista deste trabalho e pela sua contribuição para o seu desenvolvimento.

Ao Dr. Fernando Genta, pela contribuição para este trabalho, por ceder reagentes e pelo estímulo no estudo de atividade enzimática em insetos.

À Ana e Rose, técnicas do insetário, por sempre me ajudarem nos momentos que precisei.

Aos meus amigos Hot Polares Artur, Carol, Éden, Felipe, Jana, Lud, Marília, Rodrigo, Rômulo e Wagner, pelos momentos de diversão, jogos, nerdice, felicidade e pela valiosa amizade.

Às Pupas, Brena, Babi, Emanuel, Fernando, Larissa, Priscilla, Suzane, Suzany, Tati e

Thiago, pelos auxílios no dia-a-dia da bancada, pela incrível amizade construída e pelos maravilhosos momentos de descontração e alegria vividos.

Ao MaracAggeu e ao Mestre Lua, pois os batuques e a alegria sempre ajudam no alívio dos momentos de tensão.

Aos meus colegas da turma de mestrado pelo companheirismo durante estes dois anos, sempre ajudando nas dificuldades do curso.

A todos que fazem parte do departamento de Entomologia pela colaboração, conversas e dia-a-dia sempre agradável.

À FACEPE, pela bolsa de mestrado.

Ao CPqAM, pela infraestrutura.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, neste trabalho.

“A verdade está lá fora.”
Chris Carter

NASCIMENTO, N. A. **Avaliação da α -glicosidase Cqm1 de *Culex quinquefasciatus* e o impacto de suas mutações na fisiologia de larvas.** 2016. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

RESUMO

Lysinibacillus sphaericus (Lsp) é uma bactéria entomopatígena que produz a toxina Binária (Bin) com atividade larvicida para culicídeos. A sua ação em *Culex quinquefasciatus* depende da ligação da toxina Bin à α -glicosidase (Aglu) Cqm1, que atua como receptor no epitélio intestinal de larvas. Na colônia R2362, foram caracterizados dois alelos de resistência ao Lsp: *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*, cujas mutações impedem a expressão da Aglu Cqm1. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade catalítica da Cqm1 e comparar a atividade α -glicosidase e o desenvolvimento pré-imaginal de larvas de indivíduos susceptíveis (S) e resistentes (R) para cada alelo. Para isto, foram avaliados os seguintes parâmetros: atividade catalítica da Cqm1 recombinante; padrão de transcrição de outras Aglus parálogas à Cqm1; atividade de Aglus nativas em larvas; sobrevivência de indivíduos frente a diferentes dietas. A Aglu Cqm1 mostrou atividade enzimática ótima à 37° C, pH 7,5-8,0 e utilizando o substrato sintético pN α G. A atividade α -glicosidase total em larvas S e R foi similar, apesar da ausência de expressão da Cqm1 nas larvas R. A investigação *in silico* revelou 18 proteínas parálogas à Cqm1 e, dentre 11 investigadas, nove são expressas em larvas S e R. A análise quantitativa de três parálogas demonstrou que duas tem um padrão de transcrição mais elevado em larvas resistentes, sugerindo a existência de um mecanismo de compensação de expressão de α -glicosidases. O desenvolvimento pré-imaginal de larvas S foi decrescente nas seguintes dietas: ração de gatos, ração de peixes, leite desnatado, extrato de levedura e sacarose. De uma forma global, a taxa de sobrevivência de larvas R foi inferior à S em todas as dietas testadas. Os dados obtidos mostram que as mutações ligadas aos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* não parecem impactar a atividade Aglu nas larvas e que o custo biológico observado poderia estar relacionado a outros genes e vias metabólicas.

Palavras-chave: Mosquitos; biolarvicidas; resistência; custo biológico; α -glicosidases.

NASCIMENTO, N. A. **Evaluation of α -glucosidase Cqm1 from *Culex quinquefasciatus* and the impact of its mutations on larvae physiology.** 2016. Dissertation (Master's degree in Life Sciences and Biotechnology for Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

ABSTRACT

Lysinibacillus sphaericus (Lsp) is an entomopathogenic bacterium that produces the insecticidal Binary toxin (Bin) which displays larvicidal activity towards culicids. Its action to *Culex quinquefasciatus* depends on the Bin toxin binding to the α -glucosidase (Aglu) Cqm1, which act as receptors bound to larvae midgut epithelium. In the R2362 colony, two resistance alleles to Lsp were characterized: *cqm1_{REC}* and *cqm1_{REC-2}*, whose mutations prevent the expression of Aglu Cqm1 bound receptors. This study aimed to evaluate the catalytic activity of Cqm1, the total α -glucosidase activity in *C. quinquefasciatus* larvae samples, as well as compare the pre-imaginal development of susceptible (S) and resistant (R) individuals for each allele. For this purposes the following investigations were performed: catalytic activity of Cqm1; transcription pattern of Cqm1 paralogs; total activity of native Aglus in larvae; survival in different diets. The Aglu Cqm1 showed optimal enzymatic activity at 37° C, pH 7,5-8,0 using the synthetic substrate pN α G. The total α -glucosidase activity in S and R was similar, despite the lack of Cqm1 expression in R larvae. In silico search revealed 18 proteins which are Cqm1 paralogs and nine, among eleven investigated, showed to be expressed in S and R larvae. The quantitative analysis of three of those paralogs showed that two of them displayed an increased level of transcription in resistant larvae, suggesting that a mechanism of compensation of α -glucosidases expression may occur in these larvae. The pre-imaginal survival of S larvae was decreasing using the following diets: cat food, fish food, skim milk, yeast extract and sucrose. An overall analysis show that survival rates were lower for R larvae, compared to S ones, in all diets tested. Data show that mutations from the *cqm1_{REC}* and *cqm1_{REC-2}* alleles do not seem to have an impact on the α -glucosidase activity and the biological cost observed could be related to other genes and metabolic pathways.

Keywords: Mosquitoes; biolarvicides; resistance; fitness cost; α -glucosidases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do ciclo biológico de <i>Culex quinquefasciatus</i>	21
Figura 2 – <i>Lysinibacillus sphaericus</i> em fase de esporulação (Visão longitudinal em micrografia eletrônica).....	24
Figura 3 – Estrutura tridimensional (cristalografia) da toxina BinB.....	27
Figura 4 – Representação parcial da ORF do gene <i>cqm1</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i>	30
Figura 5 – Modelagem predita da proteína Cqm1 selvagem através do I-TASSER.....	31
Figura 6 – Representação esquemática de receptores no intestino de larvas de culicídeos.....	33
Figura 7 – Separação eletroforética de fragmentos amplificados por PCR para alelos do gene <i>cqm1</i> de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> das colônias S, REC e REC-2.....	35
Figura 8 – Organização espacial nos cromossomos de genes de α -glicosidases (GH13) de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Anopheles gambiae</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	38
Figura 9 – Perfil eletroforético (SDS-PAGE semi-desnaturante) de α -glicosidases presentes em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> susceptíveis ao Lsp.....	39
Figura 10 – Etapas de avaliação realizadas neste trabalho.....	45
Figura 11 – Perfil eletroforético da proteína Cqm1-S produzida em células Sf9.....	54
Figura 12 – Separação eletroforética dos fragmentos de genes que codificam a proteína Cqm1 e suas respectivas proteínas parálogas.....	58
Figura 13 – Perfil de bandas catalíticas de atividade α -glicosidase de amostras de larvas de diferentes colônias de <i>Culex quinquefasciatus</i>	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Características de α -glicosidases ortólogas de larvas de <i>Culex pipiens</i> (Cpm1), <i>Culex quinquefasciatus</i> (Cqm1), <i>Anopheles gambiae</i> (Agm3) e <i>Aedes aegypti</i> (Aam1).....	29
Quadro 2 – Alelos de resistência de <i>Culex</i> sp. associados à resistência à toxina Bin do <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	33
Quadro 3 – Alfa-glicosidases de mosquitos identificadas em análises funcionais.....	40
Quadro 4 – <i>Primers</i> utilizados nas reações de RT-PCR convencional.....	50
Quadro 5 – <i>Primers</i> utilizados nas reações de qRT-PCR em tempo real (qRT-PCR).....	51
Quadro 6 – Proteínas parálogas à α -glicosidase Cqm1 de <i>Culex quinquefasciatus</i> identificadas na plataforma VectorBase (https://vectorbase.org).....	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Frequência dos alelos <i>cqm1_{REC}</i> e <i>cqm1_{REC-2}</i> em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> da colônia R2362.....	35
Gráfico 2 – Frequência dos alelos <i>cqm1_{REC}</i> e <i>cqm1_{REC-2}</i> em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> da subcolônia R2362/RECREC-2, mantida sob condições de laboratório, por 10 gerações (F1 a F10).....	35
Gráfico 3 – Atividade α -glicosidase da proteína Cqm1 (20 μ g) em diferentes temperaturas..	54
Gráfico 4 – Atividade α -glicosidase da proteína Cqm1 (20 μ g) a partir de diferentes substratos.....	55
Gráfico 5 – Atividade α -glicosidase da proteína Cqm1 (20 μ g) na faixa de pH de 6-10.....	55
Gráfico 6 – Atividade α -glicosidase das proteínas Cqm1 (20 μ g) e Aam1 (10 μ g).....	56
Gráfico 7 – Curva de dissociação da qRT-PCR em tempo real dos genes das glicosidases Cqm1, suas parálogas (P10, P13 e P17) e gene endógeno (18S).....	60
Gráfico 8 – Expressão relativa do gene da glicosidase Cqm1 e suas parálogas nos indivíduos resistentes em relação ao susceptível.....	63
Gráfico 9 – Atividade α -glicosidase de amostra de intestinos de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> na faixa de pH de 6-10.....	65
Gráfico 10 – Atividade α -glicosidase em larvas e intestinos de <i>Culex quinquefasciatus</i>	65
Gráfico 11 – Desenvolvimento pré-imaginal de <i>Culex quinquefasciatus</i> das colônias susceptível S (A), e resistentes REC (B) e REC-2 (C) ao Lsp frente a diferentes dietas.....	68
Gráfico 12 – Dados agrupados do desenvolvimento pré-imaginal de <i>Culex quinquefasciatus</i> das colônias susceptível (S) e resistentes (REC e REC-2) ao Lsp frente ao grupo de dietas testadas.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de carboidratos e proteínas (g/kg) informados pelos fabricantes nos alimentos selecionados para avaliar o desenvolvimento de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	52
Tabela 2 – Avaliação de eficiência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de qRT-PCR.....	59
Tabela 3 – <i>Cycle Threshold</i> (C_T) médio dos genes das glicosidases Cqm1, suas parálogas (P10, P13 e P17) e gene endógeno (18S).....	62
Tabela 4 – Dados da avaliação do desenvolvimento pré-imaginal de <i>Culex quinquefasciatus</i> frente a cinco diferentes dietas.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Aminoácidos

Aam1 – *Aedes aegypti* maltase 1

Aglu – Alpha-glucosidase (alfa-glicosidase)

Agm3 – *Anopheles gambiae* maltase 3

Bin – Binária

Bp – População de campo de *Culex pipiens* (França) resistente ao *Lysinibacillus sphaericus* associada aos alelos *cpm1_{BP}* e *cpm1_{BP-del}*

Cpm1 – *Culex pipiens* maltase 1

Cqm1 – *Culex quinquefasciatus* maltase 1

Cry – Toxina do cristal

DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

E.C. – Código de enzimas dado pela *Enzyme Commission*

EL – Extrato de levedura

GEO – Colônia de *C. quinquefasciatus* (EUA) resistente a *Lysinibacillus sphaericus* associada ao alelo *cpm1_{GEO}*

GFP – *Green fluorescent protein* – Proteína fluorescente verde

GH – *Glycoside hydrolases* – Hidrolases de glicosídeos

GPI – Glicosil-fosfatidilinositol

KCl – Cloreto de potássio

kDa – Kilodalton

KH₂PO₄ – Fosfato monopotássico

L₁, L₂, L₃, L₄ – Larvas dos 1º, 2º, 3º e 4º estádios

LD – Leite desnatado

Li – Larva inteira

Mtx – *Mosquitocidal Toxins* – Toxinas Mosquitocidas

Mtx1, Mtx2 e Mtx3 – Toxinas mosquitocidas 1, 2 e 3

Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio dibásico

NaCl – Cloreto de sódio

NaH₂PO₄ – Fosfato de sódio monobásico

Ni-NTA – Resina de Níquel-Ácido nitrilotriacético Agarose

Nt – Nucleotídeos

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORF – *Open reading frame* (fase aberta de leitura)

PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salina)

pH – Potencial Hidrogeniônico

PM – Peso molecular

pNaG – *p-nitrophenyl α-D-glucopyranoside* (substrato sintético p-nitrofenil α-D-glicopiranosídeo)

qRT-PCR – *Reverse Transcriptase PCR (Polymerase Chain Reaction)* – PCR-transcriptase reversa quantitativa em tempo real (PCR - Reação da Polimerase em cadeia)

REC – Colônia de *C. quinquefasciatus* resistente ao *Lysinibacillus sphaericus* associada ao alelo *cqm1_{REC}*

REC-2 – Colônia de *C. quinquefasciatus* resistente ao *Lysinibacillus sphaericus* associada ao alelo *cqm1_{REC-2}*

RG – Ração para gatos

RMR – Região Metropolitana do Recife

RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)

RP – Ração para peixes

RT-PCR – *Reverse Transcriptase PCR (Polymerase Chain Reaction)* – PCR-transcriptase reversa (PCR - Reação da Polimerase em cadeia)

S – Colônia de referência de *C. quinquefasciatus* susceptível ao *Lysinibacillus sphaericus*

SC – Sacarose

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

Sf9 – Linhagem de células ovarianas de *Spodoptera frugiperda*

TA – Temperatura ambiente

Tdc – Tubo digestivo com conteúdo intestinal

Tds – Tubo digestivo sem conteúdo intestinal

Tm – *Melting Temperature* (temperatura de dissociação)

U - Unidade

UV – Ultravioleta

VNO – Vírus do Nilo Ocidental

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 Biologia de <i>Culex quinquefasciatus</i>	20
2.2 Controle populacional de mosquitos	22
2.3 <i>Lysinibacillus sphaericus</i> e toxinas inseticidas	23
2.4 Toxina Binária (Bin)	25
2.5 Receptores da toxina Bin	28
2.6 Resistência à toxina Bin	31
2.7 Alelos de resistência da colônia R2362	33
2.8 Custo biológico associado à resistência	36
2.9 α-glicosidases de mosquitos	37
3 JUSTIFICATIVA	41
4 PERGUNTA CONDUTORA	42
5 HIPÓTESE	43
6 OBJETIVOS	44
6.1 Objetivo geral	44
6.2 Objetivos específicos	44
7 MATERIAL E MÉTODOS	45
7.1 Colônias de culicídeos	45
7.2 Produção de proteína Cqm1 recombinante em células Sf9	46
7.3 Purificação e avaliação da proteína Cqm1 recombinante	46
7.4 Preparação de extratos de larvas	47
7.5 Ensaio de atividade α-glicosidase	47
7.5.1 Proteína Cqm1 recombinante	47
7.5.2 Extratos de larvas	48
7.6 Análise <i>in silico</i> de α-glicosidases parálogas à Cqm1	48
7.7 Avaliação da expressão de mRNA da α-glicosidase Cqm1 e suas parálogas	49
7.7.1 Extração de RNA	49
7.7.2 RT-PCR convencional	49
7.7.3 qRT-PCR em tempo real (qRT-PCR)	51
7.8 Ensaio de desenvolvimento de larvas em diferentes dietas	52
8 RESULTADOS	53

8.1 Expressão e atividade catalítica da proteína Cqm1 recombinante.....	53
8.2 Identificação de α-glicosidases parálogas à Cqm1.....	56
8.3 Expressão de glicosidases parálogas à Cqm1.....	58
8.3.1 Detecção de transcrição.....	58
8.3.2 Análise quantitativa de transcrição.....	59
8.4 Atividade α-glicosidase em larvas.....	63
8.5 Desenvolvimento pré-imaginal de larvas frente a diferentes dietas.....	65
9 DISCUSSÃO.....	70
10 CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICE A – Outras atividades desenvolvidas.....	87
APÊNDICE B – Artigo publicado 1.....	91
APÊNDICE C – Artigo publicado 2.....	92

1 INTRODUÇÃO

A bactéria entomopatogena *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) apresenta alta toxicidade para culicídeos, e biolarvicidas a base deste agente são produzidos comercialmente sobretudo para o controle de espécies de *Culex* e *Anopheles*. O Lsp tem sido utilizado no Programa de Controle da Filariose do Recife, desde 2003, para reduzir a densidade de *Culex quinquefasciatus*, que é vetor da *Wuchereria bancrofti* nesta área. O *C. quinquefasciatus* também pode ser vetor primário de arbovírus de importância na saúde pública, além de causar forte incômodo às populações em muitas áreas urbanas.

O principal fator inseticida de Lsp é a protoxina binária (Bin), proteína contida em cristais produzidos durante a esporulação bacteriana. Estes cristais têm ação larvicida por ingestão, são solubilizados em pH intestinal alcalino e as protoxinas são processadas por serina-proteases para a forma de toxinas ativas. Para a ação do Lsp, a toxina Bin deve ligar-se a receptores específicos presentes no epitélio intestinal das larvas. Em *C. quinquefasciatus*, este receptor, denominado Cqm1 (*Culex quinquefasciatus* maltase 1), é uma α -glicosidase (Aglu - EC 3.2.1.20) de 66 kDa, com 580 aminoácidos, que está ligada ao epitélio intestinal das larvas através de uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI). As Aglus desempenham uma função primordial na digestão, pois agem na clivagem de moléculas de glicose a partir de carboidratos essenciais que fazem parte da dieta de culicídeos.

A Aglu Cqm1 foi inicialmente caracterizada por atuar como receptor da toxina Bin no intestino de larvas de *C. quinquefasciatus*. Esta molécula é fundamental para a ação da toxina e mutações no seu gene podem impedir a sua expressão como proteína de membrana no epitélio intestinal. Este tem sido o principal mecanismo de resistência detectado e, até o momento, oito alelos do gene *cqm1* associados à resistência já foram identificados em colônias selecionadas em laboratório ou em populações de campo tratadas com o Lsp. A ausência de receptores Cqm1 no epitélio intestinal confere refratariedade total das larvas à toxina Bin, visto que esta Aglu é o principal sítio-alvo da toxina.

Dois dos alelos de resistência já descritos, denominados *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*, foram identificados na colônia R2362, selecionada artificialmente com o Lsp no laboratório de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ/PE) para realizar estudos de resistência a este agente. O alelo *cqm1_{REC}* apresenta uma deleção de 19 nucleotídeos (posição 1334-1352), que causa uma mudança na fase de leitura e gera um códon de terminação da tradução prematuro (posição 443). Neste caso, a proteína Cqm1_REC, potencialmente codificada por este alelo, é truncada (442 AA) e seria solúvel por não possuir

a âncora GPI, fator que impede a sua localização no epitélio para ligar-se à toxina Bin. O alelo *cqml*_{REC-2} é caracterizado por uma transição G1292A que gera um códon de terminação de tradução prematuro (posição 431) e, a exemplo do alelo *cqml*_{REC}, também codifica uma proteína truncada (430 AA) que, se produzida, seria solúvel. Embora distintas, as duas mutações têm efeito semelhante, pois ambas impedem a expressão de proteínas completas (580 AA) e dotadas de âncora GPI para sua correta localização na superfície do epitélio intestinal.

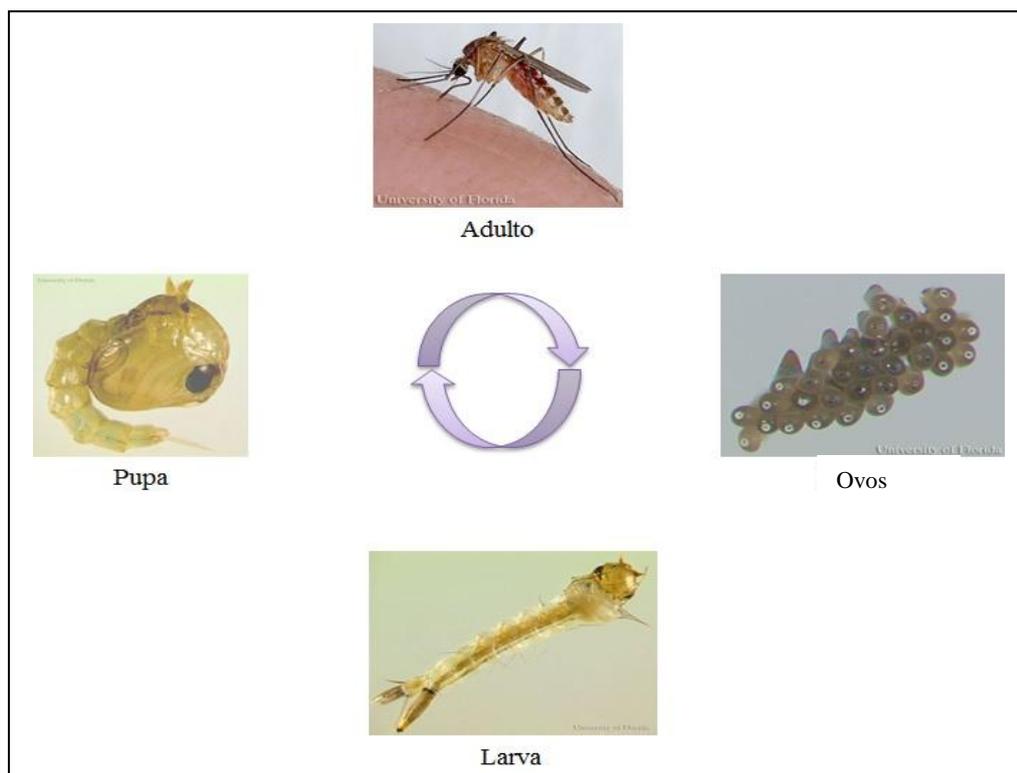
A resistência da colônia R2362 foi inicialmente associada ao alelo *cqml*_{REC}, visto que todas as larvas analisadas para o gene *cqml* no primeiro estudo realizado (F74) eram homozigotas para este alelo. No entanto, novas avaliações (F180) revelaram o alelo *cqml*_{REC-2} nesta colônia. A avaliação retrospectiva mostrou que o alelo *cqml*_{REC} era predominante na F35 (0,75 *cqml*_{REC} X 0,25 *cqml*_{REC-2}). Por razões ainda não elucidadas, o alelo *cqml*_{REC} tornou-se minoritário, pois o alelo *cqml*_{REC-2} teve um aumento de sua frequência e na F191 representava 0,69. Estes resultados apontam que ocorreu um processo de co-seleção dos alelos *cqml*_{REC} e *cqml*_{REC-2} nesta colônia mantida em laboratório, sem fluxo gênico, constituindo um modelo único para o estudo da evolução de resistência. O conjunto de dados obtidos sugere que o alelo *cqml*_{REC} foi preferencialmente selecionado nas primeiras gerações, entretanto, sua frequência foi reduzida a uma proporção inferior à do alelo *cqml*_{REC-2} nas últimas avaliações. É possível que indivíduos homozigotos para o alelo *cqml*_{REC-2} tenham um melhor desempenho biológico em relação aos homozigotos para o alelo *cqml*_{REC}, sob determinadas condições, e esta pode ser uma das razões associadas à substituição observada na colônia R2362. Colônias homozigotas para cada alelo foram estabelecidas (REC e REC-2) e têm sido mantidas em laboratório, o que permite estudos para a caracterização específica de expressão e atividade da Aglu Cqm1, e de outras Aglus potencialmente expressas nestas larvas. Dados prévios do grupo apontaram que larvas de *C. quinquefasciatus* possuem Aglus parálogas à Cqm1 que ainda não foram identificadas e que podem ter um importante papel, sobretudo em indivíduos desprovidos da Cqm1.

Diante do exposto, o principal objetivo deste estudo foi realizar uma caracterização da Aglu Cqm1 e avaliar o impacto de mutações neste gene na fisiologia de larvas de *C. quinquefasciatus* susceptíveis e resistentes. O estudo comparativo de Aglus é uma contribuição relevante para avaliar se os alelos do gene *cqml* associados à resistência podem exercer um impacto na capacidade adaptativa dos indivíduos homozigotos para cada alelo e, conseqüentemente, o risco que eles representam se forem selecionados em populações de campo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biologia de *Culex quinquefasciatus*

Culex quinquefasciatus Say 1823 é um inseto da ordem Diptera, pertencente à família Culicidae, e que possui uma grande importância na saúde pública. É um mosquito cosmopolita, encontrado em áreas urbanas de regiões tropicais e subtropicais. As fêmeas de *C. quinquefasciatus* põem os ovos preferencialmente em habitats ou criadouros com alta concentração de matéria orgânica em decomposição, como esgotos ou fossas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). No Brasil, esta espécie possui distribuição abrangente e abundância influenciada pela presença humana e urbanização, sendo considerada uma espécie sinantrópica (FORATTINI et al., 1993). *C. quinquefasciatus* é um inseto holometábolo e o seu ciclo de vida compreende as fases de ovo, quatro estágios larvais, pupa e adulto. O ciclo é considerado relativamente curto, durando cerca de dez dias desde o ovo até a emergência do adulto (Figura 1). Logo após o período de desenvolvimento embrionário, ocorre a eclosão das larvas do 1º estágio (L_1), seguida por mais três estágios larvais (L_2 , L_3 e L_4) até chegarem à fase de pupa, a partir da qual ocorre a emergência dos adultos, que corresponde à fase alada (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). O desenvolvimento pré-imaginal ocorre no ambiente aquático, e é composto pelas fases de ovo, quatro estágios larvais (L_1 , L_2 , L_3 e L_4) e pupa. Pode haver variações na duração do ciclo devido a fatores bióticos (eg. densidade e nutrição) e abióticos (eg. temperatura e fotoperíodo). As larvas se alimentam de matéria orgânica disponível no meio aquático, enquanto os adultos se alimentam de seiva vegetal. As fêmeas também realizam hematofagia, que é necessária para desenvolvimento dos ovos.

