

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE**

Heverly Suzany Gouveia de Menezes

**Caracterização e avaliação de moléculas de *Culex quinquefasciatus*
associadas a resistência a *Lysinibacillus sphaericus***

RECIFE

2023

Heverly Suzany Gouveia de Menezes

**Caracterização e avaliação de moléculas de *Culex quinquefasciatus*
associadas a resistência a *Lysinibacillus sphaericus***

Tese de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha

Coorientadoras: Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo

Dra. Tatiana Maria Teodoro Rezende

RECIFE

2023

O presente trabalho foi realizado com apoio de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) - Código de Financiamento 001.

D278c de Menezes, Heverly Suzany Gouveia.
Caracterização e avaliação de moléculas de *Culex quinquefasciatus* associadas a resistência a *Lysinibacillus sphaericus* / Heverly Suzany Gouveia de Menezes. -- 2023.
123 p. : il.color.

Orientadora: Maria Helena Neves Lobo Silva Filha.
Coorientadores: Tatiany Patrícia Romão Pompilio de Melo e Tatiana Maria Teodoro Rezende.

Tese (Doutorado em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2023.
Bibliografia: f. 16-112.

1. lipases. 2. proteases. 3. glicosidases. 4. panteteinases. 5. fitness. I.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239
Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos

Heverly Suzany Gouveia de Menezes

**Caracterização e avaliação de moléculas de *Culex quinquefasciatus*
associadas a resistência a *Lysinibacillus sphaericus***

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 23/03/2023

Banca Examinadora

Dra. Danielle Maria Nascimento Moura
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE
(Membro externo)

Dr. Emmanuel Viana Pontual
Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE
(Membro externo)

Dr. Christian Robson de Souza Reis
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE
(Membro interno)

Dr. Rafael Dhalia
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE
(Membro interno)

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que sempre esteve comigo e não me abandona nunca.

Aos meus pais e meus irmãos que sempre me incentivaram e acreditaram no meu potencial e aguentaram meus estresses.

Ao meu marido Higor, que além de marido foi amigo, parceiro e sempre me apoiou em todas as decisões e me deu suporte para não desistir dos meus objetivos e me aturou por esses longos 15 anos.

A minha orientadora, Maria Helena (Chica), por todo conhecimento, paciência e parceria ao longo da iniciação, mestrado e agora no doutorado. Chica sempre foi mais que uma orientadora e sou muito grata por todas as oportunidades, além de ter sido a primeira que acreditou no meu potencial.

A minha co-orientadora, Tatiana Rezende, que esteve ao meu lado na bancada, compartilhando conhecimento e ajudando em tudo que preciso. Tati sempre esteve disposta a contribuir e auxiliar no que foi necessário e foi uma parceirona.

A minha co-orientadora, Taty Romão, que sempre esteve de portas abertas para me ajudar com tudo, pelos inúmeros conhecimentos passados por ela e sempre confiou em mim e no meu potencial. Taty é uma amiga que ganhei para a vida.

Aos meus amigos do Laboratório de Entomologia que estiveram comigo ao longo desses quase 10 anos de departamento. Em especial Hyago, Louise, Elisama, Larissa, Luisa, Lais, Alex, Derciliano, Helena, Tanaka e Yuri.

A Rose, técnica do insetário responsável pelas colônias resistentes. SEMPRE disposta a me ajudar e passar todo o conhecimento que ela tem na criação e manutenção das colônias. Rose foi uma grande amiga que ganhei nesses anos no IAM.

A Samara Costa e Fernando Genta que me receberam de braços abertos no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do IOC-FIOCRUZ/RJ. Eles foram essenciais para a conclusão de um dos objetivos desse trabalho, além da colaboração em outros momentos.

A Patricia Paiva e Thiago Napoleão pela colaboração nos ensaios de reservas energéticas.

Às minhas amigas de sempre, Thays e Rapha, que sempre que precisei, estavam me fazendo rir, comer e me distraíndo nas lésseiras da vida. Com elas passei os melhores momentos.

Às minhas amigas coléricas, superpoderosas e que amo demais, Brenda e Amanda. Nos últimos meses partilhamos tantos momentos que ajudaram a me distrair, dançar e não surtar.

Aos amigos da HI: Rafaell, Emanuel, Guaraná, Lu (meu grudinho), Daniel, Gabi, Marcelinho, Ricardo, Stephany, Creusa, Luis, Liv, Lillian, Nilzinha, Ingrid, Rafa, Alexandre e todo mundo que alegra os meus dias com tanto carinho.

Aos membros da banca, que aceitaram o convite para avaliar e contribuir com meu projeto.

A CAPES pela bolsa que me foi concedida.

Ao IAM-FIOCRUZ pela infraestrutura que possibilitou a realização deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

MENEZES, Heverly Suzany Gouveia. **Caracterização e avaliação de moléculas de *Culex quinquefasciatus* associadas a resistência a *Lysinibacillus sphaericus***. 2023. Tese (Doutorado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2023.

A resistência de larvas de *Culex quinquefasciatus* à toxina Binária (Bin) de *Lysinibacillus sphaericus*, pode ser causada por mutações no gene do receptor da toxina Bin. Em nosso laboratório, uma colônia resistente selecionada com o *L. sphaericus* cepa IAB59 vem sendo utilizada como modelo de estudo e sua refratariedade é causada pelo alelo *cqm1_{REC}* que impede a expressão do receptor Cqm1. Um estudo prévio mostrou que as larvas resistentes, comparadas às suscetíveis, apresentam um transcriptoma diferencial com um padrão de transcrição alterado para genes ligados ao metabolismo de lipídios, carboidratos, proteínas, de xenobióticos, entre outros. O objetivo deste estudo foi validar funcionalmente e investigar estas moléculas que podem estar de alguma forma associadas ao status de resistência de *Cx. quinquefasciatus*. Para tal, a atividade de enzimas selecionadas foi determinada em intestinos de larvas resistentes e suscetíveis. Em relação às lipases, as larvas resistentes mostraram uma atividade menor para os substratos acetato ($R= 331,5 \pm 24,4$, $S= 381,8 \pm 22,8$), butirato ($R= 206,3 \pm 9,6$, $S= 257,7 \pm 17,3$) e heptanoato ($R= 121,1 \pm 10,06$, $S= 188,5 \pm 14,8$). A atividade sobre os substratos oleato, e palmitato não mostrou uma diferença significativa. A atividade de α -glicosidases utilizando o substrato sacarase mostrou uma atividade significativamente reduzida em larvas resistentes ($R= 62,25 \pm 4,8$; $S=112 \pm 4$), enquanto esta atividade foi similar para o substrato Mu α Glu. A atividade de proteases e de enzimas detoxificadoras glutationa-S-transferases, por sua vez, foi similar para as duas colônias. Foram avaliadas as reservas de lipídios e açúcares redutores e o perfil de larvas e adultos da colônia resistente foi caracterizado pela redução significativa do acúmulo de lipídios (58%) e maior quantidade de açúcares redutores (35%). Contudo, a fertilidade e fecundidade foi semelhante para as duas linhagens, indicando que as alterações nas reservas não afetaram esses parâmetros. Este estudo também visou a identificação e caracterização parcial de uma panteteinase cujo transcrito foi o mais reprimido no transcriptoma de larvas resistentes. O gene foi clonado e expresso em células S β 9 e revelou uma proteína de cerca de 70 kDa, maior do que o predito de 57 kDa. A análise *in silico* da sequência apresentou três potenciais sítios de N-glicosilação. Uma discreta presença de N-glicosídeos (~1 kDa) foi detectada em ensaios *in vitro*, porém este achado não justifica a discrepância entre os pesos, assim, a proteína deve sofrer outras alterações pós-traducionais. A quantificação relativa da transcrição de panteteinase em larvas em larvas suscetíveis mostrou uma grande variação na expressão entre indivíduos, enquanto o transcrito estava reprimido em todas as larvas resistentes ($S= 2,3 \pm 2$, $R= 0,19 \pm 0,1$). A investigação da expressão de panteteinase nativa em larvas mostrou uma proteína de 70 kDa que foi imunodetectada pelo anticorpo anti-panteteinase em amostras de microvilosidades de intestino, o que sugere a sua localização como uma proteína de membrana. Em conclusão, *Cx. quinquefasciatus* resistentes à Bin possuem características metabólicas diferenciais e a identificação da panteteinase como um segundo marcador da resistência à toxina Bin abre perspectivas para investigação do papel destas moléculas.

Palavras-chave: lipases; proteases; glicosidases; panteteinases; reservas energéticas; fitness.

ABSTRACT

MENEZES, Heverly Suzany Gouveia. **Characterization and evaluation of *Culex quinquefasciatus* molecules associated with resistance to *Lysinibacillus sphaericus*.** 2023. Thesis (Academic Doctorate in Biosciences and Biotechnology in Health) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2023.

The resistance of *Culex quinquefasciatus* larvae to the Binary toxin (Bin) from *Lysinibacillus sphaericus*, can be caused by mutations in the receptor of this toxin. In our laboratory, a resistant colony selected with the *L. sphaericus* strain IAB59 has been used as a study model and its refractoriness is caused by the *cqm1_{REC}* allele that prevents the expression of the Cqm1 receptor. A previous study showed that resistant larvae, compared to the susceptible ones, present a differential transcriptome with an altered transcription of genes linked to the metabolism of lipids, carbohydrates, proteins, xenobiotics, among others. The aim of this study was to obtain a functional validation and to investigate these molecules that may be somehow associated with the resistance status of *Cx. quinquefasciatus*. For this purpose, the activity of selected enzymes was determined in midgut samples of resistant and susceptible larvae. In relation to lipases, the resistant larvae showed a lower activity for substrates acetate ($R= 331,5 \pm 24,4$, $S= 381,8 \pm 22,8$), butyrate ($R= 206,3 \pm 9,6$, $S= 257,7 \pm 17,3$) and heptanoate ($R= 121,1 \pm 10,06$, $S= 188,5 \pm 14,8$). The activity on oleate and palmitate substrates did not show a significant difference. The activity of α -glucosidases on sucrose showed a significantly reduced activity in resistant larvae ($R= 62,25 \pm 4,8$; $S=112 \pm 4$), while this activity was similar for the $Mu\alpha$ Glu substrate. The activity of proteases and glutathione-S-transferases detoxifying enzymes, in turn, was similar for both colonies. The reserves of lipids and reducing sugars were evaluated and the profile of larvae and adults of the resistant strain was characterized by a significant reduction in lipid accumulation (58%) and a higher amount of reducing sugars (35%). Fertility and fecundity were similar for both strains, indicating that changes in reserves did not affect these parameters. This study also aimed to identify the pantetheinase whose transcript was the most repressed in the transcriptome of resistant larvae. The gene was cloned and expressed in Sf9 cells and revealed a protein of about 70 kDa, different of the predicted molecular weight of 57 kDa. The *in-silico* analysis of the protein sequence showed three potential N-glycosylation sites. A slight presence of N-glycosides (~1 kDa) was detected by *in vitro* assays, but this finding does not justify the discrepancy between the predicted and real molecular weights, and it is likely that other post-translational modifications should be responsible for that. The relative quantification of the panthethein transcripts in susceptible larvae showed its expression characterized by a wide variation among individuals, while those transcripts were repressed in all resistant larvae ($S= 2.3 \pm 2$, $R= 0.19 \pm 0.1$). The investigation of the native pantetheinase in larvae showed a 70 kDa protein which was immunodetected by anti-panthetheinase antibodies in samples of midgut microvilli, suggesting its expression as a membrane-bound protein. In conclusion, *Cx. quinquefasciatus* Bin-resistant have differential metabolic characteristics and identification of the pantetheinase as a second marker of Bin-resistance opens perspectives for the investigation of the role played by these molecules.

Keywords: lipases; proteases; glycosidases; pantetheinases; energy reserves; fitness.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Culex quinquefasciatus</i> evidenciando todos os seus estágios.....	19
Figura 2 – Representação de métodos de controle de mosquitos.....	24
Figura 3 – Aspecto do <i>Lysinibacillus sphaericus</i> cepa 2362	25
Figura 4 – Estrutura tridimensional das subunidades BinA e BinB da toxina Binária de <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	28
Figura 5 – Principais etapas do Modo de ação da toxina Binária presente nos cristais de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	31
Figura 6 – Estrutura do monômero da proteína Cqm1	33
Quadro 1 - Colônias de <i>Culex</i> sp. selecionadas sob condições de laboratório (Lab) ou populações de campo expostas ao tratamento com o <i>Lysinibacillus sphaericus</i> que apresentaram alterações na susceptibilidade a este agente, e respectivos alelos de resistência.	39
Quadro 2 – Genes diferencialmente expressos em intestinos de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistentes a <i>Lysinibacillus sphaericus</i> cepa RIAB59 comparados às larvas suscetíveis.	43
Figura 7 – Sistema digestivo de larvas de mosquito.	52
Quadro 3 – <i>Primers</i> utilizados na reação de qRT-PCR	62
Figura 8 - Atividade específica de lipases ($\mu\text{U}/\mu\text{g}$ proteína) em intestino médio de larvas individuais de quarto ínstar de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia suscetível (vermelho) e uma resistente a toxina Binária (azul), usando diferentes substratos.....	64
Figura 9 - Atividade específica de α -glicosidases ($\mu\text{U}/\mu\text{g}$ proteína) em intestino médio individual de larvas individuais de quarto ínstar de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia suscetível (vermelho) e uma resistente a toxina Binária (azul).	65
Figura 10 - Atividade específica de proteases ($\mu\text{U}/\mu\text{g}$ proteína) em intestino médio individual de larvas individuais de quarto ínstar de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia suscetível (vermelho) e uma resistente a toxina Binária (azul).	66
Figura 11 - Atividade específica de Glutathione-S-transferase ($\mu\text{U}/\mu\text{g}$ proteína) em intestino médio de larvas individuais de quarto ínstar de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia suscetível (círculos vermelhos) e uma resistente à toxina Binária (quadrados azuis).....	67

Figura 12- Reservas energéticas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia suscetível e resistente a toxina Binária.	69
Figura 13 - Fertilidade e fecundidade de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia suscetível (vermelha) e resistente a toxina Binária (azul) criadas sob condições controladas (FC) e estresse (FE).	71
Figura 14 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da panteteinase identificada sob as identidades CPIJ017593 (www.vectorbase.org) e LOC6040365 (<i>Nacional Center of Biotechnology Information</i>).	73
Figura 15 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da panteteinase identificada sob a identidade CPIJ017593 com outras panteteinases de <i>Culex quinquefasciatus</i>	74
Figura 16 - Imunodeteccção de amostras de cultivo celulares Sf9 (pistas 1-6) de linhagens transfectadas com o plasmídeo pantet-plZT que expressa a proteína panteteinase.	77
Figura 17- Perfil de amostras de panteteinases recombinantes produzida em células Sf9.	77
Figura 18 - Perfil de amostras de panteteinases recombinantes (μ g) purificadas com a resina Ni-NTA [®] (QIAGEN) separadas em SDS-PAGE e visualizadas através de imunodeteccção com o anticorpo policlonal anti-panteteinase.	78
Figura 19 - Perfil eletroforético de amostras de panteteinase (Pant) recombinantes tratadas com a enzima PNGase F (4 h ou 16 h, a 37°C), separadas em SDS-PAGE 10% e visualizadas com azul de Coomassie.	79
Figura 20- Quantificação relativa (RQ) do gene da panteteinase (CPIJ017593) em larvas do 4 ^o estágio de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetíveis (vermelho) em relação às larvas resistentes à toxina Binária (azul).	80
Figura 21 – Imunodeteccção de proteínas em preparação de microvilli intestinal (BBMF) de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> com o anticorpo policlonal anti-panteteinase.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sumário das análises estatísticas comparativas da atividade de enzimas detectada em amostras de intestinos de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetíveis e resistentes à toxina Binária.....	68
Tabela 2 - Sítios potenciais de N-glicosilação da proteína panteteinase (CPIJ017593), determinados através do programa NetNGly 1.0.....	72
Tabela 3 - Quantificação relativa de transcritos do gene da panteteinase em amostras de RNA extraídas individualmente de larvas do 4º instar das colônias suscetível e resistente a toxina Binária de <i>Culex quinquefasciatus</i>	81
Tabela Suplementar 1 - Dados dos ensaios catalíticos para medir a atividade da lipase em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia suscetível e resistente a Bin.....	118
Tabela Suplementar 2 - Dados dos ensaios catalíticos para medir a atividade de de α -glicosidase em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia suscetível e resistente a Bin.....	122
Tabela Suplementar 3 - Dados dos ensaios catalíticos para medir a atividade da protease com substratos para tripsinas (Z-Phe-Arg), quimotripsinas (Ala-Ala-Phe) e aminopeptidases (L-Leu) em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetível e uma colônia resistente a Bin.....	125
Tabela suplementar 4 - Dados dos ensaios catalíticos para medir a atividade da Glutathione-S-transferase em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> larvas de uma colônia suscetível e uma colônia resistente a Bin.....	129
Tabela Suplementar 5 - Dados de ensaios realizados para quantificação de lipídios em <i>pools</i> de larvas e em amostras individuais de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia suscetível e uma resistente a Bin.....	131
Tabela Suplementar 6 - Dados de ensaios realizados para a quantificação de açúcares redutores em <i>pools</i> de larvas de 4º instar e em <i>pools</i> de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia suscetível e uma colônia resistente a Bin.....	133
Tabela Suplementar 7 - Dados de ensaios para determinar a fecundidade e a fertilidade de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia suscetível e resistente a Bin sob condição de criação controlada ou estresse.....	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Agm3	<i>Anopheles gambiae</i> maltase 3
Aam1	<i>Aedes aegypti</i> maltase 1
Bin	Toxina binária
BSA	Albumina de soro bovino
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovariedade <i>israelensis</i>
cDNA	DNA complementar
CL ₅₀ e CL ₉₀	Concentrações letais para 50 e 90% dos indivíduos expostos
Cpm1	<i>Culex pipiens</i> maltase 1
Cqm1	<i>Culex quinquefasciatus</i> maltase 1
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DEGs	<i>Differentially Expressed Genes</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
Dpo	Dias pós oviposição
DTT	Ditiotreitol
E-64	N-trans-epoxysuccinyl-L-leucine-4-guanidinobutylamide
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FL	Filariose Linfática
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
GST	Glutathione - S – Transferase
IGR	<i>Insect Growth Regulator</i>
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
kDa	Kilo Dáton
L1, L2, L3, L4	<i>Estádios</i> larvais 1, 2, 3 e 4
LFC	<i>Log2FoldChange</i>
LLINS	<i>Long Lasting Insecticidal Nets</i>
Mtx	Toxinas mosquitocidas
NPT	Núcleo de Plataforma Tecnológica
OMS	Organização Mundial da Saúde
OP	Organofosforado
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Peso molecular
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
RT-qPCR	<i>quantitative Reverse Transcriptase PCR</i>
<i>r</i>	Alelo de resistência
RMR	Região Metropolitana do Recife
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
S9	Linhagem de células ovarianas de <i>Spodoptera frugiperda</i>
SlpC	Proteínas do envelope S-layer
TA	Temperatura ambiente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 <i>Culex quinquefasciatus</i>	18
2.2 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE	20
2.3 <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	25
2.4 TOXINA Cry48Aa/Cry49Aa	27
2.5 TOXINA BINÁRIA (Bin) E MODO DE AÇÃO EM <i>Cx. quinquefasciatus</i>	28
2.6 RECEPTORES DA TOXINA Bin.....	32
2.7 RESISTÊNCIA A <i>L. sphaericus</i>	34
2.8 COLÔNIAS DE <i>Cx quinquefasciatus</i> RESISTENTES A TOXINA Bin DO IAM-FIOCRUZ	40
2.9 TRANSCRIPTOMA DE COLÔNIAS DE <i>Cx quinquefasciatus</i> resistentes	41
2.10 PANTETEINASE.....	43
2.11 RESERVAS ENERGÉTICAS	44
3 JUSTIFICATIVA	47
4 PERGUNTA CONDUTORA	48
5 HIPÓTESE	49
6 OBJETIVOS	50
7 METODOLOGIA	51
7.1 COLÔNIAS DE <i>Culex quinquefasciatus</i>	51
7.2 ENSAIOS CATALÍTICOS.....	51
7.2.1 Preparação de amostras e quantificação de proteínas	51
7.2.2 Ensaios de atividade lipase	53
7.2.3 Ensaios de atividade α-glicosidase	53
7.2.4 Ensaios de atividade protease	54
7.2.5 Ensaios de atividade Glutathiona-S-Transferase	55
7.3 ENSAIOS DE QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS	55
7.4 ENSAIOS DE QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	56
7.5 ENSAIOS DE FECUNDIDADE E FERTILIDADE	57
7.6 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DE PANTETEINASES de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	58
7.7 CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PANTETEINASE CPIJ017593	58
7.8 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE PANTETEINASES RECOMBINANTES E NATIVAS	59
7.9 ENSAIOS DE IMUNODETECÇÃO	60
7.10 ENSAIOS DE DEGLICOSILAÇÃO.....	60
7.11 ENSAIOS DE RT-qPCR.....	61

7.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	62
8 RESULTADOS	63
8.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LIPASES, A-GLICOSIDASES, PROTEASES E GSTs ...	63
8.2 RESERVAS ENERGÉTICAS	67
8.3 FECUNDIDADE E FERTILIDADE	69
8.4 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA PANTETEINASE	71
8.5 EXPRESSÃO DA PANTETEINASE EM CÉLULAS S ⁹	76
8.6 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA N-GLICOSILAÇÃO EM PANTETEINASE	78
8.7 PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DE PANTETEINASES EM LARVAS	79
8.8 IDENTIFICAÇÃO DE PANTETEINASES NATIVAS	82
9 DISCUSSÃO	84
10 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS	97
APÊNDICE A – Outras atividades desenvolvidas	113
APÊNDICE B – Artigo submetido	114
APÊNDICE C – Artigo publicado 1	115
APÊNDICE D – Artigo publicado 2	116
APÊNDICE E – Artigo em preparação	117
APÊNDICE F – Dados brutos	118

1 INTRODUÇÃO

Larvicidas à base de *Lysinibacillus sphaericus* têm sido utilizados com sucesso para o controle de culicídeos, sobretudo dos gêneros *Culex* e *Anopheles*, em vários países, inclusive no Brasil. O programa de controle de *Culex quinquefasciatus*, que vem sendo executado em Recife desde 2003, pela Secretaria de Saúde, é um dos exemplos da aplicação deste agente. A Região Metropolitana do Recife (RMR) ainda é endêmica para a filariose linfática, onde *Cx. quinquefasciatus* é o vetor de *Wuchereria bancrofti* nesta área. Além disso, *Cx. quinquefasciatus* é vetor comprovado de arbovírus de grande relevância, como o vírus do Oeste do Nilo e potencial vetor do vírus Zika. O princípio ativo de larvicidas a base de *L. sphaericus* é um cristal proteico que contém a protoxina binária (Bin) com ação no epitélio intestinal. Após a sua ingestão e, uma vez que o cristal é solubilizado em pH alcalino do intestino das larvas, a protoxina é liberada no lúmen intestinal e é processada por serina-proteases para a forma de toxina ativa. A toxina liga-se a receptores específicos no epitélio intestinal das larvas para desencadear a ação larvicida. O receptor da toxina Bin em *Cx. quinquefasciatus* é uma α -glicosidase denominada *Culex quinquefasciatus* maltase 1 (Cqm1) que está localizada no epitélio intestinal através de uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI). A interação toxina Bin-receptor Cqm1 é essencial para ação da toxina Bin e falhas nesta ligação provocam a resistência. Mutações em alelos no gene *cqm1* que codificam o receptor Cqm1 podem gerar proteínas truncadas e desprovidas de âncora GPI, o que impede sua localização no epitélio e, conseqüentemente, a interação toxina Bin-receptor.

O fenótipo de alta resistência das larvas à toxina Bin (Razão de Resistência, RR >5.000 vezes) já foi observado em algumas colônias ou populações resistentes. Na maioria dos casos estudados, alelos mutantes do gene *cqm1*, que causam a perda da expressão do receptor Cqm1 no epitélio, conferem o fenótipo de resistência à toxina Bin. Os estudos destas colônias também demonstraram que, embora o receptor seja uma α -glicosidase com um papel primordial na digestão, a sua ausência nos indivíduos resistentes não é crítica para o seu desenvolvimento, visto que colônias vêm sendo mantidas de forma estável em laboratório, há mais de 200 gerações. Um estudo recente do perfil transcriptômico comparativo do intestino de larvas suscetíveis e resistentes revelou que outros genes e vias metabólicas estão fortemente

modulados nas larvas resistentes, além do gene *cqm1* que é o gene diretamente responsável pelo fenótipo de resistência. Este perfil de expressão alterado inclui genes envolvidos no metabolismo de lipídios, carboidratos, proteases e enzimas detoxificadoras.