Figura 1 – Representação do ciclo biológico de *Culex quinquefasciatus*.

Fonte: Hill e Connelly (2009).

Legenda: Após a postura dos ovos agrupados sob a forma de jangada, as larvas eclodem e passam por quatro estádios, com média de 24 h cada, transformam-se em pupas que, em até 48 h, atingem a fase adulta. O ciclo tem duração média de dez dias.

Devido ao hábito hematofágico das fêmeas, algumas espécies de culicídeos apresentam importância na saúde pública, pois podem atuar como vetores de agentes patogênicos ao homem e outros vertebrados. No Brasil, *C. quinquefasciatus* é o vetor do nemátodo *Wuchereria bancrofti*, que é o agente etiológico da filariose linfática (BRASIL, 2011). Atualmente, cerca de 1,4 bilhão de pessoas em 73 países vivem em área de risco para a filariose linfática, e há cerca de 120 milhões de pessoas infectadas. Destes, cerca de 40 milhões estão afetados pela morbidade que esta doença causa (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014).

A cidade do Recife ainda possui áreas endêmicas, pois tem ocorrido introdução e/ou transmissão da filariose (MEDEIROS et al., 2003). Em Pernambuco, a parasitose também foi encontrada na cidade do Recife e em áreas pertencentes à Região Metropolitana, em cidades como Olinda, Jaboatão dos Guararapes e Paulista (BRANDÃO et al., 2015; FONTES et al., 2012; RECIFE, 2008; ROCHA et al., 2010). Devido a este cenário e à decisão da OMS de erradicar a doença a nível mundial até 2020 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1997, 2000), a cidade do Recife implementou o Programa de Controle da Filariose, cujo objetivo é eliminar a doença através de diversas ações que incluem o tratamento da população

humana com drogas microfilaricidas e ações de combate ao *C. quinquefasciatus* (ROCHA et al., 2010). No subprograma de controle de vetores, têm sido utilizados larvicidas biológicos a base da bactéria entomopatogênica *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp), que será detalhado nas próximas seções. Em um monitoramento realizado pelo Programa SANAR – Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas - na Região Metropolitana do Recife, foi observado que, entre 2009 e 2012, houve uma queda de 69 para 5 casos positivos para a infecção, indicando que as ações tomadas para o controle desta doença estão tendo sucesso e precisam ser continuadas (PERNAMBUCO, 2013).

O *C. quinquefasciatus* também pode ser vetor primário de arbovírus como o vírus do Nilo Ocidental (VNO), Oropouche, Saint Louis, Rocio, entre outros (FIGUEIREDO, 2007; GODSEY et al., 2005; MONDINI et al., 2007). O VNO pode causar uma doença neurológica fatal em humanos, além de causar doenças severas e mortes em cavalos, e tem as aves como seus hospedeiros naturais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011). No Brasil, o VNO foi detectado em aves e equinos, em áreas do Nordeste, Norte e Centro-Oeste (MELANDRI et al., 2012; OMETTO et al., 2013; SILVA et al., 2011). Recentemente, foi diagnosticado o primeiro caso humano, no Brasil, em um agricultor residente no Piauí, porém ainda não foi esclarecido se o caso foi autóctone ou importado (VIEIRA et al., 2015).

2.2 Controle populacional de mosquitos

O controle de diversas doenças, como malária, dengue e filariose, que apresentam mosquitos como vetores dos respectivos agentes etiológicos, pode ser alcançado através da redução das populações destes insetos (HEMINGWAY, 2014). Entretanto, o controle de culicídeos é complexo pois os mosquitos apresentam características biológicas como ciclo de vida curto, elevada taxa reprodutiva e adaptação ao ambiente (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994) que, associadas a precariedade das condições ambientais de áreas urbanas, contribuem para sua proliferação. Após a descoberta dos inseticidas químicos, o controle de vetores teve um grande impulso, sobretudo devido ao uso, a partir de 1950, do inseticida organoclorado dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). Em seguida, outras classes inseticidas foram introduzidas como os organofosforados, carbamatos e piretróides. Entretanto, o uso destes compostos químicos tem sofrido restrições devido à sua toxicidade para organismos não-alvo e à seleção de populações resistentes aos compostos utilizados (CHAREONVIRIYAPHAP et al., 2013; HEMINGWAY; RANSON, 2000). Dados na literatura têm relatado casos de intoxicação de humanos por organofosforados e carbamatos que causa centenas de milhares de mortes a cada

ano, e apontam a necessidade de redução ou substituição do uso destes compostos (KING; AARON, 2015).

Estas limitações decorrentes do uso de inseticidas químicos motivaram a busca de métodos de controle mais seletivos, tais como agentes de controle biológico. Podem ser utilizados predadores, patógenos, parasitas, competidores ou toxinas produzidas por estes agentes (MITTAL, 2003). As bactérias entomopatogênicas produzem toxinas inseticidas que têm ação para lepidópteros, dípteros, coleópteros, dentre outros, e são os agentes de controle biológico mais utilizados na atualidade. Este grupo se caracteriza pela produção de cristais protéicos, que possuem toxinas com ação inseticida. Os cristais agem por ingestão e tem como alvo as células do epitélio intestinal, onde estão localizados receptores específicos para as toxinas do cristal (BRAVO et al., 2011; MITTAL, 2003). A bactéria *L. sphaericus* apresenta alta toxicidade para culicídeos e, por este motivo, biolarvicidas a base deste agente são produzidos comercialmente e vem sendo usados em programas de controle de vetores, sobretudo de espécies dos gêneros *Culex* e *Anopheles* (LACEY et al., 2007; REGIS et al., 2001).

2.3 *Lysinibacillus sphaericus* e toxinas inseticidas

O *Lysinibacillus sphaericus* Neide, anteriormente classificado como *Bacillus sphaericus*, teve sua proposta de alteração de nome devido à produção de peptidoglicanos contendo os aminoácidos lisina e ácido aspártico (AHMED et al., 2007). O *L. sphaericus* (Lsp) é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica, esporulante e que possui distribuição cosmopolita podendo ser encontrada em solos e ambientes aquáticos (DAVIDSON, 1984). Esta bactéria é classificada como entomopatogena, visto que durante sua esporulação produz cristais que contêm proteínas inseticidas para larvas de algumas espécies de mosquitos. Os cristais localizam-se próximos aos esporos que se encontram na região terminal do esporângio em forma de raquete (Figura 2). A primeira linhagem do Lsp com atividade inseticida para mosquitos foi isolada em 1965 nos Estados Unidos em larvas moribundas de *Culiseta incidens* (KELLEN et al., 1965). Posteriormente, foram caracterizadas diversas cepas com alto potencial larvicida para culicídeos como: 1593 da Indonésia (SINGER, 1974); 2297 do Sri Lanka (WICKREMESINGHE; MENDIS, 1980); 2362 da Nigéria (WEISER, 1984); e C3-41 da China (ZHANG et al., 1987).

Figura 2 – *Lysinibacillus sphaericus* em fase de esporulação (Visão longitudinal em micrografia eletrônica).



Fonte: Modificado de Kalfon et al. (1984).

Legenda: E = esporo; C = cristal protéico.

Até o presente, quatro classes de toxinas inseticidas produzidas pelas cepas de Lsp foram identificadas: toxina Binária (Bin), toxinas Mtx, toxinas Cry e a Sphaericolisina. Estas toxinas são sintetizadas em fases distintas do desenvolvimento da bactéria e por diferentes cepas (BERRY, 2012), e suas principais características estão descritas a seguir.

As cepas de Lsp que possuem alta atividade larvicida para culicídeos, tais como a 1593 e a 2362, produzem as protoxinas Bin em cristais proteicos, durante a fase de esporulação (BERRY, 2012). O cristal proteico apresenta quantidades equimolares de duas subunidades, que são denominadas BinA (42 kDa) e BinB (51 kDa), sendo esta considerada uma proteína heterodimérica. A protoxina é denominada binária (Bin), pois ambos polipeptídeos são necessários, em concentração equimolar, para provocar uma alta toxicidade para os insetos (BAUMANN et al., 1991). Esta é a principal toxina inseticida produzida pelo Lsp e é o princípio ativo dos produtos comerciais hoje disponíveis. As suas características serão descritas de forma detalhada na seção 2.4.

A segunda classe de toxinas descobertas são as toxinas Mtx (*Mosquitocidal Toxins* ou toxinas mosquitocidas) que são produzidas durante a fase vegetativa de crescimento e estão classificadas em três tipos: Mtx1 (100 kDa), Mtx2 (32 kDa) e Mtx3 (36 kDa). Por serem produzidas na fase vegetativa, estas proteínas apresentam atividade baixa ou instável, provavelmente devido à degradação proteolítica no meio de cultura. Entretanto, na cepa 1693 de Lsp, modificada expressando o gene da Mtx1, houve toxicidade para larvas de culicídeos durante a fase de crescimento vegetativo e durante a esporulação (THANABALU; PORTER, 1995). Quando expressas de forma recombinante em *Escherichia coli*, as toxinas Mtx1 e Mtx2 apresentam alta atividade larvicida para culicídeos (WEI; CAI; YUAN, 2006; WIRTH et al., 2007).

Proteínas da família Cry, que é a principal classe de toxinas inseticidas produzidas pelas subespécies de *Bacillus thuringiensis* (BRAVO et al., 2011; CRICKMORE et al., 1998), também podem ser produzidas por Lsp. As toxinas Cry48Aa (135 kDa) e Cry49Aa (53 kDa) foram identificadas na cepa IAB59 de Lsp. Assim como a toxina Bin, elas são produzidas em

cristais durante a fase de esporulação e agem em sinergia, sendo considerada uma nova toxina Binária. Quando as toxinas são administradas na sua forma de proteína purificada e em concentração equimolar, elas apresentam alta atividade larvicida para *C. quinquefasciatus*, comparável àquela apresentada pela toxina Bin (JONES et al., 2007). Entretanto, nas cepas nativas, a Cry48Aa apresenta um déficit ou instabilidade de produção fazendo com que a atividade larvicida nesta cepa não seja muito elevada, pois a produção dos fatores tóxicos não é equimolar. A ação das toxinas Cry48Aa/Cry49Aa parece se limitar ao gênero *Culex*, não sendo efetiva para larvas de *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* (JONES et al., 2008).

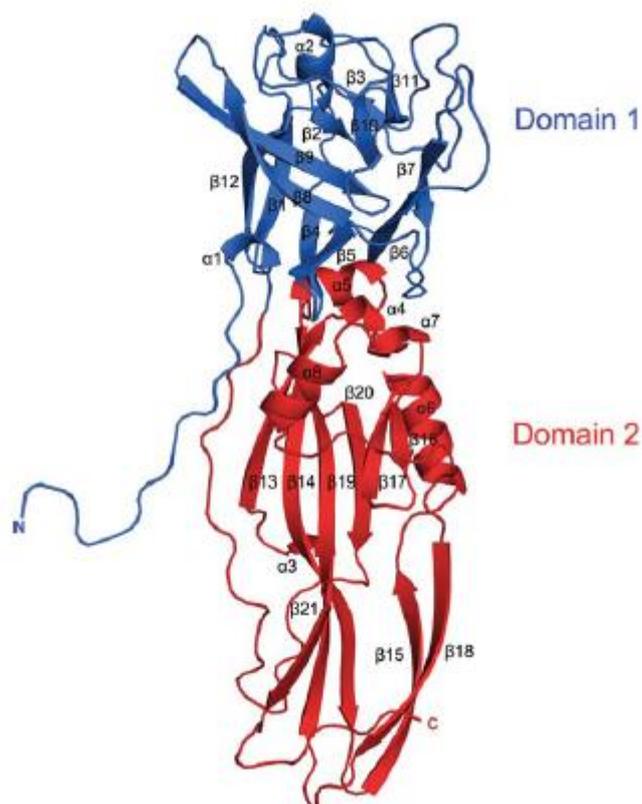
A mais recente toxina identificada, a partir da cepa A3-2 de Lsp, é uma citolisina de 53 kDa, denominada Sphaericolisina. Nesta cepa não foram encontrados genes de outras toxinas já caracterizadas. A Sphaericolisina tem toxicidade quando injetada em *Blattella germanica* (Blattodea) e *Spodoptera litura* (Lepidoptera), e ela também já foi isolada a partir de um órgão digestivo do inseto *Myrmeleon bore* (NISHIWAKI et al., 2007).

2.4 Toxina Binária (Bin)

A toxina Bin é uma proteína inseticida produzida sob a forma de cristais de maneira abundante e estável durante a esporulação. Por esta razão, os biolarvicidas comerciais são produzidos a partir de cepas de Lsp, que são produtoras de cristais contendo a protoxina Bin (LACEY et al., 2007; REGIS et al., 2001). Estes cristais tem ação larvicida por ingestão, pois as larvas se alimentam por filtração de partículas em suspensão no meio aquático. Uma vez ingeridos, os cristais são solubilizados em pH intestinal alcalino ($\cong 10$), as protoxinas são liberadas no lúmen e, devido à ação de serina-proteases, os polipeptídeos de 42 (BinA) e 51 (BinB) kDa são clivados em componentes de 39 e 43 kDa, respectivamente, que constituem a forma ativa (BROADWELL; BAUMANN, 1987). A principal etapa do modo de ação do Lsp é o reconhecimento e ligação da toxina Bin a receptores específicos presentes no epitélio intestinal, que ocorre através do componente BinB, enquanto o componente BinA é responsável pela toxicidade (CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 1997; NICOLAS et al., 1993). As subunidades BinA e BinB, quando alinhadas, apresentam 25% de identidade e 40% de similaridade. Além disso, as sequências de aminoácidos mais conservadas incluem principalmente regiões hidrofóbicas, que estão possivelmente envolvidas na interação com a membrana (BAUMANN; BROADWELL; BAUMANN, 1988; CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELÉCLUSE, 1996).

A subunidade BinA possui 286 aminoácidos e os domínios C-terminal e N-terminal são importantes para sua interação com o componente BinB (OEI; HINDLEY; BERRY, 1992). O domínio C-terminal parece estar fortemente relacionado à sua atividade tóxica para as células e pode estar implicado na capacidade de formação de poros na membrana do epitélio intestinal, que favorecem a internalização da toxina (ELANGO VAN et al., 2000). Além disto, os resíduos de cisteína (31, 47 e 195) desta subunidade, são essenciais na toxicidade da Bin (PROMDONKOY et al., 2008). Do ponto de vista estrutural, os estudos até agora realizados mostram que a porção N-terminal da subunidade BinA parece estar envolvida na interação com a BinB e análises de dicroísmo circular sugeriram a predominância de folhas β (SRISUCHARITPANIT et al., 2012).

A subunidade BinB possui 448 AA e a região N-terminal é responsável pela interação com os receptores no epitélio intestinal, enquanto a região C-terminal contém porções responsáveis pela ligação à toxina BinA (ELANGO VAN et al., 2000; OEI; HINDLEY; BERRY, 1992). A ligação da subunidade BinB ao receptor ocorre através de um segmento N-terminal localizado entre os aminoácidos N33 a L158 da subunidade BinB. Neste trecho, os aminoácidos $_{85}\text{IRF}_{87}$, $_{147}\text{FQF}_{149}$ e Y150 são críticos para a ligação da toxina ao receptor (ROMÃO; MELO-NETO; SILVA-FILHA, 2011; SINGKHAMANAN et al., 2010). A estrutura cristalográfica da subunidade BinB mostrou dois domínios: o N-terminal, com uma estrutura globular e o C-terminal, que é alongado (Figura 3). O domínio N-terminal tem resíduos de cisteína importantes para a manutenção da conformação funcional da toxina BinB, enquanto o domínio C-terminal apresenta características como um *cluster* de resíduos aromáticos e uma predominância de resíduos de serina e treonina. O domínio N-terminal tem características conservadas em relação a outras proteínas com função de ligação a carboidratos, corroborando a hipótese de que esta região é responsável pela interação com receptores (SRISUCHARITPANIT et al., 2014).

Figura 3 – Estrutura tridimensional (cristalografia) da toxina BinB.

Fonte: Srisucharitpanit et al. (2014).

Legenda: Diagrama Ribbon da toxina BinB. A estrutura é formada por dois domínios: Domínio 1 (azul), N-terminal; Domínio 2 (vermelho), C-terminal.

O espectro de ação da toxina Bin foi avaliado para vários dípteros e sua atividade larvívica foi descrita para os gêneros *Culex*, *Anopheles*, *Aedes*, *Mansonia*, além de outros, sendo os simúlídeos refratários. As espécies mais susceptíveis pertencem ao complexo *Culex pipiens*, ao passo que no gênero *Aedes* há uma ampla variação no padrão de susceptibilidade, sendo *Ae. aegypti* considerado refratário pois a concentração letal do Lsp para esta espécie é cerca de 100 a 1000 vezes superior àquela para *C. pipiens* (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). Foi demonstrado que a toxina Bin não tem capacidade de se ligar ao epitélio de larvas de *Ae. aegypti* devido à ausência de receptores específicos (FERREIRA et al., 2010). Apesar da refratariedade do *Ae. aegypti*, existem espécies do gênero que são susceptíveis ao Lsp como *Aedes atropalpus*, *Aedes triseriatus* e *Aedes vexans* (BERRY et al., 1993; WRAIGHT; MOLLOY; SINGER, 1987). Do ponto de vista aplicado, biolarvicidas a base do Lsp têm sido usados sobretudo para o controle de espécies dos gêneros *Culex* e *Anopheles* em diversas partes do mundo (LACEY et al., 2007; REGIS et al., 2001). Estudos demonstraram que em larvas de espécies susceptíveis como *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus*, *An. gambiae* e *Anopheles stephensi* a toxina Bin liga-se especificamente a receptores localizados no *microvilli* das

células epiteliais do intestino. A afinidade do complexo Bin-receptor está diretamente correlacionada à susceptibilidade da espécie analisada. Larvas do complexo *C. pipiens* apresentam o padrão mais alto de ligação já descrito, enquanto em *Ae. aegypti*, considerada uma espécie naturalmente refratária, não foi detectado um nível significativo de ligação específica da toxina Bin ao *microvilli* intestinal, confirmando o importante papel dos receptores para ação da toxina Bin (FERREIRA et al., 2010; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA et al., 1997, 2004).

2.5 Receptores da toxina Bin

Os receptores da toxina Bin em *C. quinquefasciatus*, *C. pipiens* e *An. gambiae* foram identificados e são Aglus (E.C. 3.2.1.20) ortólogas de cerca de 66-72 kDa, ligadas à membrana apical do epitélio intestinal através de uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (DARBOUX et al., 2001; OPOTA et al., 2008; PAUCHET et al., 2005; ROMÃO et al., 2006; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999). Como descrito no item anterior, a etapa de ligação da toxina Bin a estes receptores é indispensável para a ação do Lsp. Os receptores foram caracterizados em três espécies e denominados como Cpm1 ou Cqm1 em referência à “*C. pipiens* ou *C. quinquefasciatus* maltase 1” e Agm3 em referência à “*An. gambiae* maltase 3”. Estas são proteínas ortólogas e Cqm1 e Agm3 possuem 78% de similaridade. Além destas, foi identificada a ortóloga Aam1, em referência à “*Ae. aegypti* maltase 1”, que apresenta 80% de similaridade com a Cqm1, entretanto não apresenta capacidade de ligação à toxina Bin (FERREIRA et al., 2010). O quadro 1 mostra uma sinopse das características destas Aglus ortólogas.

Quadro 1 – Características de α -glicosidases ortólogas de larvas de *Culex pipiens* (Cpm1), *Culex quinquefasciatus* (Cqm1), *Anopheles gambiae* (Agm3) e *Aedes aegypti* (Aam1).

α -glicosidase	Cpm1	Cqm1	Agm3	Aam1
Gene (ORF pb)	1740	1743	1764	1746
Aminoácidos (Nº)	580	580	588	582
Identidade % (AA)	100	97	66.4	74.2
Peso molecular predito (kDa)	66	66	67	66
Peso molecular (\approx kDa)	66	64-66	67	66
Sítios preditos de glicosilação	3	3	3	6
Glicosilação <i>in vivo</i> ¹	Nd	Não	Nd	Sim
Localização no intestino	Ceco gástrico e estômago posterior	Intestino médio	Estômago posterior	Intestino médio
Atividade α -glicosidase	Sim	Sim	Nd	Sim
Ligação à toxina Bin	Sim	Sim	Sim	Não

Fonte: Silva-Filha, Berry e Regis (2014).

Legenda: ¹ = Glicosilação verificada por tratamento com a enzima PNGase F. AA = aminoácidos. Nd = Não determinado.

O receptor Cqm1 de *C. quinquefasciatus* é codificado pelo gene *cqm1* (Figura 4), que possui 1870 nucleotídeos (nt), sendo a região codificante formada por 1743 nt e dois íntrons (50-55 nt), cuja sequência está disponível no GenBank sob o número de acesso DQ333335.1 (ROMÃO et al., 2006). A proteína Cqm1, além de sua função primordial como Aglu, liga-se com alta afinidade à toxina Bin, funcionando como seu receptor (DARBOUX et al., 2001; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999). A estrutura tridimensional da proteína Cqm1 é desconhecida, mas sabe-se que sua conformação é essencial para interação com a Bin, pois a desnaturação provoca a perda desta habilidade. Dados prévios de nossa equipe demonstraram que a proteína Cqm1, aparentemente, não é glicosilada (FERREIRA et al., 2010), apesar de sua sequência apresentar três sítios preditos de glicosilação. Ferreira et al. (2014) demonstraram que a região N-terminal, entre os resíduos S129 e A312, é responsável pela interação da Cqm1 com a toxina Bin, e que resíduos ₁₅₅PATGG₁₆₀ são críticos para esta interação. A modelagem estrutural da Cqm1 mostrou que a região envolvida na interação é formada por α -hélices e o motivo ₁₅₅PATGG₁₆₀ está situado em uma alça (Figura 5) que é uma localização favorável para interações.

Figura 4 – Representação parcial da ORF do gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus*.

GGGAATTTGACGGATTTTGACAAGTTGGTGGAGGAATCGCACAGAATGGGATCAAGCTGATGCTGGACTTTTATCCGAACCACTCGAGTGATCAGCAGC 400
 G N L T D F D K L V E E S H K N G I K L M L **D F I P N H** S S D Q H 133

AGTGGTTTGTGAAGTCTGTGTTGCGGGATCCGGAGTATAGTGACTTTTATGTGTGGAGACCTCCGGCGACAGGGGGTGGTCCGCCGAATAATTGGATCTC 500
 E W F V K S V L R D P E Y S D F Y V W R P P A T G G G P P N N W I S 167

GGTATTTGGAGGGTCCGGCGTGGACATATAATCAAGCGAGAGGGGAGTACTATCTGCACCAGTTTACGCCTCAGCAGCCGGATTTGAACTACCGGAATCCG 600
 V F G G S A W T Y N Q A R G E Y Y L H Q F T P Q Q P D L N Y R N P 200

AAGTGCTTGCAGGATGACCAAGATGTTGTTCTTCTGGTTGGACCGTGGAGTGGATGGGTTCCGGTTGGACGCTATCAACCACTATGTTTCGAGGATGAGC 700
 K V L A E M T K M L F F W L D R G V D **G F R L D A I N H** M F E D E 233

AGTCCGGGATGAGCCGTTGTCTGGGTGGGACAGCCGGGAGAGTACGATTCTTTGGATCACATTTATACCAAGGACATCCCAGGATGTGTATGATGTGGT 800
 Q F R D E P L S G W G Q P G E Y D S L D H I Y T K D I P D V Y D V V 267

TTACAACCTGGCGGGATCAGATGGATAAGTATTCGCGGAGAAAAGCCGTAATCATCTGATGACCGGAAGCGTATTTCGAGCATCGAGGGAACGATGCTG 900
 Y N W R D Q M D K Y S A E K G R T I I L M T **E A Y S** S I E G T M L 300

TACTACGAGAGTGCAGGACCGGAAGCGCCAGGGAGCTCACATGCCGTTCAACTTCCAGCTGATCTATGACTTTAAGAAGGAGCAGAACGCCGTTGGGCTGA 1000
 Y Y E S A D R K R Q G A H M P F N F Q L I Y D F K K E Q N A V G L 333

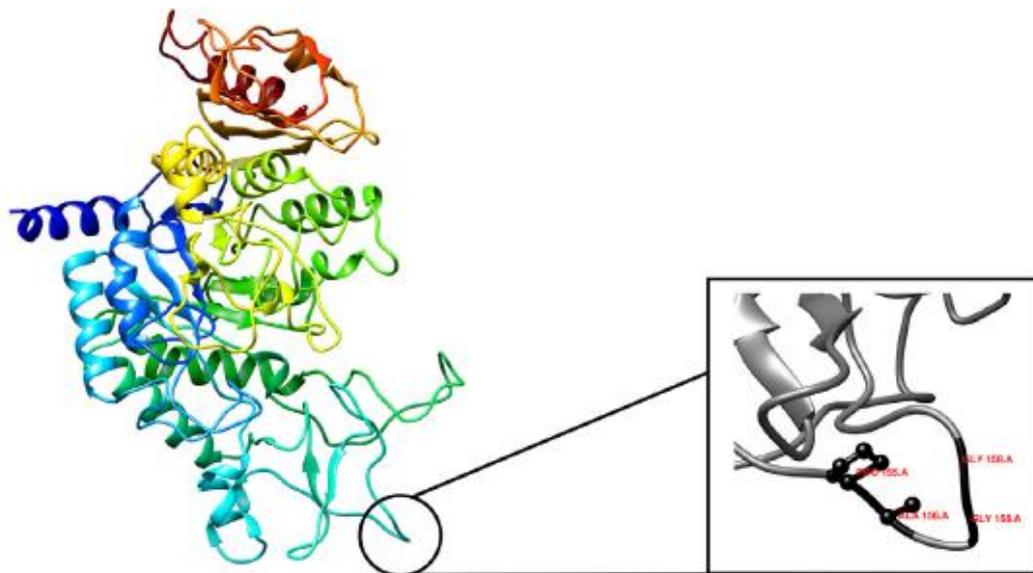
AGAATTCGATCGACTGGTGGATGAACAACATGCCGGCTCGACACACTCCAAGCTGGTAGCTGGATCGCACGATCATTACGGGTAGCGTCACGAGTTGG 1100
 K N S I D W W M N N M P A R H T P S W **V A G S H D** H S R V A S R V G 367

ACTAGATCGGGTTGATCAGGTCATGACGTTGCTGCATACCCTGCCGGGGACTAGTATTACGTATTACGGTGAAGAGGTAGCCATGCAGGACTTCAAAGAG 1200
 L D R V D Q V M T L L H T L P G T S I T Y Y G E E V A M Q D F K E 400

GCTCAGCAGTTCGACAACCGAGATCCGAACCGGACGCCGATGCAAGTGGGACTCGTCGACCAGTGCCGGGTTTCAGCACAAACACCAACACAATGCTCCGCG 1300
 A Q Q F D N R D P N R T P M Q W D S S T S A G F S T N T N T W L R 433

Fonte: VectorBase.

Legenda: A região codificante do gene *cqm1* é formada por 1743 nt e está disponível no GenBank (DQ33335.1). A figura representa a sequência nucleotídica da região (300-1300) que compreende os domínios conservados em α -glicosidasas de mosquitos (azul), a deleção de 19 nt correspondente à mutação do alelo *cqm1_{REC}* (verde) e a mutação pontual G1292A correspondente ao alelo *cqm1_{REC-2}* (rosa).

Figura 5 – Modelagem predita da proteína Cqm1 selvagem através do I-TASSER.

Fonte: Ferreira et al. (2014).

Legenda: Diagrama Ribbon da proteína Cqm1 selvagem. Quadrado destaca os resíduos localizados na alça que estão implicados na ligação à toxina Bin.

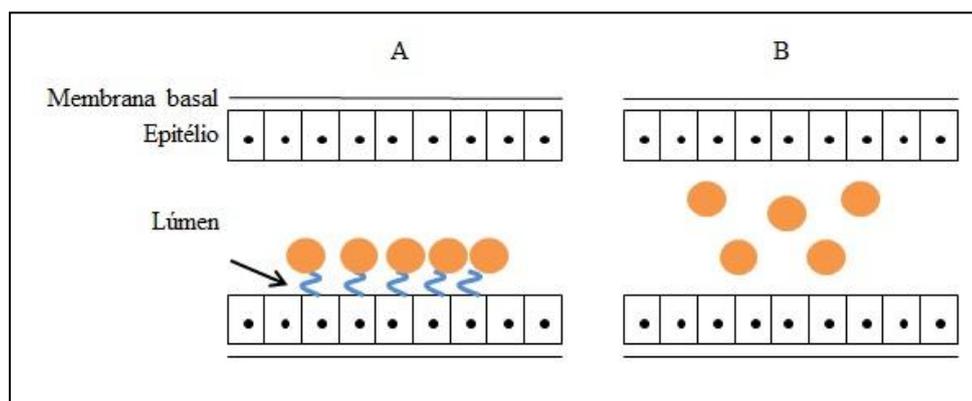
2.6 Resistência à toxina Bin

Os estudos de resistência de *Culex* ao Lsp têm demonstrado a importância das Aglus Cpm1 e Cqm1, pois elas são receptores da toxina Bin, e sua ausência no *microvilli* intestinal de larvas é o principal mecanismo de resistência registrado (NIELSEN-LEROUX et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004; SILVA-FILHA et al., 2004). A utilização do Lsp para o controle de culicídeos tem se mostrado eficiente, entretanto, a ação da toxina Bin depende da ligação a uma única classe de receptores (Aglu Cqm1), o que favorece o surgimento de resistência (FERREIRA; SILVA-FILHA, 2013). Mutações no gene que codifica o receptor podem acarretar uma falha de ligação à toxina e, por consequência, a resistência. Oito alelos do gene *cqm1/cpm1* associados à resistência já foram descritos em colônias selecionadas em laboratório ou em populações de campo (CHALEGRE et al., 2012, 2015; DARBOUX et al., 2002, 2007; GUO et al., 2013; ROMÃO et al., 2006). A ausência de receptores Cqm1 localizados no epitélio intestinal confere refratariedade total das larvas à toxina Bin (Figura 6). Uma sinopse dos alelos do gene *cqm1/cpm1* que possuem mutações associadas à resistência à toxina Bin está apresentada no quadro 2.

O alelo *cpm1_{GEO}*, identificado na colônia GEO, é caracterizado por uma mutação “nonsense” na posição T1706A, que gera um códon de terminação de tradução prematuro, levando à produção de uma proteína truncada com 568 aminoácidos, desprovida de âncora

GPI (DARBOUX et al., 2002). Dois alelos, *cpm1_{BP}* e *cpm1_{BP}-del*, foram identificados em uma população de campo resistente na França (BP). O alelo *cpm1_{BP}* apresenta uma mutação “nonsense” Gln396Stop, que gera um códon de parada de tradução prematuro, com a produção de uma proteína truncada de 395 aminoácidos sem âncora GPI. Já o alelo *cpm1_{BP}-del* é originado a partir da inserção de um elemento transponível no éxon 2, que gera uma deleção de 198 nt. A proteína produzida apresenta 514 aminoácidos e tem âncora GPI, entretanto a perda de 66 aminoácidos impede a sua ligação à toxina Bin (DARBOUX et al., 2007). O alelo *cqm1_R*, identificado na colônia CqRL/C3-41 (China), apresenta uma deleção da C445, levando à formação de um códon de terminação da tradução prematuro na posição 582 e à mudança do quadro de leitura dos 539 aminoácidos subsequentes. A proteína expressa apresenta 194 aminoácidos e é desprovida de âncora GPI (GUO et al., 2013).

Na colônia R2362, selecionada em nosso laboratório, foram identificados dois alelos: *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* (Figura 4). No alelo *cqm1_{REC}* ocorre uma deleção de 19 nt na posição 1334-1352, que causa uma mudança na fase de leitura e gera um códon de terminação da tradução prematuro na posição 443. Neste caso, a proteína codificada é truncada, apresentando 442 aminoácidos e sem sinalização para a âncora GPI (ROMÃO et al., 2006). O alelo *cqm1_{REC-2}* é caracterizado por uma mutação G1292A, esta gera um códon de terminação de tradução prematuro (posição 431) assim como ocorre no alelo *cqm1_{REC}*, e também codifica para uma proteína truncada com 430 aminoácidos que seria solúvel (CHALEGRE et al., 2015). Os alelos *cqm1_{D-16}* e *cqm1_{D-25}* foram identificados diretamente a partir de larvas coletadas em populações de campo em Recife, e apresentam deleções de 16 (1306-1321) e 25 (1276-1300) nt, respectivamente, ambos originam um códon de terminação de tradução prematuro e os transcritos codificam para proteínas desprovidas de âncora GPI (CHALEGRE et al., 2012). Em todos os casos descritos no quadro 2, a resistência está associada à ausência de receptor ligado ao epitélio intestinal para ligação à toxina Bin, exceto no caso do alelo *cpm1_{BP}-del*.

Figura 6 – Representação esquemática de receptores no intestino de larvas de culicídeos.

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: A = representação de intestino de indivíduo suscetível com os receptores Cqml (esferas laranja) ligados ao epitélio intestinal via âncora GPI (seta). B = representação de intestino de indivíduo resistente com proteínas secretadas no lúmen intestinal, desprovidas de âncora GPI.

Quadro 2 – Alelos de resistência de *Culex* sp. associados à resistência à toxina Bin do *Lysinibacillus sphaericus*.

Alelo	País	Fonte	Mutação	GPI ^a
<i>cpm1</i> _{GEO} ¹	EUA	Laboratório	Transição T1706A	Não
<i>cpm1</i> _{BP} ²	França	Campo	Transição Gln396Stop	Não
<i>cpm1</i> _{BP-del} ²	França	Campo	Deleção 198 nt	Sim
<i>cqm1R</i> ³	China	Laboratório	Deleção C 445	Não
<i>cqm1</i> _{REC} ⁴	Brasil	Laboratório	Deleção 19 nt (1225-1243)	Não
<i>cqm1</i> _{REC-2} ⁵	Brasil	Laboratório	Transição G1292A	Não
<i>cqm1</i> _{D-16} ⁶	Brasil	Campo	Deleção 16 nt (1306-1321)	Não
<i>cqm1</i> _{D-25} ⁶	Brasil	Campo	Deleção 25 nt (1276-1300)	Não

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: ^aSinalização para âncora do tipo GPI (glicosil-fosfatidilinositol) disponível. ^bReferências. ¹ = Darboux et al. (2002). ² = Darboux et al. (2007). ³ = Guo et al. (2013). ⁴ = Romão et al. (2006). ⁵ = Chalegre et al. (2015). ⁶ = Chalegre et al. (2012).

2.7 Alelos de resistência da colônia R2362

Larvas homozigotas para os alelos *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2} identificadas na colônia R2362 (CHALEGRE et al., 2015; ROMÃO et al., 2006), são o objeto deste estudo. Esta colônia de *C. quinquefasciatus*, fundada a partir de ovos coletados em criadouros do Recife, foi selecionada em laboratório e atingiu um alto nível de resistência (RR \approx 100.000) ao Lsp 2362 após 46 gerações de exposição (PEI et al., 2002). O mecanismo de resistência desta

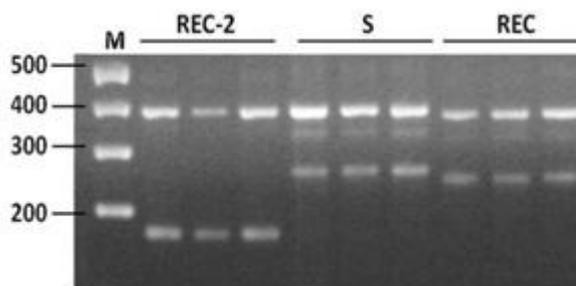
colônia é a ausência de receptores Cqm1 no epitélio das larvas (OLIVEIRA et al., 2004) causada pelo alelo *cqm1_{REC}* em homozigose (ROMÃO et al., 2006). Este alelo, como descrito anteriormente, apresenta uma mutação de 19 nt no gene *cqm1* e o respectivo transcrito codifica para uma proteína desprovida de âncora GPI e, portanto, ausente do epitélio intestinal, impossibilitando a ação da toxina Bin nas larvas. Quando a base molecular da resistência da colônia foi caracterizada em larvas da geração F74, este fenótipo foi associado ao alelo *cqm1_{REC}* visto que todos os indivíduos eram homozigotos para este alelo (PEI et al., 2002; ROMÃO et al., 2006). A colônia foi mantida continuamente em laboratório e novas avaliações a partir do sequenciamento do gene *cqm1* de um número maior de indivíduos na geração F180, revelaram a existência de um novo polimorfismo. Este, identificado como alelo *cqm1_{REC-2}*, é caracterizado por outra mutação que também codifica para um transcrito de uma proteína desprovida de âncora GPI, conforme descrito no item 2.6. Um método de PCR-multiplex específico para detectar os alelos *cqm1*, *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* foi padronizado (Figura 7), sendo usados quatro *primers* cuja associação pode gerar amplificações de fragmentos específicos para cada alelo para a determinação do genótipo dos indivíduos para este *locus* (CHALEGRE et al., 2015).

Uma avaliação de frequência destes dois alelos em diferentes momentos da colônia mostrou que na geração F35 o alelo *cqm1_{REC}* era predominante com frequência de 0,75, enquanto o alelo *cqm1_{REC-2}* apresentava uma frequência de 0,25. Foi detectado um aumento na frequência do alelo *cqm1_{REC-2}*, superior a 0,60 a partir da geração F182 (gráfico 1). Estes resultados apontam que esta variação na frequência se deve a um processo de co-seleção dos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* nesta colônia mantida em laboratório, sem fluxo gênico, constituindo um modelo único para o estudo de alelos de resistência.

No estudo de Chalegre et al. (2015) foram obtidas subcolônias formadas por indivíduos homozigotos dos alelos de resistência *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*, possibilitando a análise destes alelos. Um ensaio de competição dos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* sob condições de laboratório foi realizado a partir de uma subcolônia cuja geração parental foi formada por indivíduos homozigotos para cada alelo em igual frequência (1:1). Nas progênes desta subcolônia, houve aumento da frequência do alelo *cqm1_{REC}* a partir da geração F₃, que foi mantida nas sete gerações subsequentes avaliadas (gráfico 2). Neste caso, a exemplo do que foi observado na colônia R2362, o alelo *cqm1_{REC}* foi preferencialmente selecionado. As razões que levaram a seleção inicial do *cqm1_{REC}* não foram elucidadas. Os dados da evolução dos alelos nas colônias estudadas sugerem que eles podem ter diferentes capacidades de

competição, apesar de ambos os alelos provocarem um nível de resistência similar e através de um mecanismo equivalente.

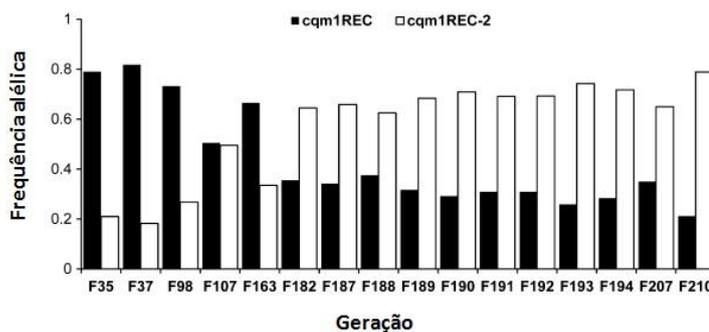
Figura 7 - Separação eletroforética de fragmentos amplificados por PCR para alelos do gene *cqm1* de larvas de *Culex quinquefasciatus* das colônias S, REC e REC-2.



Fonte: Chalegre et al. (2015).

Legenda: REC-2 = Indivíduos homocigotos para o alelo *cqm1*_{REC-2}. S = Indivíduos homocigotos para o alelo *cqm1*. REC = Indivíduos homocigotos para o alelo *cqm1*_{REC}. M = Marcador em pares de bases.

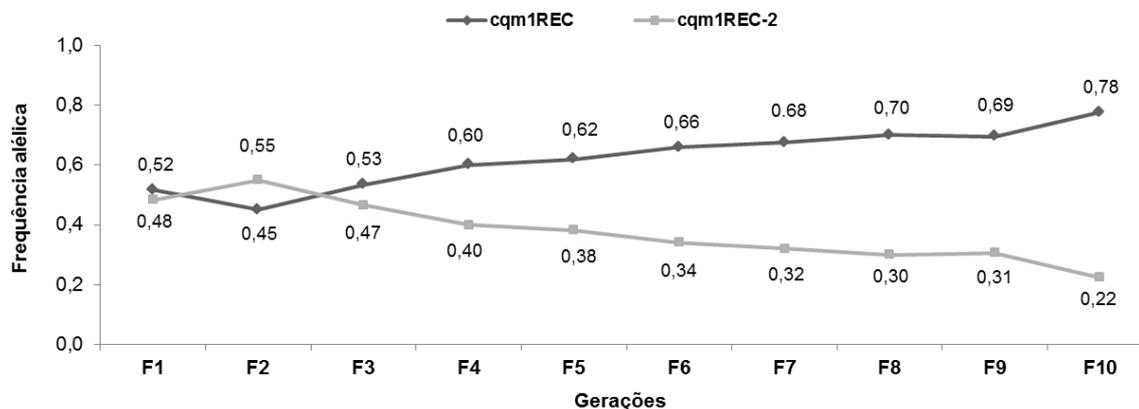
Gráfico 1 – Frequência dos alelos *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2} em larvas de *Culex quinquefasciatus* da colônia R2362.



Fonte: Chalegre et al. (2015).

Legenda: A avaliação foi feita em diferentes gerações na colônia R2362, mantida em condições de laboratório.

Gráfico 2 – Frequência dos alelos *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2} em larvas de *Culex quinquefasciatus* da subcolônia R2362/REC-2, mantida sob condições de laboratório, por 10 gerações (F1 a F10).



Fonte: Chalegre et al. (2015).

2.8 Custo biológico associado à resistência

A resistência a um determinado inseticida caracteriza-se pela capacidade dos insetos sobreviverem a doses que são letais para a maioria dos indivíduos expostos. A resistência está frequentemente associada a um custo biológico, e este custo pode ser definido como a realocação de recursos para a manutenção da maquinaria de resistência, em detrimento da aplicação destes recursos em outras características que são importantes para o desempenho biológico do organismo (SHELDON; VERHULST, 1996). O *fitness* ou desempenho biológico pode ser definido como a contribuição genética de um indivíduo para a próxima geração, ou seja, está relacionado à sua habilidade de sobrevivência e de reprodução no ambiente. Estudos de custo biológico da resistência se tornam importantes, pois são fundamentais para compreender os fatores que influenciam o surgimento, aumento, distribuição e sucesso adaptativo dos alelos de resistência (ORR, 2009; RIGBY; HECHINGER; STEVENS, 2002).

No campo de resistência dos insetos, já foram avaliadas diversas espécies e parâmetros, e, uma revisão de um conjunto de dezenas de estudos feitos a partir de 18 espécies de insetos (incluindo coleópteros, dípteros e lepidópteros) mostrou que 34% dos casos de resistência apresentaram custo biológico relacionado a algum parâmetro do *fitness* (GASSMANN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009). O desempenho biológico de insetos pode ser avaliado por uma gama complexa de parâmetros e técnicas, dentre estes fecundidade, fertilidade, tempo de desenvolvimento pré-imaginal, capacidade de vôo e de cópula, entre outros. Os principais aspectos do desenvolvimento biológico afetados foram sobrevivência, tempo de desenvolvimento e massa corpórea. Por outro lado, em um estudo de uma colônia de *C. quinquefasciatus* resistente ao Lsp (IAB-59), foi mostrado que não houve redução significativa em relação à fecundidade, fertilidade e peso pupal das colônias resistentes em comparação com a susceptível. Na ausência de pressão de seleção, o alelo *cqm1_{REC}* foi mantido estável e com alta frequência após 11 gerações, o que sugere que este alelo não está ligado a um alto custo biológico. Estes dados indicam que, apesar de a resistência estar frequentemente associada a um custo biológico, há casos em que este custo pode não ocorrer (AMORIM et al., 2010).

Em um estudo com populações de *C. pipiens* do Sul da França (Montpellier), foi avaliada a frequência de alelos de resistência a organofosforados e o custo biológico associado a eles. Esta análise mostrou a adaptação do inseto ao meio ambiente onde está inserido, pois foi demonstrado que houve substituições sucessivas de três alelos de resistência

nestas populações. Primeiramente, o alelo *Ester*¹ foi substituído pelo *Ester*⁴, por este apresentar custo biológico menor. No segundo evento de substituição, o *Ester*⁴ foi substituído pelo *Ester*², que apresenta um custo biológico maior, mas por outro lado, apresenta vantagem em possibilitar um melhor desempenho na área tratada com o inseticida (LABBÉ et al., 2009).

Em relação às colônias resistentes REC e REC-2, já foi feito um estudo comparativo em relação à colônia de referência susceptível (S), avaliando diferentes parâmetros: longevidade de fêmeas; fecundidade; fertilidade; comportamento hematofágico; desenvolvimento pré-imaginal; e estado nutricional de pupas dos indivíduos. A colônia REC teve fecundidade e fertilidade reduzida comparada às outras colônias (REC-2 e S), o que não foi verificado para a linhagem REC-2 que teve fecundidade, fertilidade, longevidade e tempo de desenvolvimento equivalentes ou superiores à colônia S. Estes dados indicam que o alelo *cqm1*_{REC-2} pode estar associado a um baixo custo biológico (MELO, 2013).

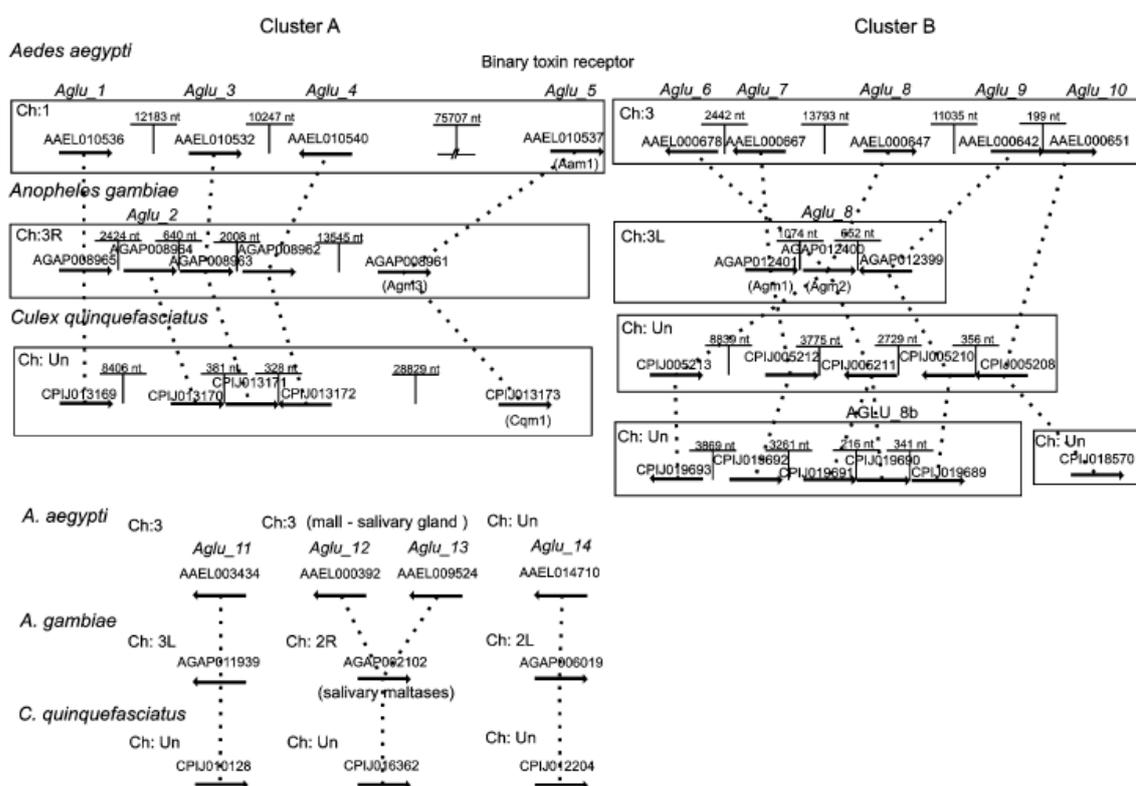
2.9 α -glicosidases de mosquitos

As Aglus de culicídeos tem sido caracterizadas sobretudo em razão do seu papel na digestão de carboidratos adquiridos de seiva vegetal, principal alimento de insetos na fase adulta (FOSTER, 1995). As Aglus são encontradas em cinco famílias de hidrolases de glicosídeos (GH4, GH13, GH31, GH63, GH97 e GH122), de acordo com a classificação Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes ou CAZy) de Cantarel et al. (2009). Estas famílias compreendem exoenzimas responsáveis pela hidrólise de ligações glicosídicas, principalmente em dissacarídeos e oligossacarídeos, liberando α -glicose da porção não-redutora da cadeia de um substrato. Estas enzimas apresentam características como um domínio sequencial de oito α -hélices e folhas β , conhecido como barril $(\beta/\alpha)_8$, além de apresentarem domínios de aminoácidos conservados, representados na figura 5 (KRASIKOV; KARELOV; FIRSOV, 2001).

A dieta dos mosquitos adultos se baseia principalmente em carboidratos simples, sendo consumido por machos e fêmeas. Além da importância da hematofagia para a reprodução nas fêmeas, a dieta de carboidratos é essencial para o metabolismo, sobrevivência, longevidade e voo (NAYAR; SAUERMAN, 1971; NAYAR; VAN HANDEL, 1971). As Aglus secretadas na saliva de adultos são necessárias para a digestão destes carboidratos, e algumas já foram identificadas em espécies de mosquito como *Aedes albopictus*, *Ae. aegypti*, *Anopheles darlingi*, *An. gambiae*, *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus* (quadro 3).

Em recente revisão de dados de bioinformática das Aglus de insetos (GH13) do grupo Nematocera, foram descritos 14 genes de Aglus (*Aglu_1-Aglu_14*) em *Ae. aegypti*, *An. gambiae* e *C. quinquefasciatus*, conforme representação na figura 8. Dentre estas, algumas são expressas nas glândulas salivares (*Aglu_12* e *Aglu_13*), no intestino (*Aglu_5-Aglu_8*) e várias delas são desconhecidas (*Aglu_1-Aglu_4*, *Aglu_9-Aglu_11* e *Aglu_14*) (GABRISKO, 2013). Apesar dos estudos de bioinformática indicarem um amplo conjunto de Aglus, poucos estudos bioquímicos e funcionais têm sido realizados.