Dentre estas novas moléculas associadas ao fenótipo de resistência, reveladas pelo estudo transcriptômico, as panteteinases tiveram destaque. Estudos prévios de nosso grupo apontaram que as panteteinases poderiam funcionar como possíveis receptores da toxina binária denominada Cry48Aa/Cry49Aa, que é produzida por algumas linhagens do *L. sphaericus*, além da toxina Bin. A toxina Cry48Aa/Cry49Aa tem importância estratégica pois ela tem ação para larvas de *Cx. quinquefasciatus* resistentes à toxina Bin e, portanto, liga-se a receptores que são diferentes do Cqm1. As panteteinases ainda não foram caracterizadas em insetos. A maioria dos estudos disponíveis são relativos às panteteinases de humanos e sua função primária é a conversão do precursor panteteína em ácido pantotênico (vitamina B5) e cisteamina. Outros estudos mostram que seu papel é mais complexo pois estão envolvidas com a regulação do metabolismo de lipídios, com a via de gliconeogênese e imunidade. Portanto, identificar as panteteinases reveladas por nosso estudo é de fundamental importância para investigar suas funções em *Cx. quinquefasciatus*. Além disso, os relatos de panteteinases em insetos são raros e sem qualquer análise funcional. No perfil de super expressão destacaram-se genes de proteases que podem estar envolvidas diretamente na digestão ou na resposta imune, frente à exposição às toxinas, além de enzimas detoxificadoras. Portanto a expressão diferencial destes grupos de moléculas necessita ser avaliado para aprofundar os conhecimentos em relação ao impacto da resistência à toxina Bin, para além do fenótipo de refratariedade à toxina propriamente dita, e que podem ter um impacto crucial no metabolismo das larvas. É importante ressaltar que alelos de resistência para à toxina Bin ocorrem em populações de *Cx. quinquefasciatus* da cidade do Recife e que conhecimentos relativos às características associadas a este fenótipo são relevantes para a compreensão aprofundada do fenômeno de resistência que podem ser úteis para subsidiar estratégias de manejo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

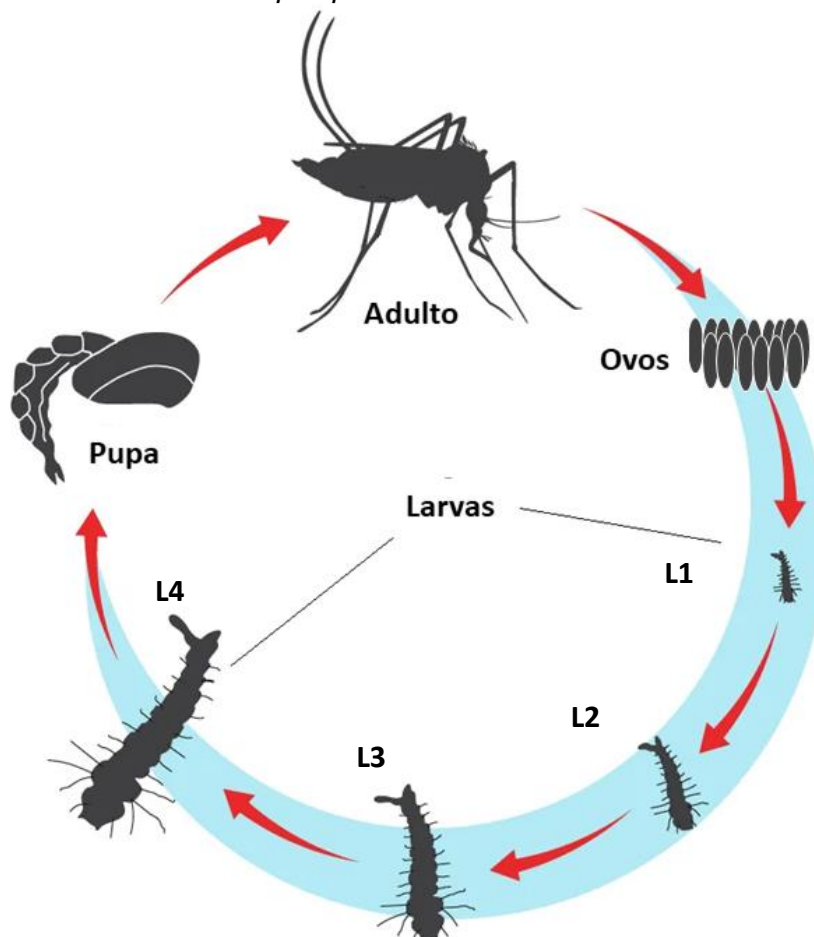
2.1 *Culex quinquefasciatus*

Culex quinquefasciatus Say, 1823 é um inseto (Diptera: Culicidae) com distribuição cosmopolita, com predominância em regiões tropicais e subtropicais, e que possui uma grande importância na saúde pública, como vetor de patógenos humanos (ANDRADE; NASCIMENTO, 2010; BRASIL, 2011; FORATTINI *et al*, 2002). É um mosquito amplamente encontrado no Brasil, sobretudo em áreas urbanas, onde há problemas de saneamento básico, os quais fornecem condições propícias para a sua proliferação, visto que seus criadouros preferenciais são caracterizados por conter água com alto teor de matéria orgânica (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; BRASIL, 2011; FARAJOLLAHI *et al.*, 2011).

É um inseto holométabolo, ou seja, apresenta desenvolvimento completo sendo composto por quatro estágios ou fases: ovo, larva (quatro estádios), pupa e mosquito adulto. Este ciclo biológico tem duração média de 10 dias (Figura 1). Os adultos são altamente antropofílicos e, as fêmeas precisam da alimentação sanguínea para o desenvolvimento dos ovários e a maturação dos ovos. As fêmeas fazem o repasto sanguíneo preferencialmente no período crepuscular e a noite (ANDRADE; NASCIMENTO, 2010; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; FORATTINI *et al*, 2002). O processo de postura dos ovos ocorre em até 48 h após o repasto e é realizada na superfície da água, onde os ovos são depositados de forma agrupada (~150-250 ovos), em estruturas flutuantes denominadas de “jangadas”. As fêmeas são atraídas a fazer a oviposição em criadouros anteriormente colonizados, devido ao feromônio de agregação de oviposição, depositado em forma de gotículas sobre o polo apical dos ovos (LAURENCE; PICKETT, 1982). A eclosão das larvas do 1º estágio (L₁) ocorre em até 48h e estas sofrem sucessivas mudas (L₂, L₃ e L₄), até atingirem a fase de pupa. Esta fase tem duração média de 48 h e, em seguida ocorre a muda para a fase adulta, ou muda imaginal (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). As larvas são filtradoras e se alimentam ativamente de matéria orgânica em suspensão na água. As pupas não se alimentam e exibem pouca movimentação passando boa parte do tempo paradas na superfície da água. Em termos ecológicos, *Cx. quinquefasciatus* é classificado como um organismo *r*-estrategista pois possui uma intensa dinâmica populacional com elevações e reduções drásticas de densidade, curto ciclo de vida, alta capacidade

de reprodução e de adaptação aos habitats. Estas características tornam seu controle populacional um desafio (REGIS *et al.*, 2001).

Figura 1 – Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* evidenciando todos os seus estágios.



Fonte: Adaptado de (CIÊNCIA, 2020).

Nota: L1-L4: os quatro estádios larvais de *Culex quinquefasciatus*.

Cx. quinquefasciatus pode ser um vetor importante de patógenos a humanos, dentre eles, o nemátodo *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose linfática no Brasil. Esta doença atinge milhões de pessoas no mundo, localizadas em algumas regiões endêmicas das Américas, África e Ásia. A Região Metropolitana do Recife (RMR), ainda é uma destas áreas (BRASIL, 2021) e está em processo de erradicação da doença (BRASIL, 2018). *Cx. quinquefasciatus* também é o vetor responsável de algumas arboviroses como o vírus do Oeste do Nilo, que recentemente foram reportados 10 casos no estado do Piauí (BRASIL, 2022), encefalite de St. Louis (FARAJOLLAHI *et al.*, 2011; KENT; CRABTREE; MILLER, 2010), Oropouche, Mayaro, Rocio, e o seu papel na transmissão do vírus Zika também vem sendo

investigado (ELIZONDO-QUIROGA *et al.*, 2018; GUEDES *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2016).

2.2 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE

Ações integradas de controle de culicídeos vetores adaptadas às condições locais e executadas de forma correta podem ser capazes de reduzir a densidade de mosquitos e conseqüentemente reduzir a transmissão dos agentes etiológicos de doenças (ACHEE *et al.*, 2019). Devido a importância dos mosquitos na saúde pública, eles representam alvos importantes de estratégias e programas para o seu controle (ALPHEY, 2014). Diferentes métodos de controle podem ser utilizados desde a gestão ambiental, controle mecânico, uso de produtos larvicidas e adulticidas, métodos comportamentais até técnicas de controle genético (ACHEE *et al.*, 2015). A maioria desses recursos visa reduzir a transmissão das doenças transmitidas pelos vetores através de diferentes objetivos tais como: redução direta da densidade populacional dos mosquitos, redução da taxa de picada por métodos de manipulação do comportamento das fêmeas, substituição da população de mosquitos competentes em transmitir patógenos por populações de mosquitos refratários ao desenvolvimento do patógeno (ACHEE *et al.*, 2015). Estas abordagens podem ser combinadas e adaptadas para cada situação com o objetivo de atingir uma maior redução populacional no âmbito de programas de controle de vetores.

No Brasil, e em vários outros países endêmicos, ainda persiste o modelo de controle tradicional, desde a década de 1950, que é baseado no uso intensivo de larvicidas e adulticidas químicos convencionais. A utilização desses compostos no combate aos insetos vetores foi bastante difundida e, a princípio, se mostrou eficaz para controlar e até mesmo erradicar doenças provocadas por vetores em diversas regiões do mundo (HEMINGWAY *et al.*, 2006). O primeiro inseticida químico utilizado, de forma sistemática e disseminada, foi o organoclorado dicloro-difenil-tricloro-etano (DDT) seguido das classes de organofosforados, carbamatos e piretróides (BECKER, 2003). Estes compostos podem ser usados como larvicidas para o tratamento de criadouros e como adulticidas para aplicação espacial e pulverização residual interna em domicílios (IRS). Recentemente, os adulticidas vem ganhando uma aplicação diferenciada através do uso de telas-mosquiteiros impregnadas com estes compostos

(LLINS, *Long-Lasting Impregnated Nets*) (KILLEEN *et al.*, 2017). Este método tem se mostrado muito eficiente em campanhas de controle de anofelinos em várias áreas endêmicas na África promovendo a redução da transmissão de malária (KILLEEN *et al.*, 2017). Contudo, a aplicação espacial de adulticidas só é recomendada atualmente em situações críticas, tais como em focos estratégicos e para o bloqueio de casos em situações de surtos localizados. Além destas classes de inseticidas químicos, existem os compostos que regulam o crescimento de insetos (IGRs, *Insect growth regulators*), classificados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA como inseticidas de síntese química. As principais categorias são: os análogos do hormônio juvenil como o metopreno e o pyriproxyfen e os inibidores da síntese de quitina, que afetam o desenvolvimento do inseto e impedem a muda para a fase adulta, representados principalmente pelos compostos novaluron e diflubenzuron (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998).

Apesar dos inseticidas das classes convencionais (organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides) terem muitas limitações, eles ainda são muito usados até o presente, sobretudo, em países endêmicos para doenças negligenciadas. O uso de DDT, por exemplo, já foi banido de muitos países, inclusive o Brasil (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002). Os inseticidas químicos convencionais possuem um mecanismo de ação inespecífico, caracterizado por um amplo espectro de ação podendo ter toxicidade para organismos não-alvo, bem como causar sérios danos à saúde humana, além de gerar prejuízos para o meio ambiente (HEMINGWAY *et al.*, 2004; KING; AARON; 2015). Outro problema é seleção de resistência dos mosquitos aos inseticidas químicos convencionais, que vem sendo registrada desde o seu uso em larga escala a partir de 1950 (ACHEE *et al.*, 2019; LIU, 2015). Para substituir o uso de inseticidas químicos convencionais, a utilização de outras estratégias de controle se faz necessária, sobretudo através de ações integradas com a escolha de compostos mais seletivos, tais como agentes de controle biológico (ACHEE *et al.*, 2015; KILLEEN *et al.*, 2017). O controle biológico de insetos é uma abordagem baseada na utilização de organismos, ou de toxinas resultantes de seu metabolismo, que causam a mortalidade através de um mecanismo de ação seletivo pois é baseado em relações ecológicas (LACEY *et al.*, 2015). Dentre estes agentes, podemos citar a utilização de predadores (agentes larvívoros como peixes, copépodos e anfíbios), fungos, bactérias entomopatogênicas, compostos inibidores de oviposição

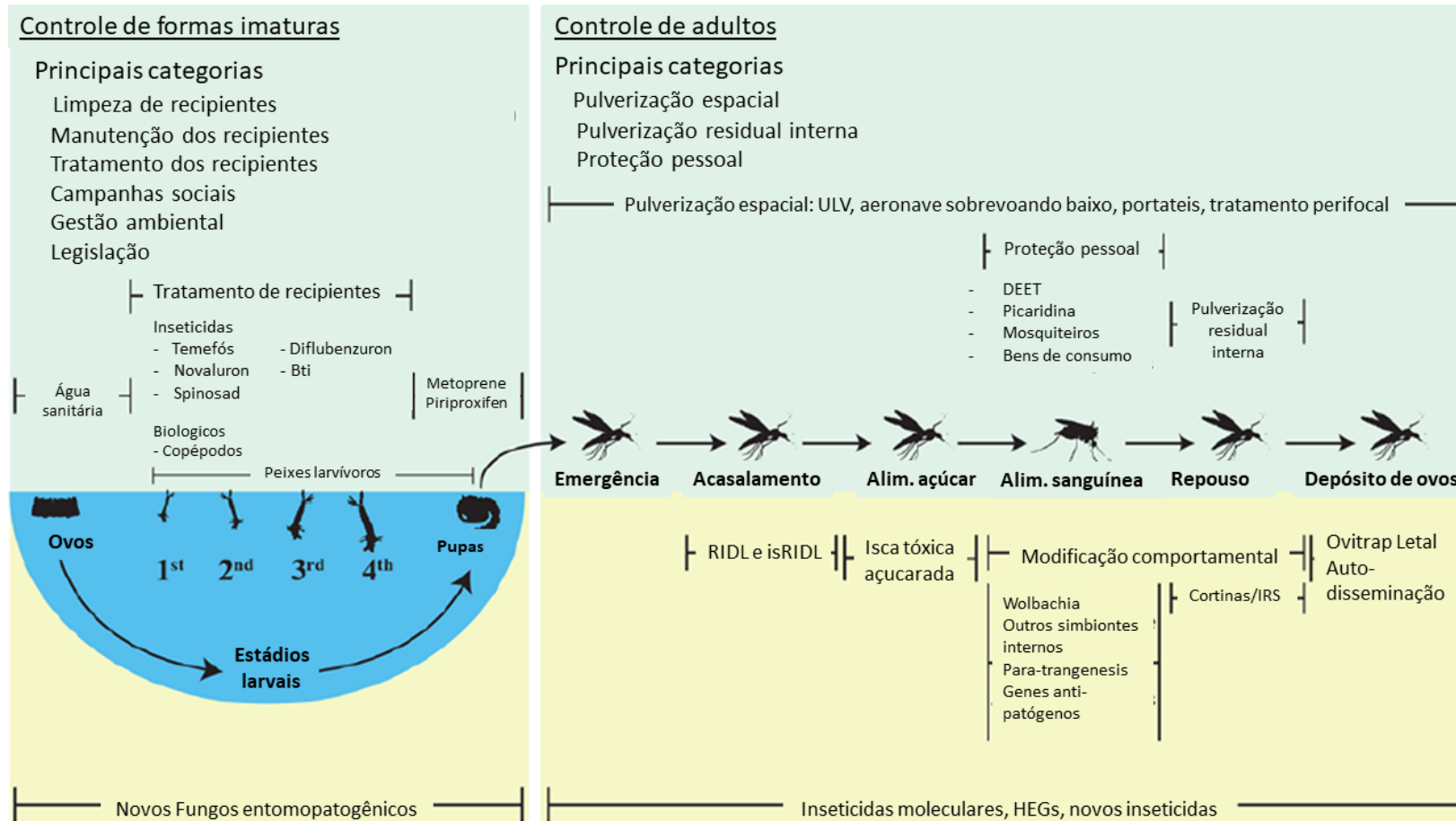
de origem vegetal, dentre outros (ACHEE *et al.*, 2015; DAHMANA; MEDIANNIKOV, 2020; RAWAL, 2019). Estratégias de controle nas fases do ciclo de vida do mosquito estão sumarizadas na figura 2.

As bactérias entomopatogênicas são os agentes biológicos mais empregados para o controle de alguns grupos de insetos (BRAVO *et al.*, 2011) devido à produção de uma ampla variedade de toxinas inseticidas, cuja classificação está disponível no Bacterial Pesticidal Protein Resource Center-BPPRC (www.bpprc-db.org). Para os insetos da ordem Diptera, as bactérias mais utilizadas são *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* (Bti) e *Lysinibacillus sphaericus* que possuem alto potencial larvicida, devido a produção de cristais que contém endotoxinas (LACEY, 2007; SILVA-FILHA *et al.*, 2021). Os cristais são processados no intestino das larvas e se ligam a receptores específicos, desencadeando alterações citopatológicas que provocam alta letalidade. Essas bactérias possuem ação específica para alguns gêneros de importância médica, tais como *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* e *Simulium* (LACEY, 2007). As características de *L. sphaericus*, que é alvo deste estudo, serão tratadas na seção 2.3. Outro agente bacteriano que pode ser utilizado no controle de vários grupos de insetos é o Spinosad, composto pelos metabólitos espinosinas A e D produzidos a partir da fermentação da bactéria *Saccharopolyspora spinosa* (SANTOS; PEREIRA, 2020). Seu modo de ação, bem como dos seus análogos (spinosóides), é baseado na ativação de moduladores alostéricos de receptores GABA presentes no sistema nervoso de insetos, que ocasiona a morte do inseto por rápida excitação do sistema nervoso (HERTLEIN *et al.*, 2010; SPARKS *et al.*, 2012). O Spinosad tem ação para uma grande número de insetos e pragas, mas apresenta um risco baixo de toxicidade ambiental para espécies não-alvo (HERTLEIN *et al.*, 2010; SANTOS; PEREIRA, 2020). Os produtos à base de Spinosad têm se mostrado eficazes para uma ampla gama de insetos, porém já há registros de resistência e seu uso deve ser monitorado e integrado com outros agentes de controle (SPARKS *et al.*, 2012; SU; CHENG, 2014).

A utilização de larvicidas em programas de controle é recomendado, pois através da eliminação em massa de formas jovens, ocorre uma redução gradativa da população de adultos (ACHEE *et al.*, 2015). A utilização desses larvicidas é importante sobretudo para o controle de espécies como *Cx. quinquefasciatus* que possuem criadouros preferenciais com elevada densidade de larvas e que podem ser

mapeados. Desta forma há uma cobertura substancial do tratamento das fontes produtoras de adultos (ACHEE *et al.*, 2015; BALDACCHINO *et al.*, 2017). Por outro lado, espécies como por exemplo, *Aedes aegypti* que tem a capacidade de explorar grande número de criadouros, sendo muitos deles crípticos, há um cenário de dispersão de seus ovos e as larvas são de difícil localização no ambiente. Nestes casos a ação dos larvicidas é importante para eliminar as fontes de criação detectáveis, porém é necessário empregar outros métodos de controle para, assim, potencializar a redução populacional (BALDACCHINO *et al.*, 2015).

Figura 2 – Representação de métodos de controle de mosquitos.

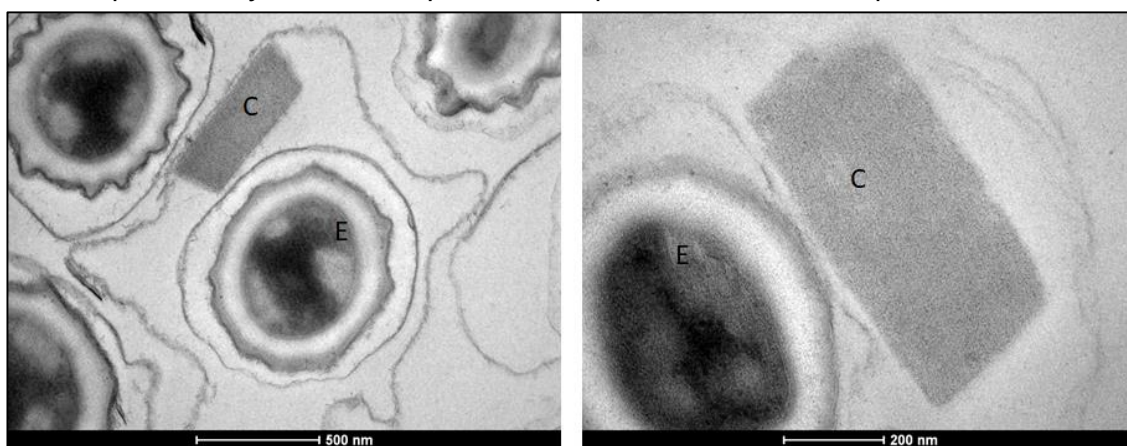


Legenda: Os métodos existentes (parte superior verde) e métodos em desenvolvimento (parte inferior amarela) que afetam os estágios jovens do mosquito (à esquerda) e a fase adulta (direita). Métodos que visam o subestágio particular dentro do ciclo de vida de um mosquito são orientados verticalmente com esses subestágios. Fonte: Traduzido de ACHEE *et al.* (2015)

2.3 *Lysinibacillus sphaericus*

A bactéria entomopatogena *Lysinibacillus sphaericus*, anteriormente denominada *Bacillus sphaericus* (AHMED *et al.*, 2007), é uma bactéria Gram-positiva, saprófita, esporulante, com distribuição cosmopolita, podendo ser encontrada em solos, ambientes aquáticos, cadáveres de insetos entre outros (DAVIDSON, 1984). Durante a fase de esporulação esta bactéria pode produzir esporos arredondados, localizados na região terminal em um esporângio, além de cristais proteicos contendo protoxinas com ação para larvas de mosquitos (Figura 3).

Figura 3 – Aspecto de *Lysinibacillus sphaericus* cepa 2362 em microscopia eletrônica.



Fonte: A. Pereira-Neves (2018).

Legenda: Corte transversal de células em fase final de esporulação cristal (C) e esporo (E).

Esta bactéria tem atividade larvicida para algumas espécies de gêneros da ordem Diptera, dentre eles *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia*, *Aedes* e *Psorophora* (BERRY, 2012; CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELÉCLUSE, 1996). Cepas de *L. sphaericus* que produzem cristais com atividade larvicida para mosquitos já foram isoladas em inúmeras localidades do mundo. A primeira cepa com atividade larvicida foi identificada em larvas de *Culiseta incidens* (KELLEN *et al.*, 1965), mas este isolado tinha uma atividade relativamente baixa. A partir dessa descoberta outras cepas foram isoladas em diferentes regiões, com alta toxicidade incluindo a 1593 da Indonésia (SINGER, 1977); 2297 do Sri Lanka (WICKREMESINGHE; MENDIS, 1980); 2362 da Nigéria (WEISER, 1984) e C3-41 da China (ZHANG *et al.*, 1987), que são as principais cepas utilizadas para a produção industrial de biolarvicidas. Todas estas cepas que possuem alta atividade larvicida são produtoras de cristais contendo a protoxina Binária (Bin), que é o fator inseticida mais importante caracterizado até o presente.

Outras classes de toxinas inseticidas produzidas por algumas cepas de *L. sphaericus* são: as toxinas mosquitocidas (Mtx), a toxina binária Cry48Aa/Cry49Aa, a sphaericolisina e a proteína S-layer. As toxinas Mtx são produzidas durante a fase vegetativa, e são classificadas em Mtx1, Mtx2, Mtx3 e Mtx4 (BERRY, 2012; THANABALU. *et al.*, 1991; THANABALU; PORTER, 1996; WIRTH *et al.*, 2014). Essas proteínas são degradadas por proteases durante a fase estacionária e não são detectadas em culturas esporuladas (THANABALU; PORTER, 1996). Apesar dessas toxinas apresentarem baixa toxicidade comparada à Bin, alguns estudos apontam que a combinação destas toxinas com outras toxinas de *L. sphaericus* apresentam ação em sinergia, oferecendo uma ferramenta para superar a resistência (WIRTH *et al.*, 2007, 2014). As sphaericolisinas são citolisinas de 53 kDa descobertas na cepa A3-2 de *L. sphaericus*. Elas possuem um domínio N-terminal com uma forte atividade hemolítica, que ocasiona sua ação formadora de poros através das interações com o colesterol nas membranas, além do registro da sua ação no sistema nervoso dos insetos (NISHIWAKI *et al.*, 2007). A sphaericolisina apresentou toxicidade quando injetada em *Blatella 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), mas sua atividade em mosquitos ainda não foi determinada. As proteínas S-layer são produzidas nas fases vegetativa e de esporulação e vêm sendo envolvidas na patogenicidade de algumas cepas de *L. sphaericus* (ALLIEVI *et al.*, 2011, 2014; LOZANO; AYALA; DUSSÁN, 2011). Essas proteínas estão associadas aos esporos de duas cepas do *L. sphaericus* (2362 e C7) e acredita-se que domínios de ligação hemolítica e de ligação à quitina presentes nessas proteínas possam contribuir para a sua atividade entomopatogênica (ALLIEVI *et al.*, 2014). As duas protoxinas binárias produzidas por isolados de *L. sphaericus* sob a forma de cristais durante a esporulação, Bin e Cry48Aa/Cry49Aa, serão especificamente descritas abaixo. A toxina Bin ainda é a única utilizada como ingrediente ativo de produtos comerciais já disponíveis e a toxina Cry48Aa/Cry49Aa é bastante promissora, embora ainda não tenha sido alvo de desenvolvimento industrial.