Figura 8 – Organização espacial nos cromossomos de genes de α -glicosidasas (GH13) de *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* e *Culex quinquefasciatus*.



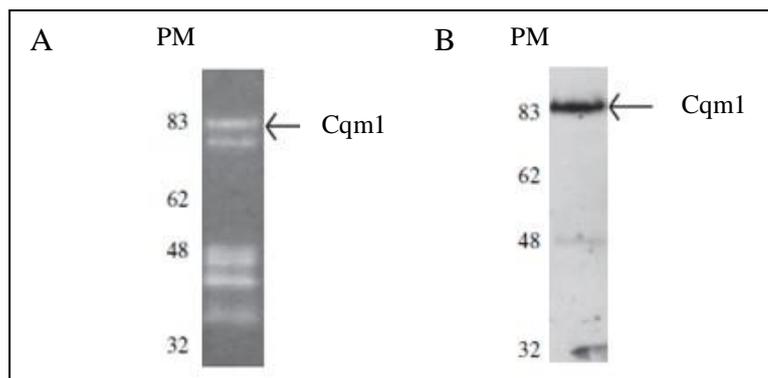
Fonte: Gabrisko (2013).

Legenda: Setas = direção da transcrição. Acima das setas = número de identificação na plataforma VectorBase. Caixas = genes situados próximos uns aos outros. Ch = designação do cromossomo. Un = *unknown* (desconhecido). Linhas pontilhadas = conexão entre α -glicosidasas ortólogas.

Como descrito, em *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus*, as proteínas Cpm1 e Cqm1 são Aglus expressas no epitélio intestinal de larvas, e também atuam como receptor da toxina Bin (DARBOUX et al., 2001; ROMÃO et al., 2006; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999). Uma análise de atividade *Aglu in gel* de extratos de larvas de *C. quinquefasciatus* mostra a Cqm1 e outras bandas catalíticas, correspondentes a outras Aglus expressas pelas larvas (Figura 9). A Cqm1 tem o seu gene correspondido ao *Aglu_5*, de

acordo com a correlação feita no trabalho de Gabrisko (2013). Em *C. quinquefasciatus*, também foram identificadas, α -glicosidases de 63 e 92 kDa em glândulas salivares (*Aglu_12-13*) de adultos relacionadas à dieta de carboidratos (NASCIMENTO; MALAFRONTTE; MARINOTTI, 2000; SUTHANGKORNKUL et al., 2015).

Figura 9 – Perfil eletroforético (SDS-PAGE semi-desnaturante) de α -glicosidases presentes em larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis ao Lsp.



Fonte: Modificado de Romão et al. (2006).

Legenda: A = Zimograma (ensaio *in gel* de poliacrilamida semi-desnaturante) de α -glicosidases. B = Imunodeteção da amostra mostrada em A com anticorpo anti Cqm1. Lsp = *Lysinibacillus sphaericus*. PM. Peso molecular em kDa.

Em *Ae. aegypti*, uma Aglu foi detectada nas glândulas salivares de machos e fêmeas adultos (MARINOTTI; JAMES, 1990) e, recentemente em larvas, foi caracterizada a Aam1, que é um ortólogo da Aglu Cqm1. Transcritos do gene *aam1* foram encontrados em larvas e adultos e a Aam1 é expressa ligada ao epitélio intestinal de larvas. Entretanto, esta Aglu não apresenta ligação à toxina Bin, tornando estes indivíduos resistentes ao Lsp (FERREIRA et al., 2010). Em *Ae. albopictus*, uma Aglu foi caracterizada em glândulas salivares de machos e fêmeas adultos (MARINOTTI; BRITO; MOREIRA, 1996).

Em adultos de *Anopheles aquasalis*, *An. darlingi* e *Anopheles dirus*, Aglus foram encontradas em glândulas salivares (JARIYAPAN et al., 2007; MOREIRA-FERRO; MARINOTTI; BIJOVSKY, 1999; SOUZA-NETO et al., 2007). Em *An. gambiae*, foram detectados dois genes de Aglus expressos no intestino, sendo o *agm1* expresso em adultos e em pupas, enquanto que o *agm2* é expresso apenas em adultos (ZHENG et al., 1995). Nesta espécie, também foi detectada a Aglu Agm3 expressa no intestino de larvas (ZHANG et al., 2013) que foi identificada por Opota et al. (2008) como receptor da toxina Bin. A Agm3, assim como os seus ortólogos Cqm1 e Aam1, está correlacionada ao gene *Aglu_5* (GABRISKO, 2013).

Quadro 3 – Alfa-glicosidases de mosquitos identificadas em análises funcionais.

Espécie	Análise funcional			Análise bioinformática ^b	
	Gene	Local de expressão	FD	Referência ^a	
<i>Ae. aegypti</i>	<i>Mall</i>	Glândula salivar	Adultos	1,2	<i>Aglu_12/ Aglu_13</i>
	<i>aam1</i>	Intestino	Larvas	3	<i>Aglu_5</i>
<i>Ae. albopictus</i>	Nd	Glândula salivar	Adultos	4	Nd
<i>An. aquasalis</i>	Nd	Intestino	Adultos	5	Nd
<i>An. darlingi</i>	Nd	Glândula salivar	Adultos	6	Nd
<i>An. dirus</i>	Nd	Glândula salivar	Adultos	7	Nd
<i>An. gambiae</i>	<i>agm1</i>	Intestino	Pupas	8	<i>Aglu_7</i>
	<i>agm2</i>	Intestino	Adultos	8	<i>Aglu_8</i>
	<i>agm3</i>	Intestino	Larvas	9, 10	<i>Aglu_5</i>
<i>C. pipiens</i>	<i>cpm1</i>	Intestino	Larvas	11, 12	Nd
<i>C. quinquefasciatus</i>	Nd	Glândula salivar	Adultos	13	<i>Aglu_12/ Aglu_13</i>
	<i>cqm1</i>	Intestino	Larvas	14	<i>Aglu_5</i>
	<i>CQMall</i>	Glândula salivar	Adultos	15	<i>Aglu_12/ Aglu_13</i>

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: ^aReferências. 1 = James; Blackmer; Racioppi (1989). 2 = Marinotti; James (1990). 3 = Ferreira et al. (2010). 4 = Marinotti; Brito; Moreira (1996). 5 = Souza-Neto et al. (2007). 6 = Moreira-Ferro; Marinotti; Bijovsky (1999). 7 = Jariyapan et al. (2007). 8 = Zheng et al. (1995). 9 = Opota et al. (2008). 10 = Zhang et al. (2013). 11 = Silva-Filha; Nielsen-Leroux; Charles (1999). 12 = Darboux et al. (2001). 13 = Nascimento; Malafronte; Marinotti (2000). 14 = Romão et al. (2006). 15 = Suthangkornkul et al. (2015). Nd = não determinado. ^bCorrelação feita entre os genes estudados em análises funcionais e entre os genes estudados em análise bioinformática (*Aglu_1-Aglu_14*) de Gabrisko (2013).

3 JUSTIFICATIVA

O *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) é um agente larvicida de culicídeos com importante aplicação para o controle populacional do *Culex quinquefasciatus*, vetor de patógenos para o homem. Na cidade do Recife, biolarvicidas a base de Lsp tem sido utilizados em programas de controle de *C. quinquefasciatus*, bem como em outras áreas do país. Entretanto, o seu uso pode promover a seleção de populações resistentes, que é um obstáculo para a eficácia das ações. Este tema é um dos principais eixos de pesquisa do Departamento de Entomologia do CPqAM-FIOCRUZ/PE relacionado à identificação de alelos de resistência ao Lsp e para o seu diagnóstico molecular em populações de campo. Este estudo foi realizado para avaliar os efeitos de dois importantes alelos de resistência na fisiologia dos insetos. O estudo da α -glicosidase Cqm1 e de suas parálogas pode contribuir para a compreensão do risco que estes alelos representam em caso de seleção, bem como para a produção de conhecimento nas áreas de bioquímica e fisiologia de culicídeos.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Indivíduos homozigotos para os alelos de resistência *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* possuem alterações na atividade α -glicosidase (Aglu) e na sua capacidade de sobrevivência?

5 HIPÓTESE

Larvas de *Culex quinquefasciatus* homozigotas para cada alelo de resistência, *cqmI_{REC}* e *cqmI_{REC-2}*, ao biolarvicida Lsp possuem divergências na atividade α -glicosidase (Aglu) que influenciam na digestão de carboidratos e conseqüentemente na sua capacidade adaptativa.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de α -glicosidases (Aglu) em *Culex quinquefasciatus* e analisar o impacto de mutações do gene da Aglu Cqm1 na fisiologia de indivíduos resistentes ao biolarvicida Lsp.

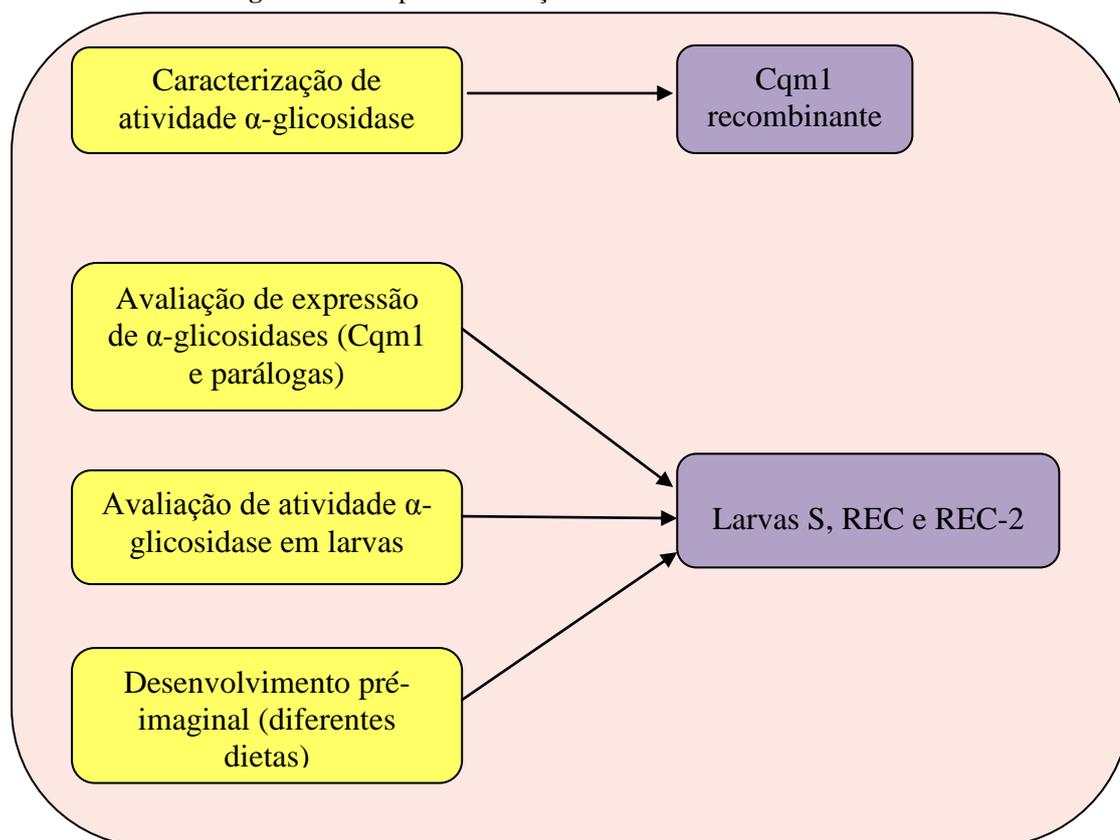
6.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar a atividade catalítica da Aglu Cqm1;
- b) Identificar *in silico* Aglus parálogas à Cqm1;
- c) Avaliar a expressão relativa da Cqm1 e suas parálogas nas larvas das colônias susceptíveis e resistentes;
- d) Comparar a atividade Aglu total do intestino de larvas das colônias susceptíveis e resistentes (*cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*) ao Lsp;
- e) Avaliar o desenvolvimento pré-imaginal de larvas susceptíveis e resistentes (*cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*) ao Lsp com diferentes dietas.

7 MATERIAL E MÉTODOS

O esquema abaixo apresenta as principais abordagens utilizadas para o estudo de α -glicosidases (Aglus) de *Culex quinquefasciatus* (Figura 10).

Figura 10 – Etapas de avaliação realizadas neste trabalho.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: S = colônia susceptível. REC = colônia resistente ao *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) 2362 associada ao alelo *cqm1*_{REC}. REC-2 = colônia resistente ao Lsp 2362 associada ao alelo *cqm1*_{REC-2}.

7.1 Colônias de culicídeos

Neste trabalho, foram utilizadas três colônias de *C. quinquefasciatus*, abaixo descritas. As colônias foram mantidas no insetário sob as seguintes condições: temperatura de 26 ± 1 °C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo 12:12 h (dia/noite). As larvas foram mantidas em laboratório em recipientes, medindo 25 cm x 15 cm x 7 cm, com 2 L de água potável e alimentadas com ração para gatos (Whiskas[®]) e dietas experimentais descritas no item 7.8. Os adultos foram alimentados com solução de sacarose a 10% e as fêmeas fizeram o repasto sanguíneo em *Gallus* sp. As colônias utilizadas foram:

- a) **S.** Colônia susceptível ao biolarvicida Lsp, estabelecida a partir de ovos coletados em criadouros localizados na Região Metropolitana do Recife (RMR), e mantida há mais de 10 anos no instetário (CHALEGRE et al., 2015);
- b) **REC.** Colônia selecionada em laboratório com alto nível de resistência ao biolarvicida Lsp, composta por indivíduos homozigotos para o alelo de resistência *cqm1_{REC}* (CHALEGRE et al., 2015);
- c) **REC-2.** Colônia selecionada em laboratório com alto nível de resistência ao biolarvicida Lsp, composta por indivíduos homozigotos para o alelo de resistência *cqm1_{REC-2}* (CHALEGRE et al., 2015).

7.2 Produção de proteína Cqm1 recombinante em células Sf9

A proteína Cqm1 sob a forma solúvel (Cqm1-S) foi expressa em células eucarióticas Sf9, do lepidóptero *Spodoptera frugiperda*, usando o kit de sistema de expressão heteróloga *InsectSelect™ Glow System*, de acordo com Ferreira et al. (2014). O plasmídeo de expressão pIZT/V5-His[®] utilizado tem características importantes para produção e avaliação de proteínas recombinantes tais como: promotor constitutivo para a expressão gênica; gene marcador de resistência para o antibiótico zeocina[®]; gene GFP (*Green Fluorescent Protein*) para verificar a eficiência da transfecção; cauda de poli-histidina para purificação em resina de níquel (INVITROGEN, 2012). Os cultivos celulares foram feitos em monocamada aderente em meio Sf900 (Gibco[®]) sem conter soro fetal bovino e suplementado com os antibióticos gentamicina (10 mg/mL), zeocina[®] (150 μ g/mL) e fungizone[®] (250 μ g/mL). As culturas de células foram mantidas a 27° C e sua manutenção foi realizada de acordo com instruções do fabricante, que podem ser consultadas no manual *Insect Cell Lines: Growth and Maintenance of Insect Cell Lines*, 2013 (INVITROGEN, 2013).

7.3 Purificação e avaliação da proteína Cqm1 recombinante

As proteínas recombinantes produzidas pelas linhagens de células Sf9 e secretadas sob a forma solúvel no meio de cultura foram purificadas em cromatografia de afinidade com resina de níquel Ni-NTA Agarose[®] (QIAGEN). A purificação foi feita usando amostras de 20-50 mL de meio de cultura, incubadas durante 1h a 4 °C com a resina de níquel (200 μ L) e

imidazol 1 M (100 μ L) para bloquear ligações inespecíficas. Posteriormente, a resina foi recuperada por centrifugação (3.220g, 10 min, 4° C) e submetida a três lavagens (1.500g, 2 min, 4° C) com 1 mL de tampão PBS Eisen (NaH₂PO₄ 2,1 mM, Na₂HPO₄ 14 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) e três lavagens (1.500g, 2 min, 4° C) com 500 μ L de tampão de lavagem (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol 10%, pH 6,0). Ao final, foi adicionado o volume de 200 μ L de PBS à resina obtida. Para a eluição das proteínas adsorvidas na resina foi adicionado um volume de 500 μ L de tampão de lavagem contendo imidazol (1 M) durante 3h a 4° C. Em seguida, foi feita centrifugação (20.000g, 2 min, 4° C) para recuperação do sobrenadante. Para avaliação da purificação, as amostras adsorvidas na resina ou eluídas (5-20 μ L) foram solubilizadas em tampão de Laemmli 2X (LAEMMLI, 1970), submetidas à separação eletroforética em SDS-PAGE a 10% e coradas com azul de Coomassie. As amostras de proteínas adsorvidas em resina foram usadas para determinação de atividade Aglu, após quantificação proteica estimada pelo método de Bradford (1976) e pela quantificação através da densidade das bandas eletroforéticas usando o programa KODAK MI, usando uma curva padrão de albumina sérica bovina, em ambos os métodos.

7.4 Preparação de extratos de larvas

Para avaliar a atividade Aglu, foram utilizadas amostras de larvas de 4° estágio das três colônias. Cada amostra foi composta de 10 larvas inteiras (Li), ou de 10 tubos digestivos com (Tdc) ou sem conteúdo intestinal (Tds) macerados em 60 μ L de tampão PBS Eisen. As amostras Tdc contêm a membrana peritrófica com o alimento, e nas amostras Tds a membrana peritrófica contendo o alimento foi retirada. Após a dissecação, as amostras foram armazenadas a -80° C. Para a utilização em ensaio de atividade enzimática, as amostras foram mantidas a 4° C e centrifugadas (1000g, 30 seg, 4° C). Em seguida, as amostras foram maceradas (1 minuto, 4° C) e foi realizada nova centrifugação (1000g, 6 min, 4° C) para coletar o sobrenadante a ser utilizado nos ensaios de atividade Aglu (item 7.5).

7.5 Ensaios de atividade α -glicosidase

7.5.1 Proteína Cqm1 recombinante

Para a Aglu Cqm1 recombinante (E.C. 3.2.1.20), foram realizados ensaios para otimização e determinação das condições ótimas de atividade enzimática em relação à

temperatura, pH e substrato. Os ensaios para determinação da temperatura (25°, 30° e 37° C) foram feitos utilizando o tampão citrato-fosfato de sódio (0,1 M, pH 6,5) contendo 2 mM do substrato p-nitrofenil α -D-glicopiranosídeo (pN α G, SIGMA N1377). Amostras de 10-20 μ g de proteínas foram incubadas por 1h. Após a incubação, foi realizada a leitura da absorbância a 405 nm a TA. Em seguida, foram realizados ensaios para determinação da atividade em uma faixa de pH entre 6 e 10, sob as mesmas condições descritas para os ensaios de temperatura. O substrato padrão pN α G em tampão citrato-fosfato de sódio foi comparado com os substratos naturais maltose e sacarose. Para o pN α G, os ensaios foram realizados a 37° C e pH 6,5 segundo o método descrito acima. Para os substratos naturais, a atividade foi mensurada com o kit Glicose Monorreagente (Bioclin[®]), segundo instruções do fabricante. Neste ensaio, os substratos maltose ou sacarose (5 mM) e 10-20 μ g da proteína Cqm1-S foram incubados com 1 mL do reagente (Glicose Monorreagente, pH 7,4) durante 2h a 37° C. Após a incubação, foi realizada a leitura da absorbância a 505 nm a TA.

7.5.2 Extratos de larvas

Foi feita uma análise através de um ensaio qualitativo em gel, para caracterizar o padrão de bandas catalíticas das amostras de larvas, conforme descrito em Romão et al. (2006). Em síntese, o ensaio consiste em separação eletroforética das amostras em SDS-PAGE, sob condições semi-desnaturantes, lavagens com Triton-X 2,5%, incubação com tampão citrato-fosfato de sódio (0,1 M, pH 6,5) contendo 2 mM do substrato 4-metil-lumbeliferil α -D-glucosídeo (SIGMA 69591) e detecção das bandas através de transilumindor de luz ultravioleta (UV). Para mensurar a atividade de Aglus totais (nativas) em amostras de larvas das três colônias (S, REC e REC-2), foram realizados ensaios com o tampão citrato-fosfato de sódio (0,1 M) contendo 2 mM do substrato pN α G, com pH modificado para 7,5. Foram utilizadas amostras de larvas (Li, 25 μ g) e de intestinos (Tdc e Tds, 10 μ g). As amostras foram incubadas durante 30 min a 37° C, e após a incubação, a leitura da absorbância foi feita a 405 nm a TA. Também foi realizada a determinação da atividade em uma faixa de pH de 6 a 10, usando amostras Tdc obtidas a partir de larvas susceptíveis.

7.6 Análise *in silico* de α -glicosidases parálogas à Cqm1

Dados prévios do grupo mostram que o perfil catalítico *in gel* de amostras de microvilosidades intestinais de larvas susceptíveis é composto pela Cqm1 e outras bandas

catalíticas (ROMÃO et al., 2006). O objetivo desta análise foi identificar, *in silico*, parálogas da proteína Cqm1 que podem corresponder às outras bandas catalíticas observadas *in vivo*, e analisar a sua expressão como descrito no item 7.7. Para isto, foi realizada uma pesquisa de parálogas da proteína Cqm1 (Gene ID CPIJ013173) em *C. quinquefasciatus* na plataforma VectorBase (<https://vectorbase.org>). Estes dados foram comparados com Gabrisko (2013), que fez uma revisão de dados de Aglus de eucariotos a partir de análises de bioinformática. Foram analisadas diferentes características das parálogas como: presença de domínios de Aglus conservados em mosquitos (Figura 5) (KRASIKOV; KARELOV; FIRSOV, 2001); predição de âncora GPI a partir de dados de DARBOUX et al. (2001) e do uso do preditor *big-PI Predictor* (I.M.P. BIOINFORMATICS GROUP, 2005); peso molecular predito (kDa). Após análise destes parâmetros, foram escolhidas algumas parálogas para avaliar sua transcrição.

7.7 Avaliação da expressão de mRNA da α -glicosidase Cqm1 e suas parálogas

7.7.1 Extração de RNA

Para cada colônia analisada, as larvas foram obtidas de grupos de criação homogêneos e mantidas segundo as condições descritas no item 7.1. A extração de RNA total foi feita utilizando o reagente Trizol[®] (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante, a partir de *pools* de 10 larvas de 4^o estágio de cada colônia, com até 2h de muda. Após a extração, o RNA foi tratado para remoção de DNA genômico com 2U da enzima rDNase USB[®], segundo instruções do fabricante. Em seguida, foi feita a avaliação da concentração e da qualidade das amostras de RNA por espectrofotometria nas absorvâncias de 260 e 280 nm em NanoDrop 2000c[®] (Thermoscientific).

7.7.2 RT-PCR convencional

Após obtenção das amostras de RNA das três colônias estudadas, foi feita a reação de transcrição reversa para obtenção do cDNA, através de transcriptase reversa PCR (RT-PCR), com 15U da enzima AMV *Reverse Transcriptase* USB[®], segundo instruções do fabricante. O desenho de *primers* das Aglus estudadas (escolhidas de acordo com os critérios apresentados no item 7.6) foi feito através do PrimerSelect (DNASTAR). Após a etapa de RT-PCR, foi feita a reação de PCR com os *primers* específicos (0,4 μ M) para as parálogas selecionadas

(quadro 4) e a enzima *Platinum Taq Polymerase High Fidelity* Invitrogen[®], de acordo com as instruções do fabricante. Para evitar amplificação do DNA genômico, além do tratamento com a enzima DNase (item 7.7.1), os *primers* (*forward* ou *reverse*) foram desenhados em regiões de junção entre éxons, no caso das sequências que apresentam íntrons. Os fragmentos amplificados foram separados eletroforeticamente em gel de agarose 1% e visualizados através de transiluminador UV. A presença de transcritos de cada gene foi avaliada dos resultados obtidos de três reações independentes. A partir da análise qualitativa da expressão das Aglus parálogas à Cqm1, foram selecionadas algumas para o desenho de *primers* para análise quantitativa através de qRT-PCR em tempo real (qRT-PCR), descrita na seção seguinte.

Quadro 4 – *Primers* utilizados nas reações de RT-PCR convencional.

Gene	<i>Primers</i> (5'-3')	Amplicon (pb)
CPIJ013173 (Cqm1)	F CTGGTTGGACCGTGGAGTGGATG R CTCATTGCCCGCCTTCGACTTG	976
CPIJ013172 (P1)	F GGAGAAGGACTGGTGGGAAAC R GTAGAATACGGATTGCCAGTTGTTC	448
CPIJ019693 (P3)	F GTGAACTTAGTGTGAGCGATTGG R CTTCAATCCAGTTATTCGGTGG	447
CPIJ005213 (P4)	F GTGTGAGCGATTGGTGGGAAAAG R CTTCAATCCAGTTATTCGGTGGCG	438
CPIJ013171 (P5)	F GTGTGGTTTAGTCCGCTGTTCAAG R GTACGATTTGTCCTGATTCATGG	576
CPIJ012204 (P8)	F CGGCAGCCATCGTACTCTCAATAG R GTAAGTCTCGAGCAAGCTGTTTCGTG	785
CPIJ019691 (P9)	F CATGAGTGGTTCGTGAAGAGTGAG R GTGATTCCCTAGCACCCAGTTG	693
CPIJ013170 (P10)	F GACGGCGAAACTCACTACTATCTG R CCATACCAATCTCCTCACCGTAG	649
CPIJ010128 (P11)	F GAAGCGGTTGGGTTTGAAGGTG R CATCACCCAATTTGCTGCATGAC	760
CPIJ005212 (P13)	F GTGCCGAACCATAGTAGTGACGAG R GTGATTTCCAAGCACCCAGTTG	723
CPIJ019690 (P14)	F CCTCAAGGACATTGGAGTGAAG R GTCTTCATTCCAATTGTTCCGG	325
CPIJ019689 (P17)	F CTACCAGATCTATCCGCGTTCCTTC R CTTGCCAGGTCCGTTATGAAC	904

Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa PrimerSelect (DNASTAR) a partir das sequências obtidas na plataforma VectorBase. pb = pares de base. F = *primer forward*. R = *primer reverse*.

7.7.3 qRT-PCR em tempo real (qRT-PCR)

Foi feita uma avaliação quantitativa do padrão de transcrição da Aglu Cqm1 e de um grupo de parálogas selecionadas na etapa de análise de RT-PCR convencional (7.7.2). Foram desenhados *primers* específicos para as parálogas selecionadas (quadro 5), segundo critérios citados nos itens 7.6 e 7.7.2. As reações foram realizadas em triplicata em placas de 96 poços a partir de amostras de RNA extraídas de cada colônia (7.7.1). A reação foi feita com o Kit QuantiTect® SYBR Green RT-PCR® (QIAGEN) para as reações de qPCR *one-step*, segundo instruções do fabricante. Após a quantificação do RNA, as reações foram feitas usando o SYBRGreen Mix, enzima transcriptase reversa, RNA molde (100 ng), *primers forward* e *reverse* (0,1 μ M/primer) para os genes alvos da Aglu Cqm1 e suas parálogas e para o gene controle (gene endógeno, subunidade ribossômica 18S). As reações foram realizadas no NPT-CPqAM, no equipamento ABI 7500® (Applied Biosystems). A quantificação relativa foi feita através do programa 7500 *software* v.2.0.5 da Applied Biosystems® (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As análises foram realizadas pelo método do C_T comparativo e a colônia S foi utilizada como calibrador da reação.

Quadro 5 – *Primers* utilizados nas reações de qRT-PCR em tempo real (qRT-PCR).

Gene	<i>Primers</i> (5'-3')	Amplicon (pb)
18S¹	F CGCGGTAATTCCAGCTCCACTA R GCATCAAGCGCCACCATATAGG	159
CPIJ013173 (Cqm1)²	F CGTTCCTGACGGTGCTGAACATGG R GACCTCATTGCCCGCCTTCGACTTGG	131
CPIJ005213 (P4)	F CGCCACCGAATAACTGGAATGAAG R GCGGTAGTTCAGATCAGGTTGCTTC	116
CPIJ013170 (P10)	F CTACGGTGAGGAGATTGGTATGG R GAATGGCGTTTCGAACTGGATCTC	130
CPIJ010128 (P11)	F CATGCAGCAAATTGGGTGATGGG R CTGGTAGGTCACGGTTGCTCCC	126
CPIJ005212 (P13)	F CAACTGGGTGCTTGGAATCAC R GGTTACGGCGATTTCCTGGCAG	112
CPIJ019689 (P17)	F GTTGAAGCGAGGTGTGGACGGATAC R GGGTCGTCCGGATCGTTCGTG	126

Fonte: Elaborado pelo autor, ¹Liu et al. (2011) e ²Chalegre et al. (2015).

Legenda: Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa PrimerSelect (DNASTAR) a partir das sequências obtidas na plataforma VectorBase. pb = pares de base. F = *primer forward*. R = *primer reverse*.

7.8 Ensaios de desenvolvimento de larvas em diferentes dietas

O objetivo desta etapa foi avaliar o desenvolvimento pré-imaginal de indivíduos das três colônias (S, REC e REC-2) mantidos em diferentes dietas, sob condições de insetário. Cada grupo experimental consistiu de 50 larvas do 1º estágio larval (triadas entre 16 e 18h após a eclosão) em 100 mL de água deionada e alimentadas com 100 mg da dieta selecionada, administrada nos dias 0 e 5 de cada ensaio, que teve duração de 12 dias. As dietas avaliadas foram ração para gatos Whiskas[®], ração para peixes Maramar[®], leite desnatado Molico[®], extrato de levedura Sigma[®] (Y1625) e sacarose Sigma[®] (S8501). O experimento de cada dieta avaliada foi feito em duplicata, e cada experimento foi repetido, pelo menos, três vezes. Os experimentos foram observados diariamente e as pupas e adultos foram removidos e registrados. A tabela 1 apresenta os teores de proteínas e carboidratos presentes em cada dieta.

Tabela 1 – Teor de carboidratos e proteínas (g/kg) informados pelos fabricantes nos alimentos selecionados para avaliar o desenvolvimento de larvas de *Culex quinquefasciatus*.

Dieta	Carboidratos (g/kg)	Proteínas (g/kg)
Ração para gatos Whiskas [®]	345	300
Ração para peixes Maramar [®]	200	440
Leite desnatado Molico [®]	500	335
Extrato de levedura Sigma [®] (Y1625)	*	*
Sacarose Sigma [®] (S8501)	1000	Não há

Fonte: Whiskas[®], Maramar[®], Molico[®] e Sigma[®].

Legenda: * = não determinado.

8 RESULTADOS

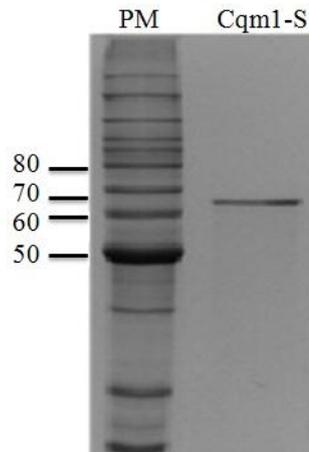
8.1 Expressão e atividade catalítica da proteína Cqm1 recombinante

A α -glicosidase (Aglu) Cqm1 foi identificada previamente por outra função, no âmbito dos estudos do modo de ação do biolarvicida Lsp, que é a de receptor da toxina Bin (ROMÃO et al., 2006). Neste trabalho, um dos objetivos foi avaliar sua atividade catalítica. A proteína Cqm1 selvagem (Cqm1-S) foi produzida sob a forma solúvel em células Sf9, e sua presença foi detectada a partir das proteínas totais secretadas no meio, a partir do qual ela foi purificada. A proteína Cqm1-S apresentou peso molecular de 64 kDa, conforme esperado a partir do peso predito, e a sua expressão e integridade podem ser visualizadas na Figura 11.

A atividade catalítica da Aglu Cqm1 foi investigada a partir de amostras de proteínas ainda adsorvidas na resina (20 μ g). Foram avaliados os efeitos dos seguintes parâmetros: temperatura, substrato e pH na atividade enzimática. A proteína Cqm1 teve sua atividade avaliada em três temperaturas diferentes (25°, 30° e 37° C), sendo a maior atividade detectada a 37° C e a menor atividade a 25° C, que é cerca de quatro vezes inferior à temperatura ótima (gráfico 3).

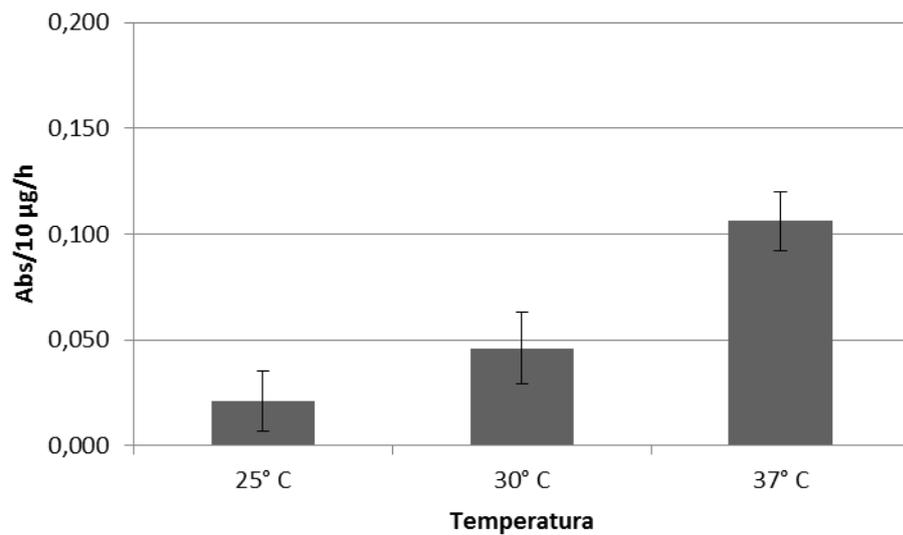
A atividade Aglu da Cqm1 foi avaliada a partir de três substratos, sendo um sintético (p-nitrofenil α -D-glicopiranosídeo, pNaG – SIGMA N1377) e dois naturais (maltose e sacarose). O substrato sintético foi melhor catalisado pela Aglu Cqm1, enquanto que com a sacarose a proteína apresentou menor atividade. Dentre os substratos naturais, houve uma maior atividade enzimática para a maltose, possivelmente porque este é um dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose, fornecendo melhor detecção para o teste (gráfico 4).

A atividade foi avaliada na faixa de pH de 6-10, com intervalos de 0,5, sendo observada uma atividade mais elevada entre os pH's 7,5 – 9,0. Entretanto, a curva não apontou um pico de atividade ótima claro e este resultado pode ser devido à amostra de proteína estar ainda adsorvida na resina. A avaliação mostra que a atividade da Cqm1 é especialmente afetada na faixa de pH mais ácido (< 7,5) em relação à faixa de pH mais alcalino (> 8), como está apresentado no gráfico 5.

Figura 11 – Perfil eletroforético da proteína Cqm1-S produzida em células Sf9.

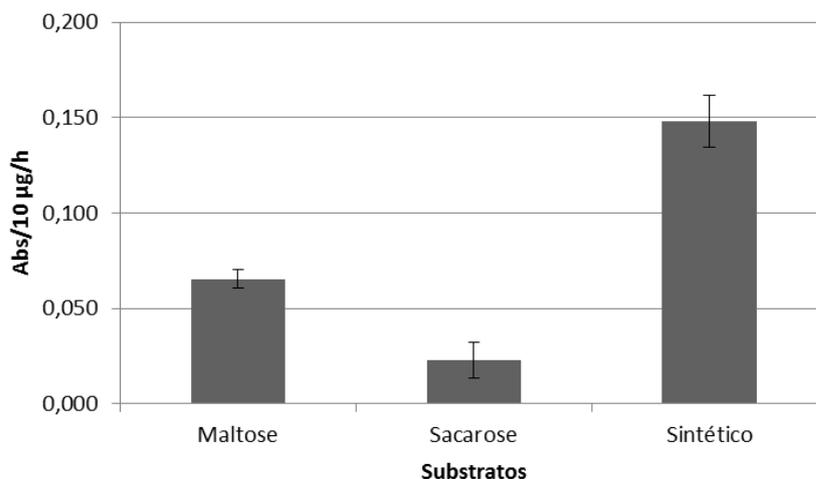
Fonte: Nascimento (2013).

Legenda: Eletroforese em SDS-PAGE 10% e corado com azul de Coomassie. PM. Marcador de peso molecular em kDa.

Gráfico 3 – Atividade α -glicosidase da proteína Cqm1 (20 μ g) em diferentes temperaturas.

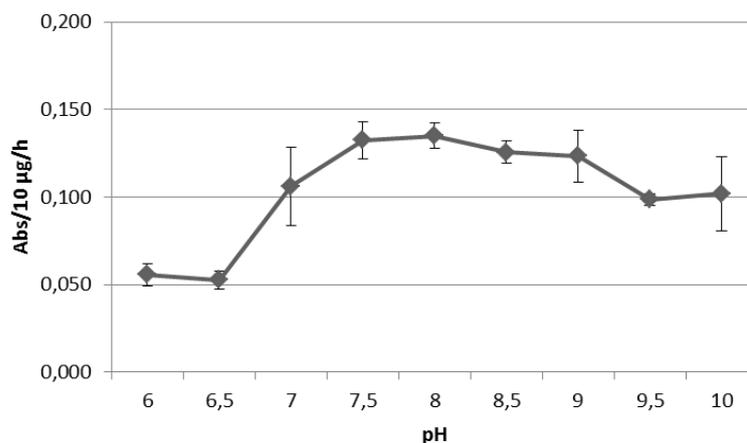
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Proteína Cqm1 (adsorvida em resina) recombinante produzida em células Sf9. Tampão citrato-fosfato pH 6,5 com 2 mM do substrato pN α G. Os dados representam as médias de, no mínimo, três pontos experimentais.

Gráfico 4 – Atividade α -glicosidase da proteína Cqm1 (20 μ g) a partir de diferentes substratos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

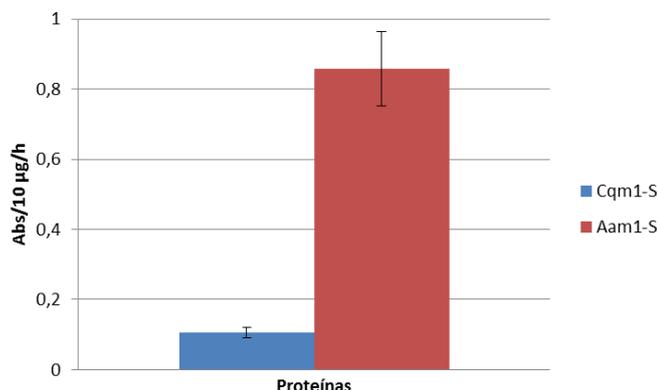
Legenda: Proteína Cqm1 (adsorvida em resina) recombinante produzida em células Sf9. Substrato sintético pN α G a 2 mM (SIGMA N1377) em tampão citrato-fosfato (pH 6,5). Substratos maltose e sacarose a 5 mM em tampão do kit Glicose Monorreagente (Bioclin[®]). Os dados representam as médias de, no mínimo, três pontos experimentais. Atividade enzimática avaliada a 37° C.

Gráfico 5 – Atividade α -glicosidase da proteína Cqm1 (20 μ g) na faixa de pH de 6-10.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Proteína Cqm1 (adsorvida em resina) recombinante produzida em células Sf9. Tampão citrato-fosfato com 2 mM do substrato pN α G. Atividade enzimática avaliada a 37° C. Os dados representam as médias de dois a quatro pontos experimentais.

A atividade da Aglu Cqm1 foi comparada com atividade enzimática de uma ortóloga em *Aedes aegypti*, a Aam1, produzida em estudos prévios do grupo (FERREIRA et al., 2014). A Aam1 apresenta alta identidade (74%) em relação à Cqm1, porém ela possui duas características diferenciais em relação à Cqm1: não apresenta capacidade de ligação à toxina Bin; é fortemente glicosilada, o que não parece ocorrer com a Cqm1 (FERREIRA et al., 2010). A comparação da atividade catalítica destas duas Aglus mostrou que a atividade da Aam1 é cerca de 16 vezes maior do que a da Cqm1 (gráfico 6).

Gráfico 6 – Atividade α -glicosidase das proteínas Cqm1 (20 μ g) e Aam1 (10 μ g).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Proteínas Cqm1-S e Aam1-S (adsorvidas em resina) recombinantes produzida em células Sf9Tampão citrato-fosfato pH 6,5 com 2 mM do substrato pN α G. Atividade enzimática avaliada a 37° C. Os dados representam as médias de pelo menos três pontos experimentais.

8.2 Identificação de α -glicosidases parálogas à Cqm1

Após uma pesquisa na plataforma VectorBase e no artigo de revisão de Gabrisko (2013), foram encontradas 18 proteínas parálogas à Cqm1 (quadro 6). Dezesseis delas apresentaram identidade de aminoácidos entre 38 e 44%, enquanto duas apresentaram identidade inferior entre 29 e 31%. O tamanho dos genes varia entre 1227 e 1883 pb, e o peso molecular predito das proteínas varia entre 61 e 71 kDa, com exceção de uma proteína cujo peso predito é \approx 47 kDa.

A partir desta análise, foram utilizados critérios para selecionar as parálogas e desenhar *primers* para realização de RT-PCR (quadro 6). Os critérios utilizados foram: presença de domínios conservados de Aglus de mosquitos; predição de âncora GPI; e peso molecular predito. A partir destes critérios, foram escolhidas 12 parálogas para o desenho de *primers*, incluindo a proteína Cqm1. Além da pesquisa de proteínas parálogas à Cqm1, foi feita uma busca de Aglus de *Culex quinquefasciatus* e, após a sua análise, foi observado que parte delas já havia sido identificada dentre as parálogas, e a outra parte não foi considerada no estudo pois não possuía os domínios catalíticos conservados característicos destas enzimas.

Esta análise demonstrou que, dentre o grupo de parálogas encontradas no banco de dados, algumas delas podem corresponder às Aglus que foram detectadas, além da Cqm1, em análises qualitativas *in gel* feita com amostras de larvas (ROMÃO et al., 2006). As análises subsequentes visam avaliar transcritos destas parálogas em larvas de *C. quinquefasciatus* bem como um padrão de expressão diferencial em larvas resistentes.

Quadro 6 – Proteínas parálogas à α -glicosidase Cqm1 de *Culex quinquefasciatus* identificadas na plataforma VectorBase (<https://vectorbase.org>).

Parálogo (ID)	Função predita	Identidade % (AA)	Nº Nt	Nº AA	PM (kDa)	Domínios conservados	Predição âncora GPI	Análise de transcrição
CPIJ013173 (Cqm1)	“AA transport protein rBAT*”	100	1743	570	66,5	4	Sim	Sim
CPIJ013172 (P1)	“Alpha-glicosidase precursor”	44	1865	611	70,6	4	Sim	Sim
CPIJ013169 (P2)	“Alpha-glicosidase precursor”	44	1671	556	63,8	4	Não	Não
CPIJ019693 (P3)	“Alpha-glicosidase precursor”	43	1883	616	69,5	4	Sim	Sim
CPIJ005213 (P4)	“Alpha-glicosidase precursor”	43	1851	616	69,7	4	Sim	Sim
CPIJ013171 (P5)	“Alpha-glicosidase precursor”	43	1818	605	69,4	4	Sim	Sim
CPIJ018570 (P6)	“Alpha-amylase”	43	1803	600	68,5	4	Não	Não
CPIJ005210 (P7)	“Alpha-amylase”	43	1785	594	67,9	4	Não	Não
CPIJ012204 (P8)	“Alpha-glicosidase precursor”	42	1827	608	70,3	4	Sim	Sim
CPIJ019691 (P9)	“Conserved hypothetical protein”	42	1827	608	69,0	4	Sim	Sim
CPIJ013170 (P10)	“Maltase 1 precursor”	42	1815	604	69,4	4	Sim	Sim
CPIJ010128 (P11)	“Alpha-glicosidase precursor”	42	1800	599	67,0	4	Não	Sim
CPIJ009692 (P12)	“Alpha-amylase”	41	1807	580	66,5	4	Não	Não
CPIJ005212 (P13)	“Oligo-1,6-glicosidase”	41	1795	580	66,4	4	Não	Sim
CPIJ019690 (P14)	“Maltodextrin glucosidase”	41	1686	561	63,9	3	Não	Sim
CPIJ005208 (P15)	“Alpha-amylase”	39	1605	534	61,2	4	Não	Não
CPIJ016362 (P16)	“Alpha-glicosidase precursor”	38	1864	584	66,6	4	Não	Não
CPIJ019689 (P17)	“Glucanotransferase precursor”	31	1227	408	46,8	4	Não	Sim
CPIJ005211 (P18)	“Alpha-amylase 2”	29	1845	614	69,3	1	Sim	Não

Fonte: Elaborado pelo autor.

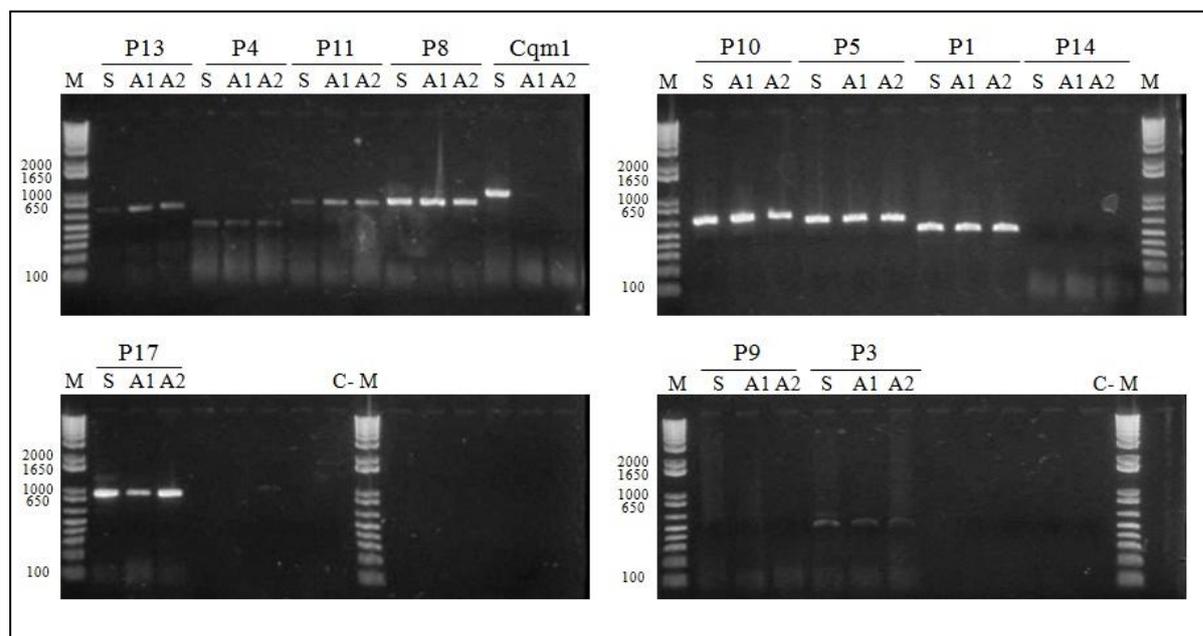
Legenda: Nt = nº de nucleotídeos. AA = aminoácidos. PM = peso molecular predito (kDa). *Função descrita no VectorBase, porém estudos do grupo demonstraram que a proteína é uma α -glicosidase (FERREIRA et al., 2010, 2014; ROMÃO et al., 2006).

8.3 Expressão de glicosidases parálogas à Cqm1

8.3.1 Detecção de transcrição

Nesta etapa, foi feita uma análise qualitativa da transcrição através de RT-PCR convencional da Cqm1 e de 11 parálogas, dentre o grupo de 19 proteínas apresentadas no quadro 6. Esta avaliação foi feita a partir de amostras de RNA de indivíduos das colônias susceptível (S) e resistentes (REC e REC-2). A expressão de mRNA, de acordo com tamanho de fragmento amplificado esperado (quadro 4), foi observada para nove parálogas em amostras das três colônias estudadas, enquanto que amplicons a partir do mRNA de duas não foram detectadas (P9 e P14), nas condições experimentais utilizadas. No grupo de parálogas cujos transcritos foram detectados observou-se que: a Cqm1 estava presente apenas na amostra da colônia susceptível; P1, P5, P8, P10 e P17 geraram amplicons de maior intensidade nas larvas das três colônias; P4, P11 e P13 amplificaram fragmentos com intensidade mais discreta (Figura 12). De uma forma global, foram observadas variações na intensidade de bandas e algumas parálogas foram selecionadas para análise quantitativa.

Figura 12 – Separação eletroforética dos fragmentos de genes que codificam a proteína Cqm1 e suas respectivas proteínas parálogas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Reações de RT-PCR, a partir do mRNA de larvas de *Culex quinquefasciatus*, em gel de agarose a 1% visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta. S, A1 e A2 = amostras de indivíduos susceptíveis (S) e resistentes portadores do alelo *cqm1*_{REC} (A1) e *cqm1*_{REC-2} (A2). P1-P17 = cDNA que codifica as respectivas proteínas parálogas do gene *cqm1*. C- = controle negativo da reação sem a amostra de mRNA. M = marcador em pares de bases.

8.3.2 Análise quantitativa de transcrição

Após a análise da RT-PCR convencional, foram escolhidos cinco genes de *Agilus* parálogos à *Cqm1* (P4, P10, P11, P13 e P17) para desenho de *primers*, além da *Cqm1* e do gene de controle endógeno 18S (quadro 5). Os ensaios foram realizados em triplicata com amostras de RNA obtidas a partir da extração de *pools* de 10 larvas, totalizando 30 indivíduos analisados por colônia. Dos cinco genes analisados, não foi possível obter resultados de dois deles (P4 e P11), pois os testes preliminares de padronização das condições dos ensaios não permitiram a detecção de transcrição. Na tabela 2, estão os parâmetros utilizados para avaliação da eficiência de amplificação dos demais alvos selecionados (*Cqm1*, P10, P13 e P17). O coeficiente angular da reta (*slope*), composta pelos pontos da curva, com um valor de -3,32 indica 100% de eficiência de amplificação. O R^2 é o coeficiente de correlação da regressão linear a partir dos dados do C_T de pontos individuais das amostras padrão, cujo máximo equivale a 1 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2010). Com base nestes parâmetros, foi possível avaliar que foi obtida, no mínimo, uma boa eficiência de amplificação para os alvos selecionados. Além disso, a curva de dissociação dos *primers* mostrou amplificação em uma única *melting temperature* (T_m - temperatura de dissociação) para cada gene nas amostras das três colônias, indicando um sinal específico para cada alvo (gráfico 7). E, para o gene endógeno, também ocorre boa eficiência de amplificação (LIU et al., 2011).