2.4 TOXINA Cry48Aa/Cry49Aa

Esta é uma protoxina produzida como inclusões cristalinas durante a esporulação e foi identificada na cepa IAB59 de *L. sphaericus*. Esta protoxina, formada por duas subunidades denominadas Cry48Aa (135 kDa) e Cry49Aa (53 kDa), é também considerada binária, pois os componentes na sua forma individual não possuem atividade larvicida (JONES *et al.*, 2007). Quando ambos os componentes estão presentes em concentração equimolar (JONES *et al.*, 2007) a atividade é comparável àquela exibida pela toxina Bin. A proteína Cry48Aa está relacionada as toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* pois é membro da família Cry de três domínios (3-D), enquanto que a proteína Cry49Aa faz parte da família das toxinas binárias como a própria Bin e outras toxinas, como a Cry34A e Cry35A, produzidas por alguns isolados de *B. thuringiensis* (BERRY, 2012; KELKER *et al.*, 2014). Como descrito, a toxina Cry48Aa/Cry49Aa apresenta alta atividade larvicida para *Cx. quinquefasciatus*, quando os componentes são administrados na sua forma purificada e em concentração equimolar. Contudo, a expressão da Cry48Aa nos isolados nativos já estudados é baixa e possivelmente instável (JONES *et al.*, 2007). A expressão deficiente deste fator nas cepas nativas é um aspecto que dificulta o desenvolvimento de produtos comerciais contendo este ingrediente ativo.

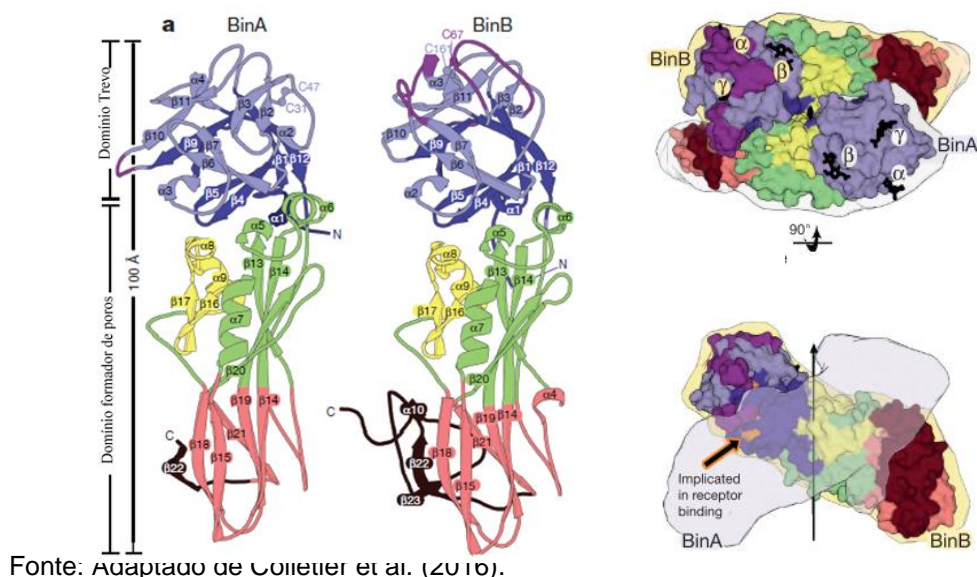
No entanto, a toxina Cry48Aa/Cry49Aa tem um atributo muito importante que é a sua ação contra larvas resistentes à toxina Bin de *L. sphaericus*, que são desprovidas de receptores Cqm1 (MELO *et al.*, 2009), o que demonstra que esta toxina liga-se a receptores diferentes daqueles da toxina Bin. O mecanismo de ação desta toxina ainda não foi bem elucidado, mas sabe-se que a toxina Cry48Aa/Cry49Aa é solubilizada e processada no pH alcalino do intestino médio larval, então as subunidades da toxina ativa ligam-se entre si por interação intermolecular, formando o complexo Cry48Aa/Cry49Aa que então liga-se a receptores das células do epitélio intestinal (GUO *et al.*, 2016). De acordo com os estudos realizados até agora, o espectro de ação é limitado para larvas de *Culex* (JONES *et al.*, 2008). Já foi demonstrado que a toxina Cry48Aa/Cry49Aa interage especificamente com proteínas do microvilli intestinal de *Cx. quinquefasciatus* (GUO *et al.*, 2016; REZENDE *et al.*, 2017), tais como fosfatases alcalinas, aminopeptidases, maltases e panteteinases (*vanin-like proteins*) (REZENDE *et al.*, 2017). Deve ser destacado que o potencial envolvimento de proteínas panteteinases, ou *vanin-like proteins*, no modo de ação de

toxinas inseticidas produzidas por bactérias entomopatógenas nunca foi descrito, e são necessários mais estudos para sua identificação e caracterização funcional (REZENDE *et al.*, 2017).

2.5 TOXINA BINÁRIA (Bin) E MODO DE AÇÃO EM *Cx. quinquefasciatus*

A protoxina Bin é uma proteína heterodimérica constituída pelas subunidades BinA e BinB (Figura 4), que são requeridas em quantidades equimolares para a obtenção da toxicidade máxima sendo, por isso, considerada uma toxina binária (CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELÉCLUSE, 1996; NICOLAS *et al.*, 1993). Deve-se destacar que a produção da toxina Bin nas cepas nativas é equimolar e em cristais de grande tamanho contendo uma considerável quantidade de protoxina. As duas proteínas compartilham regiões de identidade e parecem ter evoluído de um ancestral comum. Seus genes estão localizados no cromossomo bacteriano e as sequências das proteínas BinA e BinB alinhadas possuem 28% de identidade e 46% de similaridade (BAUMANN; BROADWELL; BAUMANN, 1988; CHARLES; NIELSON-LEROUX; DELÉCLUSE, 1996; COLLETIER *et al.*, 2016). Entre estas toxinas, algumas sequências de aminoácidos altamente conservadas são também as principais regiões hidrofóbicas, que estão frequentemente localizadas na porção interna da proteína e, assim, envolvidas na interação com a membrana celular (BAUMANN; BROADWELL; BAUMANN, 1988).

Figura 4 – Estrutura tridimensional das subunidades BinA e BinB da toxina Binária de *Lysinibacillus sphaericus*, determinada por cristalografia.



A: estrutura das toxinas BinA e BinB, formadas por dois domínios: trefoil e de formação de poro. B: representação da superfície do dímero BinAB demonstrando que a exposição do sítio de interação se dá após modificação conformacional da toxina.

Os dois componentes desta toxina tem funções distintas e complementares para o modo de ação da toxina Bin. A subunidade BinB (448 aminoácidos, 51 kDa) tem a função de reconhecer e ligar-se especificamente aos receptores no epitélio intestinal (CHARLES *et al.*, 1997; NICOLAS *et al.*, 1993) e esta interação é essencial para a ação da toxina Bin, como será descrito posteriormente (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). Esta ligação com o receptor se dá através da região N-terminal no segmento compreendido entre os resíduos 33-158, e alguns resíduos específicos (147-149-150) são críticos para esta ligação (ROMÃO; DE-MELO-NETO; SILVA-FILHA, 2011; SINGKHAMANAN *et al.*, 2010). A região C-terminal da subunidade BinB está envolvida na interação com a BinA e vários aminoácidos críticos para esta interação já foram identificados (BOONSERM *et al.*, 2006; KALE *et al.*, 2013; SILVA FILHA; BERRY; REGIS, 2014).

A subunidade BinA (370 aminoácidos, 42 kDa), é responsável pela toxicidade para as células (BAUMANN *et al.*, 1991; LOZANO; DUSSÁN, 2013; ROMÃO; DE-MELO-NETO; SILVA-FILHA, 2011), a qual ocorre mediante a internalização desta subunidade nas células do epitélio intestinal. Este processo, por sua vez, depende da interação de BinB com os receptores celulares e, estudos prévios mostram que após a etapa de ligação ocorre uma internalização do complexo destas subunidades (LEKAKARN; PROMDONKOY; BOONSERM, 2015; OPOTA *et al.*, 2011). O mecanismo de ação intracelular da subunidade BinA ainda não foi completamente elucidado, mas a capacidade da BinA e BinB de formarem poros na membrana celular, demonstrada anteriormente, pode possibilitar a internalização destas subunidades nas células (COLLETIER *et al.*, 2016; SCHWARTZ *et al.*, 2001; SHARMA; KUMAR; KUMAR, 2020).

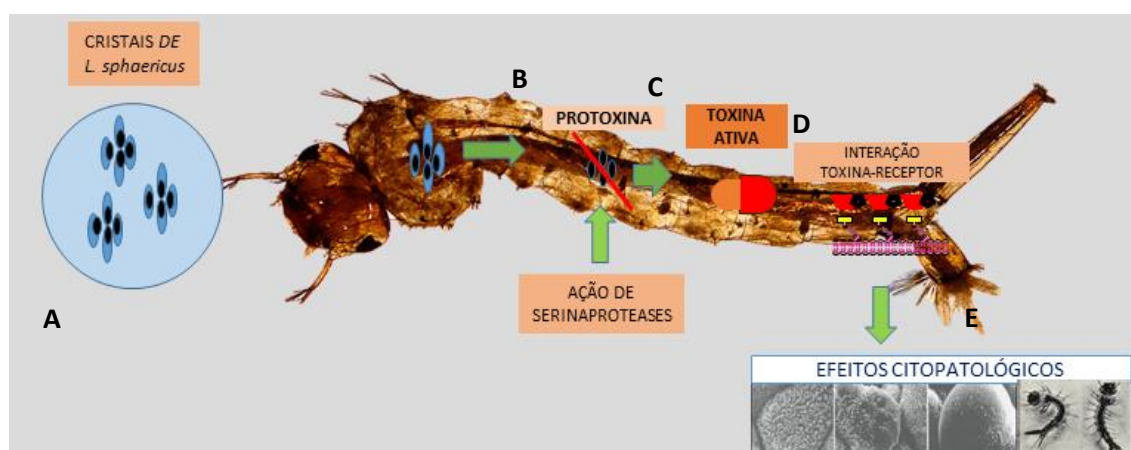
Estudos *in vitro* demonstraram que as subunidades BinA e BinB são monoméricas e que, quando ativadas, podem formar um heterodímero e é, provavelmente, sob esta forma que a toxina interage com o receptor no epitélio intestinal (SURYA *et al.*, 2016). Essa estrutura heterodimérica BinAB, aponta que uma modificação conformacional expõe a região de interação com o receptor (COLLETIER *et al.*, 2016).

A protoxina Bin de *L. sphaericus* tem ação larvicida via oral, portanto, os produtos contendo seus cristais como princípio ativo são aplicados na superfície aquática dos criadouros, a fim de serem ingeridos pelas larvas de culicídeos. Estas se alimentam das partículas em suspensão através de filtração. Os cristais ingeridos pelas larvas são solubilizados em pH intestinal alcalino ($\cong 10$), liberando as protoxinas no lúmen do intestino. Em seguida ocorre o processamento das protoxinas em toxinas ativas onde os polipeptídeos de 42 kDa (BinA) e 51 kDa (BinB) são clivados por serina-proteases em peptídeos de 39 e 43 kDa respectivamente (BAUMANN, P. *et al.*, 1985; BROADWELL; BAUMANN, 1987). A próxima etapa do modo de ação da toxina Bin é a interação das toxinas ativas com receptores específicos no epitélio intestinal das larvas suscetíveis que é essencial para a ação larvicida. Como descrito no tópico anterior, as proteínas BinA e BinB estão sob a forma monomérica como protoxinas e após a sua ativação elas são combinadas, formando um dímero. Provavelmente, é sob esta forma que a toxina Bin interage com seu receptor nativo. Entretanto, para a sua ação nas células, estas toxinas não necessitam formar oligômeros, tal como já foi demonstrado para as toxinas Cry (HIRE *et al.*, 2014). Esta etapa de ligação entre a toxina ativa e o receptor é decisiva para a ação da toxina nas larvas (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992) pois desencadeiam alterações citopatológicas no epitélio intestinal e a subsequente morte das larvas. As principais alterações celulares observadas são a destruição de microvilosidades, vacuolização citoplasmática, intumescimento das mitocôndrias, danos nas cristas mitocondriais e alterações do retículo endoplasmático rugoso (CHARLES, 1987; MELO *et al.*, 2008; SINGH; GILL, 1988).

Um estudo detalhado da ação da toxina Bin em células de mamíferos expressando o receptor Cqm1 apontou que a toxina Bin induz a autofagia, formando vacúolos citoplasmáticos e formação de células apoptóticas como uma resposta à intoxicação (OPOTA *et al.*, 2011). Outro estudo apontou que a morte celular mediada pela toxina Bin pode ser causada pela ativação da via intrínseca da apoptose que resulta de danos mitocondriais causados pela toxina, e estas são de fato umas das principais organelas alvo da toxina na células do epitélio intestinal (TANGSONGCHAROEN *et al.*, 2015). É importante considerar que a ação da toxina Bin pode levar à ativação destes mecanismos simultaneamente. Um aspecto comum, demonstrado por diferentes estudos, é que a toxicidade depende da internalização da

subunidade BinA. A internalização é dependente da ligação de BinA à subunidade BinB, da ligação deste complexo ao receptor de membrana via BinB e da sua posterior translocação para a célula (LEKAKARN; PROMDONKOY; BOONSERM, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2020). Recentemente um estudo mostrou que a internalização de BinA nas células do epitélio também pode ocorrer através de sinergia com a toxina Cyt1Aa do Bti (NASCIMENTO *et al.*, 2020). Larvas de *Cx. quinquefasciatus* resistentes à toxina Bin desprovidas de receptores, quando tratadas com uma mistura das toxinas BinA e Cyt1Aa apresentam mortalidade. Neste estudo foi demonstrado que a subunidade BinA foi internalizada nas células graças à sinergia da toxina Cyt1A, possivelmente devido à capacidade da Cyt1A de formar poros. Outro trabalho mostrou que uma proteína quimérica recombinante formada pela subunidade BinA e a toxina Cyt1Aa apresentou ação para larvas de *Cx. quinquefasciatus* suscetíveis e resistentes à Bin e de *Ae. aegypti* reforçando, portanto, que o acesso da subunidade BinA ao citoplasma é suficiente para causar mortalidade larval (BIDSHI *et al.*, 2017). Juntos, estes resultados comprovam que a entrada da BinA nas células, por algum destes mecanismos, é fundamental para a toxicidade. As principais etapas do modo de ação da toxina Bin em larvas de *Cx. quinquefasciatus* suscetíveis podem ser visualizadas na figura 5.

Figura 5 – Principais etapas do Modo de ação da toxina Binária presente nos cristais de *Lysinibacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus*.



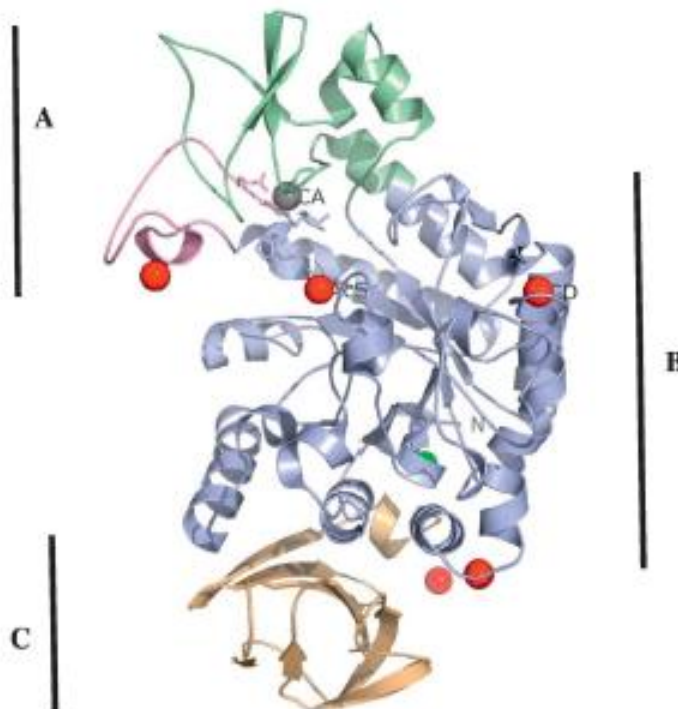
Fonte: a autora

Nota: Após a ingestão (A), o cristal é solubilizado no pH alcalino intestinal da larva, a protoxina Bin é liberada no lúmen (B) e processada até a forma de toxina ativa (C). Esta interage com receptores específicos (D) presentes na membrana apical do epitélio intestinal e desencadeia os efeitos citopatológicos (E), culminando com a morte da larva.

2.6 RECEPTORES DA TOXINA Bin

O mecanismo de ação da toxina Bin em larvas suscetíveis é altamente específico e depende de sua ligação a receptores no epitélio intestinal das larvas. Os receptores da toxina Bin para *Culex pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* e *Anopheles gambiae* são α -glicosidases (EC 3.2.1.20) ortólogas com cerca de 66 kDa, ligados a membrana epitelial das células do intestino através de uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) (SILVA-FILHA; BERRY; REGIS, 2014). A primeira sequência descrita foi do gene *cpm1* de *Cx. pipiens* e este gene codifica uma proteína Cpm1, 'Culex pipiens maltase 1' que apresenta três sítios preditos de N-glicosilação e aminoácidos que sinalizam uma sequência sinal e a inserção de uma âncora GPI (DARBOUX *et al.*, 2001). Em *Cx. quinquefasciatus*, o receptor da toxina Bin é denominado *Culex quinquefasciatus* maltase 1 (Cqm1/Figura 6). Esta proteína é codificada pelo gene *cqm1* cuja fase aberta de leitura possui 1743 pares de bases (pb) e a proteína resultante tem 580 aminoácidos e peso molecular predito de 66 kDa (ROMÃO *et al.*, 2006). É importante ressaltar que apesar dos sítios de N-glicosilação preditos, a avaliação da proteína Cqm1 nativa não apresentou esta característica (NASCIMENTO *et al.*, 2017). A sequência da Cqm1 apresenta ainda quatro domínios conservados característicos das α -glicosidases da família GH13 (GABRIŠKO, 2013). Em *Anopheles gambiae*, os receptores já caracterizados foram denominados 'An. gambiae maltase 3', Agm3 (OPOTA *et al.*, 2008). A proteína Cpm1 receptor compartilha uma identidade de 97% com Cqm1 e 66% com Agm3 (OPOTA *et al.*, 2008; ROMÃO *et al.*, 2006; SILVA FILHA; BERRY; REGIS, 2014). Em *Aedes aegypti* as larvas conseguem processar a protoxina em toxina e possuem uma α -glicosidase Aam1 que é ortóloga a Cpm1/Cqm1 com 74% de identidade. Entretanto as larvas de *Ae. aegypti* são naturalmente refratárias a *L. sphaericus* pois, a proteína Aam1 apesar da alta identidade com a proteína Cqm1, não tem a capacidade de se ligar a toxina Bin (FERREIRA *et al.*, 2010, 2014; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992).

Figura 6 – Estrutura do monômero da proteína Cqm1 evidenciando os três domínios.



Fonte: SHARMA; KUMAR (2019)

Nota: O domínio A é constituído por duas alças (alça-1; verde) e (alça-2; rosa). Domínio B descontínuo com dobra em barril (azul claro). O terminal C adota uma dobra em sanduíche β e constituem o domínio C do monômero (laranja). Os cinco íons metálicos ligados a um monômero são mostrados em esferas.

A expressão das proteínas Cpm1/Cqm1 ligadas à membrana celular é uma característica imprescindível para a atividade da toxina Bin nas larvas (DARBOUX *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2010; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999). Falhas na ligação entre a toxina Bin e o receptor podem ocorrer devido a mutações que impedem a expressão de proteínas ligadas ao epitélio via âncora GPI. Assim, a ausência de receptores localizados no epitélio provoca altos níveis de resistência como será discutido no tópico 2.7 (NIELSEN-LEROUX *et al.*, 1995; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2004; PEI *et al.*, 2002; SILVA-FILHA; BERRY; REGIS, 2014). A estrutura da proteína Cqm1 foi inicialmente predita através de uma modelagem que apontou uma estrutura secundária formada por doze α -hélices e o mesmo número de folhas β (FERREIRA *et al.*, 2014). Análises funcionais mostraram que a região N-terminal da Cqm1, entre os resíduos S129 e A312, é responsável pela sua interação com a toxina Bin e o motivo ¹⁵⁵PATGG¹⁶⁰, localizado em uma região de alça em sua estrutura predita, é necessário para que ocorra esta ligação (FERREIRA *et al.*, 2014). Posteriormente, Sharma *et al.* (2018) apresentou a estrutura da Cqm1 desvendada por cristalografia em raios-X que revelou uma

estrutura de três domínios, resíduos de ligação ao Ca^{+2} conservados e diferentes regiões de alça, e foi demonstrado que o Ca^{+2} proporciona estabilidade estrutural para a proteína Cqm1 (SHARMA *et al.*, 2018). A presença de aminoácidos da tríade catalítica e dos resíduos conservados da família GH13 das α -glicosidases também foram demonstradas neste estudo.

2.7 RESISTÊNCIA A *L. sphaericus*

Atualmente a resistência é considerada um dos maiores obstáculos para a eficácia de larvicidas ou adulticidas usados em programas de controle. Geralmente, em populações que não são expostas à inseticidas, a frequência de alelos que conferem resistência é baixa. Conseqüentemente, a utilização contínua de inseticidas, sem estratégias de manejo, pode levar à seleção destes alelos e, conseqüentemente, ao aparecimento de mosquitos resistentes (FFRENCH-CONSTANT, 2007; TABASHNIK *et al.*, 2008). Os alelos podem conferir a resistência através de diferentes mecanismos capazes de reduzir o efeito dos compostos inseticidas e os principais são: alteração no sítio-alvo, detoxificação metabólica, alteração comportamental e redução da penetração na cutícula. Os mecanismos de alteração no sítio-alvo e detoxificação metabólica são os mais frequentes e, portanto, aqueles mais bem investigados e caracterizados do ponto de vista molecular.

O mecanismo de modificação de sítio-alvo reduz a capacidade de interação da molécula do inseticida com o seu alvo, ou receptores específicos, provocando uma grande perda do efeito da toxicidade (BROGDON; MCALLISTER, 1998; LOPES; LIMA; MARTINS, 2019). A alteração na molécula que atua como receptor, ou o sítio-alvo de ligação do inseticida, resulta de mutações nos genes que codificam estas proteínas e um repertório de mutações ligadas à resistência a inseticidas químicos pode ser encontrado no site: <https://irac-online.org>. O trabalho de DU (2013) demonstrou diretamente o efeito de tais mutações e falhas de ligação. Este estudo mostrou que cinco mutações específicas na proteína do canal de sódio, que é o receptor, reduzem significativamente a capacidade de ligação do piretróide. A resistência através de detoxificação metabólica de inseticidas químicos é um fenômeno bastante documentado para insetos de diferentes ordens (HEMINGWAY, 2000; LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007; LIU, 2015). Este mecanismo ocorre pela

ação de enzimas que são capazes de metabolizar, modificar ou degradar as moléculas dos xenobióticos antes de alcançarem seu alvo (MINETTI; INGHAM; RANSON, 2019). O processo de detoxificação nos insetos através de reações de biotransformação possuem três fases, nas quais as enzimas detoxificadoras fazem parte: fase I de modificação química, fase II de conjugação e fase III de excreção. As monooxidases de função mista (MFOs) e esterases (EST) atuam na fase I e as glutationas-S-transferases (GSTs) na Fase II (FROVA, 2006; HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

Em relação à resistência de colônias ou populações de *Culex pipiens* e *Culex quinquefasciatus* a *L. sphaericus*, oito dentre dez casos avaliados mostram a perda do sítio alvo (sete casos) ou a uma alteração no sítio alvo (um caso), como mecanismo responsável pela refratariedade (Quadro 1). Estes estudos demonstraram que alelos dos genes *cpm1* e *cqm1* com determinadas mutações codificam proteínas truncadas e ausentes do epitélio intestinal, ou ainda modificadas em regiões críticas o que confere um elevado nível de resistência à toxina Bin, como descrito abaixo. A resistência foi detectada em populações submetidas a intensos tratamentos com larvicidas à base de *L. sphaericus* ou selecionadas em laboratório. O primeiro caso foi relatado em populações de *C. pipiens* do sul da França expostas ao *L. sphaericus* e que exibiram altos níveis de resistência (CHEVILLON *et al.*, 2001; SINÈGRE *et al.*, 1994). Há ainda relatos de populações resistentes na Índia (RAO *et al.*, 1995), China (YUAN *et al.*, 2000), Tunísia (NIELSEN-LEROUX *et al.*, 2002), Tailândia (MULLA *et al.*, 2003) e EUA (SU *et al.*, 2018, 2019). A resistência também foi obtida através de seleção artificial de colônias em laboratório, o que também comprovou que altos níveis de resistência à toxina Bin poderiam ser atingidos (CHALEGRE *et al.*, 2012; 2015; GUO *et al.*, 2013; PEI *et al.*, 2002; ROMÃO *et al.*, 2006; WIRTH *et al.*, 2000).