Tabela 2 – Avaliação de eficiência dos *primers* utilizados nas reações de qRT-PCR.

Alvo	<i>Slope</i>	R^2	Eficiência	Limite de detecção (pg)
<i>Cqm1</i>	-3,305	0,998	100,72	1
P10	-2,27	0,988	175,72	10
P13	-3,686	0,998	86,75	1
P17	-3,229	0,998	104,03	10

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: qRT-PCR em tempo real realizada com os *primers* dos genes alvos das glicosidases *Cqm1*, suas parálogas (P10, P13 e P17) e controle endógeno da reação (18S). A reação foi feita com amostras de RNA de indivíduos da colônia susceptível (S).

Gráfico 7 – Curva de dissociação da qRT-PCR em tempo real dos genes das glicosidasas Cqm1, suas parálogas (P10, P13 e P17) e gene endógeno (18S) (*continua*).

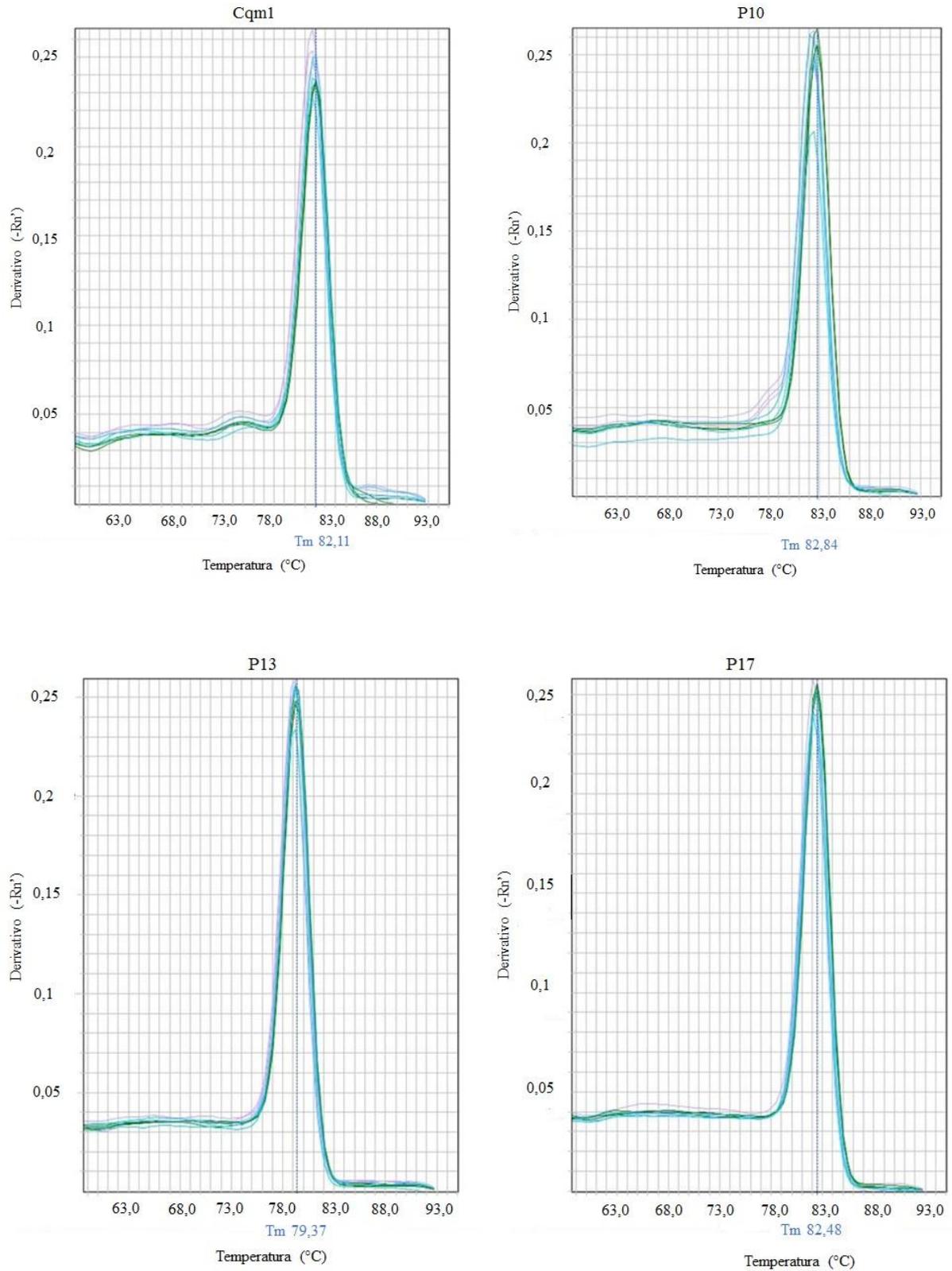
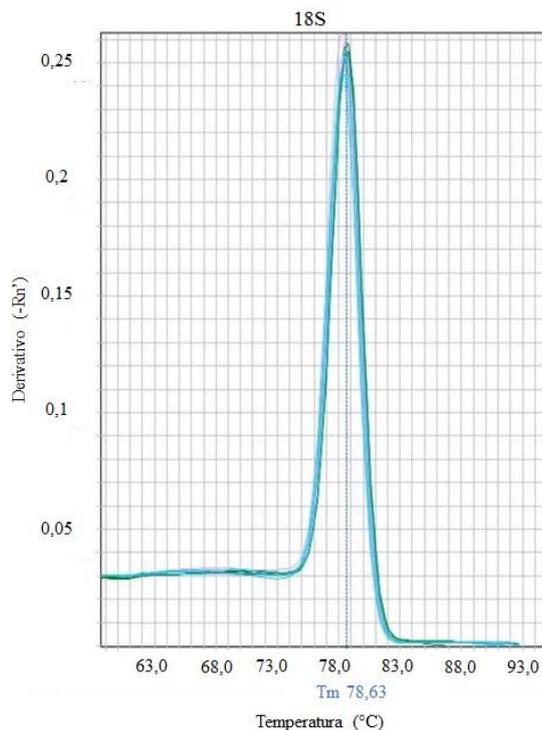


Gráfico 7 – Curva de dissociação da qRT-PCR em tempo real dos genes das glicosidases Cqm1, suas parálogas (P10, P13 e P17) e gene endógeno (18S) (conclusão).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: qRT-PCR em tempo real a partir dos genes alvos das glicosidases Cqm1, suas parálogas (P10, P13 e P17) e controle endógeno da reação (18S). A reação foi feita com amostras de RNA de indivíduos das colônias susceptível (S) e resistentes (REC e REC-2). T_m = *Melting temperature* (temperatura de dissociação). Gene Cqm1 $\rightarrow T_m = 82,11^\circ \text{C}$. Gene da P10 $\rightarrow T_m = 82,84^\circ \text{C}$. Gene da P13 $\rightarrow T_m = 79,37^\circ \text{C}$. Gene da P17 $\rightarrow T_m = 82,48^\circ \text{C}$. Gene 18S $\rightarrow T_m = 78,63^\circ \text{C}$.

Os ensaios de quantificação relativa mostraram que os valores de C_{T_S} (*Cycle Threshold*) médios, os quais informam o número de ciclos requeridos para o sinal fluorescente ultrapassar o nível de ruído (*threshold*) da reação, foram similares para o controle endógeno (≈ 15) e para os alvos das parálogas P10 (≈ 32), P13 (≈ 20) e P17 (≈ 26). Entretanto, para o gene da glicosidase Cqm1 estes valores foram distintos (22 a 30), indicando diferentes padrões de transcritos de ordem decrescente para os alelos *cqm1*, *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* (Tabela 3).

Tabela 3 – *Cycle Threshold* (C_T) médio dos genes das glicosidases *Cqm1*, suas parálogas (P10, P13 e P17) e gene endógeno (18S).

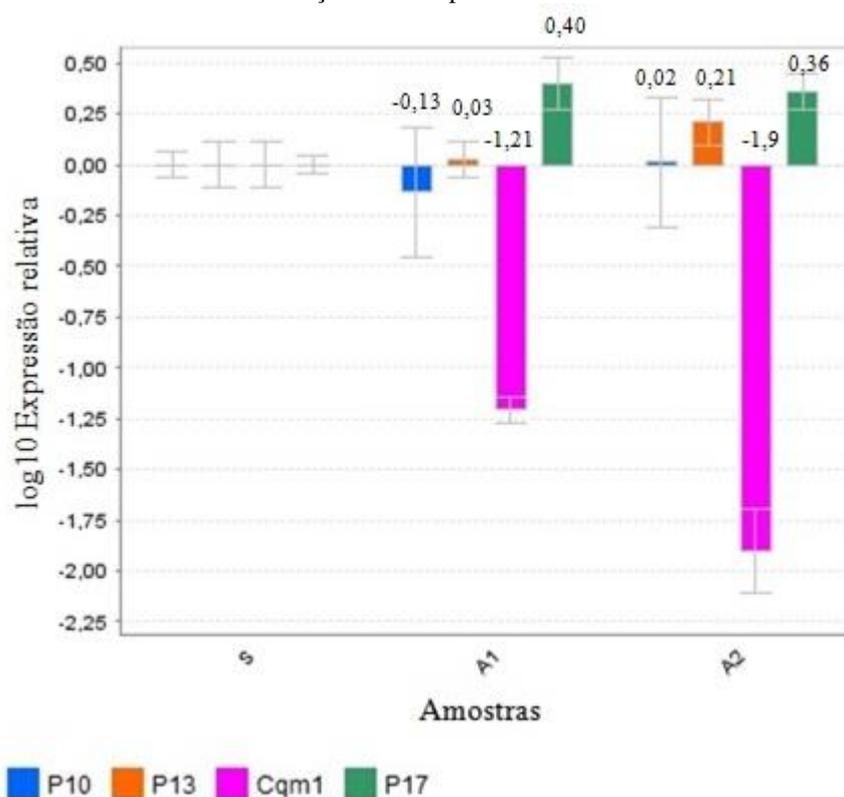
Gene	C_T médio		
	Susceptível	REC	REC-2
Cqm1	22,486	27,22	30,034
P10	31,509	32,673	32,695
P13	19,84	20,47	20,375
P17	26,825	26,23	26,867
18S	14,511	15,234	15,747

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: qRT-PCR em tempo real a partir dos genes alvos das glicosidases *Cqm1*, suas parálogas (P10, P13 e P17) e controle endógeno da reação (18S). A reação foi feita com amostras de RNA de indivíduos das colônias susceptível (S) e resistentes (REC e REC-2). C_T = *Cycle threshold*.

Em relação à quantificação relativa do alvo *cqm1*, foi observada uma baixa expressão dos transcritos dos alelos resistentes *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*, que foram cerca de 20 e 80 vezes menores, respectivamente, em comparação com o *cqm1* da colônia susceptível. Em relação às parálogas da Aglu *Cqm1*, apesar do C_T da P17 ter sido similar entre as amostras de indivíduos susceptíveis e resistentes, foi observada uma maior abundância de transcritos nos indivíduos resistentes (*cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*), que foi cerca de três vezes maior do que nos susceptíveis (gráfico 8). No caso da paróloga P13, os níveis de transcritos foram cerca de duas vezes maior nos indivíduos portadores do alelo de resistência *cqm1_{REC-2}* em comparação com os indivíduos susceptíveis e resistentes portadores do alelo *cqm1_{REC}* (gráfico 8). Estes dados indicam uma modificação do padrão de expressão relativa de duas das três parálogas analisadas. A análise final das colônias resistentes mostrou que REC possui baixa expressão do gene *cqm1_{REC}* e maior expressão da paróloga P17, ao passo que REC-2 mostrou baixa expressão do *cqm1_{REC-2}* e maior expressão das parálogas P13 e P17.

Gráfico 8 – Expressão relativa do gene da glicosidase Cqm1 e suas parálogas nos indivíduos resistentes em relação ao susceptível.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: qRT-PCR em tempo real a partir dos genes alvos das glicosidases Cqm1, suas parálogas (P10, P13 e P17) e controle endógeno da reação (18S). A reação foi feita com amostras de RNA de indivíduos das colônias susceptível (S) e resistentes (A1-REC e A2-REC-2). O valor da expressão relativa nas amostras de indivíduos resistentes está apresentado acima das barras.

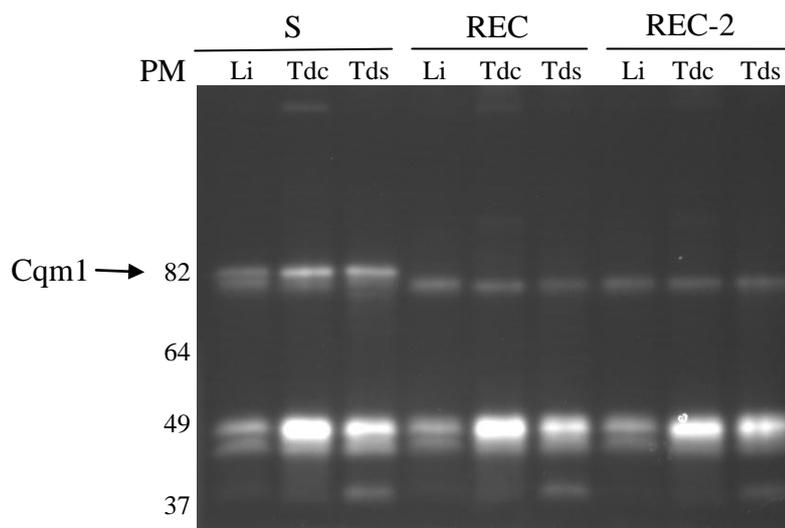
8.4 Atividade α -glicosidase em larvas

Para avaliar a atividade de Aglus nativas nas larvas das colônias susceptíveis e resistentes, foi feita inicialmente uma análise qualitativa do perfil de bandas catalíticas *in gel*. O padrão detectado na amostra de indivíduos susceptíveis apresentou cinco bandas catalíticas, com destaque para a Cqm1 que migra com o maior peso molecular aparente, sob condições semi-desnaturantes (figura 13). Nos indivíduos susceptíveis, o padrão foi similar para larvas inteiras e intestinos, e esta última mostrou uma maior intensidade das bandas indicando uma maior quantidade de enzimas neste tecido, comparado com larvas inteiras. O padrão das amostras de indivíduos resistentes é semelhante ao de larvas susceptíveis e entre si, exceto pela ausência da banda catalítica correspondente à Aglu Cqm1 (figura 13), confirmando que a expressão desta proteína não ocorre nos indivíduos resistentes. Esta análise qualitativa mostra um padrão similar, exceto pela ausência da Cqm1, o que foi também observado na análise de

transcrição. Entretanto, não foi possível observar diferenças claras na intensidade de outras bandas entre indivíduos susceptíveis e resistentes.

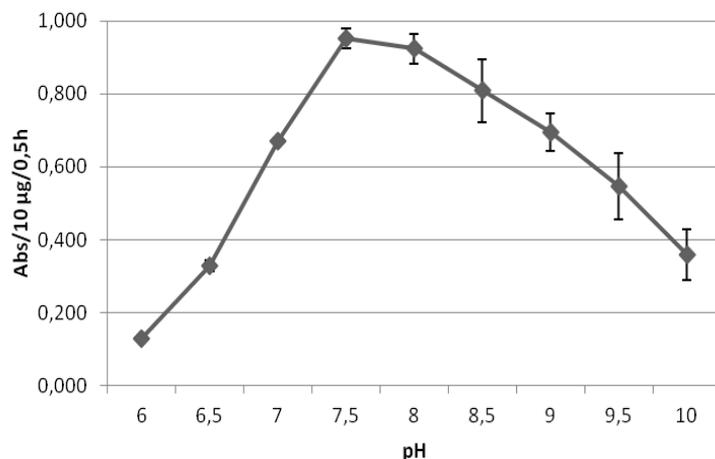
A atividade total das Aglus nativas das larvas das três colônias foi comparada. A etapa inicial foi avaliar o pH adequado para mensurar a atividade em amostras nativas de tubo digestivo (Tdc) de indivíduos susceptíveis. Assim como detectado para a proteína Cqm1 recombinante, foi observada uma maior atividade entre os pH's 7,5 – 8,0 (gráfico 9). Em seguida, a atividade foi avaliada nas mesmas amostras de proteínas nativas utilizadas no ensaio anterior (Li, Tdc e Tds). As amostras Li dos indivíduos das três colônias apresentaram uma atividade similar entre si e menor do que as amostras de intestino (Tdc e Tds). Comparando as amostras das três colônias analisadas, a atividade Aglu total é similar (gráfico 10).

Figura 13 – Perfil de bandas catalíticas de atividade α -glicosidase de amostras de larvas de diferentes colônias de *Culex quinquefasciatus*.



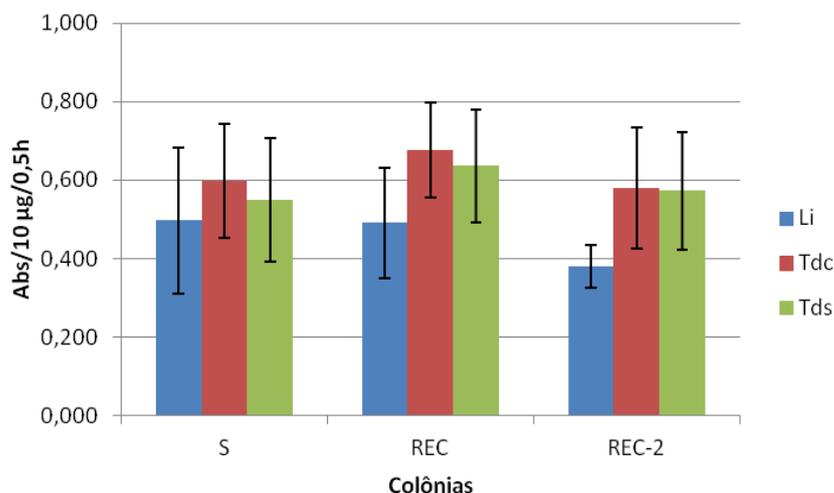
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Zimograma (ensaio catalítico *in gel*) de α -glicosidases. S = indivíduos susceptíveis ao *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp). REC e REC-2 = indivíduos resistentes ao Lsp associados aos alelos *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2}, respectivamente. PM = Marcador de peso molecular em kDa. Li = larva inteira. Tdc = tubo digestivo com conteúdo intestinal. Tds = Tubo digestivo sem conteúdo intestinal.

Gráfico 9 – Atividade α -glicosidase de amostra de intestinos de larvas de *Culex quinquefasciatus* na faixa de pH de 6-10.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Amostras de proteína (10 µg) de extrato de intestinos. Os dados representam as médias de seis pontos experimentais.

Gráfico 10 – Atividade α -glicosidase em larvas e intestinos de *Culex quinquefasciatus*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: S = colônia susceptível. REC = colônia resistente ao *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) 2362 associada ao alelo *cqm1*_{REC}. REC-2 = colônia resistente ao Lsp 2362 associada ao alelo *cqm1*_{REC-2}. Li = larva inteira. Tdc = tubo digestivo com conteúdo intestinal. Tds = Tubo digestivo sem conteúdo intestinal. Os dados representam as médias de pelo menos 20 pontos experimentais.

8.5 Desenvolvimento pré-imaginal de larvas frente a diferentes dietas

O desenvolvimento pré-imaginal de larvas de *C. quinquefasciatus* foi avaliado frente a diferentes dietas. A tabela 4 mostra os dados obtidos após o período de avaliação de 12 dias para cada dieta avaliada nas três colônias. Foi observado na colônia de referência S (gráfico 11A) o maior percentual de pupas e adultos nas dietas de ração para gatos (RG - 86%) e ração para peixes (RP - 82%), enquanto que na presença de sacarose (SC) não houve

desenvolvimento para a fase adulta, com percentual de 90% de mortalidade e estagnação do desenvolvimento de indivíduos (10%) nas fases L₁-L₃. O percentual de adultos nos grupos experimentais alimentados com leite desnatado (LD - 28%) e extrato de levedura (EL - 20%) foi inferior, sendo observado um grande número de indivíduos na fase de larvas L₄ (LD 42%, EL 25%), e mortalidade elevada (EL 51%, LD 29%). A partir desta dietas foi possível atingir a fase adulta, porém o índice é baixo comparado às rações testadas.

Nas colônias resistentes REC (gráfico 11B) e REC-2 (gráfico 11C) a sobrevivência até a fase de pupa/adulto foi inferior em comparação com a colônia de referência S. Na dieta padrão RG, as colônias resistentes apresentaram 81 e 71% de adultos, respectivamente, menor que a S (86%). Na dieta RP também houve menor percentual de adultos, com valores de 67% para REC e 75% para REC-2, em comparação com 82% da S. Assim como na colônia de referência, na dieta SC não houve desenvolvimento para a fase adulta dos indivíduos das colônias resistentes. Na dieta LD, houve um percentual ainda menor de adultos (7-8%) comparado à colônia S (28%), com grande parte dos indivíduos permanecendo na fase larval (72-83%). Na dieta EL, a colônia REC apresentou um desempenho similar à S em número de pupas e adultos (S 20%, REC 17%). Já a colônia REC-2 teve um baixo percentual de adultos (3%) acompanhado de alta mortalidade (96%), ao invés de estagnação larval, observada na dieta LD.

O desempenho global das três colônias avaliadas a partir dos dados agrupados obtidos demonstrou que os indivíduos resistentes apresentaram um maior comprometimento no desenvolvimento, com percentual de sobrevivência mais baixo (30-34%) do que os susceptíveis (49%), devido ao retardo de desenvolvimento e ao processo de estagnação apresentado em algumas fases do desenvolvimento. A comparação entre as colônias resistentes mostra que REC-2 teve um maior percentual de mortalidade, o que a coloca em desvantagem em relação à REC quanto à sobrevivência de seus indivíduos. No entanto, deve ser notado que houve um alto desvio padrão (gráfico 12) devido às diferenças de desenvolvimento em relação às diferentes dietas, como observado na tabela 4 e gráfico 11.

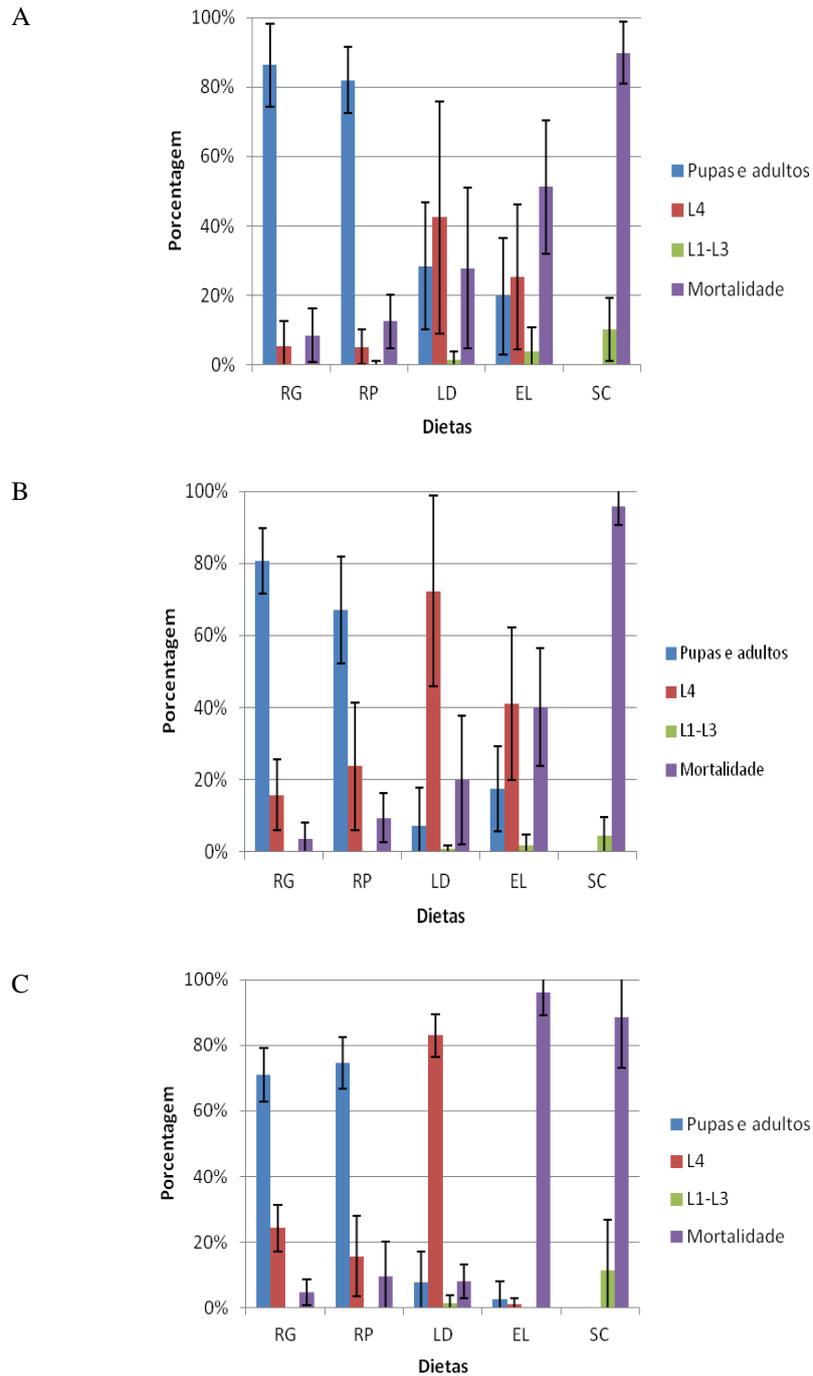
Tabela 4 – Dados da avaliação do desenvolvimento pré-imaginal de *Culex quinquefasciatus* frente a cinco diferentes dietas.