Dentre os casos de resistência investigados, o principal mecanismo de resistência descrito é a ausência de receptores (NIELSEN-LEROUX *et al.*, 2002). Há apenas duas populações de *Culex pipiens* (SPHAE e TUNIS) resistentes a *L. sphaericus* que apresentam receptores Cpm1 funcionais, indicando mecanismos de resistência ainda desconhecidos (NIELSEN-LEROUX *et al.*, 1997; 2002). Em relação ao mecanismo de perda de sítio alvo que prevalece nos estudos já realizados, foram identificados sete alelos de resistência com mutações que levam à produção de proteínas truncadas e desprovidas de âncora GPI (DARBOUX *et al.*, 2002, 2007; GUO *et al.*, 2013;

CHALEGRE *et al.*, 2012; ROMÃO *et al.*, 2006). Portanto, se produzidas, estas proteínas não estão localizadas na membrana apical das células no epitélio intestinal e a toxina Bin não consegue assim interagir com estas células alvo.

Alguns casos de resistência devido à ausência do receptor no epitélio pela perda de âncora GPI e os mecanismos já foram caracterizados. O primeiro relato foi para a colônia GEO de *Cx. pipiens*, a primeira a ser selecionada com *L. sphaericus* 2362 em laboratório. Nela foi identificado o alelo *cpm1_{GEO}*, caracterizado por uma mutação pontual na posição T1706A que gera um códon prematuro de terminação da tradução, e leva à expressão de uma proteína de 568 aminoácidos, desprovida de âncora GPI (DARBOUX *et al.*, 2002). Já a resistência da colônia CqRL/C3-41 da China, está associada ao alelo *cqm1_R*, caracterizado pela deleção de uma citosina na posição 445, que gera um códon de parada na posição 582, e produz uma proteína truncada composta de 194 resíduos (GUO *et al.*, 2013). No caso de uma população de *Cx. pipiens* da França, dois alelos de resistência denominados *cpm1_{BP}* e *cpm1_{BP-del}* foram detectados (DARBOUX *et al.*, 2007). O alelo *cpm1_{BP}* possui uma mutação “nonsense” (G396Stop) que leva à formação de um códon de parada prematuro e síntese de uma proteína truncada com 395 aminoácidos e sem a âncora GPI (DARBOUX *et al.*, 2007). O outro alelo, denominado *cpm1_{BP-del}*, codifica uma proteína ligada à membrana por uma âncora GPI, no entanto, a mutação é responsável por uma deleção de 66 aminoácidos e esta proteína é incapaz de ligar-se à toxina, provavelmente devido à perda do sítio de ligação propriamente dito ou do sítio conformacional necessário para a ligação com a toxina (DARBOUX *et al.*, 2007).

No Brasil, especificamente em Recife, quatro alelos de resistência foram identificados em *Cx. quinquefasciatus*, sendo dois em indivíduos de uma colônia resistente (R2362) selecionada em laboratório e dois detectados em indivíduos coletados em populações de campo. Os alelos denominados *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*, foram caracterizados na colônia R2362, que possui um alto nível de resistência à toxina Bin (OLIVEIRA *et al.*, 2004; PEI *et al.*, 2002). O alelo *cqm1_{REC}* é caracterizado por uma deleção de 19 nucleotídeos (posição 1225-1243), que causa um stop códon prematuro (posição 443), codificando uma proteína truncada sem âncora GPI (CHALEGRE *et al.*, 2009; ROMÃO *et al.*, 2006). O alelo *cqm1_{REC-2}* também confere resistência em larvas desta colônia, e possui uma mutação pontual G1292A que gera um códon de parada de tradução prematuro (posição 431) e, a exemplo do alelo

cqm1_{REC}, também codifica uma proteína truncada (CHALEGRE *et al.*, 2015). Apesar de terem sido identificados em uma colônia de laboratório, estes alelos já foram encontrados em campo no Recife, em populações tratadas e não tratadas, com frequência da ordem de 10^{-3} (*cqm1_{REC}*) e 10^{-4} (*cqm1_{REC-2}*) (CHALEGRE *et al.*, 2012; MENEZES *et al.*, 2016). Os alelos *cqm1_{REC-D16}* e *cqm1_{REC-D25}*, foram identificados em larvas de populações de campo cujo gene *cqm1* foi sequenciado e apresentou deleções de 16 e 25 nucleotídeos. Estas mutações provocam a formação de um códon de parada prematuro e, portanto, também irão gerar proteínas desprovidas de âncora GPI. Nos casos de resistência associados a alelos do gene *cqm1* foi demonstrado que a herança é recessiva, ou seja, apenas larvas homozigotas para um determinado alelo exibem o fenótipo resistente. A quantificação relativa de expressão gênica mostrou que os transcritos para os alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* possuíam níveis baixos, em média 20 e 100 vezes menores, em relação ao alelo *cqm1*, respectivamente (CHALEGRE *et al.*, 2015). Ensaio de imunodeteção e de atividade enzimática mostra que a proteína Cqm1 não é expressa de forma detectável nas larvas homozigotas para os alelos de resistência, ou seja, elas são desprovidas de expressão desta molécula (AMORIM *et al.*, 2010; CHALEGRE *et al.*, 2015; ROMÃO *et al.*, 2006).

O fenótipo de resistência aos inseticidas geralmente está relacionado a um custo biológico. Estudos deste custo são importantes para compreender o surgimento, aumento, distribuição e sucesso adaptativo dos alelos de resistência (ORR, 2009). Em insetos resistentes a inseticidas, os principais parâmetros biológicos afetados são sobrevivência, tempo de desenvolvimento e massa corpórea, além de outros fatores. O custo biológico da resistência à toxina Bin ainda vem sendo investigado e, dados obtidos até o presente, não indicam que este fenótipo está associado a uma elevada redução de desempenho. Os estudos de uma colônia de *Cx. quinquefasciatus* resistente a *L. sphaericus* (RIAB59), não mostraram redução significativa de fecundidade, fertilidade e peso pupal comparada à uma colônia suscetível (AMORIM *et al.*, 2007, 2010). Em uma colônia contendo uma alta frequência de indivíduos resistentes mantida sem pressão de seleção, a frequência do alelo *cqm1_{REC}* foi mantida estável após 11 gerações, e sugere que este alelo não está associado a um alto custo biológico (AMORIM *et al.*, 2010).

O desempenho de alguns parâmetros biológicos de colônias resistentes REC e REC-2, homozigotas para os alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* respectivamente, foi comparado à uma colônia suscetível. A colônia REC teve fecundidade e fertilidade reduzida comparada às outras colônias, o que não foi verificado para a colônia REC-2 que teve fecundidade, fertilidade, longevidade e tempo de desenvolvimento equivalentes ou superiores à colônia suscetível. Estes dados indicam que o alelo *cqm1_{REC}* pode estar associado a um baixo custo biológico (MELO, 2013). Além disso, um estudo mais recente, avaliando a competição de indivíduos homozigotos para estes alelos mostrou que o alelo *cqm1_{REC}* foi preferencialmente selecionado num processo de tratamentos por 20 gerações sob condições de criação ótimas, enquanto que larvas homozigotas para o *cqm1_{REC-2}* tem uma maior capacidade de sobrevivência frente a baixa disponibilidade de alimento e alta densidade larval (MENEZES *et al.*, 2021). O surgimento de populações resistentes à toxina Bin é uma ameaça a eficiência dos larvicidas a base de *L. sphaericus* e demonstra a necessidade de compreender os mecanismos que levam à resistência.

Quadro 1 - Colônias de *Culex* sp. selecionadas sob condições de laboratório (Lab) ou populações de campo expostas ao tratamento com *Lysinibacillus sphaericus* que apresentaram alterações na susceptibilidade a este agente, e respectivos alelos de resistência já caracterizados em algumas amostras.

País	Origem	Colônia/ população	Alelo <i>r</i>	RR ³	Herança ⁴	Ligação ao receptor	Referência
Brasil	Campo	Coque ²	ND	~10	ND	Sim	SILVA-FILHA <i>et al.</i> , 1995
Brasil	Campo	Recife	<i>cqm1</i> _{REC-D16} / <i>cqm1</i> _{REC-D25}	3-6	ND	Não	CHALEGRE <i>et al.</i> , 2012
França	Campo	SPHAE ¹	ND	>20.000	R/S	Sim	NIELSEN-LEROUX <i>et al.</i> , 1997;2002
França	Campo	BP ¹	<i>cpm1</i> _{BP} <i>cpm1</i> _{BP} - del	>10.000	R/S	Não	NIELSEN-LEROUX <i>et al.</i> , 2002; DARBOUX <i>et al.</i> , 2007; CHEVILLON <i>et al.</i> , 2001
Índia	Campo	Kochi ²	ND	146-180	ND	Não	RAO <i>et al.</i> , 1995
China	Campo	RFCq1 ²	ND	>20.000	ND	ND	YUAN <i>et al.</i> , 2000
Tunísia	Campo	TUNIS ¹	ND	~750	R/S	Sim	NIELSEN-LEROUX <i>et al.</i> , 2002
Tailândia	Campo	Wat Pikul ¹	ND	>125.000	ND	ND	MULLA <i>et al.</i> , 2003
EUA	Lab	GEO ¹	<i>cpm1</i> _{GEO}	>100.000	R/A	Não	DARBOUX <i>et al.</i> , 2002; WIRTH <i>et al.</i> , 2000
EUA	Lab	L-SEL	ND	37	ND	ND	RODSHAROEN; MULLA, 1994
Brasil	Lab	R2362 ²	<i>cqm1</i> _{REC}	>100.000	R/A	Não	PEI <i>et al.</i> , 2002; ROMÃO <i>et al.</i> , 2006;
Brasil	Lab	RIAB59 ²	<i>cqm1</i> _{REC}	~40.000	R/A	Não	AMORIM <i>et al.</i> , 2007; PEI <i>et al.</i> , 2002
Brasil	Lab	REC	<i>cqm1</i> _{REC}	> 3425	R/A	Não	CHALEGRE <i>et al.</i> , 2015; MENEZES <i>et al.</i> , 2021
Brasil	Lab	REC-2	<i>cqm1</i> _{REC-2}	> 3475	R/A	Não	CHALEGRE <i>et al.</i> , 2015; MENEZES <i>et al.</i> , 2021
China	Lab	RLCq2/IAB59 ²	<i>cqm1</i> _{REC}	>100.000	R/A	Não	PEI <i>et al.</i> , 2002
China	Lab	RLCq1/C3-41 ²	<i>cqm1</i> _R	>100.000	R/A	Não	PEI <i>et al.</i> , 2002; GUO <i>et al.</i> , 2013

Fonte: Traduzido de Silva-filha *et al.* (2021)

Nota: ¹*Cx. pipiens*. ²*Cx. quinquefasciatus*. ³RR= Razão de resistência. ⁴Herança da resistência: R/A=recessiva/autossomal; R/S = recessiva e ligada ao sexo. ND=não determinado

2.8 COLÔNIAS DE *Cx quinquefasciatus* RESISTENTES A TOXINA Bin DO IAM-FIOCRUZ

Conforme descrito anteriormente, os estudos desenvolvidos pelo nosso grupo levaram à seleção de colônias selecionadas com *L. sphaericus*. A primeira colônia denominada R2362 foi fundada a partir de ovos e larvas coletadas em bairros do Recife e foi selecionado com *L. sphaericus* 2362 em laboratório. A colônia atingiu um alto nível de resistência, superior a 100.000 vezes comparada à colônia suscetível (PEI *et al.*, 2002). A resistência desta colônia é devido à ausência da expressão do receptor Cqm1 no epitélio intestinal, que é o sítio-alvo da toxina Bin (OLIVEIRA *et al.*, 2004). A caracterização molecular da colônia R2362, mostrou o genótipo homozigoto para o alelo *cqm1_{REC}* (ROMÃO *et al.*, 2006). Uma avaliação posterior demonstrou a presença de outro alelo de resistência denominado *cqm1_{REC-2}* (CHALEGRE *et al.*, 2015). Ambos os alelos levam à falha de expressão do receptor Cqm1 no epitélio intestinal (CHALEGRE *et al.*, 2015). Após a caracterização destes alelos, duas subcolônias denominadas REC e REC-2, formadas por indivíduos homozigotos para os alelos *cqm1_{REC}* e o *cqm1_{REC-2}*, respectivamente, foram fundadas. Estas colônias vêm sendo mantidas no insetário do IAM há mais de 100 gerações sob condições controladas.

Outra colônia de *Cx. quinquefasciatus* denominada RIAB59 foi selecionada com *L. sphaericus* cepa IAB59 que produz cristais da toxina Bin e cristais da toxina Cry48Aa/Cry49Aa (JONES *et al.*, 2007; PEI *et al.*, 2002). O mais alto nível de resistência à toxina Bin, com uma razão de 40.000 vezes, foi detectado apenas na geração 72 (AMORIM *et al.*, 2007), que está associada ao alelo *cqm1_{REC}* (AMORIM *et al.*, 2010). Esta colônia tem sido mantida sob condições de laboratório há mais de 240 gerações e uma avaliação da resistência mostrou um nível apenas moderado de resistência à toxina Cry48Aa/Cry49Aa (RR= 15 vezes) (REZENDE *et al.*, 2017). O mecanismo de resistência específico para a toxina Cry48Aa/Cry49Aa ainda é desconhecido e, por isso, esta colônia é alvo de nossos estudos visto que ela tem importância estratégica para produção de informações valiosas sobre o modo de ação das toxinas Bin e Cry48Aa/Cry49Aa.

2.9 TRANSCRIPTOMA DE COLÔNIAS DE *Cx quinquefasciatus* resistentes

Estudos do transcriptoma comparativos de larvas resistentes e suscetíveis à inseticidas têm sido realizados no sentido de obter uma visão mais ampla de genes e vias que se relacionam, direta ou indiretamente, com o status de resistência. O transcriptoma do intestino de larvas de *Cx. quinquefasciatus* da colônia RIAB59 *versus* larvas de uma colônia suscetível (REZENDE *et al.*, 2019), mostrou que as larvas resistentes possuem um destacado perfil de expressão gênica diferencial, cujos genes com maior destaque em termos de redução de transcritos denotados pelo valor de *Log2 Foldchange* (LFC) e nível de significância (valor de *p*) estão apresentados no quadro 2. Neste estudo, foi observado que o gene *cqm1*, que é um marcador interno da resistência teve baixa expressão com alta significância (LFC= 4.65) o que corroborou o fenótipo de resistência. Com destaque ainda maior, foi observada a baixíssima detecção de transcritos de panteteinases (LFC= 7). Estudos prévios mostraram que a mesma panteteinase foi detectada em microvilli intestinal de larvas de *Cx. quinquefasciatus*, como um ligante e, portanto, candidata a receptor da toxina Cry48Aa/Cry49Aa (REZENDE *et al.*, 2017), porém seu papel neste processo resta a ser desvendado. Mais informações sobre a panteteinases estão disponíveis na seção 2.10.

O segundo grupo de destaque do perfil de baixa expressão foram genes relacionados ao metabolismo de lipídios. Alguns desses genes de metabolismo de lipídios podem estar envolvidos em processos de antioxição e anti-apoptose, homeostase celular e também resposta ao estresse (FLOWER, 1994; GURCEL *et al.*, 2006). Um estudo prévio de nosso grupo, que mostrou um acúmulo de inclusões lipídicas em células do epitélio intestinal de larvas resistentes à toxina Bin, corrobora com a correlação entre resistência e alterações no metabolismo de lipídios destas larvas (MELO *et al.*, 2008). Ainda no perfil de baixa expressão, foram encontrados genes do processo intrínseco de apoptose, o qual é induzido pela ação das toxinas Bin e Cry (PORTUGAL *et al.*, 2017; TANGSONGCHAROEN *et al.*, 2015). Já no perfil de super expressão destacaram-se genes envolvidos no metabolismo de DNA (reparo, recombinação), genes de proteases ligadas diretamente a digestão e resposta imune, e de enzimas detoxificadoras.

O transcriptoma realizado nas colônias resistentes a *L. sphaericus* REC e REC-2, com alta resistência à toxina Bin, também demonstrou a significativa sub expressão do transcrito do gene *cqm1* e novamente as panteteinases/*vanin-like proteins* tiveram o maior nível de repressão, inclusive mais acentuado do que o próprio receptor Cqm1 (MENEZES *et al.*, em preparação). O segundo achado mais expressivo foi a transcrição de genes de metabolismo de carboidratos e detoxificação metabólica. Assim, as panteteinases mostram um padrão significativo de repressão em todos os transcriptomas de larvas resistentes realizadas pelo grupo. Diferente de várias enzimas de destaque cuja função é conhecida e possibilita a sua avaliação do fenótipo ligado a elas, a panteteinase é uma molécula praticamente sem registros de identificação e caracterização em insetos. Portanto, um breve referencial teórico sobre estas moléculas está apresentado na seção 2.10.

Quadro 2 – Exemplos de genes diferencialmente expressos em intestinos de larvas de *Culex quinquefasciatus* resistentes a *Lysinibacillus sphaericus* cepa RIAB59 comparados às larvas suscetíveis, com destaque para as panteteinases (sublinhado).

Gene_id	Descrição	Log2 Foldchange	p value
Sub expressos			
<i>Ligantes de toxinas</i>			
CPIJ013173	Neutral & basic aminoacid transport protein rBAT	4.65	9.14E-304
<i>Panteteinases</i>			
<u>CPIJ017593</u>	<u>Pantetheinase precursor</u>	7.13	1.51E-49
<u>CPIJ017592</u>	<u>Vanin-like protein 1 precursor, putative</u>	6.14	1.06E-31
<i>Metabolismo de lipídios</i>			
CPIJ001035	Lipase member H	5.43	7.13E-43
CPIJ002726	Lipase 3 precursor	3.52	4.08E-16
CPIJ004230	Lipase	2.94	4.22E-68
CPIJ015726	Apolipoprotein D putative	4.10	1.76E-11
CPIJ015727	Apolipoprotein D putative	3.34	7.18E-09
<i>Apoptose</i>			
CPIJ008888	p53 and DNA damage-regulated 1	3.36	1.15E-28
CPIJ004873	RING finger and SPRY domain-containing 1	2.77	6.64E-15
CPIJ019024	Cytochrome c	2.23	2.20E-94
CPIJ012580	Caspase-3 precursor	2.05	1.41E-12
Super expressos			
<i>Metabolismo DNA</i>			
CPIJ019303	Transcription termination factor 2	3.45	2.06E-08
CPIJ015649	DNA-binding protein smubp-2 putative	3.38	4.23E-08

Quadro 2 – Genes diferencialmente expressos em intestinos de larvas de *Culex quinquefasciatus* resistentes a *Lysinibacillus sphaericus* cepa RIAB59 comparados às larvas suscetíveis. (Continuação)

CPIJ010133	Structural maintenance of chromosomes smc2	3.18	1.81E-08
CPIJ005091	DNA replication licensing factor MCM8	2.66	4.77E-08
<i>Proteases</i>			
CPIJ011720	Dipeptidyl-peptidase	3.18	3.49E-07
CPIJ009147	Serine/threonine-protein kinase chk2	2.52	4.86E-05
CPIJ008523	Serine-type endopeptidase, putative	2.21	1.55E-04
CPIJ013616	Trypsin 5 precursor	2.17	1.61E-04
CPIJ017371	Phd finger protein	2.00	2.71E-06
CPIJ007754	Rac serine/threonine kinase (AKT) ^a	1.35	7.43E-04
<i>Enzimas detoxificadoras</i>			
CPIJ006721	CYP4H37: cytochrome P450 4H37	2.19	4.38E-49
CPIJ019765	CYP9M14: cytochrome P450 9M14	2.18	2.85E-05
CPIJ002663	Glutathione S-transferase 1-1	1.36	1.58E-20
CPIJ018632	Glutathione-s-transferase theta, gst	1.29	2.32E-11

Fonte: a autora

2.10 PANTETEINASE

Transcritos de panteteinases ou *vanin-like proteins* tiveram a maior repressão no transcriptoma de larvas de *Cx. quinquefasciatus* resistente RIAB59 (Quadro 2). Estudos sobre estas proteínas são escassos em mosquitos e a literatura disponível é sobretudo baseada em panteteinases de humanos e camundongos. A função primária destas enzimas é converter a panteteína em ácido pantotênico ou vitamina B5, que é um importante cofator na produção e degradação de lipídios (KASKOW *et al.*, 2012). Esta proteína também pode estar envolvida em alguns processos como homeostase, imunidade e metabolismo de lipídios (FERREIRA; NAQUET; MANAUTOU, 2015). No entanto, a destacada repressão de dois genes codificadores de panteteinases nestes indivíduos leva a hipotetizar o seu envolvimento no modo de ação da toxina Bin e, portanto, no mecanismo de resistência. Alternativamente, este gene pode ter sido co-selecionado e sem nenhum envolvimento direto com a ação da toxina Bin nas larvas. Portanto, estas moléculas necessitam ser avaliadas para a compreensão do perfil diferencial exibido pelos insetos resistentes.

Em humanos, dois principais genes denominados *vnn1* e *vnn2*, codificam as panteteinases. Como citado anteriormente, as panteteinases humanas são bem estudadas pois estão envolvidas em processos fisiológicos e patológicos relevantes

(BARTUCCI *et al.*, 2019; GALLAND *et al.*, 1998; MARTIN *et al.*, 2001). A VNN1 é expressa como proteína de membrana em altas concentrações em células do fígado, rim, pulmão, trato gastrointestinal, baço, sangue e pele (YAMASHITA *et al.*, 2017). A VNN2 também é expressa nestes órgãos, porém com maior concentração em neutrófilos no sangue, provavelmente devido à sua relação com a regulação de aderência e migração destas células (BARTUCCI *et al.*, 2019; NITTO; ONODERA, 2013). A VNN1 em humanos possui um peso molecular aparente de 70 kDa, o que difere do peso predito (57 kDa) (AURRAND-LIONS *et al.*, 1996). Esta diferença ocorreu devido a modificações pós-traducionais, no qual houve adição de N-glicosídeos (KASKOW *et al.*, 2012; RUAN *et al.*, 2010; SUZUKI *et al.*, 1999).

Há 648 genes codificantes de panteteinases, de acordo com o NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene acessado em 02/2023), sendo 457 desses genes distribuídos entre vertebrados, com 204 desses em mamíferos. Em artrópodes, 44 genes que codificam panteteinases foram descritos, e já foram detectados em *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, *Spodoptera frugiperda*, *Ostrinia nubilalis* e *Mamestra configurata*. Dos genes descritos em mosquitos, 19 foram encontrados em *Anopheles spp.*, 8 em *Culex quinquefasciatus*, 7 em *Aedes albopictus* e 2 em *Aedes aegypti*. Na maior parte destes estudos, as panteteinases ou *vanin-like proteins* foram identificadas a partir de análises proteômicas e transcriptômicas. Em um estudo, a expressão diferencial de potenciais panteteinases foi encontrada em larvas de *Ostrinia nubilalis* suscetíveis que foram tratadas com a toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* (YAO *et al.*, 2014), bem como em larvas resistentes a esta toxina (YAO *et al.*, 2017). Em uma análise proteômica de *Bombyx mori*, uma *Vanin like protein* foi observada em células da glândula de seda de larvas desta espécie (ZHANG *et al.*, 2006). Outro relato é a presença destas *Vanin-like proteins* na membrana microvilar do intestino médio do inseto lepidóptero *Spodoptera frugiperda*, com homologia a VNN1 de *D. melanogaster*, cuja função é desconhecida (FERREIRA *et al.*, 2007). Além dos nossos estudos (REZENDE *et al.*, 2017, 2019), e os de Yao *et al.* (2014; 2017) este é o único que detectou panteteinases, ou seus transcritos diferencialmente expressos, em insetos expostos ou resistentes à toxinas de bactérias entomopatógenas.

2.11 RESERVAS ENERGÉTICAS

As reservas energéticas em insetos, tais como lipídios e carboidratos, desempenham um papel importante na estrutura, desenvolvimento e sobrevivência. Acredita-se que indivíduos resistentes apresentam uma menor quantidade de reservas energéticas em relação aos indivíduos suscetíveis, o que reduziria a energia disponível para as suas funções biológicas (RIVERO *et al.*, 2011). Diante de um amplo perfil de transcritos ligados à metabolismo de lipídios e carboidratos diferencialmente expressos na colônia de *Cx. quinquefasciatus* resistente RIAB59, a avaliação de reservas energéticas também se tornou um dos aspectos avaliados neste estudo. A reserva lipídica é uma das mais importantes utilizadas pelos insetos, devido ao alto consumo de energia para metamorfose (HAHN; DENLINGER, 2007), desenvolvimento embrionário e voo (ARRESE; SOULAGES, 2010; ZIEGLER; VAN ANTWERPEN, 2006). Os lipídios também são constituintes de estruturas celulares, podem exercer funções de hormônio e formam importantes reservas energéticas, podendo também serem acumulados no corpo gorduroso (ATELLA *et al.*, 2012). No decorrer do processo de digestão, triacilgliceróis e fosfolipídios, são hidrolisados em ácidos graxos que são liberados e posteriormente absorvidos pelo epitélio intestinal (CANAVOSO *et al.*, 2001). Após esta absorção, os ácidos graxos são utilizados para a síntese de outros lipídios (ARRESE *et al.*, 2001). Essas reservas são utilizadas principalmente em atividades que requerem grandes demandas metabólicas, tais como voo prolongado, metamorfose, produção de ovos, longevidade e uma maior tolerância a temperaturas mais baixas (ARRESE *et al.*, 2001). Dentre as moléculas que agem no metabolismo de lipídios, existem as lipases, cuja principal função biológica é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis para gerar ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Em insetos, as lipases atuam principalmente na obtenção, digestão, armazenamento e transporte dos lipídios, tendo também um papel importante em processos fisiológicos ligados a reprodução, desenvolvimento, proteção contra patógenos e estresse oxidativo, e sinalização de feromônios (FILIETAZ; LOPES, 2010; HAHN; DENLINGER, 2007; HORNE; HARITOS; OAKESHOTT, 2009).

O metabolismo da maioria dos mosquitos precisa de carboidratos, geralmente provenientes de seivas, flores e frutos, considerados fontes primárias de energia em mosquitos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). O glicogênio é uma das reservas mais importantes de carboidratos nos insetos podendo ser convertido em

glicose que então é oxidada para fornecer energia, e esta síntese ocorre quando o consumo de carboidrato é superior à necessidade imediata (KLOWDEN, 2013). Os carboidratos são mobilizados principalmente a partir das reservas de glicogênio no corpo gorduroso. A quantidade de glicogênio é, em geral, menor do que a de gordura e apresenta variações de acordo com a atividade motora e alimentar. Após a metamorfose, o glicogênio é drasticamente reduzido e pode estar quase esgotado, e os adultos recuperam os estoques de glicogênio somente após se alimentarem de fontes de açúcar (ARRESE.; SOULAGES, 2010). A energia do voo é inicialmente produzida pelo glicogênio, armazenado no corpo gorduroso e nos músculos de voo (HAHN; DENLINGER, 2011), podendo influenciar também a sobrevivência, o comportamento de cópula, de oviposição e a busca por hospedeiro (HARDSTONE *et al.*, 2010), mostrando a importância destas reservas para o desenvolvimento dos insetos.

3 JUSTIFICATIVA

A nota técnica da Organização Mundial de Saúde “Global Vector Control Response 2017-2030 (<http://www.who.int/vector-control/publications/global-control-response/>) ressalta a necessidade de pesquisa básica para subsidiar a utilização racional de agentes de controle de vetores, incluindo os biolarvicidas. O projeto visou produzir conhecimento para subsidiar o emprego racional de larvicidas para o controle populacional de *Culex quinquefasciatus* e compreender, de forma ampla, o impacto da resistência na biologia da espécie, por ser o principal vetor de patógenos de grande importância na saúde pública. Os larvicidas biológicos à base de *Lysinibacillus sphaericus* são agentes de controle efetivos que já foram utilizados em programas integrados de vetores, inclusive na Região Metropolitana (RMR). Este estudo visou contribuir para um aprofundamento do conhecimento sobre o modo de ação das toxinas de *L. sphaericus* a partir de uma caracterização mais ampla de moléculas que podem estar associadas à resistência desses insetos.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Culex quinquefasciatus resistentes à toxina Bin de *Lysinibacillus sphaericus*, apresentam características metabólicas diferenciais em relação aos indivíduos suscetíveis, além do fenótipo de refratariedade?

5 HIPÓTESE

Larvas de *Culex quinquefasciatus* resistentes a *Lysinibacillus sphaericus* possuem, além deste fenótipo, um perfil diferencial de atividade de enzimas ligadas ao metabolismo energético, em relação a indivíduos suscetíveis, que podem ser importantes para seu desempenho biológico.

6 OBJETIVOS

Geral

Avaliar moléculas de *Culex quinquefasciatus* relacionadas com o status de resistência às toxinas de *Lysinibacillus sphaericus*, baseada em uma análise comparativa de larvas resistentes e suscetíveis.

Específicos

- a) Determinar a atividade enzimática de lipases, proteases, α -glicosidases e glutationa-S-transferases em larvas de *Culex quinquefasciatus*;
- b) Comparar as reservas energéticas de lipídios e açúcares redutores de larvas e adultos de *Culex quinquefasciatus* resistentes e suscetíveis;
- c) Avaliar a fecundidade e fertilidade de fêmeas sob condições de criação padrão e sob estresse de indivíduos resistentes e suscetíveis;
- d) Caracterizar e investigar a expressão de uma panteteinase nativa de *Cx. quinquefasciatus* e sua expressão em um sistema recombinante;

7 METODOLOGIA

7.1 COLÔNIAS DE *Culex quinquefasciatus*

Foram utilizadas três colônias de *Culex quinquefasciatus* mantidas no insetário do Departamento de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ (IAM/FIOCRUZ). **CqS**: composta por indivíduos suscetíveis a inseticidas e mantida há mais de dez anos (CHALEGRE *et al.*, 2015). **CqRIAB59**: colônia selecionada com *L. sphaericus* cepa IAB59 produtora de toxinas Bin e Cry48Aa-Cry49Aa (JONES *et al.*, 2007). Os indivíduos apresentam alta razão de resistência à Bin (RR > 130.000 vezes) (PEI *et al.*, 2002) associada ao alelo *cqm1_{REC}*, em homozigose. Eles também exibem baixa resistência à toxina Cry48Aa/Cry49Aa (RR~ 15 vezes) (REZENDE *et al.*, 2017), cujo mecanismo ainda não foi caracterizado. **REC**: colônia composta por indivíduos homozigotos para o alelo *cqm1_{REC}*, com alto nível de resistência à toxina Bin (RR > 3500 X) (CHALEGRE *et al.*, 2015; MENEZES *et al.*, 2021). Os mosquitos foram mantidos a $26 \pm 1^\circ$ C, umidade relativa entre 65-85% e fotoperíodo 14 h claro:10 h escuro. As larvas foram mantidas em água de torneira e alimentadas com ração para gatos (Friskies®). Os adultos foram alimentados em solução de sacarose (10%) *ad libidum* e um repasto de sangue de coelho desfibrinado foi oferecido semanalmente para as fêmeas.

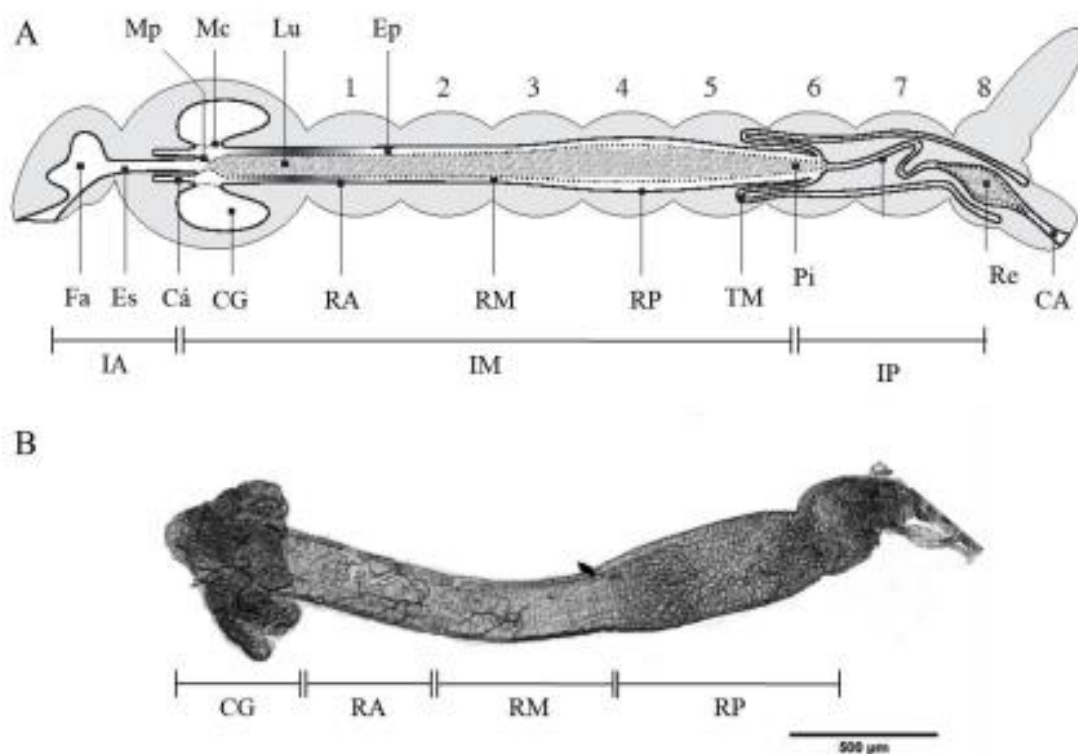
7.2 ENSAIOS CATALÍTICOS

7.2.1 Preparação de amostras e quantificação de proteínas

O intestino médio inteiro de larvas de quarto instar da colônias suscetível e resistente CqRIAB59, com seu conteúdo envolvido pela membrana peritrófica (Figura 7), foi individualmente dissecado em solução salina (NaCl 0,9%, p/v) sob gelo e homogeneizado em tampão apropriado descrito em cada seção. Em seguida a amostra foi centrifugada (15.000 x g, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante foi coletado para os ensaios. Para todas as classes de enzimas avaliadas, exceto para as proteases, uma mistura de inibidores de protease foi utilizada nos tampões de reação compostos pelos seguintes componentes (Sigma-Aldrich) nas concentrações finais indicadas: E-

64 (20 μM , N-trans-epoxissuccinil-L-leucina4-guanidinobutilamida), pepstatina A (20 μM) e PMSF (10 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride). A concentração de proteínas foi determinada usando o Pierce™ BCA Protein Assay Kit (SMITH *et al.*, 1985), de acordo com as instruções do fabricante (ThermoFisher Scientific), usando a albumina de soro bovino (BSA) para a curva padrão. Ensaios de quantificação enzimática e de proteína foram realizados usando cada amostra de intestino médio individual testado em duplicata. Cada ensaio foi repetido pelo menos três vezes com um mínimo de quinze insetos por réplica biológica. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de produto/min.

Figura 7 – Sistema digestivo de larvas de mosquito.



Fonte: Adaptado de Clements (1992) por Nascimento, N. A. (2020).

Nota: A: Desenho esquemático do canal alimentar de larva de mosquito. B: Imagem composta por fotos de microscopia confocal do tubo digestivo de larva de *Culex quinquefasciatus* destacando as regiões do intestino médio. Cá: cárdia. CA: canal anal. CG: cecos gástricos. Ep: espaço peritrófico. Es: esôfago. Fa: faringe. IA: intestino anterior. IM: intestino médio. IP: intestino posterior. Lu: lúmen intestinal. Mc: membrana cecal. Mp: membrana peritrófica. Pi: piloro. RA: região anterior. RM: região média. RP: região posterior. TM: túbulos de Malpighi. 1-8: segmentos abdominais.

7.2.2 Ensaios de atividade lipase

A atividade de lipases (EC 3.1.1.34) foi medida em amostras de intestino médio inteiro usando ensaios contínuos com detecção de fluorescência. Cinco diferentes substratos (Sigma-Aldrich) foram testados nas concentrações finais indicadas: 4-metilumbeliferil acetato (10 μ M), 4-metilumbeliferil butirato (10 μ M), 4-metilumbeliferil heptanoato (10 μ M), 4-metilumbeliferil palmitato (100 μ M; BioChemika Fluka) e 4-metilumbeliferil oleato (100 μ M). Cada intestino médio foi homogeneizado em 100 μ L de solução salina (0,9%) contendo o mix de inibidores de proteases. A reação foi composta pela amostra do intestino médio (20 μ L para acetato, butirato e heptanoato; 25 μ L para oleato; 40 μ L para palmitato), cada substrato nas concentrações finais indicadas em um volume final de reação de 200 μ L de tampão Tris-HCl 200 mM (pH 8,5), em placas de 96 poços. As reações foram incubadas a 30 °C por 20 min (acetato, butirato e oleato) ou por 60 min (heptanoato e palmitato). A detecção de fluorescência do produto de catálise, a 4-metilumbeliferona, foi registrada continuamente em λ_{exc} 360 nm de excitação e λ_{em} 449 nm de emissão, no leitor de microplacas de 96 poços SpectraMax Gemini.XPS™ (Molecular Devices San Jose, CA, EUA). A quantidade de produto de catálise liberada da reação foi calculada usando uma curva padrão de 4-metilumbeliferona (0,1-2 nmol), registrada sob as mesmas condições das amostras. Um número total de 41 a 48 amostras individuais do intestino médio foi analisado por colônia.

7.2.3 Ensaios de atividade α -glicosidase

A atividade de α -glicosidases (E.C. 3.2.1.20) foi determinada em amostras individuais de intestino médio que foram homogeneizadas em 100 μ L de tampão citrato-fosfato 200 mM pH 6,5 contendo 1% (v/v) Triton-X e o mix de proteases supracitado. A atividade foi medida usando o substrato natural sacarose (Sigma-Aldrich) ou o substrato sintético MU α Glu (4-metilumbeliferil α -glucopiranosídeo, Sigma-Aldrich). A reação foi composta pela amostra de intestino médio (50 μ L), em uma concentração final de 0,4 mM de MU α Glu e volume de reação final de 200 μ L de tampão citrato-fosfato 200 mM pH 6,5, que foi incubada por 1 h a 30 °C. A quantidade de 4-metilumbeliferona liberada foi determinada continuamente em excitação λ_{exc} 355

nm e emissão λ 460 nm (PROFETA *et al.*, 2017), no leitor de microplacas SpectraMax Gemini XPS™. A quantidade de produto de reação liberada foi calculada a partir de uma curva padrão de 4-metilumbeliferona (0,3-6 nmol) registrada sob as mesmas condições que as amostras de teste. Para os ensaios usando sacarose como substrato, a reação foi composta pela amostra do intestino médio (20 μ L), em uma concentração final de 200 mM de sacarose e volume de reação final de 50 μ L de tampão citrato-fosfato 200 mM (pH 6.5), que foi incubada a 30 °C por diferentes períodos (COSTA *et al.*, 2019). As reações foram interrompidas em diferentes intervalos (0, 90, 180 ou 240 min) fervendo as amostras a 99 °C por 5 min. A quantidade de glicose liberada foi determinada com o kit glicose mono-reagente (Bioclin, K082), que se baseia na reação da glicose oxidase. Para isso, o reagente glicose oxidase (200 μ L) foi adicionado à amostra da reação (50 μ L) e incubado a 37 °C por 15 min (COSTA *et al.*, 2019; RAABO; TERKILDSEN, 1960). As placas foram lidas a 505 nm no SpectraMax 190™ (Molecular Devices San Jose, CA, EUA). A quantidade de produto de reação liberado foi determinada usando uma curva padrão de glicose (10-100 nmol), registrada sob as mesmas condições das amostras de teste. Um número total de 38 a 46 amostras individuais do intestino médio foram analisadas por colônia.

7.2.4 Ensaios de atividade protease

A atividade de proteases (E.C. 3.4) em amostras de intestino médio foi determinada através de um ensaio contínuo usando três substratos diferentes (Sigma-Aldrich): N-Succinil-Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metilcumarina (para quimotripsinas), Z-Phe-Arg-7-amido-4-metilcumarina (para tripsinas) e L-Leu-7-amido-4-metilcumarina (para aminopeptidases). O intestino médio foi homogeneizado em 100 μ L de solução salina (0,9%). A reação foi composta por uma alíquota de amostra de intestino médio (20 μ L para Ala-Ala-Phe e L-Leu e 40 μ L para Z-Phe-Arg), para uma concentração final de 10 μ M de cada substrato, em uma reação com volume final de 200 μ L em tampão 200 mM Tris-HCl (pH 8), que foi incubado a 30 °C por 1 h. O ensaio enzimático baseou-se na detecção contínua do ácido metilcumarínico (MCA) liberado a partir da hidrólise do substrato, que foi registrado na excitação de λ 380nm e emissão de λ 460nm no leitor de microplacas SpectraMax Gemini XPS™. A quantidade de produto liberado foi calculada a partir de uma curva padrão (0,01-0,2 nmol) de

metilcumarina (Sigma-Aldrich), registrada sob as mesmas condições de amostra. Um número total de 45 a 51 amostras individuais do intestino médio foram analisadas por colônia.

7.2.5 Ensaios de atividade Glutathione-S-Transferase

A atividade das enzimas detoxificadoras Glutathione-S-Transferases (GST) (E.C. 2.5.1.18) foi medida em ensaio contínuo utilizando com amostras individuais de intestino médio preparadas em 100 μ L de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,5), contendo o mix de inibidores de protease citado. A reação foi composta por uma amostra de intestino médio (15 μ l), pelos substratos 1 cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB) e glutathione reduzida (GSH) em concentração final de 100 μ M de cada, e volume final de reação de 210 μ l de tampão fosfato potássio 100 mM (pH 6,5). O registro da absorbância a 340 nm foi realizado no espectrofotômetro leitor de placas SpectraMax™ Gemini XPS Microplate Reader. Para este ensaio foram utilizados controles, sem conter amostras de intestinos, que foram incubados sob a mesma condição. Os parâmetros para converter os valores de absorbância em quantidade de produto liberado (nmoles/intestino/min) foram realizados como descrito em Brasil, 2006.

7.3 ENSAIOS DE QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS

A quantificação de lipídios foi realizada em trinta *pools* de 20 larvas de quarto instar e em trinta fêmeas individuais recém-emergidas (em até 20 h após a muda) das colônias CqS e resistente CqRIAB59. Para tal foi usado o método colorimétrico de vanilina-ácido fosfórico, que determina os lipídios totais, adaptado de protocolos anteriores (VAN HANDEL, 1985). As amostras (*pool* de 20 larvas ou uma fêmea) foram homogeneizadas sob gelo em 200 μ L de sulfato de sódio a 2%. Uma alíquota de clorofórmio-metanol (proporção 1:1, 800 μ L) foi adicionada e a amostra foi centrifugada (3000 x g, 5 min) à temperatura ambiente (TA) e o sobrenadante foi descartado. Em seguida este procedimento foi repetido mais uma vez e o sobrenadante foi coletado. Uma alíquota de água ultrapura (600 μ L) foi adicionada a este sobrenadante coletado e a amostra foi centrifugada (3000 x g, 5 min, TA). Após

a centrifugação, a amostra apresentou duas fases e a fase inferior foi coletada para análise lipídica. A amostra foi transferida para um tubo de ensaio e levada a um bloco de aquecimento (90-110 °C) para a evaporação do solvente. Em seguida uma alíquota de ácido sulfúrico (98%, 200 µL) foi adicionada a amostra e incubada a 100 °C por 10 min. Ainda no bloco aquecedor o reagente vanilina-ácido fosfórico, preparado de acordo com Van Handel (1985), foi adicionado à amostra (q.s.p 5 mL), e homogeneizado delicadamente. Remover a amostra do bloco aquecedor e colocar recipiente com gelo por 5 min para permitir resfriamento e o desenvolvimento de uma coloração vermelha por 5 min. Uma alíquota de 1 ml da amostra foi utilizada para leitura da absorbância a 525 nm no espectrofotômetro UltroSpec2100™ (Amershan Biosciences). A quantidade de lipídios foi determinada a partir de uma curva padrão (25-300 µg) utilizando óleo de soja comercial (Liza®), composto principalmente por triglicerídeos, que foi determinada sob as mesmas condições da amostra-teste.

7.4 ENSAIOS DE QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

A quantificação de açúcares redutores foi determinada em 15 *pools* de quarenta larvas de quarto instar e quinze *pools* de cinco fêmeas recém-emergidas (20 h) das colônias CqS e resistente CqRIAB59, com protocolo adaptado de Yamada *et al.*, 2018. As amostras (*pool* de quarenta larvas ou *pool* de cinco fêmeas) foram homogeneizados sob gelo com uma mistura de 200 µL de metanol, água ultrapura e clorofórmio (2:1:1). As amostras foram incubadas (-30 °C, 30 min) e em seguida centrifugadas (21.000 x g, 20 min, 4 °C). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol absoluto ultrapuro (300 µl) e seco à TA. Na sequência, foi adicionada uma alíquota de 400 µL de tampão PBS-fosfato salina 0,2X (PBS 1X 2,1 mM NaH₂PO₄, 14 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4) com Triton X-100 0,1% e a mostra foi incubada a 70 °C por 30 min. Após esta etapa cada amostra foi subdividida em duas amostras teste e controle negativo de 200 µL. A amostra teste foi incubada com amiloglucosidase (Sigma-Aldrich) a uma concentração final de 0,5 mg/ml, a 60 °C por 30 min. O controle negativo (200 µL) sem a enzima foi incubado sob as mesmas condições. Para interromper a reação, foi adicionado o ácido dinitrosalicílico (500 µL) e, em seguida, as amostras foram incubadas a 100 °C por 6 min. Após este período, as amostras foram resfriadas em gelo por 15 min (LIMA *et al.*, 2014). Uma alíquota de 400 µl de cada amostra (teste e controle negativo) foi utilizada

para leitura de absorvância a 540 nm em placas de 96 poços no espectrofotômetro Benchmark Plus™ (Bio-Rad). Os valores de absorvância da amostra tratada e controle foram convertidos em concentração de glicose (Sigma-Aldrich) a partir de uma curva padrão (0,06-3 mg/ml), que foi registrada sob as mesmas condições da amostra-teste. Em seguida a concentração de açúcares redutores liberados foi obtida a partir da variação do valor da amostra teste e controle negativo.

7.5 ENSAIOS DE FECUNDIDADE E FERTILIDADE

A fertilidade e a fecundidade foram avaliadas utilizando fêmeas criadas em condições ideais, descritas anteriormente (MENEZES *et al.*, 2021) ou criadas sob condições de estresse das colônias suscetível e resistente CRIAB59. Resumidamente, as condições ótimas foram as seguintes: larvas de primeiro estágio de uma jangada (~ 250 ovos) foram mantidas em um recipiente de plástico (21,5 L x 29 L x 5,5 A cm), com água da torneira (1 L) e alimentação (0,8 g de ração de gato), fornecida durante o dia 0 (0,1 g), dia 4 (0,3 g) e dia 8 (0,4 g). Para simular a condição de estresse, 600 larvas de primeiro instar por bandeja foram mantidas nas condições descritas acima. Os adultos obtidos foram mantidos em condições de insetário conforme descrito em 7.1. Fêmeas de cinco dias de idade foram alimentadas com sangue de coelho defibrinado. As jangadas de ovos de seu primeiro ciclo gonadotrófico foram coletadas em até 24 horas após a oviposição. A fertilidade e a fecundidade foram avaliadas aos 0, 3, 5 e 8 dias pós-oviposição (dpo). Para avaliar a quiescência, durante esses tempos de armazenamento, as jangadas foram mantidas em câmara úmida (placa de Petri, 60 x 15 mm) à TA. Para cada jangada, o número de ovos foi registrado em microscópio estereoscópico e, a seguir, a jangada foi colocada no recipiente de criação com água da torneira (1 L) e ração (0,1 g). A jangada foi mantida em condições de insetário para a eclosão das larvas. A fecundidade foi determinada com base na eclosão das larvas de primeiro estágio, em até 36 horas após a jangada ser colocada no recipiente de criação. No ensaio, cada ponto experimental foi realizado em duplicata (pelo menos duas jangadas de ovos /por condição/ por colônia). Portanto, pelo menos 32 jangadas de ovos (16/colônia) foram analisadas por ensaio e cada ensaio foi realizado pelo menos duas vezes.

7.6 ANÁLISE *IN SILICO* DE PANTETEINASES de *Cx. quinquefasciatus*

Foi realizada uma busca em bancos de dados afim de obter informações básicas sobre a proteína panteteinase (CPIJ017593). No Vectorbase (www.vectorbase.org) foi possível obter dados do gene, ortólogos, peso predito e alinhamentos. Foi realizada a análise da predição de âncora GPI no big-PI Predictor 3.0 (https://mendel.imp.ac.at/gpi/cgi-bin/gpi_pred.cgi) (EISENHABER; BORK; EISENHABER, 1999). No software NetNGlyc 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>), foram realizadas predições de N-glicosilação e O-glicosilação.

7.7 CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PANTETEINASE CPIJ017593

Para a caracterização da panteteinase de *Cx. quinquefasciatus* codificada pelo gene CPIJ017593 foi feita inicialmente uma etapa de clonagem e expressão deste gene em *Escherichia coli* cepa BL21 star, conforme protocolo descrito (ROMÃO *et al.*, 2006). Esta etapa foi executada por Dra. Tatiana Rezende, uma das orientadoras deste trabalho. O objetivo desta etapa foi obter anticorpos policlonais para realização de ensaios de imunodeteção. Neste procedimento as proteínas recombinantes com cerca de 70 kDa foram produzidas, purificadas e sua identidade foi confirmada por espectrometria de massas MALDI-TOF (T. Rezende, comunicação pessoal). Uma amostra de cerca de 1.2 mg de proteína recombinante foi utilizada como antígeno para a produção de anticorpos policlonais em coelhos pela empresa Célula B (www.celulab.org.br).