Colônia	Dietas	N	N				%			
			PA	L ₄	L ₁ -L ₃	M	PA	L ₄	L ₁ -L ₃	M
S	RG	700	604	37	0	59	86	5	0	9
	RP	600	492	31	2	75	82	5	0	13
	LD	500	142	212	7	139	28	42	1	29
	EL	400	79	101	15	205	20	25	4	51
	SC	500	0	0	51	449	0	0	10	90
Total		2700	1317	381	75	927	49	14	3	34
REC	RG	300	242	47	0	11	81	16	0	3
	RP	300	201	71	0	28	67	24	0	9
	LD	300	21	217	2	60	7	72	1	20
	EL	300	52	123	5	120	17	41	2	40
	SC	300	0	0	14	287	0	0	4	96
Total		1500	516	458	20	506	34	31	1	34
REC-2	RG	300	213	73	0	14	71	24	0	5
	RP	300	224	47	0	29	75	16	0	9
	LD	300	23	248	4	25	8	83	1	8
	EL	400	11	4	0	385	3	1	0	96
	SC	300	0	0	34	266	0	0	11	89
Total		1600	471	372	38	719	30	23	2	45

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os grupos experimentais contêm 50 larvas de *C. quinquefasciatus*/100 mL de água dechlorada e o experimento teve duração de 12 dias. N = número de indivíduos. PA = pupas e adultos. L₄ = estágio larval L₄. L₁-L₃ = estágio larval de L₁ a L₃. M = mortalidade. S, REC e REC-2 = Colônias de *C. quinquefasciatus* susceptível e resistentes à toxina Bin homozigotas para os alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*, respectivamente. RG = Ração para gatos Whiskas®. RP = Ração para peixes Maramar®. LD = Leite em pó desnatado Molico®. EL = Extrato de levedura Sigma®. SC = Sacarose Sigma®.

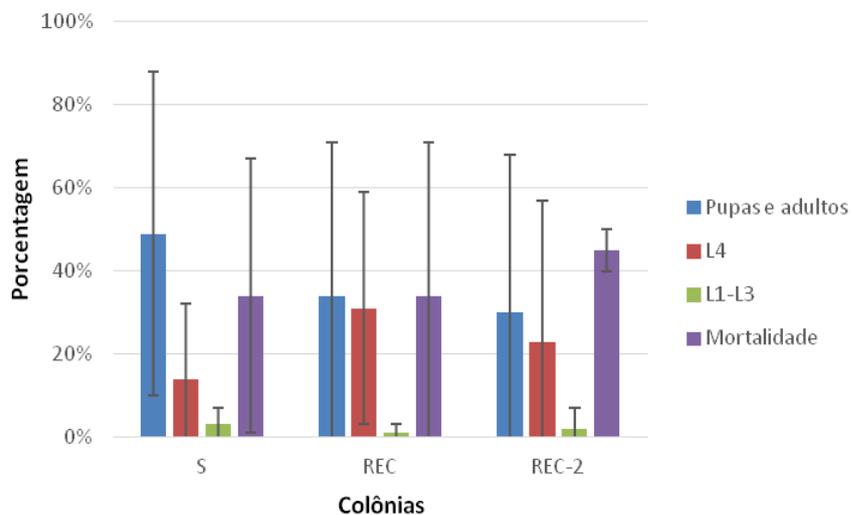
Gráfico 11 – Desenvolvimento pré-imaginal de *Culex quinquefasciatus* das colônias susceptível S (A), e resistentes REC (B) e REC-2 (C) ao Lsp frente a diferentes dietas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Grupos experimentais de 50 larvas de *C. quinquefasciatus*/100 mL de água deionada, o ensaio teve duração de 12 dias e os dados representam de dois a quatro pontos experimentais. RG = Ração para gatos Whiskas®. RP = Ração para peixes Maramar®. LD = Leite em pó desnatado Molico®. EL = Extrato de levedura Sigma®. SC = Sacarose Sigma®. L₄ = estágio larval L₄. L₁-L₃ = estágio larval de L₁ a L₃. S, REC e REC-2 = Colônias de *C. quinquefasciatus* susceptível e resistentes à toxina Bin homocigotas para os alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*, respectivamente.

Gráfico 12 – Dados agrupados do desenvolvimento pré-imaginal de *Culex quinquefasciatus* das colônias susceptível (S) e resistentes (REC e REC-2) ao Lsp frente ao grupo de dietas testadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Dietas = ração para gatos Whiskas[®], ração para peixes Maramar[®], leite em pó desnatado Molico[®], extrato de levedura Sigma[®] e sacarose Sigma[®]. L₄ = estágio larval L₄. L₁-L₃ = estágio larval de L₁ a L₃.

9 DISCUSSÃO

As α -glicosidases (Aglus) são enzimas que atuam na digestão de carboidratos, e são essenciais para a sobrevivência de larvas e adultos de mosquitos (FOSTER, 1995). A maioria dos estudos destas enzimas vem sendo realizada com adultos visto que a dieta básica nesta fase do ciclo de vida é quase exclusiva de sacarose. Apesar das fêmeas realizarem o repasto sanguíneo para a maturação dos ovos, apenas este tipo de alimentação não é suficiente para a sua sobrevivência. Souza-Neto et al. (2007) demonstraram que fêmeas adultas de *Anopheles aquasalis* submetidas exclusivamente à alimentação sanguínea possuem uma longevidade de apenas seis dias. Por outro lado, a caracterização de Aglus na fase de larva é escassa. Em *Culex quinquefasciatus*, a Aglu Cqm1 vem sendo estudada a partir de sua identificação como receptor da toxina Binária (Bin), produzida pela bactéria entomopatogena *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) (ROMÃO et al., 2006). Apesar de sua função primordial estar associada à digestão de carboidratos, sua atividade catalítica ainda não foi caracterizada.

Neste estudo, a caracterização inicial da atividade enzimática da Cqm1 foi realizada, sendo demonstrado que a Cqm1 apresenta atividade ótima a 37° C, pH 7,5-8,0 a partir do substrato sintético p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (pN α G), cuja degradação foi superior aos substratos naturais testados. A avaliação de pH ótimo para a atividade de Aglus nativas em amostras de intestinos de larvas mostrou um padrão similar ao da Cqm1, com atividade ótima em pH entre 7,5 e 8,0. Estes dados diferem do que foi encontrado para glicosidase presente em glândulas salivares (MalI) de *C. quinquefasciatus*, que exibiu atividade ótima a 35° C, pH 5,5. Além destas diferenças, houve preferência pelo substrato maltotriose ao invés do substrato sintético pN α G (SUTHANGKORNKUL et al., 2015). Glicosidases presentes em glândulas salivares de adultos de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* também apresentaram maior atividade em pH na faixa ácida (MARINOTTI; BRITO; MOREIRA, 1996; MARINOTTI; JAMES, 1990). Estas diferenças podem representar peculiaridades de cada enzima. O pH do intestino médio (*midgut*) de larvas e adultos de mosquitos é alcalino, podendo variar de 7 a 10 e apresenta atividade de várias enzimas digestivas ligadas ao epitélio tais como glicosidases, e esta pode ser a razão pela qual a Cqm1 apresenta uma maior atividade em pH mais elevado do que as glicosidases de glândula salivar (DADD, 1975; TERRA; FERREIRA, 2010). Estes dados podem indicar uma adaptação em relação às condições ótimas de atividade catalítica destas glicosidases, de acordo com a fase de vida e o tecido onde são expressas nos insetos.

O estudo das Aglus ortólogas Cqm1 e Aam1 mostra que elas tem alta identidade de sequência, mas podem apresentar alta diversidade funcional. No caso, elas apresentam diferenças na capacidade de interagir com a toxina Bin e no padrão de glicosilação (FERREIRA et al., 2010). Este estudo mostra ainda uma significativa redução na capacidade catalítica da Cqm1 em relação à Aam1. Apesar da glicosilação da Aam1, esta característica não parece influenciar na capacidade de interação da Aam1 com a toxina Bin (FERREIRA et al., 2014), e sua relação com a capacidade catalítica está sendo investigada. Ainda em relação à diversidade funcional, a função predita da Cqm1 na plataforma GenBank sugere uma outra habilidade desta proteína como transportadora de aminoácidos. Este fato pode ocorrer devido à alta diversidade de funções de proteínas, como demonstrado no trabalho de Mury et al. (2009), no qual uma Aglu de *Rhodnius prolixus* está associada à formação de hemozoína, que é um produto da detoxificação de grupamento heme da hemoglobina. Deve ser notado que a maioria das parálogas da Cqm1 tem função predita relacionada à degradação de carboidratos, exceto a própria Cqm1. Entretanto, deve ser considerado também que a função predita possa se tratar de um equívoco de anotação.

Dentre os alelos da Aglu Cqm1 do *C. quinquefasciatus* ou Cpm1 do *Culex pipiens* que estão associados à resistência à toxina Bin (CHALEGRE et al., 2012, 2015; DARBOUX et al., 2002, 2007; GUO et al., 2013; ROMÃO et al., 2006), estão os alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* que, em homozigose, são responsáveis pela resistência das larvas das respectivas colônias avaliadas neste estudo. As proteínas codificadas pelos genes mutantes podem não ser produzidas pois os alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* tem baixa transcrição de mRNA (CHALEGRE et al., 2015). Portanto, um dos objetivos deste trabalho, que partiu da hipótese que a Aglu Cqm1 não é expressa, foi avaliar a ocorrência da expressão de outras Aglus que poderiam estar associadas a algum tipo de mecanismo de compensação, ou de redundância fisiológica devido à ausência da Cqm1 nos indivíduos resistentes. Dados de bioinformática (GABRISKO, 2013) descrevem diversas Aglus preditas no genoma de *C. quinquefasciatus*, porém dados de identificação e caracterização destas enzimas *in vivo*, além da Cqm1, são escassos. No presente estudo, 18 parálogas à proteína Cqm1 foram identificadas *in silico*, cuja função predita em sua maioria está relacionada à atividade Aglu, e delas, 11 foram selecionadas para avaliar se são expressas em larvas das colônias estudadas.

Nove destas parálogas foram detectadas nas três colônias estudadas, indicando a expressão destes genes de Aglus nas larvas. Foram observadas diferenças da intensidade no sinal dos transcritos identificados, sugerindo diferenças quantitativas nos padrões de expressão destes genes. Em relação ao gene *cqm1* e seus mutantes (*cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*), foi

observado um padrão esperado de amplicons para a Cqm1 em susceptíveis e ausência nas resistentes. Na qRT-PCR foi observada uma baixa expressão deste gene nas resistentes conforme demonstrado por Chalegre et al. (2015). Transcritos de duas parálogas (P9 e P3) não foram detectados em nenhuma das colônias estudadas, sendo possível que elas não sejam expressas, ou que as condições experimentais aplicadas não foram capazes de detectar a sua expressão. Alternativamente, estas parálogas poderiam ser expressas em outro estágio do desenvolvimento, como ocorre com Aglus que são expressas em adultos (FERREIRA et al., 2010; JAMES; BLACKMER; RACIOPPI, 1989; SOUZA-NETO et al., 2007; SUTHANGKORNKUL et al., 2015). A avaliação de quantificação relativa de três parálogas à Cqm1 (P10, P13 e P17) mostrou um padrão de transcrição diferente para duas delas, em relação ao padrão de larvas susceptíveis. Comparada aos susceptíveis, as larvas resistentes (REC) mostram maior abundância de transcritos da P17, e a colônia REC-2 mostra uma maior abundância da paráloga P17 e também um aumento discreto da P13. A maior expressão observada em duas parálogas, das três analisadas, sugere a existência de um mecanismo de compensação da expressão outras de Aglus presentes em *C. quinquefasciatus* em resposta à baixa expressão da Cqm1 nos indivíduos resistentes.

As toxinas inseticidas de bactérias entomopatógenas dependem da interação com receptores para a sua ação. Vários destes receptores são enzimas intestinais tais como as Aglus (Agm3, Cqm1 e Cpm1), que são receptores da toxina Bin do Lsp, além de aminopeptidases e fosfatases alcalinas, que agem como receptores de toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* (BRAVO et al., 2002; DARBOUX et al., 2001; JIMÉNEZ et al., 2012; OPOTA et al., 2008; PAUCHET et al., 2005; ROMÃO et al., 2006; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999). Nos genes destes receptores podem ocorrer mutações que impedem a sua expressão, acarretando em uma forma de silenciamento gênico de moléculas constitutivamente importantes e com papel fisiológico primordial na digestão. Apesar de sua implicação direta com um possível custo biológico associado à resistência, o impacto da ausência de expressão destas moléculas nos insetos não tem sido estudado. Os dados deste estudo sugerem a existência de mecanismos para suprir a ausência destas moléculas, através do padrão de expressão diferencial de Aglus parálogas nas linhagens resistentes em comparação com a susceptível. Um painel mais completo do perfil de transcrição de Aglus nestes insetos, indicando outras parálogas, deve ser analisado para confirmar esta hipótese. Adicionalmente, seria necessário expressar e caracterizar funcionalmente as parálogas que apresentaram aumento de expressão a fim de avaliar sua equivalência funcional em relação à Cqm1.

Após a análise do padrão de expressão individual de Aglus selecionadas, a avaliação de atividade Aglu total em amostras de larvas em ensaio qualitativo *in gel* corroborou o fenótipo resistente, mostrando a ausência da banda catalítica correspondente à Cqm1, como observado por Romão et al. (2006). O perfil de bandas catalíticas não mostrou resolução para avaliar possíveis diferenças das demais bandas de Aglus entre as colônias, além daquela previamente sabida, que é a ausência da Cqm1. No entanto, observou-se que oito, dentre as nove parálogas expressas (RT-PCR convencional), teriam um peso molecular da proteína predito entre 60 e 70 kDa que poderiam corresponder a bandas catalíticas que migram próxima à Cqm1, conforme observado no ensaio *in gel*. Já a Aglu P17, que apresentou o maior aumento de expressão de transcritos, apresenta um peso predito de 47 kDa, e poderia corresponder a uma das outras bandas catalíticas que migram com peso molecular inferior. Estes dados indicam que os transcritos detectados podem corresponder às Aglus conservadas no perfil qualitativo de amostras nativas. A quantificação da atividade total de Aglus entre as amostras de indivíduos susceptíveis e resistentes foi similar, indicando que a atividade catalítica global é equivalente. Este resultado corrobora a hipótese que poderia haver um mecanismo de compensação de Aglus devido à ausência da Cqm1, sem prejuízo para a digestão de carboidratos em larvas de 4º instar.

O desenvolvimento pré-imaginal das colônias susceptíveis e resistentes frente a cinco dietas foi avaliado neste estudo para investigar as possíveis consequências da ausência da Cqm1 nos indivíduos resistentes. A nutrição larval é um fator essencial para o desenvolvimento, sendo importante considerar qualidade e quantidade de alimento disponível (GIMNIG et al., 2002). Neste estudo, as dietas que proporcionaram melhor desenvolvimento (taxa de sobrevivência) foram as rações para gatos e para peixes. Comparativamente, o leite desnatado e o extrato de levedura foram as dietas que provocaram retardos no desenvolvimento pré-imaginal de *C. quinquefasciatus*, causando, no período avaliado, uma estagnação de grande número de indivíduos nos estádios larvais, além de provocarem uma reduzida emergência de adultos. Já a sacarose, mostrou-se uma dieta insuficiente para promover o desenvolvimento dos indivíduos, visto que estes permaneceram na fase L₁, possivelmente por esta dieta não conter proteína, que é um componente nutricional essencial para o desenvolvimento pré-imaginal (GIGLIOLI, 1947; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Nosso resultado contrasta com o estudo comparativo do desenvolvimento de *C. quinquefasciatus* que não mostrou diferença significativa em relação à administração de dietas de ração para cães, ração para camundongos e leite desnatado (BRITO et al., 1999). Além disso, já foi observado que o extrato de levedura pode ser um alimento adequado para o

desenvolvimento de *Ae. aegypti*, conforme estudos já realizados (F. Genta, comunicação pessoal).

Outro importante aspecto que influencia no desenvolvimento pré-imaginal dos mosquitos é a densidade larval. É necessário que a quantidade de indivíduos no ambiente seja compatível para propiciar um desenvolvimento homogêneo, pois a alta densidade de larvas gera competição por espaço e por alimento, fatores que influenciam no tempo de desenvolvimento pré-imaginal, no tamanho dos indivíduos e no processo de pupação (BESERRA; FERNANDES; RIBEIRO, 2009; LÉONARD; JULIANO, 1995). Uma avaliação do efeito da densidade larval no desenvolvimento de *Ae. aegypti* mostrou que é possível manter colônias com até 1250 larvas/L, desde que seja administrado 5,7 mg de alimento/larva (BESERRA; FERNANDES; RIBEIRO, 2009). Outro estudo avaliou os efeitos da densidade larval, temperatura da água e composição da dieta para *Ae. albopictus* na produção de pupas e diferenciação de tamanho para separação por sexo. A densidade de 2000 a 3000 larvas/L foi ideal para uma elevada produção de pupas, 24h após o início desta fase (BALESTRINO et al., 2014). No nosso estudo, os experimentos com *C. quinquefasciatus* foram conduzidos com 500 larvas/L e administração de 2 mg de alimento/larva, estando de acordo com os parâmetros sugeridos para permitir o desenvolvimento pré-imaginal.

O desempenho das colônias resistentes, avaliado individualmente ou globalmente para as dietas, foi inferior, indicando que houve comprometimento no desenvolvimento. Entretanto, não foi possível estabelecer uma relação direta com a falta da *Cqm1*, visto que a atividade Aglu total nas larvas susceptíveis e resistentes é similar, e que parece haver uma modulação na expressão de outras proteínas com função predita possivelmente equivalente. É possível que outros genes, responsáveis por outros parâmetros, possam ter sido selecionados conjuntamente com o *Cqm1*. Entre as colônias resistentes, a REC-2 teve a taxa de sobrevivência global inferior à REC, apresentando maior mortalidade. No entanto, o trabalho de Melo (2013) mostrou um melhor desempenho biológico para os indivíduos da colônia resistente REC-2. Entretanto, naquele estudo, a manutenção dos grupos experimentais foi feita com menor densidade larval (100 larvas/L), maior disponibilidade de alimento (5 mg/larva/dia) e os parâmetros avaliados foram distintos daqueles aplicados no nosso estudo (como fecundidade, fertilidade e longevidade das fêmeas), podendo ser a razão das diferenças observadas nos resultados.

O conjunto de dados obtidos neste trabalho pode indicar que a resistência ao Lsp, conferida pelos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*, possui custo biológico relativamente baixo. As análises de expressão e de atividade de Aglus nas larvas apontam um aumento em pelo menos

duas potenciais Aglus, que poderia assegurar uma equivalência fisiológica em relação à capacidade de digestão de carboidratos em larvas susceptíveis e resistentes. Apesar disso, o desempenho biológico em relação à taxa de sobrevivência dos indivíduos resistentes é inferior em comparação com os susceptíveis. Portanto, não é possível concluir quanto ao custo biológico associado ao gene *cqm1*, visto que são necessárias análises mais completas até a fase adulta. O *fitness* ou desempenho biológico é definido principalmente pela capacidade reprodutiva e de contribuição genética do indivíduo dentro de uma população e, neste trabalho, foi feita apenas a avaliação do desenvolvimento pré-imaginal, sendo importante avaliar um conjunto mais amplo de parâmetros (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; (GASSMANN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009; ORR, 2009; RIGBY; HECHINGER; STEVENS, 2002).

Avaliações de custo biológico são de extrema importância para o entendimento das dinâmicas populacionais no ambiente. A aplicação exacerbada de biolarvicidas pode promover a pressão de seleção de indivíduos que possuem alelos de resistência que poderão manter uma frequência elevada deste alelo em populações. No caso das colônias de *C. quinquefasciatus* resistentes analisadas neste estudo (PEI et al., 2002), os alelos de resistência ligados ao gene *cqm1* parecem estar associados a um baixo custo biológico, podendo ser mantidos mesmo na ausência da pressão de seleção (AMORIM et al., 2010). Os resultados deste estudo indicam que a análise mais ampla de genes e proteínas seria relevante para a compreensão da diferente capacidade adaptativa das colônias REC e REC-2.

10 CONCLUSÕES

- a) A α -glicosidase (Aglu) Cqm1 de *Culex quinquefasciatus* mostrou características específicas, como atividade em pH adaptado ao intestino de larvas de mosquito, e capacidade enzimática significativamente inferior a Aglu Aam1 de *Aedes aegypti*, apesar da alta similaridade entre elas;
- b) *C. quinquefasciatus* possui pelo menos nove proteínas parálogas à Cqm1 expressas na fase larval e que podem estar envolvidas na digestão de carboidratos, visto que apresentam domínios conservados de Aglu;
- c) Nas larvas resistentes desprovidas de expressão da Aglu Cqm1, foram observados transcritos de nove parálogas à Cqm1 e, pelo menos duas delas (P13 e P17) possuem um expressão relativa aumentada em relação às larvas susceptíveis, sugerindo uma compensação pela ausência da Cqm1;
- d) As larvas susceptíveis e resistentes possuem um atividade Aglu total similar, indicando que a ausência da Aglu Cqm1 não parece exercer um impacto sobre este aspecto fisiológico, especificamente relacionado a ausência dos produtos de expressão dos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*;
- e) A avaliação do desenvolvimento pré-imaginal mostrou que a presença de proteína na dieta de larvas é fundamental para que os indivíduos atinjam a fase adulta;
- f) As larvas resistentes apresentaram um desenvolvimento pré-imaginal inferior comparado às susceptíveis nas dietas avaliadas;
- g) É possível que os alelos de resistência *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* estejam associados a um baixo custo biológico para os insetos, pelo menos no que se refere à atividade Aglu total envolvida na digestão de carboidratos.

REFERÊNCIAS

- AHMED, I. et al. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 57, n. 5, p. 1117-1125, 2007.
- AMORIM, L. B. et al. Stability of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* evaluated by molecular tools. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 40, n. 4, p.311- 316, 2010.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Real Time PCR Systems. **Relative Standard Curve and Comparative CT Experiments Getting Started Guide**. Atlanta, 2010. Disponível em: <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_050330.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2015.
- BALESTRINO, F. et al. Validation of a new larval rearing unit for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mass rearing. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e91914, 2014.
- BAUMANN, L.; BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Sequence analysis of the mosquitocidal genes encoding 51.4- and 41.9-Kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 170, n. 5, p. 2045-2050, 1988.
- BAUMANN, P. et al. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 55, n. 3, p. 425-436, 1991.
- BERRY, C. et al. Genetic determinants of host ranges of *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxins, **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, n. 2, p. 510-518, 1993.
- BERRY, C. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 109, p. 1-10, 2012.
- BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; RIBEIRO, P. S. Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em laboratório. **Neotrop. Entomol.**, Londrina, v. 38, n. 6, p. 847-852, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANDÃO, E. et al. Lymphatic filariasis among children and adolescents: spatial identification via socio-environmental indicators to define priority areas for elimination. **Int. Health**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 324-331, 2015.
- BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.

_____. Pore formation activity of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in an improved membrane vesicle preparation from *Manduca sexta* midgut cell microvilli. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1562, n. 1, p. 63-69, 2002.

BRITO, A. C. et al. Desenvolvimento larvário de *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: culicidae) sob três diferentes dietas. **Rev. Patol. Trop.**, Goiânia, v. 28, n. 1, p. 72-77, 1999.

BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 53, n. 6, p. 1333-1337, 1987.

CANTAREL, B. L., et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 37, p. 233-238, 2009.

CHALEGRE, K. D. et al. Novel mutations associated to *Bacillus sphaericus* resistance are identified in a polymorphic region of the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* gene. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 78, n. 17, p. 6321-6326, 2012.

_____. Co-selection and replacement of resistance alleles to *Lysinibacillus sphaericus* in a *Culex quinquefasciatus* colony. **FEBS J.**, Oxford, v. 282, n. 18, p. 3592-3602, 2015.

CHAREONVIRIYAPHAP, T., et al. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. **Parasit Vectors**, London, v. 6, n.1, p. 280-308, 2013.

CHARLES, J. F., NIELSEN-LEROUX, C., DELÉCLUSE, A. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. **Ann. Rev. Entomol.**, Palo Alto, v. 41, p. 451-472, 1996.

CHARLES, J. F.; NIELSEN-LEROUX, C. Les bactéries entomopathogènes: mode d'action sur les larves de moustiques et phénomènes de résistance. **Ann. Inst. Pasteur/Actualités**, Paris, v. 7, p. 233-245, 1997.

CONSOLI, R. A. G. D., OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**, 20 ed, Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 1994, 228p.

CRICKMORE, N. et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

DADD, R. H. Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline-active digestive enzymes. **J. Insect Physiol.**, London, v. 21, n. 11, p. 1847-1853, 1975.

DARBOUX, I. et al. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 31, n. 10, p. 981-990, 2001.

_____. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 99, n. 9, p. 5830-5835, 2002.

_____. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Cell. Microbiol.**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 2022-2029, 2007.

DAVIDSON, E. Microbiology, pathology and genetics of *Bacillus sphaericus*: biological aspects which are important to field use. **Mosq. News**, Albany, v. 44, n. 2, p. 147-152, 1984.