A expressão heteróloga da panteteinase foi realizada em linhagem de células de tecido ovariano do lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (Sf9). Este sistema é capaz de produzir proteínas com enovelamento e modificações pós-traducionais das proteínas nativas eucarióticas. O gene da panteteinase (CPIJ017593) foi subclonado no plasmídeo pIZT/V5-His® (Invitrogen) que possui as seguintes características: promotor constitutivo para a expressão gênica; gene marcador de resistência para o antibiótico zeocina®; gene codificador da GFP (*Green Fluorescent Protein*), epitopo V5 e cauda de poli-histidina (INVITROGEN, 2013). As células foram mantidas de acordo com instruções do fabricante (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Insect_Cell_Lines). Em resumo,

os cultivos celulares em monocamada aderente foram mantidos a 27 °C em meio Sf900®II (Gibco) sem conter soro fetal bovino e suplementado com gentamicina (10 µg/mL), zeocina® (150 µg/mL) e fungizone® (250 µg/mL). A transfecção com as minipreparações contendo os plasmídeos recombinantes pIZT nas células foi feita utilizando o reagente *Cellfectin*® (Invitrogen), segundo Ferreira *et al* (2014). Resumidamente, as células foram mantidas em meio Sf-900 II SFM (Gibco®) até a confluência, e cada reação de transfecção foi realizada com 7,5 µg de minipreparações plasmidiais e 4% de *Cellfectin*™ (Invitrogen), em frascos de cultura de 25 cm². Quarenta e oito horas após esse procedimento, os cultivos celulares foram selecionados com o antibiótico zeocina® (entre 150 e 300 µg/mL) (Invitrogen), para o estabelecimento de linhagens tranfectadas com o plasmídeo e que possuem o gene marcador de resistência a esse antibiótico. A expressão da proteína da panteteinase foi realizada sob a forma secretada, pois a sequência do gene inserido foi desenhada excluindo a sequência nucleotídica codificadora dos últimos 15 aminoácidos localizados na porção C-terminal que, potencialmente, conteria uma sinalização de ancoragem via GPI na membrana celular.

7.8 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE PANTEINASES RECOMBINANTES E NATIVAS

Para avaliar a expressão da panteteinase recombinante pelas linhagens tranfectadas foram analisadas as amostras descritas a seguir: amostra do meio total de um cultivo celular em confluência (1 ml) precipitada pelo ácido tricloroacético (TCA a 10%) segundo Ferreira *et al.* (2014); amostras do meio de cultivo celular em confluência submetidos à protocolo de purificação e proteínas usando a resina Ni-NTA®(QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante. As seguintes amostras de larvas de *Cx. quinquefasciatus* foram utilizadas para investigar a presença de panteteinases nativas: microvilli intestinal (BBMF) de larvas de quarto estágio dissecadas (NIELSEN-LEROUX *et al.*, 1992) a partir de larvas inteiras (SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997); extrato total de larvas (1-3 indivíduos) ou de intestinos dissecados (1-5 tubos digestivos com conteúdo intestinal), homogeneizados em tampão PBS (15 ul) contendo um mix de inibidores de proteases (Roche, cód.

11697498001). As amostras foram submetidas a SDS-PAGE 10% e visualizadas com azul de Coomassie ou submetidas à imunodeteção (seção 7.9).

7.9 ENSAIOS DE IMUNODETEÇÃO

As amostras de proteínas descritas na seção 7.8 foram separadas eletroforéticamente em SDS-PAGE 10%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose Protam Premium NC™ (Amershan, cod. 10600008) e submetidas à imunodeteção com os anticorpos primários descritos a seguir: anticorpo comercial monoclonal anti-Poli-histidina (anti-His) feito em camundongo (Sigma-Aldrich, H1029); anticorpo policlonal anti-panteteinase (anti-Pan) feito em coelho conforme descrito na seção 7.7. Para o seu uso nos ensaios de imunodeteção, o soro imune total anti-Pan foi purificado parcialmente por imunoabsorção, em nosso laboratório, utilizando o antígeno usado na imunização (DHALLIA *et al.*, 2005; MINSHALL; THOM; STANDART, 2001). A imunodeteção foi realizada em membranas de nitrocelulose bloqueadas em tampão TBS-T (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,6) contendo 5% de leite desnatado (Molico®) à TA, por 1 h sob leve agitação. As membranas foram incubadas em TBS-T com o anticorpo primário (anti-His 1:5000 ou anti-pan 1:100) e, em seguida, com os respectivos anticorpos secundário (1:10.000) anti-IgG de coelhos ou anti-IgG de camundongo. Após o bloqueio, e entre as incubações com os anticorpos, as membranas foram extensivamente lavadas com o tampão TBS-T. As membranas foram submetidas à reação de quimioluminescência usando o reagente Imobilon-Forte™ (Millipore), segundo as instruções do fabricante, e o sinal foi registrado no iBright™ CL1000 Imaging System (Thermo Fisher Scientific).

7.10 ENSAIOS DE DEGLICOSILAÇÃO

Dados prévios da literatura indicam que panteteinases de humanos possuem N-glicosilações, ou sejam, recebem a adição de carboidratos ao nitrogênio das cadeias laterais de asparagina ou arginina. A presença de N-glicosídeos na estrutura das panteteinases recombinantes, produzidas em células Sf9, foi analisada através de ensaios *in vitro* baseada no tratamento com a enzima endoglicosidase PNGase F (New England Biolabs), que tem a capacidade específica de remover tais oligossacarídeos de glicoproteínas. Assim, amostras de panteteinases recombinantes

(20 µg), desnaturadas de acordo com protocolo do fabricante, ou amostras não desnaturadas, foram avaliadas usando protocolos do fabricante com adaptações no tempo de incubação e quantidade de enzima utilizada. As amostras desnaturadas foram incubadas com a PNGase F, a 37 °C por 4 h. As amostras não desnaturadas foram incubadas com PNGase F, a 37 °C overnight. A proteína recombinante Aam1 de *Ae. aegypti* dotada de N-glicosídeos (NASCIMENTO *et al.*, 2017), previamente produzida em linhagem Sf9 e disponível no laboratório, foi utilizada como um controle positivo da reação. As amostras de proteínas incubadas sob as mesmas condições, mas sem PNGase F, foram utilizadas como controle negativo da reação. Após a reação, as proteínas foram submetidas a SDS-PAGE para comparar o peso molecular aparente antes e após o tratamento.

7.11 ENSAIOS DE RT-qPCR

A avaliação quantitativa do padrão de transcrição da panteteinase em amostras individuais de larvas das colônias suscetível e resistente REC de *Cx. quinquefasciatus* foi feita por reações de RT-qPCR. O RNA total de cada larva foi extraído utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e qualidade das amostras foi determinada pelo Nanodrop 2000® (Thermo Scientific) e a concentração das amostras foi normalizada para 25 ng/µl e foram utilizados 100 ng de RNA na reação. As amostras de RNA de cerca de 13 larvas de 4^o estágio das colônias suscetível e REC foram extraídas individualmente. Para as reações de RT-qPCR foram utilizados primers específicos (5'-3'), apresentados no quadro 3, do gene alvo panteteinase (CPIJ017593), gene *cqm1* (CPIJ013173) marcador de resistência e gene endógeno da subunidade ribossômica 18S usado como controle endógeno da reação. As reações foram realizadas utilizando o kit QuantiTect® SYBR Green RT-PCR® (QIAGEN, código 204243) para as reações de qPCR one-step, segundo instruções do fabricante. As reações foram feitas com a enzima transcriptase reversa, RNA das larvas (100 ng), primers específicos para o gene alvo e para o gene do controle endógeno (0,2 µM/primer *forward* e *reverse*). As reações foram realizadas no equipamento ABI 7500® (Applied Biosystems) disponível no NPT do IAM-FIOCRUZ. 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 CT (*Cycle Threshold*) comparativo utilizando uma amostra de RNA da

colônia S como referência-calibrador, em cada placa de reação avaliada. Neste caso, a amostra de RNA de referência foi escolhida baseada em uma amostra de RNA cujos valores de ΔCt foram os mais próximos possíveis a média de ΔCt de um grupo representativo de larvas suscetíveis analisadas.

Quadro 3 – *Primers* utilizados na reação de RT-qPCR

Primer	Sequência (5'-3')
18S	<i>Forward</i> CGCGGTAATTCCAGCTCCACTA <i>Reverse</i> GCATCAAGCGCCACCATATAGG
<i>panteteinase</i> (CPIJ017593)	<i>Forward</i> TCTTTGCCTGCACCGGGACCA <i>Reverse</i> CGAATGGTTTGCCATCCTTCGT

7.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 6.0. O teste de normalidade D'Agostino-Pearson Omnibus K2 foi usado para determinar a que distância a distribuição está da Gaussiana, em termos de assimetria e forma. Para amostras paramétricas, os “outliers” foram identificados pelo método ROUT com base na taxa de descoberta falsa (FDR). Para a comparação de dados com distribuição normal, foi usado o teste T não pareado e a significância foi considerada para $p < 0,05$. Para comparação de dados sem distribuição normal, foi usado o teste de Mann-Whitney e significância foi considerada para um valor de $p < 0,05$. Os resultados foram apresentados através de médias e seus respectivos desvios-padrão.

8 RESULTADOS

Neste estudo foram investigados dois tópicos. O primeiro compreende a avaliação comparativa de moléculas de *Cx. quinquefasciatus* resistentes e suscetíveis, as toxinas de *Lysinibacillus sphaericus*, cuja função é conhecida e inclui a determinação de atividade enzimática, quantificação de reservas energéticas relacionadas à parte das enzimas avaliadas e avaliação de parâmetros biológicos de *Cx. quinquefasciatus* relacionados por sua vez a estas reservas. O segundo tópico abrange a identificação de uma panteteinase de *Cx. quinquefasciatus* cujo destacado status de repressão em indivíduos resistentes, maior do que o próprio gene marcador de resistência, apontou a necessidade de investigar esta proteína ainda desconhecida nesta espécie, e sem conhecimento prévio de seu possível papel na resistência.

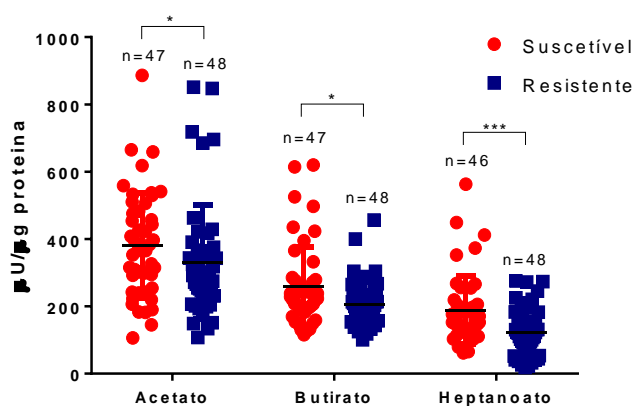
8.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LIPASES, A-GLICOSIDASES, PROTEASES E GSTs

Para avaliar se o padrão de expressão diferencial de genes de grupo de enzimas observado no transcriptoma de larvas resistentes (REZENDE *et al.*, 2019) está associado a alterações de algumas enzimas, a atividade lipase, α -glicosidase, protease e GST foram determinadas em extratos de intestinos de larvas resistentes e suscetíveis. Dados de transcriptoma em intestino de larvas resistentes da colônia RIAB59 apresentaram uma sub expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios, que incluíram lipases. Assim, a atividade das lipases foi registrada tanto para as larvas da colônia resistente, quanto para as da colônia suscetível, usando cinco substratos que diferem no comprimento da cadeia e presença/ausência de insaturação (Figura 8). Os resultados mostraram que a atividade específica ($\mu\text{U}/\mu\text{g}$ proteína) foi decrescente para acetato, butirato, heptanoato, oleato e palmitato. A comparação entre elas mostrou que as larvas resistentes tiveram uma atividade específica de lipase significativamente menor quando comparadas aos controles suscetíveis para MU-acetato ($R= 330 \pm 20$, $S= 380 \pm 20$), MU-butirato ($R= 206 \pm 9,0$, $S=250 \pm 10$) e MU-heptanoato, que apresentou a redução mais significativa ($R=120 \pm 10$, $S=180 \pm 10$) (Figura 8A). A atividade específica para MU-oleato foi menor em larvas resistentes ($R= 3,0 \pm 0,4$) quando comparada às suscetíveis ($S= 6,0 \pm 2,0$),

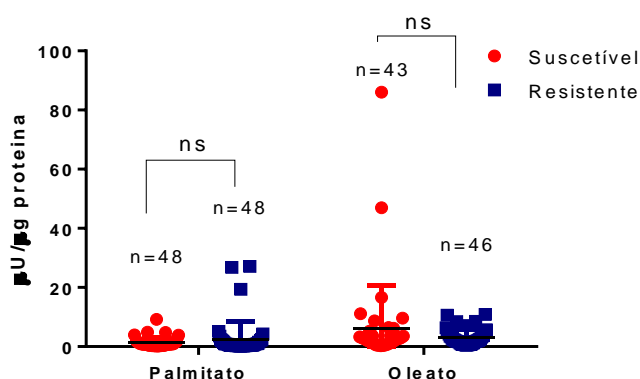
enquanto para MU-palmitato a atividade foi maior em larvas resistentes ($R= 2,5 \pm 0,8$, $S=1,3 \pm 0,2$). No entanto, as diferenças para as atividades detectadas a partir dos dois últimos substratos não foram estatisticamente significativas (Figura 8B). Os resultados mostraram que as larvas da colônia resistentes em geral tiveram atividades de lipase reduzidas, quando comparadas com a colônia suscetível. Os dados brutos estão disponíveis no Apêndice F, tabela suplementar 1.

Figura 8 - Atividade específica de lipases ($\mu\text{U}/\mu\text{g}$ proteína) em intestino médio de larvas individuais de quarto ínstar de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia suscetível (vermelho) e uma resistente a toxina Binária (azul), usando diferentes substratos.

A



B



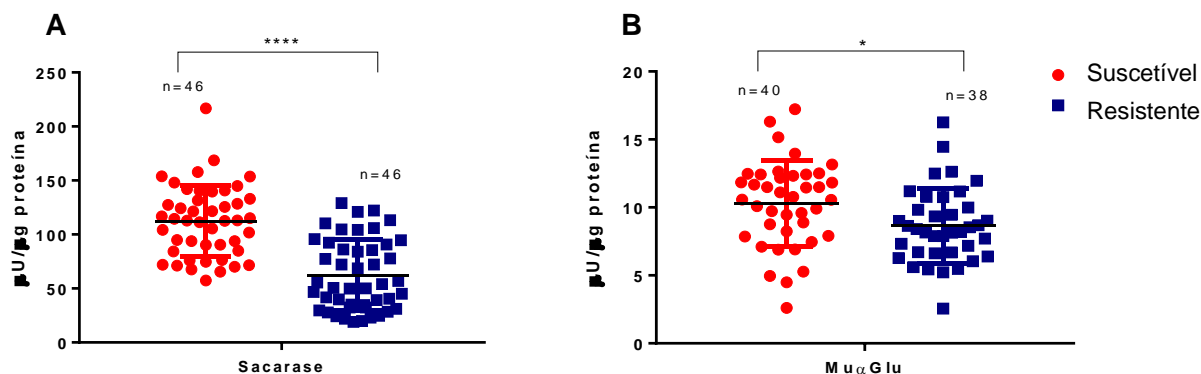
Fonte: a autora

Nota: A. Acetato, Butirato e Heptanoato. B. Palmitato e Oleato. Os resultados são a média \pm DP de quatro réplicas biológicas. Teste de Mann-Whitney, diferenças estatísticas de *** $p < 0,001$, * $p < 0,01$, ou ns= não significativo.

A atividade de α -glicosidase foi investigada no intestino das larvas pois o receptor Cqm1 da toxina Bin, que não é expresso nas larvas resistentes, é uma α -

glicosidase e sua ausência poderia ter um impacto na atividade total no intestino dos insetos e, conseqüentemente, em outros fatores. A atividade da α -glicosidase foi detectada em larvas de ambas as colônias utilizando um substrato sintético (MU α Glu) e um substrato natural (sacarase). A atividade específica (μ U/ μ g proteína) a partir da sacarase foi maior comparado a atividade do substrato sintético nas duas colônias analisadas (Figura 9). Já a comparação entre as colônias mostrou que a atividade sobre a sacarose foi notavelmente menor nos indivíduos resistentes (62 ± 5), quando comparados aos suscetíveis (112 ± 4) (Figura 9A). Para o substrato sintético (MU α Glu) essa atividade também foi menor em indivíduos resistentes ($8,6 \pm 0,4$) e quando comparadas com os suscetíveis ($10,3 \pm 0,5$) (Figura 9B). Os dados brutos estão disponíveis no Apêndice F, tabela suplementar 2.

Figura 9 - Atividade específica de α -glicosidases (μ U/ μ g proteína) em intestino médio individual de larvas individuais de quarto ínstar de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia suscetível (vermelho) e uma resistente a toxina Binária (azul).



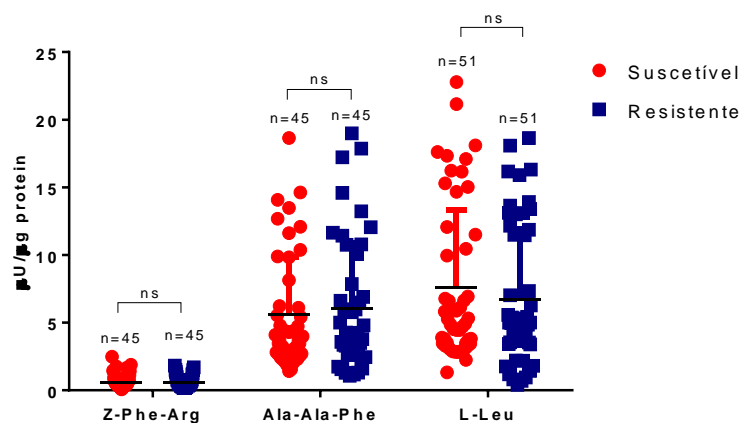
Fonte: a autora.

Nota: A. sacarose. B. 4-Metilumbeliferil α -glucopiranosídeo (MU α Glu). Os resultados são a média \pm DP de três réplicas biológicas. Teste de Mann-Whitney, diferenças estatísticas de **** $p < 0,0001$, * $p < 0,01$.

A investigação da atividade protease é relevante no contexto deste estudo pois estas são enzimas necessárias para ativação da protoxina Binária em toxina ativa e alterações na sua atividade poderia causar falhas de ação da toxina. Além disso, as proteases estão envolvidas em outros processos fisiológicos relevantes, como homeostase e resposta imune que podem estar relacionados com o *status* de resistência dos insetos às toxinas estudadas. A atividade das três principais proteases encontradas no intestino médio larval, tripsina (substrato Z-Phe-Arg-MCA), quimotripsina (substrato Ala-Ala-Phe_MCA) e aminopeptidase (substrato L-Leu-MCA)

foi registrada em larvas de ambas as colônias (Figura 10). Ao comparar as taxas de hidrólise dos três substratos, as atividades de quimotripsinas e aminopeptidases foram maiores do que as tripsinas, em larvas das duas colônias. As análises comparativas entre as colônias mostraram atividade específica ($\mu\text{U}/\mu\text{g}$ proteína) semelhante para todos os substratos, uma vez que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas como seguem: Z-Phe-Arg-MCA ($R= 0,59 \pm 0,06$, $S= 0,60 \pm 0,08$), Ala-Ala-Phe-MCA ($R= 6,1 \pm 0,7$, $S= 5,6 \pm 0,6$), L-Leu-MCA ($R= 6,7 \pm 0,7$, $S= 7,6 \pm 0,8$) (Figura 10). Os dados brutos estão disponíveis no Apêndice F, tabela suplementar 3.

Figura 10 - Atividade específica de proteases ($\mu\text{U}/\mu\text{g}$ proteína) em intestino médio individual de larvas individuais de quarto ínstar de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia suscetível (vermelho) e uma resistente a toxina Binária (azul).

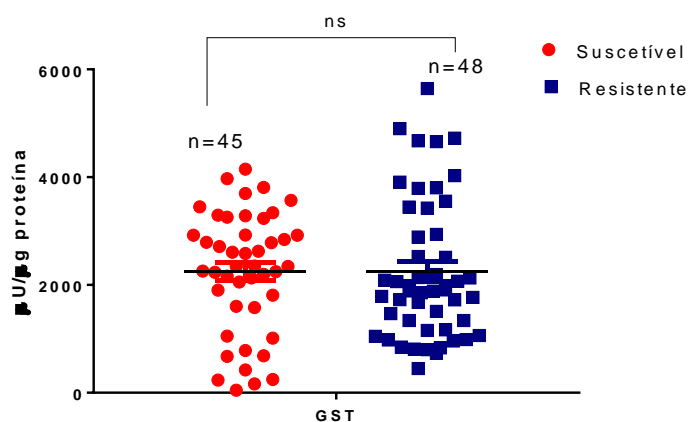


Fonte: a autora.

Nota: substratos para tripsinas (Z-Phe-Arg), quimotripsinas (Ala-Ala -Phe) e aminopeptidases (L-Leu). Os resultados são a média \pm DP de três réplicas biológicas. Teste de Mann-Whitney, não foram encontradas diferenças estatísticas (ns).

As GSTs são proteínas de uma importante e ampla família de enzimas detoxificadoras, e seu envolvimento na metabolização de inseticidas químicos pelos insetos que pode levar à resistência é bem documentada na literatura. Por outro lado, o seu envolvimento no processo de metabolização de toxinas bacterianas para insetos, a exemplo das toxinas de *L. sphaericus* e toxinas de Bt são escassos. Os dados desta avaliação mostraram que a atividade específica ($\mu\text{U}/\mu\text{g}$ proteína) de GSTs foi estatisticamente similar entre larvas resistentes e suscetíveis sendo a atividade específica de 2.246 ± 189.7 e 2.252 ± 165.8 , respectivamente (Figura 11). O sumário das análises estatísticas das avaliações de atividades enzimáticas realizadas neste estudo está apresentado na Tabela 1. Os dados brutos estão disponíveis no Apêndice F, tabela suplementar 4.

Figura 11 - Atividade específica de Glutaciona-S-transferase ($\mu\text{U}/\mu\text{g}$ proteína) em intestino médio de larvas individuais de quarto ínstar de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia suscetível (círculos vermelhos) e uma resistente à toxina Binária (quadrados azuis).



Fonte: a autora.

Nota: Os resultados são a média \pm DP de três réplicas biológicas. Teste de Mann-Whitney, não foram encontradas diferenças estatísticas (ns).

8.2 RESERVAS ENERGÉTICAS

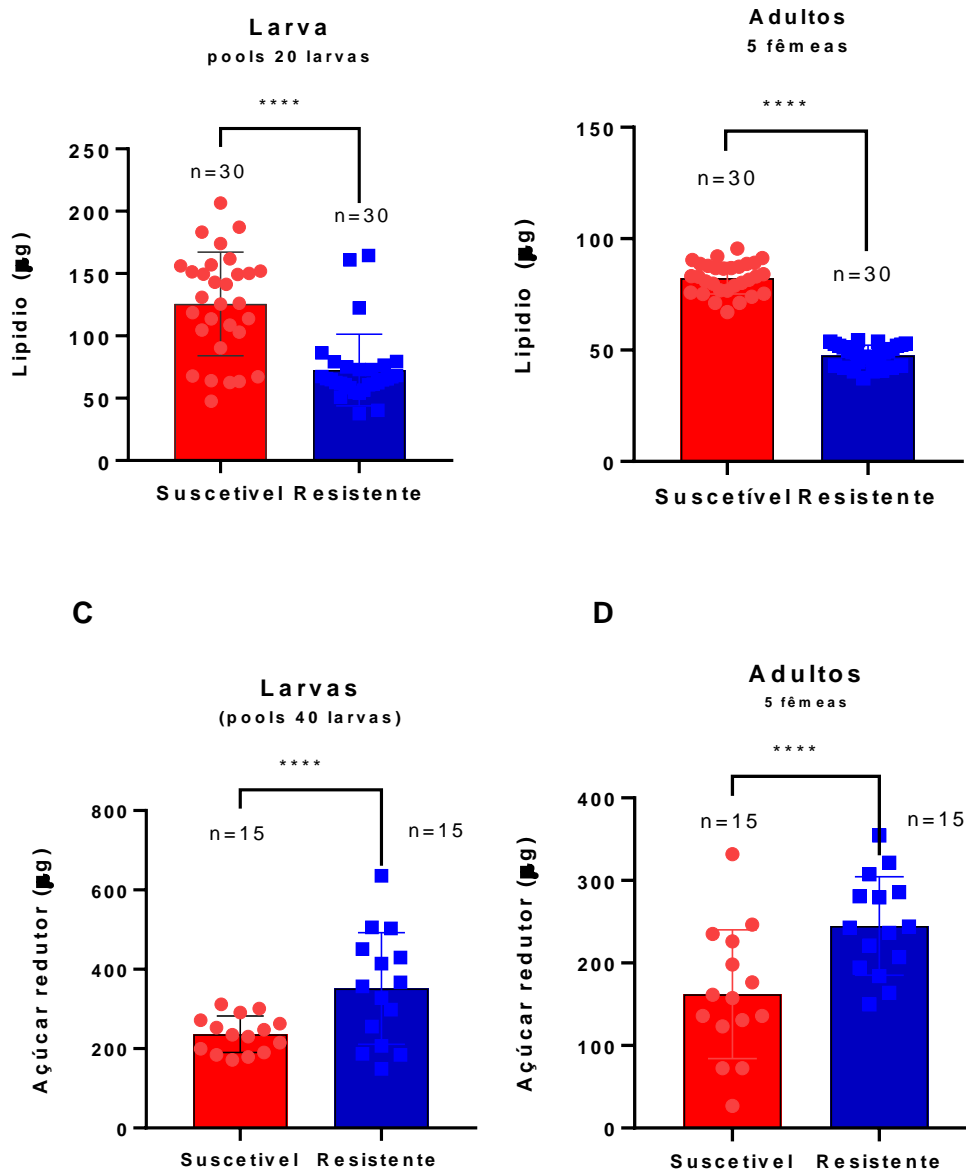
A quantificação de lipídios e açúcares redutores de larvas e adultos foram realizadas para investigar se as diferenças na expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios e carboidratos, e a atividade alterada de algumas enzimas, entre as colônias resistentes e suscetíveis (Figura 12), afetaria os recursos energéticos desses insetos. Os *pools* de 20 larvas resistentes apresentaram uma quantidade significativamente menor (μg) de lipídios ($72,5 \pm 6$) quando comparadas às larvas suscetíveis ($125,69 \pm 9$) (Figura 12A). A reserva lipídica em adultos resistentes também foi significativamente menor ($47,5 \pm 1$) quando comparada aos suscetíveis ($82,3 \pm 1$) (Figura 12B). As reservas de açúcares redutores (μg) também foram diferentes entre as colônias. Neste caso, tanto larvas resistentes ($351,5 \pm 36$) quanto adultos resistentes (245 ± 15) apresentaram maior quantidade de açúcares redutores em comparação com larvas suscetíveis ($236,3 \pm 12$) e adultos ($162,8 \pm 20$), respectivamente (Figura 12C e 12D). Em geral, os indivíduos resistentes apresentaram 58% menos lipídios e 33% mais reservas de açúcares redutores do que os suscetíveis. Os dados brutos estão disponíveis no Apêndice F, tabelas suplementares 5 e 6.

Tabela 1 – Sumário das análises estatísticas comparativas da atividade de enzimas detectadas em amostras de intestinos de larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis e resistentes à toxina Binária.

	Normalidade		Outliers		Teste estatístico	Significância ($p < 0.05$)	Valor p
	Suscetível	Resistente	Suscetível	Resistente			
Lipases							
Acetato	Não	Não	NA	NA	Mann-Whitney	*	0.0337
Butirato	Não	Não	NA	NA	Mann-Whitney	*	0.0172
Heptanoato	Não	Sim	NA	Não	Mann-Whitney	***	0.0002
Palmitato	Não	Não	NA	NA	Mann-Whitney	ns	NA
Oleato	Não	Não	NA	NA	Mann-Whitney	ns	NA
Glicosidase							
M α Gli	Sim	Sim	Não	Não	Teste T	*	0.0151
Sacarase	Sim	Não	Não	NA	Mann-Whitney	****	0.0001
Proteases							
Z-Phe-Arg	Não	Não	NA	NA	Mann-Whitney	ns	NA
Ala-Ala-Phe	Não	Não	NA	NA	Mann-Whitney	ns	NA
L-leu	Não	Não	NA	NA	Mann-Whitney	ns	NA
Lys-Ala	Sim	Sim	Não	Não	Teste T	ns	NA
Caspase 3	Não	Sim	NA	Não	Mann-Whitney	ns	NA
GST	Sim	Sim	Não	Não	Teste T	ns	NA

Fonte: a autora. NA= não se aplica, **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$ * $p < 0.01$, ns= não significativo.

Figura 12- Reservas energéticas de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia suscetível e resistente a toxina Binária.



Fonte: a autora.

Nota: A. Lipídios (µg) em pools de 20 larvas de quarto ínstar. B. Lipídios (µg) de fêmeas individuais. C. Açúcares redutores (µg) em pools de 40 larvas de quarto ínstar. D. Açúcares redutores (µg) em pools de cinco fêmeas. Teste de Mann-Whitney, diferenças estatísticas de **** $p < 0,0001$.

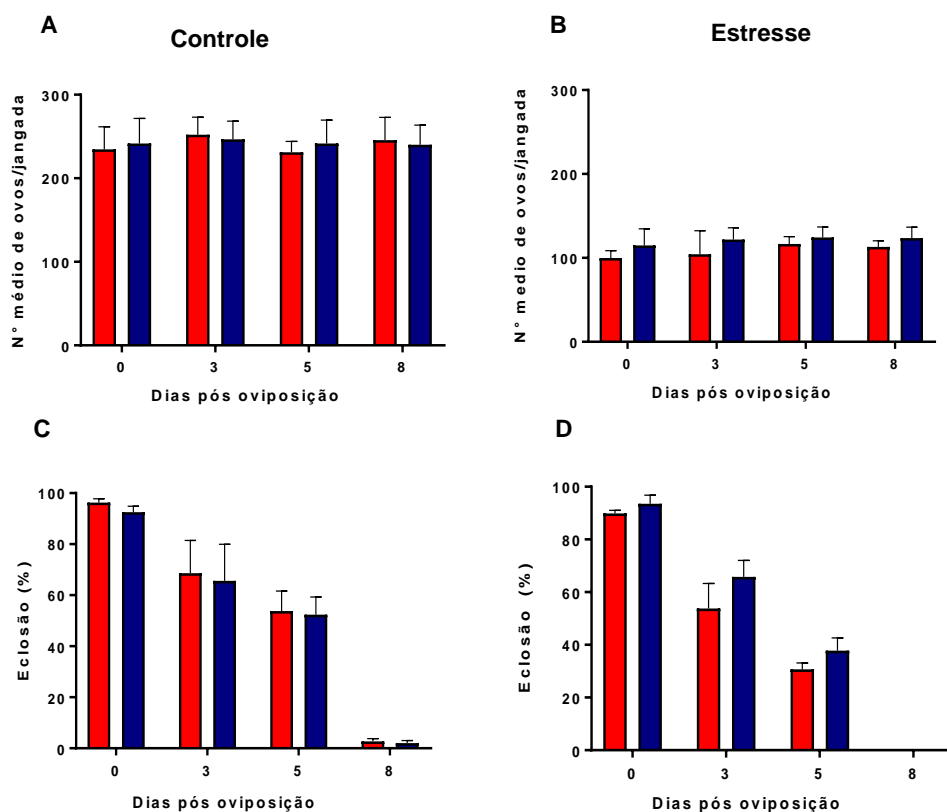
8.3 FECUNDIDADE E FERTILIDADE

A fertilidade e fecundidade das fêmeas foram investigadas para avaliar se as mudanças nas reservas de lipídios e açúcares redutores encontradas entre as colônias resistentes e suscetíveis poderiam impactar estes aspectos reprodutivos.

Esses parâmetros foram avaliados usando ovos produzidos por fêmeas criadas em condições ótimas ou de estresse. Além disso, a viabilidade dos ovos foi analisada imediatamente após a oviposição e após o armazenamento em câmara úmida. O número médio de ovos produzidos por fêmeas criadas em condições ótimas no dia 0 foi de 234 ± 23 para suscetíveis e 241 ± 26 para resistentes, e não foram observadas diferenças estatísticas (Figura 13A). O número médio de ovos registrado a partir de jangadas armazenadas durante 3, 5 e 8 dpo em câmara úmida foram semelhantes para ambas as colônias nas diferentes repetições (Figura 13A). Para as fêmeas criadas sob condições de estresse, uma redução significativa de cerca de 55% no número médio de ovos foi registrada no dia 0 para ambas as linhagens suscetível (99 ± 8) e resistente (114 ± 17) (Figura 13B). Essas médias foram semelhantes nos grupos experimentais de todos os momentos de armazenamento para ambas as colônias (Figura 13B).

Em relação à fertilidade a porcentagem média de eclosão de larvas a partir de ovos postos por fêmeas criadas sob condições controladas no dia 0 foi de 96 ± 1 e 92 ± 2 para as colônias suscetíveis e resistentes, respectivamente, demonstrando uma alta viabilidade (Figura 13C). Enquanto nos grupos de ovos 3 e 5 dpo a eclosão das larvas caiu de forma similar para ambas as colônias (3 dpo: S= 68 ± 11 e R= 65 ± 12 ; 5 dpo: S= 53 ± 6 e R= 52 ± 6) (Figura 13C). A eclosão de larvas a partir de ovos armazenados do grupo 8 dpo, foi de apenas 2% para ambas as colônias (Figura 13C). A eclosão das larvas a partir dos ovos de fêmeas criadas sob condições de estresse também apresentou uma diminuição, estatisticamente semelhante ao grupo controle, em ambas as colônias (Figura 13D). A redução da fecundidade foi observada em ovos a partir do 3º e 5º dpo para ambas as colônias (Figura 13D), sendo menos acentuada na colônia resistente, mas as diferenças não foram estatisticamente significativas. Nenhuma eclosão foi registrada a partir de ovos armazenados durante 8 dpo (Figura 13D). O conjunto de dados mostra que a fecundidade e fertilidade das fêmeas das duas colônias, testadas sob diferentes condições, foram similares. Os dados brutos estão disponíveis no Apêndice F, tabela suplementar 7.

Figura 13 - Fertilidade e fecundidade de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia suscetível (vermelha) e resistente a toxina Binária (azul) criadas sob condições controladas (FC) e estresse (FE).



Fonte: a autora.

Nota: A. Número médio de ovos por jangada FC. B. Número médio de ovos FE. C. Porcentagem de eclosão de larvas por jangada FC. D. Porcentagem de eclosão de larvas por jangada FE. Cada coluna e barras representam a média e o desvio padrão, de pelo menos quatro pontos experimentais. Teste t não pareado, não foram encontradas diferenças estatísticas.

8.4 ANÁLISE *IN SILICO* DA PANTETEINASE

O segundo tópico desta tese compreende a identificação da panteteinase (CPIJ017593) de *Cx. quinquefasciatus* cujo transcrito mostrou o maior status de repressão em indivíduos resistentes, comparado aos indivíduos suscetíveis. A análise *in silico* do gene da panteteinase (CPIJ017593) mostrou uma sequência codificadora com 1551 pares de base (pb), proteína com 516 aminoácidos e peso molecular predito de 57 kDa. Recentemente, esta proteína ganhou uma atualização da anotação no *Nacional Center of Biotechnology Information* (NCBI) e seu código de acesso atualmente é LOC6040365. Esta nova anotação apresenta um gene com sequência

codificadora de 1714 pb, 526 aminoácidos e peso molecular predito de 58 kDa (Figura 14). Além de apresentar 10 aminoácidos adicionais na porção C-terminal, a LOC6040365 difere em 9 aminoácidos em relação a CPIJ017593 (Figura 14). Em *Cx. quinquefasciatus* foram encontradas sete outras panteteinases com identidades que variam entre 98 a 55% em relação a panteteinase CPIJ017593 (Figura 15). Seis delas codificam proteínas contendo entre 516 e 555 aminoácidos e pesos moleculares preditos de cerca de 61 kDa. No entanto, uma a panteteinase CPIJ019637-PA teria apenas 219 aminoácidos e peso predito de 31 kDa. Também foram encontradas três ortólogas dessa proteína em *Culex pipiens pallens* e em outras espécies de mosquitos vetores como *Aedes aegypti* (2), *Aedes albopictus* (8) e *Anopheles* spp. (28).

A análise da predição de âncora GPI não mostrou nenhum sítio com potencial significativo. Na anotação da panteteinase CPIJ017593 a posição 502 da sequência foi a que obteve o melhor score (-18.70; $p= 0,019$). Enquanto na anotação LOC6040365, o melhor score foi na posição 503 (-9.37; $p= 0,0064$). A análise de predição de N-glicosilação mostrou que esta proteína possui em sua sequência três sítios preditos (Tabela 2; Figura 14), representados pela tríade de aminoácidos (NTT, NFT e NIT) para ambas as anotações da panteteinase. Para esta análise o preditor NetGlyc 1.0 foi acessado em 10/01/2023. Na tabela 2, referente a N-glycosilação, os potenciais são representados por sinais (+/-). +: potencial maior que 0,5; ++: potencial maior que 0,5 e concordância de 9 redes para suportar a predição ou potencial maior que 0,75. Em relação aos potenciais sítios de O-glicosilação, onde pode ocorrer a adição de carboidratos ao radical hidroxila de cadeias laterais de treonina ou serina, foram encontrados dois sítios potenciais (T³⁰⁷ e T³¹¹) para a anotação da panteteinase LOC6040365. E para a CPIJ17593, além desses, há S⁵⁰⁸.

Tabela 2 - Sítios potenciais de N-glicosilação da proteína panteteinase (CPIJ017593), determinados através do programa NetNGly 1.0.

Sítio	Posição		Potencial de glicosilação	
	CPIJ017593	LOC6040365	CPIJ017593	LOC6040365
1		¹⁷⁷ NTT ¹⁷⁹ V	+	+
2		³⁵³ NFT ³⁵⁵ I	++	+
3		⁴⁶³ NIT ⁴⁶⁵ K	++	++

Fonte: a autora.

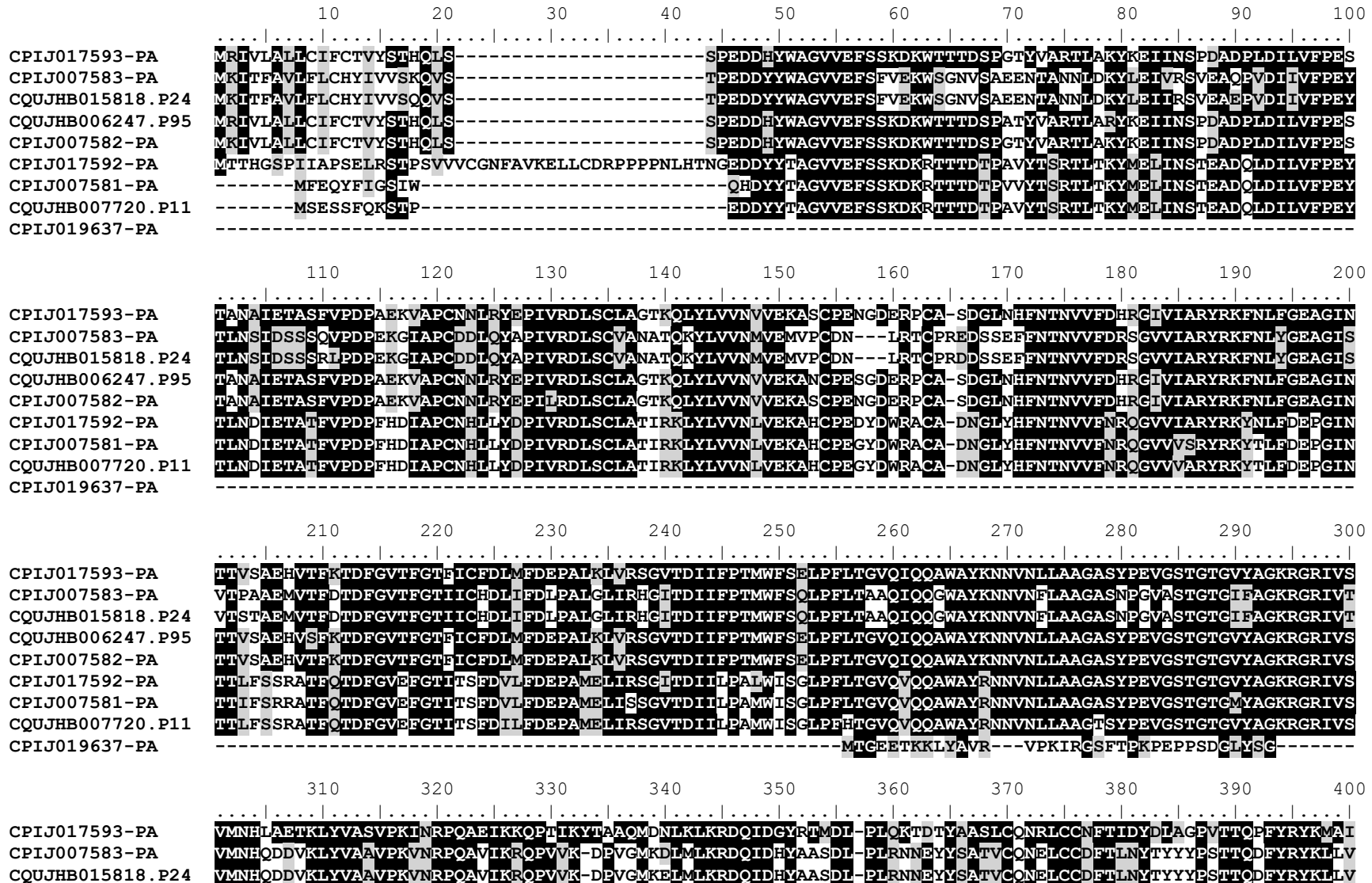
Figura 14 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da panteteinase identificada sob as identidades CPIJ017593 (www.vectorbase.org) e LOC6040365 (*Nacional Center of Biotechnology Information*).

CPIJ017593	MRIVLALLCI	FCTVYSTHQL	SSPEDDHYWA	GVVEFSSKDK	WTTTDSPTGTY	50
LOC6040365	MRIVLALLCI	FCTVYSTHQL	SSPEDDHYWA	GVVEFSSKDK	WTTTDSPTATY	50
CPIJ017593	VARTLARYKE	IINSPDADPL	DILVFPPESTA	NAIETASFVP	DPAEKVAPCN	100
LOC6040365	VARTLARYKE	IINSPDADPL	DILVFPPESTA	NAIETASFVP	DPAEKVAPCN	100
CPIJ017593	NLRYEPIVRD	LSCLAGTKQL	YLVVNVVEKA	SCPENSGDERP	CASDGLNHFN	150
LOC6040365	NLRYEPIVRD	LSCLAGTKQL	YLVVNVVEKA	NCPEISGDERP	CASDGLNHFN	150
CPIJ017593	TNVVFDHRGI	VIARYRKFNL	FGEAGINTTV	SAEHVTFKTD	FGVTFGTFIC	200
LOC6040365	TNVVFDHRGI	VIARYRKFNL	FGEAGINTTV	SAEHVTFKTD	FGVTFGTFIC	200
CPIJ017593	FDLMFDEPAL	KLVRSGVTDI	IFPTMWFSEL	PFLTGVQIQQ	AWAYKNNVNL	250
LOC6040365	FDLMFDEPAL	KLVRSGVTDI	IFPTMWFSEL	PFLTGVQIQQ	AWAYKNNVNL	250
CPIJ017593	LAAGASYPEV	GSTGTGVYAG	KRGRIVSVMN	HLAETKLYVA	SVPKINRPQA	300
LOC6040365	LAAGASYPEV	GSTGTGVYAG	KRGRIVSVMN	HLAETKLYVA	SVPKIDRPQA	300
CPIJ017593	EIKKQPTIKY	TAAQMDNLKL	KRDQIDGYRT	MDLPLQKTD	YAASLCONRL	350
LOC6040365	EIKKQPTIKY	TAAQMDNLKL	KRDQIDGYRT	MDLPLQKTD	YAASLCHNRL	350
CPIJ017593	CCNFTIDYDL	AGPVTTQPFY	RYKMAILD GK	RTFDGFADGF	ITACAIFACT	400
LOC6040365	CCNFTIDYDL	AGPVTTQPFY	RYKMAILD GK	RTFDGFADGF	ITACAIFACT	400
CPIJ017593	GTTLDTCATR	FEHGANTVPM	FVFNSIELTG	TFPGGEEVFL	LPNSVDTSIL	450
LOC6040365	GTTLETTCATR	FEHGANTVPM	FVFNSIELTG	TFPGGEEVFL	LPNSVDTSIL	450
CPIJ017593	PLEVDEIEYS	EENITKDGKP	FVEITHKLVK	PRSDLYSFAI	WGRKRVQDQD	500
LOC6040365	PLEVDEIEYS	EENITKDGKP	FVEITHKLVK	PRSDLYSFAI	WGRKRVQDQD	500
CPIJ017593	PNAAVPVSIG	STLPSL	-----			516
LOC6040365	PNAAVPVSIG	STLLVLA	VAAV CSIMFK			526

Fonte: a autora

Nota: evidenciando os sítios de N-glicosilação (vermelho), O-glicosilação (verde) e as diferenças entre as sequências (retângulos).

Figure 15 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da panteteinase identificada sob a identidade CPIJ017593 (www.vectorbase.org) com outras panteteinases de *Culex quinquefasciatus* (www.vectorbase.org).



```

CQUJHB006247.P95 VMNHLAETKLYVASVPKIDRPOAEIKKQPTIKYTAQMDTLKLRDQIDGYRTMDL-PLQKTDTYAASLCHNRCCNFTIDYDLACPVTTQPFYRYKMAI
CPIJ007582-PA VMNHLAETKLYVASVPKIDRPOAEIKKQPTIKYTAQMDNLKLRDQIDGYRTMDL-PLQKTDAYAAASLCONRLCCNFTIDYDLACPVTTQPFYRYKMAI
CPIJ017592-PA VMNHNAAETKLYVASVPKICRPOAEVKKQPVIKYTPAOMSNLKMLRDFIDGYTTVEL-PLTMDEKFEASLCHERVCCKFTIDYELSAPIITTOQFYRYRLAA
CPIJ007581-PA VMNHNAAETKLYVASVPKICRPOAEVKKQPVIKYSPAOMSNLKMLRDFIDGYTTFFEL-PLTKDEKFEASLCHERVCCKFTIDYELSAPIITTOQFYRYRLAA
CQUJHB007720.P11 VMNHYAETKLYVASVPKICRPOAEVKKQPVIKYTPAOMSNLKMLRDFIDGYTTFFDL-PMTKDEKFEASLCHERVCCKFTIDYELSAPIITTOQFYRYRLAA
CPIJ019637-PA -----RMHGKFLNIRMGSDHLDREFTTMOINPERYHDKIGQIICNGEFCCEFSATVTVLP--DRELTHHYREAV

                410         420         430         440         450         460         470         480         490         500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CPIJ017593-PA LDGKRTEFDGFADGFIITACAIFACTGTTLDTCATRFEHGANTVPMFVFNSIELT-----CTFPGGEEVELLPNSVDTSILPLEVDEIEYSEENITKDGKP
CPIJ007583-PA NDG-HDSKG-----RIACAI VACTNEMLETCCSRFEDPTSVVPAIQFNEIDIS-----GRFPGGDNVEMVPSGVDTSVLPLEVEIEFYMEHLYVODGNQ
CQUJHB015818.P24 NDG-HDFKG-----RIACAI VACTNEMLETCCSRFEDPTSVVPAIQFNEIDIS-----GRFPGGDNVEMVPSGVDTSVLPLEVEIEFYMEHLYVODGNQ
CQUJHB006247.P95 LDGKRTEFDGFADGFIITACAIFACTGTTLDTCATRFEHGANTVPMFVFNSIELT-----CTFPGGEEVELLPNSVDTSILPLEVDEIEYSEENITKDGKP
CPIJ007582-PA LDGKRTEFDGFADVFIITACAIFACTGTTLDTCATRFEHGANTVPMFVFNSIELT-----CTFPGGEEVELLPNSVDTSILPLEVDEIDYSEENVITKDGKP
CPIJ017592-PA FDGARSFQGFASRVTVCAVLACTGTTLASCGTRFESGANTVPMVVFNSIELKETVDLEGSFLGEOQYMLPPTS LDT SILPLEVDEIEFYSERDVTIDGKL
CPIJ007581-PA FDGVRSEFQGFASRVTVCAVLACTGTTLASCGTRFESGANTVPMVVFNSIELKETVDLEGSFLGEEKYMLPPTS LDT SILPLEVDEIEFYSERDVTIDGKL
CQUJHB007720.P11 FDGARSFQGFASRVTVCAVLACTGTTLASCGTRFESGANTVPMVVFNSIELKETVDLEGSFLGEOQYMLPPTS LDT SILPLEVDEIEFYSERDVTIDGKL
CPIJ019637-PA FDGVRSEFQGMADAHVSIQGVITCRNESLITSCGLPMNENSN---YLEFNEIVIA-----GRFIANG-TLAMPNSLDMLHSLDTRYRFYSVWNSSTNQO

                510         520         530         540         550         560         570         580
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CPIJ017593-PA FVEITHKLVKPRSDLYSFAIWGR-----KRVQD--ODPNAAVPVSIGSTLPSL-----
CPIJ007583-PA TLQIRQQLILPRSDLLTFGIWGR-----KEDNEDHRDNSDDGATSTTVSLLTILFALIAFVLTGK-----
CQUJHB015818.P24 TLQIRQQLVILPRSDLLTFGIWGR-----KEDNEDHRDNSDDGATSTTVSLLTMLFALIAFVLTGK-----
CQUJHB006247.P95 FVEITHKLVKPRSDLYSFAIWGR-----KRVQD--ODPNAAVPVSIGSTLLVLVAAVCSIMFK-----
CPIJ007582-PA FVEITHKLVKPRSDLYSFAIWGR-----KRVQD--ODPNAAVPVSIGSTLLVLVAAVCSIIILK-----
CPIJ017592-PA IVEITHKLVKPRSDLYSFAIWGR-----EVVQE--FSSGAFS--SIGSTCLMIAAALFAIVLNNFN----
CPIJ007581-PA IVEITHKLVKPRSDLYSFAIWGR-----EVVQE--FSSGAFS--SIGSTCLMFAAALFAIVLNNFN----
CQUJHB007720.P11 IVEITHKLVKPRSDLYSFAIWGR-----EVVQE--FSSGAFS--SIGSTCLMFAAALFAIVLNKFN----
CPIJ019637-PA NVQLT--LVDTVANLQTEGTYALNHADFEYVNPPIEPPPETTEGLTGDSKESDEDGDDGGGASTVGCASRVLVALAVLLVSSSELRRSGFQ

```

Fonte: a autora

Nota: a imagem mostra um alinhamento de oito panteteinases de *Culex quinquefasciatus* com a panteteinase CPIJ00175973. Evidenciando os aminoácidos idênticos (preto), similares (cinza) e diferentes (branco). As regiões com *gaps* estão representadas (-).