ELANGOVA, G et al. Identification of the functional site in the mosquito larvicidal binary toxin of *Bacillus sphaericus* 1593M by site-directed mutagenesis. **Biochem. Biophys. Res. Commu.**, New York, v. 276, n. 3, p. 1048-1055, 2000.

FERREIRA, L. M. et al. The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI-anchored α -glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 604-610, 2010.

FERREIRA, L. M.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Bacterial larvicides for vector control: mode of action of toxins and implications for resistance. **Biocontrol Sci. Technol.**, Abingdon, v. 23, n. 10, p. 1137-1168, 2013.

FERREIRA, L. M. et al. Non conserved residues between Cqm1 and Aam1 mosquito α -glucosidases are critical for the capacity of Cqm1 to bind the Binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 50, p. 34-42, 2014.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FONTES, G. et al. Lymphatic filariasis in Brazil: epidemiological situation and outlook for elimination. **Parasit Vectors**, London, v. 5, n. 272, p. 1-11, 2012.

FORATTINI, O. P. et al. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. A - Survey of resting adults and synanthropic behaviour in South-Eastern, Brazil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 398-411, 1993.

FOSTER, W. A. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. **Annu. Rev. Entomol.** Palo Alto, v. 40, p. 443-474, 1995.

GABRISKO, M. Evolutionary history of eukaryotic α -glucosidases from the α -amylase family. **J. Mol. Evol.**, Berlin, v. 76, p. 129-145, 2013.

GASSMANN, A. J.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B. E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annu. Rev. Entomol.**, Palo Alto, v. 54, p. 147-163, 2009.

GIGLIOLI, G. Laboratory colony of *Anopheles darlingi*. **J. Natl. Malar. Soc.**, Savannah, v. 6, n. 3, p. 159- 164, 1947.

GIMNIG, J. E. et al. Density-dependent development of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larvae in artificial habitats. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 39, n. 1, p. 162-172, 2002.

GODSEY, M. S. Jr. et al. West Nile virus-infected mosquitoes, Louisiana, 2002. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 11, n. 9, p. 1399-1404, 2005.

GUO, Q. et al. Single nucleotide deletion of *cqml* gene results in the development of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus*. **J. Insect Physiol.**, London, v. 59, p. 967-973, 2013.

HILL, S.; CONNELLY, R. **Southern house mosquito: *Culex quinquefasciatus* Say.** Disponível em: <http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/southern_house_mosquito.htm#life>. Acesso em: 18 jan. 2015.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Ann. Rev. of Entomol.**, Palo Alto, v. 45, p. 371-391, 2000.

HEMINGWAY, J. The role of vector control in stopping the transmission of malaria: threats and opportunities. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.**, London, v. 369, n. 1645, p. 20130431, 2014.

I.M.P. BIOINFORMATICS GROUP. **big-PI Predictor GPI Modification Site Prediction.** Viena, 2005. Disponível em: http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.html. Acesso em: 10 jun. 2015.

INVITROGEN. **Growth and maintenance of insect cell lines.** Waltham, 2013. Disponível em: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/insect_man.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2014.

_____. **InsectSelect™ Glow System.** Waltham, 2012. Disponível em: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/insectselfpzt_man.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2014.

JAMES, A. A.; BLACKMER, K.; RACIOPPI, J. V. A salivary gland-specific, maltase-like gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Gene.**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 73-83, 1989.

JARIYAPAN, N. et al. Salivary gland proteins of the human malaria vector, *Anopheles dirus* B (Diptera: Culicidae). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 5-10, 2007.

JIMÉNEZ, A. I. et al. *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins, **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 42, n. 9, p. 683-689, 2012.

JONES, G. W. et al. A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. **FASEB J.**, Bethesda, v. 21, n. 14, p. 4112-4120, 2007.

_____. The Cry48Aa-Cry49Aa binary toxin from *Bacillus sphaericus* exhibits highly restricted target specificity. **Environ. Microbiol.**, College Park, v. 10, n. 9, p.2418-2424, 2008.

- KALFON, A. et al. Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297: an electron microscope study of crystal-like inclusions biogenesis and toxicity to mosquito larvae. **J. Gen. Microbiol.**, London, v. 130, p. 893-900, 1984.
- KELLEN, W. et al. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 7, p. 442-448, 1965.
- KING, A. M., AARON, C. K. Organophosphate and carbamate poisoning. **Emerg. Med. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 33, n. 1, p. 133-151, 2015.
- KRASI KOV, V. V., KARELOV, D. V., FIRSOV, L. M. Alpha-Glucosidases. **Biochem. (Mosc.)**, New York, v. 66, n. 3, p. 267-281, 2001.
- LABBÉ, P. et al. Resistance gene replacement in the mosquito *Culex pipiens*: fitness estimation from long-term cline series. **Genetics**, Austin, v. 182, p. 303-312, 2009.
- LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 23, n. 2, p. 133-163, 2007.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LÉONARD, P. M.; JULIANO, S. A. Effect of leaf litter and density on fitness and population performance of the hole mosquito *Aedes triseriatus*. **Ecol. Entomol.**, Saint Albans v. 20, n. 2, p. 125-136, 1995.
- LIU, N. et al. Multiple cytochrome P450 genes: their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 8, p. e23403, 2011.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- MARINOTTI, O.; BRITO, M.; MOREIRA, C. K. Apyrase and α -glucosidase in the salivary glands of *Aedes albopictus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 113B, n. 4, p. 675-679, 1996.
- MARINOTTI, O.; JAMES, A. A. An α -glucosidase in the salivary glands of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem.**, Oxford, v. 20, n. 6, p. 619-623, 1990.
- MEDEIROS, Z. et al. Controle da filariose linfática no Brasil, 1951-2000. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 12, n. 2, p. 77-86, 2003.
- MELANDRI, V. et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 8, p. 1073-1075, 2012.
- MELO, D. C. T. V. **Avaliação do desempenho biológico de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) resistente a *Bacillus sphaericus***. 2013. 65 f.

Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância do *Culex quinquefasciatus***, Brasília, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_vigilancia_culex_quinquefasciatus_os7.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2014.

MITTAL, P. K. et al. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. **J. Vector Borne Dis.**, Delhi, v. 40, p. 20-32, 2003.

MONDINI, A. et al. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 13, n. 1, p. 176-178, 2007.

MOREIRA-FERRO, C. K.; MARINOTTI, O.; BIJOVSKY, A. T. Morphological and biochemical analyses of the salivary glands of the malária vector, *Anopheles darlingi*. **Tissue Cell**, Edinburgh, v. 31, n. 3, p. 264-273, 1999.

MURY, F. B. et al. Alpha-glucosidase promotes hemozoin formation in a blood-sucking bug: an evolutionary history. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 9, p. e6966, 2009.

NASCIMENTO, E. P.; MALAFRONTA, R. S.; MARINOTTI, O. Salivary gland proteins of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, New York, v. 43, n. 1, p. 9-15, 2000.

NASCIMENTO, N. A. **Avaliação da influência da glicosilação das proteínas Cqm1 e Aam1 na sua capacidade de interação com a toxina Bin**. 68 f. Monografia – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

NAYAR, J. K.; SAUERMAN, D. M. Physiological effects of carbohydrates on survival, metabolism, and flight potential of female *Aedes taeniorhynchus*. **J. Insect Physiol.**, Oxford, v. 17, p. 2221-2233, 1971.

NAYAR, J. K.; VAN HANDEL, E. The fuel for sustained mosquito flight. **J. Insect Physiol.**, Oxford, v. 17, p. 471-481, 1971.

NICOLAS, L. et al. Respective role of the 42- and 51-kDa component of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 275-280, 1993.

NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 210, n. 2, p. 585-590, 1992.

NIELSEN-LEROUX, C. et al. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west-Mediterranean countries. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 39, n. 5, p. 729-735, 2002.

NISHIWAKI, H. et al. Cloning, functional characterization, and mode of action of a novel insecticidal pore-forming toxin, Sphaericolysin, produced by *Bacillus sphaericus*. **App. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 73, n. 10, p. 3404-3411, 2007.

OEI, C.; HINDLEY, J.; BERRY, C. Binding of purified *Bacillus sphaericus* binary toxin and its deletion derivatives to *Culex quinquefasciatus* gut: elucidation of functional binding domains. **J. Gen. Microbiol.**, London, v. 138, n. 7, p. 1515-1526, 1992.

OLIVEIRA, C. M. F. et al. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* from China and Brazil (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 41, p. 58-64, 2004.

OMETTO, T. et al. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008–2010. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 107, n. 11, p. 723-730, 2013.

OPOTA, O. et al. Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 149, n. 3, p. 419-427, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Eliminate filariasis: attack poverty**. Geneva, 2000. 41p.

_____. **Elimination of lymphatic filariasis as a public health problem**. Agenda item 20. Geneva, 1997. (WHA50/1997/REC/1).

_____. **Lymphatic filariasis**. Geneva, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en/>>. Acesso em: 21 dez. 2014.

_____. **West Nile Virus**. Geneva, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs354/en/>>. Acesso em: 21 dez. 2014.

ORR, H. A. Fitness and its role in evolutionary genetics. **Nat. Rev. Genet.**, London, v. 10, n.8, p. 531-539, 2009.

PAUCHET, Y. et al. Effects of a mosquitocidal toxin on mammalian epithelial cell line expressing its target receptor. **Cell. Microbiol.**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 1335-1344, 2005.

PEI, G. F. et al. A strain of *Bacillus sphaericus* causes a slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 68, n. 6, p. 3003-3009, 2002.

PROMDONKOY, B. et al. Cys31, Cys47 and Cys195 in BinA are essential for toxicity of a binary toxin from *Bacillus sphaericus*. **Curr. Microbiol.**, New York, v. 56, n. 4, p. 334-338, 2008.

REGIS, L. et al. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 377-380, 2001.

RIGBY, M. C.; HECHINGER, R. F.; STEVENS, L. Why should parasite resistance be costly? **Trends in Parasitol.**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 116-1120, 2002.

ROCHA, A. et al. Programa de controle e eliminação da filariose linfática: uma parceria da Secretaria de Saúde de Olinda-Pe, Brasil, com o serviço de referência nacional em filarioses. **Rev. Patologia Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 3, 2010.

ROMÃO, T. P. et al. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its α -glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. **FEBS J.**, Oxford, v. 273, n. 7, p. 1556-1568, 2006.

ROMÃO, T. P.; MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. The N-terminal third of the BinB subunit from the *Bacillus sphaericus* binary toxin is sufficient for its interaction with midgut receptors in *Culex quinquefasciatus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 321, n. 2, p. 167-174, 2011.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Cadernos de Monitoramento - Programa Sanar**. 1. ed. Recife, 2013. 20p. (Filariose, v. 3).

RECIFE. Secretaria de Saúde do Recife. **PCR apresenta novas estratégias de controle da filariose**. Recife, 2008. Disponível em: <http://www.recife.pe.gov.br/2008/10/31/pcr_apresenta_novas_estrategias_de_controle_da_filariose_164478.php>. Acesso em: 21 dez. 2014.

SHELDON, B. C.; VERHULST, S. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. **Trends Ecol. Evol.**, Amsterdam, v. 11, n. 8, p. 317-321, 1996.

SILVA-FILHA, M. H. N. L.; CHARLES, J. -F.; NIELSEN-LEROUX, C. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp mosquito larvae. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 247, n. 3, p. 754-761, 1997.

SILVA-FILHA M. H.; NIELSEN-LEROUX C.; CHARLES J. F. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* binary toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 711-721, 1999.

SILVA-FILHA, M. H. N. L. et al. Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut receptor binding site: implications for resistance of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) larvae. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 241, n. 2, p. 185-191, 2004.

SILVA-FILHA, M. H. N. L.; BERRY, C; REGIS, L. *Lysinibacillus sphaericus*: toxins and mode of action, applications for mosquito control and resistance management. In: DHADIALLA, T. S.; GILL, S. S. **Advances in Insect Physiology**. Oxford: Academic Press, 2014. v. 47, p. 89-176.

SILVA, M. L. C. R., et al. Outbreaks of Eastern equine encephalitis in northeastern Brazil. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Thousand Oaks, v. 23, n. 3, p. 570-575, 2011.

SINGER, S. Entomogenous bacilli against mosquito larvae. **Develop. Indust. Microbiol.**, Arlington, v. 15, p. 187-194, 1974.

SINGKHAMANAN, K. Identification of amino acids required for receptor binding and toxicity of the *Bacillus sphaericus* binary toxin. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 303, n. 1, p. 84-91, 2010.

SOUZA-NETO, J. A. et al. Sugar digestion in mosquitoes: Identification and characterization of three midgut α -glucosidases of the neo-tropical malaria vector *Anopheles aquasalis*

(Diptera: Culicidae). **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, New York, v. 147, n. 4, p. 993-1000, 2007.

SRISUCHARITPANIT, K. et al. Expression and purification of the active soluble form of *Bacillus sphaericus* binary toxin for structural analysis. **Protein Expr. Purif.**, San Diego, v. 82, n. 2, p. 368-372, 2012.

_____. Crystal structure of BinB: a receptor binding component of the binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. **Proteins**, New York, v. 82, n. 10, p. 2703-2712, 2014.

SUTHANGKORNKUL, R. et al. Functional expression and molecular characterization of *Culex quinquefasciatus* salivary α -glucosidase (Mall). **Protein Expr. Purif.**, San Diego, v. 110, p. 145-150, 2015.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, New York, v. 109, n. 1, p. 1-62, 2010.

THANABALU, T.; PORTER, A. G. Efficient expression of a 100-Kilodalton mosquitocidal toxin in protease-deficient recombinant *Bacillus sphaericus*. **App. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 61, n. 11, p. 4031-4036, 1995.

VECTORBASE. **Gene CPIJ013173 – Paralogues**. Disponível em: <https://www.vectorbase.org/Culex_quinquefasciatus/Gene/Compara_Paralog?g=CPIJ013173;r=supercont3.465:99515-101362;t=CPIJ013173-RA>. Acesso em: 23 dez. 2014.

VIEIRA, M. A. C. S. et al. West Nile virus encephalitis: the first human case recorded in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 93, n. 2, p. 377-379, 2015.

WEI, S.; CAI, Q.; YUAN, Z. Mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* induces stronger delayed effects than binary toxin on *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 43, n. 4, p. 726-730, 2006.

WEISER, J. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. **Zentralbl. Mikrobiol.**, Jena, v. 139, n. 1, p. 57-60, 1984.

WICKREMESINGHE, R. S. B.; MENDIS, C. L. *Bacillus sphaericus* spore from Sri Lanka demonstrating rapid larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus*. **Mosq. News**, New York, v. 40, n. 3, p. 387-389, 1980.

WIRTH, M. C. et al. Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 73, n. 19, p. 6066-6071, 2007.

WRAIGHT, S. P.; MOLLOY, D. P.; SINGER, S. Studies on the Culicine mosquito host range of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* with notes on the effects of temperature and instar on bacterial efficacy. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 49, n. 3, p. 291-302, 1987.

ZHANG, Q. et al. Analyses of α -amylase and α -glucosidase in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*, as receptors of Cry11Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** Oxford, v. 43, n. 10, p. 907-915, 2013.

ZHANG, Y. M. et al. Isolation of two high toxic *Bacillus sphaericus* strains. **Insecticidal Microorg.**, Washington, v. 1, p. 98-99, 1987.

ZHENG, L. et al. Two genes encoding midgut-specific maltase-like polypeptides from *Anopheles gambiae*. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 81, n. 3, p. 272-283, 1995.

APÊNDICE A – Outras atividades desenvolvidas**Produção bibliográfica****a) Resumos**

- NASCIMENTO, N. A.; FERREIRA, L. M.; ROMÃO, T. P.; MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Avaliação da influência da glicosilação das proteínas Cqm1 e Aam1 na sua capacidade de interação com a toxina Bin. Resumo apresentado no IV Congresso de Biomedicina e Farmácia da Faculdade ASCES. Caruaru, 28 a 30 de maio de 2014.
- FERREIRA, L. M.; NASCIMENTO, N. A.; ROMÃO, T. P.; REZENDE, A. M.; MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Comparative analysis of the Cqm1 and Aam1 ortholog proteins from mosquitoes that have a differential capacity to bind to the Binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. Resumo apresentado no International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Mainz, 3 a 7 de agosto de 2014.
- NASCIMENTO, N. A.; FERREIRA, L. M.; ROMÃO, T. P.; MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Comparative analysis of two orthologs alpha-glucosidases from the vectors *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. Resumo apresentado no 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology – SBBq. Foz do Iguaçu, 24 a 28 de agosto de 2015.
- SILVA-FILHA, M. H. N. L.; CHALEGRE, K. D. M.; ROMÃO, T. P.; MENEZES, H. S. G.; NASCIMENTO, N. A.; OLIVEIRA, C. M. F.; MELO-NETO, O. P. Characterization and screening of alpha-glucosidases alleles from *Culex quinquefasciatus* associated to biolarvicide resistance. Resumo apresentado no 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology – SBBq. Foz do Iguaçu, 24 a 28 de agosto de 2015.

- ROMÃO, T. P.; CHALEGRE, K. D. M.; TAVARES, D. A.; MENEZES, H. S. G.; NASCIMENTO, N. A.; OLIVEIRA, C. M. F.; MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Molecular characterization of the resistance mechanisms to *Lysinibacillus sphaericus* associate with two alleles co-selected in a *Culex quinquefasciatus* resistant colony. Resumo apresentado no 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology – SBBq. Foz do Iguaçu, 24 a 28 de agosto de 2015.
- NASCIMENTO, N. A.; FERREIRA, L. M.; ROMÃO, T. P.; MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Avaliação de α -glicosidases de *Culex quinquefasciatus* e impacto de mutações na α -glicosidase Cqm1 e na fisiologia dos insetos. Resumo apresentado à III Jornada Científica da FIOCRUZ/PE. Recife, 14 a 17 de setembro de 2015.
- NASCIMENTO, N. A.; FERREIRA, L. M.; ROMÃO, T. P.; MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Characterization of two ortholog mosquito α -glucosidases that play a differential role in the susceptibility to *Lysinibacillus sphaericus* biolarvicides. Resumo submetido ao XXV International Congress of Entomology. Orlando, 25 a 30 de setembro de 2016.

b) Artigos publicados

- FERREIRA, L. M.; ROMÃO, T.P.; NASCIMENTO, N. A.; COSTA, M. C. M. F.; REZENDE, A. M.; MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Non conserved residues between Cqm1 and Aam1 mosquito α -glucosidases are critical for the capacity of Cqm1 to bind the Binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 50, p. 34-42, 2014.
- CHALEGRE, K. D. M.; TAVARES, D. A.; ROMÃO, T. P.; MENEZES, H. S. G.; NASCIMENTO, N. A.; OLIVEIRA, C. M. F.; MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Co-selection and replacement of resistance alleles to *Lysinibacillus sphaericus* in a *Culex quinquefasciatus* colony. **FEBS J.**, Oxford, v. 282, n. 18, p. 3592-3602, 2015.

c) Manuscrito em preparação

- NASCIMENTO, N. A.; ROMÃO, T. P.; DE-MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Avaliação catalítica da α -glicosidase Cqm1 e do impacto de sua ausência em *Culex quinquefasciatus* resistentes ao *Lysinibacillus sphaericus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology (em preparação)**.
- NASCIMENTO, N. A.; FERREIRA, L. M.; ROMÃO, T. P. A.; CORREIA, D. M. C.; REZENDE, A. M.; DE-MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Characterization of two ortholog alpha-glucosidases from mosquitoes that are involved in the mode of action of *Lysinibacillus sphaericus*. **Insect physiology (em preparação)**.

Prêmios

- Prêmio Frederico Abath, 1º lugar na III Jornada Científica da FIOCRUZ/PE, 14 a 17 de setembro de 2015.

Participação em eventos

- IV Congresso de Biomedicina e Farmácia da Faculdade Asces, Caruaru, 28 a 30 de maio de 2014;
- Comissão organizadora da II Semana de Biociências e Biotecnologia em Saúde: Ciência à Serviço da Sociedade. Recife, 15 a 19 de dezembro de 2014.
- 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology – SBBq. Foz do Iguaçu, 24 a 28 de agosto de 2015.
- III Jornada Científica da FIOCRUZ/PE. Recife, 14 a 17 de setembro de 2015.
- Comissão organizadora da III Semana de Biociências e Biotecnologia em Saúde: Ciência à Serviço da Sociedade. Recife, 30 de novembro a 4 de dezembro de 2015.

Atividade docente em curso de graduação

- Participação na disciplina de Biomoléculas oferecida para a turma de Bacharelado em Ciências Ambientais da UFPE (30h, 2014.1-2015.2);

Participação em disciplina de pós-graduação

- Monitoria na disciplina Engenharia Genética do programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde, FIOCRUZ/PE (2015.2).

APÊNDICE B – Artigo publicado 1

Insect Biochemistry and Molecular Biology 50 (2014) 34–42



Contents lists available at ScienceDirect

Insect Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibmb

Non conserved residues between Cqm1 and Aam1 mosquito α -glucosidases are critical for the capacity of Cqm1 to bind the Binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*



Lígia Maria Ferreira^a, Tatiány Patrícia Romão^a, Nathaly Alexandre do Nascimento^a,
 Maria da Conceição Mendes Ferreira da Costa^a, Antônio Mauro Rezende^b,
 Osvaldo Pompílio de-Melo-Neto^b, Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha^{a,*}

^aDepartment of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife, PE 50740-465, Brazil

^bDepartment of Microbiology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife, PE 50670-420, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 15 January 2014
 Received in revised form
 31 March 2014
 Accepted 4 April 2014

Keywords:
Culex quinquefasciatus
Aedes aegypti
 Biolarvicides
 Orthologs
 Receptor
 Binding sites

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.04.004>
 0965-1748/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ABSTRACT

The Binary (Bin) toxin from the entomopathogenic bacterium *Lysinibacillus sphaericus* acts on larvae of the culicid *Culex quinquefasciatus* through its binding to Cqm1, a midgut-bound α -glucosidase. Specific binding by the BinB subunit to the Cqm1 receptor is essential for toxicity however the toxin is unable to bind to the Cqm1 ortholog from the refractory species *Aedes aegypti* (Aam1). Here, to investigate the molecular basis for the interaction between Cqm1 and BinB, recombinant Cqm1 and Aam1 were first expressed as soluble forms in Sf9 cells. The two proteins were found to display the same glycosylation patterns and BinB binding properties as the native α -glucosidases. Chimeric constructs were then generated through the exchange of reciprocal fragments between the corresponding *cqm1* and *aam1* cDNAs. Subsequent expression and binding experiments defined a Cqm1 segment encompassing residues S129 and A312 as critical for the interaction with BinB. Through site directed mutagenesis experiments, replacing specific sets of residues from Cqm1 with those of Aam1, the ¹⁵⁹GG₁₆₀ doublet was required for this interaction. Molecular modeling mapped these residues to an exposed loop within the Cqm1's structure, compatible with a target site for BinB and providing a possible explanation for its lack of binding to Aam1.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

APÊNDICE C – Artigo publicado 2

the **FEBS**
Journal**Co-selection and replacement of resistance alleles to *Lysinibacillus sphaericus* in a *Culex quinquefasciatus* colony**Karlos Diogo de Melo Chalegre¹, Daniella A. Tavares¹, Tatiany P. Romão¹, Heverly Suzany G. de Menezes¹, Nathaly A. Nascimento¹, Cláudia Maria F. de Oliveira¹, Osvaldo P. de-Melo-Neto² and Maria Helena N. L. Silva-Filha¹¹ Department of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, Brazil² Department of Microbiology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, Brazil**Keywords**allele replacement; Binary toxin; *cqm1* alleles; receptors; α -glicosidases**Correspondence**M. H. N. L. Silva-Filha, Department of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife 50740-465, Brazil
Fax: +55 81 21012516
Tel: +55 81 21012553
E-mail: mhneves@cpqam.fiocruz.br

(Received 23 January 2015, revised 5 June 2015, accepted 25 June 2015)

doi:10.1111/febs.13364

The Cqm1 α -glucosidase, expressed within the midgut of *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae, is the receptor for the Binary toxin (Bin) from the entomopathogen *Lysinibacillus sphaericus*. Mutations of the Cqm1 α -glucosidase gene cause high resistance levels to this bacterium in both field and laboratory populations, and a previously described allele, *cqm1_{REC}*, was found to be associated with a laboratory-resistant colony (R2362). This study described the identification of a novel resistance allele, *cqm1_{REC-2}*, that was co-selected with *cqm1_{REC}* within the R2362 colony. The two alleles display distinct mutations but both generate premature stop codons that prevent the expression of midgut-bound Cqm1 proteins. Using a PCR-based assay to monitor the frequency of each allele during long-term maintenance of the resistant colony, *cqm1_{REC}* was found to predominate early on but later was replaced by *cqm1_{REC-2}* as the most abundant resistance allele. Homozygous larvae for each allele were then generated that displayed similar high-resistance phenotypes with equivalent low levels of transcript and lack of protein expression for both *cqm1_{REC}* and *cqm1_{REC-2}*. In progeny from a cross of homozygous individuals for each allele at a 1 : 1 ratio, analyzed for ten subsequent generations, *cqm1_{REC}* showed a higher frequency than *cqm1_{REC-2}*. The replacement of *cqm1_{REC}* by *cqm1_{REC-2}* observed in the R2362 colony, kept for 210 generations, indicates changes in fitness related to traits that are unknown but linked to these two alleles, and constitutes a unique example of evolution of resistance within a controlled laboratory environment.