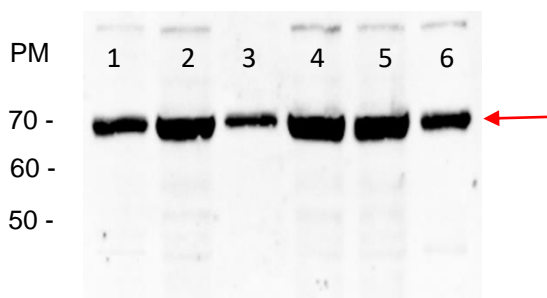
8.5 EXPRESSÃO DA PANTETEINASE EM CÉLULAS Sf9

Até o presente, nenhuma das panteteinases de *Cx. quinquefasciatus* disponíveis no Vectorbase foi identificada ou caracterizada através de ensaios *in vitro* ou *in vivo* e, apenas dados *in silico* estão disponíveis. A panteteinase (CPIJ017593) tornou-se alvo deste estudo por ter sido o transcrito mais reprimido em larvas resistentes à toxina Bin. Outro gene de uma panteteinase (CPIJ017592, *Vanin-like protein 1* precursor putative) com status altamente reprimido também foi revelado (Quadro 2). O gene CPIJ017593 foi selecionado por ter o maior Log2 foldchange. Além disso, a análise destas sequências mostrou grande identidade entre estes dois genes anotados como panteteinases (dados não apresentados).

A primeira etapa para a caracterização da panteteinase CPIJ017593 de *Cx. quinquefasciatus* foi a clonagem do seu gene e expressão em um sistema eucarioto, de uma linhagem de células Sf9. As amostras de meio de cultivo transfectado foram precipitadas com TCA e apresentaram diversas proteínas, que foram submetidas à imunodeteção com o anticorpo monoclonal anti-His e uma proteína, com peso aparente de 70 kDa, foi detectada de forma específica (Figura 16). Em seguida, as amostras do meio foram submetidas à purificação com a resina Ni-NTA, sendo obtidas as amostras de proteínas ligadas a resinas, bem como amostras de proteínas eluídas da resina. O perfil da resina revelou algumas proteínas incluindo a potencial banda de 70 kDa que foi melhor definida após a sua eluição da resina, demonstrando uma proteína majoritária de 70 kDa (Figura 17A). Estas amostras foram submetidas à imunodeteção, com o anticorpo monoclonal anti-His, que reconheceu especificamente a respectiva proteína de 70 kDa (Figura 17B). A imunodeteção destas amostras utilizando o anticorpo policlonal anti-Pan, foi concordante e detectou uma proteína de 70 kDa, porém, o reconhecimento da proteína por este anticorpo foi muito inferior ao do anticorpo anti-His (Figura 17C). Um ensaio de imunodeteção, com a proteína recombinante purificada, confirmou a baixa capacidade de reconhecimento do anti-Pan (Figura 18). A identidade da proteína recombinante de 70 kDa expressa foi confirmada por espectrometria de massas. Nesta análise de identificação dos peptídeos nesta amostra, a panteteinase de *Cx. quinquefasciatus* (scores de 25 peptídeos únicos e $5,8 \times 10^9$ de intensidade) foi detectada e os demais peptídios identificados foram do organismo hospedeiro, *S. frugiperda*. Assim, os

ensaios de detecção da panteteinase foram concordantes em revelar uma proteína com peso aparente de 70 kDa, diferente do peso predito (57 kDa), e este resultado sugere que esta proteína sofra modificações pós-traducionais.

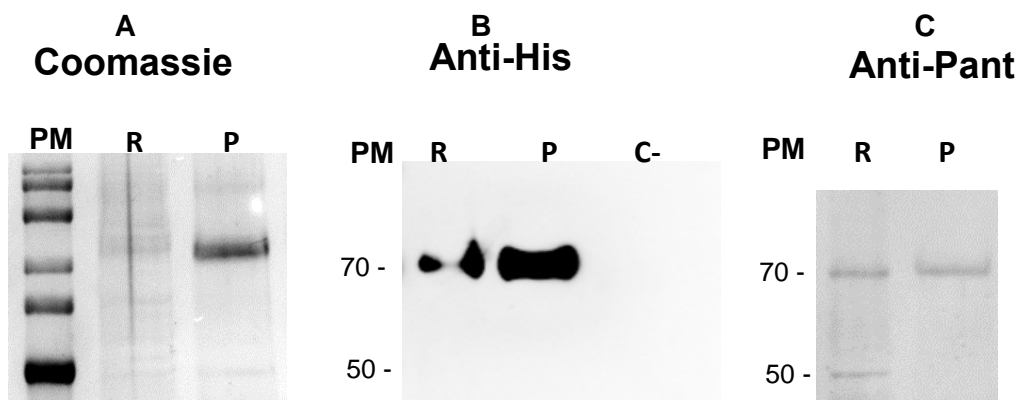
Figura 16 - Imunodeteção de amostras de cultivo celulares Sf9 (pistas 1-6) de linhagens transfectadas com o plasmídeo pantet-plZT que expressa a proteína panteteinase.



Fonte: Tatiana Rezende.

Nota: As amostras precipitadas pelo ácido tricloroacético foram separadas em SDS-PAGE 10%, transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à imunodeteção com anticorpo anti-histidina. PM: peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (kDa). Seta evidenciando a proteína panteteinase de 70kDa.

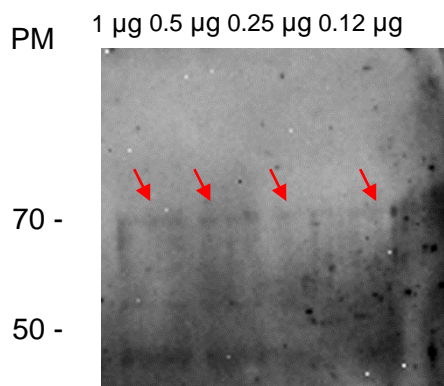
Figura 17- Perfil de amostras de panteteinases recombinantes produzida em células Sf9.



Fonte: a autora.

Nota: A. Proteínas acopladas a uma resina NI-NTA (R) e eluídas (P) separadas em SDS-PAGE 10% e visualizadas com azul de comassie. B. Proteínas transferidas para membranas de nitrocelulose e imunodetectadas com um anticorpo monoclonal anti-histidina (B). Idem com imunodeteção com anticorpo policlonal anti-panteteinase (C). BSA 0,5 µg utilizado como controle negativo (C-). PM: Marcadores de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (kDa).

Figura 18 - Perfil de amostras de panteteinases recombinantes (μg) purificadas com a resina Ni-NTA[®] (QIAGEN) separadas em SDS-PAGE e visualizadas através de imunodeteção com o anticorpo policlonal anti-panteteinase.



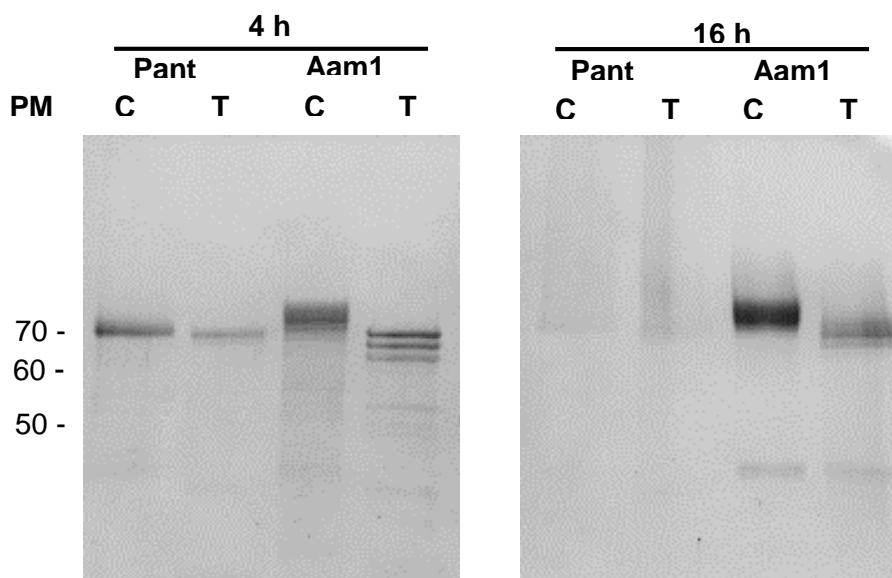
Fonte: a autora.

Nota: PM: peso molecular BenchMark[™] Protein Ladder (kDa). Setas mostram a panteteinase com 70 kDa.

8.6 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA N-GLICOSILAÇÃO EM PANTETEINASE

Modificações pós-traducionais, como a N-glicosilação, podem ser uma das razões para a diferença entre o peso molecular predito e observado desta proteína. Como a análise *in silico* mostrou três sítios de N-glicosilação na sequência da panteteinase, foi feita uma análise *in vitro* da presença de N-glicósídeos da panteteinase recombinante através do tratamento com a enzima PNGase F. Esta enzima tem a capacidade de remover uma ampla gama de N-glicósídeos ligados à proteínas. Foram realizados ensaios testando diferentes condições tais como uso de amostras de proteína desnaturada ou nativa, tempos de incubação (1-16 h) e diferentes concentrações de PNGase F. Todos os ensaios mostraram uma discreta diferença de peso molecular (1 kDa) antes e após o tratamento, que foi avaliada no iBright[™] CL1000 Imaging System (Figura 19). Em todos os ensaios, o controle positivo mostrou a deglicosilação da proteína Aam1, evidenciada pela redução do peso molecular, de ~73 para ~66 kDa, como esperado. Assim os dados apontam que a panteteinase tem uma discreta N-glicosilação, porém esta não reflete a discrepância detectada entre os pesos observado (70 kDa) e predito (57 kDa).

Figura 19 - Perfil eletroforético de amostras de panteteinase (Pant) recombinantes tratadas com a enzima PNGase F (4 h ou 16 h, a 37°C), separadas em SDS-PAGE 10% e visualizadas com azul de Coomassie. Aam1: amostra controle da reação. Controle negativo proteína incubada sem enzima (C). Proteína tratada (T). Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder em kDa (PM).



Fonte: a autora

8.7 PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DE PANTETEINASES EM LARVAS

Inicialmente o padrão de transcrição do gene da panteteinase (CPIJ017593) em larvas individuais das colônias CqS, REC e RIAB59 foi investigado e comparado, através de ensaios de quantificação relativa. Anteriormente, a validação do status de repressão do gene da panteteinase foi feita unicamente a partir de *pool* de larvas (REZENDE *et al.*, 2019; T. M. T. Rezende e H. S. G. Menezes, dados não publicados) e não há dados do padrão de transcrição em indivíduos. A transcrição da panteteinase foi detectada em todas as larvas suscetíveis e os dados de quantificação relativa deste alvo mostrou uma grande variação nessas larvas (Figura 20; Tabela 3). Em contraste, todas as larvas resistentes analisadas tiveram um perfil de transcrição relativa inferior, tanto para a colônia REC, quanto para a colônia RIAB59, podendo ser muito baixo em alguns indivíduos analisados (Figura 20; Tabela 3). As médias de quantificação relativa a partir de todas as larvas de cada colônia refletem estes dados, pois mostrou uma baixa expressão na colônia resistente REC ($0,19 \pm 0,11$) e RIAB59 ($0,67 \pm 0,60$) comparada a uma expressão robusta e com ampla variação ($2,7 \pm 2,1$) em larvas da colônia suscetível (Tabela 3).

Tabela 3 - Quantificação relativa de transcritos do gene da panteteinase em amostras de RNA de larvas do 4º estágio das colônias suscetível e resistente a toxina Binária de *Culex quinquefasciatus*. Ct (*Cycle Threshold*). Rq (*Relative Quantification*).

Suscetível						REC						RIAB59					
N	CT 18S	Ct Pant	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	Rq	CT 18S	Ct Pant	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	Rq	CT 18S	Ct Pant	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	Rq		
REF	9.470	28.027	18.56	0.00	1.00	REF	9.470	28.027	18.56	0.00	1.00	REF	9.470	28.027	18.56	0.00	1.00
1	13.392	30.135	16.74	-1.82	3.52		12.532	31.631	19.10	0.54	0.69		11.908	30.88	18.97	0.41	0.75
2	12.275	27.674	15.40	-3.16	8.94		11.148	29.848	18.70	0.14	0.91		11.071	30.63	19.56	1.00	0.50
3	10.693	27.738	17.05	-1.52	2.86		13.704	33.640	19.94	1.38	0.39		11.046	30.6	19.55	0.99	0.50
4	12.150	32.177	20.03	1.47	0.36		9.853	38.047	28.19	9.63	0.001		12.936	33.50	20.56	2.00	0.25
5	9.671	29.577	19.91	1.35	0.39		10.066	36.626	26.56	8.00	0.004		12.372	30.90	18.53	-0.03	1.022
6	11.924	31.614	19.69	1.13	0.46		10.354	33.624	23.27	4.71	0.04		11.197	30.25	19.05	0.49	0.711
7	9.639	28.376	18.74	0.18	0.88		12.637	34.104	21.47	2.91	0.13		12.152	33.28	21.13	2.57	0.17
8	13.041	32.247	19.21	0.65	0.64		13.056	36.688	23.63	5.07	0.03		11.166	32.04	20.87	2.31	0.20
9	13.720	32.875	19.15	0.59	0.66		13.407	37.722	24.32	5.76	0.02		11.191	30.64	19.45	0.89	0.54
10	12.606	31.841	19.23	0.67	0.63		10.354	34.666	24.31	5.75	0.02		11.059	31.49	20.43	1.87	0.27
11	11.021	28.511	17.49	-1.07	2.10		10.773	36.027	25.25	6.69	0.01		13.988	33.04	19.05	0.49	0.71
12	13.704	31.640	17.94	-0.62	1.54		11.722	35.407	23.69	5.13	0.03		11.126	31.41	20.28	1.72	0.30
13	13.941	30.687	16.75	-1.81	3.52		11.987	31.823	19.84	1.34	0.40		11.594	31.87	20.28	1.72	0.30
14	8.319	28.496	20.18	1.62	0.33		12.748	33.443	20.70	2.20	0.22		14.650	31.81	17.16	-1.40	2.64
15	10.428	29.708	19.28	0.72	0.61		12.839	34.201	21.36	2.86	0.14		12.204	30.52	18.32	-0.24	1.18
16	11.954	28.742	16.79	-1.77	3.42		13.120	35.515	22.40	3.90	0.07						
17	11.676	27.910	16.23	-2.33	5.01		14.434	34.060	19.63	1.13	0.458						
18	11.223	30.166	18.94	0.38	0.77		10.912	32.936	22.02	3.52	0.09						
19	11.172	25.970	14.80	-3.76	13.57		10.762	32.894	22.13	3.63	0.08						
20	10.636	30.198	19.56	1.00	0.50		14.153	38.088	23.94	5.44	0.02						
21	14.491	30.075	15.58	-2.98	7.87												
Média	11.69	29.74	18.06		2.71		12.03	34.55	22.52		0.19		11.98	31.52	19.55		0.67
Desvio	1.60	1.78	1.61		2.14		1.39	2.17	2.47		0.26		1.08	1.02	1.04		0.60

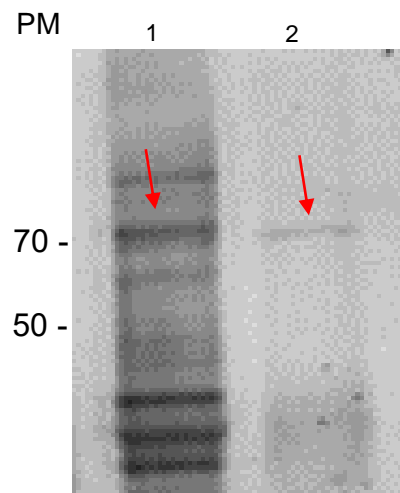
Fonte: a autora

Nota: A amostra da colônia suscetível foi a referência usada para a análise comparativa está destacada em azul.

8.8 IDENTIFICAÇÃO DE PANTETEINASES NATIVAS

A investigação da expressão da panteteinase nativa de *Cx. quinquefasciatus* foi realizada em amostras de preparação de microvilli intestinal de (BBMF) a partir de larvas inteiras, ou BBMF de intestinos dissecados, ou extratos totais de larvas e extratos totais de intestinos. As amostras foram separadas eletroforéticamente e submetidas à imunodeteção com o anticorpo policlonal anti-panteteinase. Uma proteína com cerca de 70 kDa foi imunodetectada em ambas as amostras de BBMF, embora com uma baixa intensidade (Figura 21). O anticorpo anti-panteteinase, embora imunoabsorvido, apresentou um reconhecimento fraco além do reconhecimento de outras proteínas ou de possíveis formas degradadas da proteína investigada, sobretudo uma banda de 45 kDa que foi co-detectada com frequência nestas amostras bem como em proteínas recombinantes. Não foi detectado nenhum sinal compatível com a presença desta proteína nas amostras de larvas e intestinos (dados não apresentados). Porém, o resultado sugere a presença da panteteinase nativa em amostras intestinais de larvas de *Cx. quinquefasciatus*. Uma ampla gama de ensaios foi realizada para otimizar a imunodeteção, incluindo variáveis como a quantidade de proteínas nativas, tipos de preparações testadas (BBMF, larvas, intestino), melhoria do bloqueio de sítios não específicos, imunoabsorção, diluição e tempo de incubação dos anticorpos, porém, não foi obtida uma melhoria significativa. Diante da baixa capacidade de reconhecimento da panteteinase pelo anticorpo anti-Pan nas amostras de larvas suscetíveis, não foi feita uma análise comparativa em larvas resistentes, cuja expressão estaria reprimida. Assim é necessária a otimização de um sistema de detecção específica das panteteinases para continuidade desta investigação.

Figura 21 – Imunodeteção de proteínas em preparação de microvilli intestinal (BBMF) de larvas de *Culex quinquefasciatus* com o anticorpo policlonal anti-panteteinase.



Fonte: a autora

Nota: Amostras separadas em SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à imunodeteção. 1: BBMF preparada usando larvas inteiras. 2: BBMF preparada usando intestinos dissecados. PM: peso molecular (kDa). Setas evidenciando a potencial panteteinase de 70 kDa.

9 DISCUSSÃO

Os dados deste estudo mostraram que *Cx. quinquefasciatus* resistente à toxina binária larvicida de *L. sphaericus* apresentou características metabólicas diferenciadas, conforme indicado pelo perfil transcriptômico dessa cepa (REZENDE *et al.*, 2019). Na primeira etapa do estudo foi feita uma validação funcional de grupos de transcritos, mais especificamente de enzimas, cujas atividades são conhecidas e poderiam ser acessadas a partir de ensaios enzimáticos, utilizando substratos fluorescentes, derivados de ésteres substituídos de ácidos carboxílicos com diferentes comprimentos de cadeia, rotineiramente utilizados para triagem e caracterização de lipases (DE MONPEZAT *et al.*, 1990; MATEOS *et al.*, 2007). Na segunda etapa foi feita a identificação e caracterização parcial de uma panteteinase que se revelou como o produto do gene mais reprimido do perfil transcriptômico das larvas resistentes e ainda não foi estudada em insetos.

Inicialmente foi avaliada a atividade enzimática de lipases, que são moléculas envolvidas no metabolismo lipídico de insetos. Os lipídios são fundamentais para formar as reservas energéticas, são componentes das estruturas celulares, hormônios e podem desempenhar papéis críticos na imunidade e reprodução (GONDIM *et al.*, 2018). Nossos resultados sugerem uma predominância da atividade das carboxilesterases, que em geral preferem substratos de cadeia curta, sobre as lipases verdadeiras, que tendem a preferir substratos de cadeia longa. No entanto, as especificidades do substrato dessas enzimas têm uma superposição considerável, especialmente contra substratos fluorescentes solúveis em água e muito sensíveis como ésteres MU (CHANG *et al.*, 2021; IMANAKA *et al.*, 1984; RIVERA-PEREZ *et al.*, 2011 ; RUIZ *et al.*, 2002). É importante lembrar que o aumento da atividade de carboxil-esterases pode estar envolvido em vários exemplos de resistência metabólica de *Cx. quinquefasciatus* a inseticidas (LOPES *et al.*, 2019; YAVASOGLU; SIMSEK, 2021). No entanto, em larvas resistentes RIAB59, essas enzimas apresentaram uma atividade reduzida e esse status não é consistente com um papel na desintoxicação de xenobióticos. É provável que a atividade mais baixa dessas enzimas possa estar envolvida com outros processos, conforme discutido posteriormente. A menor atividade de lipases no intestino médio de larvas resistentes mostrada neste estudo é consistente com o status de repressão (LFC de 1,6 a 5,43) de transcritos do metabolismo lipídico previamente encontrados (lipases CPIJ002726, CPIJ004230,

CPIJ001036, CPIJ004227, CPIJ001035, CPIJ003525); fosfolipases CPIJ004228, CPIJ019675, CPIJ002340; triacilglicerol lipase CPIJ004226) (REZENDE *et al.*, 2019). As panteteinases (CPIJ017593, CPIJ017592), são outro exemplo, de transcritos sob um forte status de repressão com LFC que foi ainda mais significativo (7,13) do que para o gene *cqm1* (4,65) que é o principal gene que confere resistência. Essas enzimas são responsáveis pela catálise da panteteína em ácido pantotênico e cisteamina (BARTUCCI *et al.*, 2019) e foi recentemente demonstrado que desempenham um papel central na modulação da lipólise em humanos (CHEN *et al.*, 2020). Na investigação de possíveis consequências relacionadas a estas alterações foi detectado que a colônia resistente apresentou uma redução significativa do acúmulo de lipídios tanto em larvas como em adultos indicando um possível impacto no metabolismo. Entretanto a redução desta reserva pode não estar diretamente relacionada à menor atividade lipásica observada, visto que a repressão destas moléculas geraria potencialmente um maior acúmulo de lipídeos totais e não uma redução. O metabolismo de lipídios é complexo e formado por várias vias e moléculas, que estão envolvidas na formação destas reservas. Assim, os dados deste trabalho mostram que o metabolismo de lipídios em *Cx. quinquefasciatus*, resistentes à Bin possuem alterações, embora não seja possível relacionar diretamente os dados de atividade das enzimas avaliadas com a dramática redução de 58% da reserva de lipídeos observada. Aqui cabe citar outros transcritos alterados ligados ao metabolismo de lipídios com expressivo valor de LFC que também foram encontrados no transcriptoma da colônia resistente RIAB59 (REZENDE *et al.*, 2019) e podem estar envolvidos neste processo. Exemplos de transcritos sub expressos são a apolipoproteína D (CPIJ015726/CPIJ015727), apolipoforina III (CPIJ007775), superfamília da hidroxilase de ácidos graxos (CPIJ009045) e piruvato desidrogenase (CPIJ014889). A apolipoforina III, por exemplo, é uma proteína associada à lipoforina que auxilia na manutenção da sua hidrofobicidade quando esta está repleta de lipídios que são transportados da hemolinfa até os locais de absorção e armazenamento (VAN DER HORST, RYAN, 2017). Os transcritos do metabolismo de lipídeos super expressos em larvas RIAB59 foram a 2-hidroxiacil-CoA liase 1 (CPIJ014172), além de transcritos de fosfolipases (CPIJ000903, CPIJ013122), que estão envolvidas na digestão de ácidos graxos e fosfolipídios (GONDIM *et al.*, 2018). É importante destacar que ácidos graxos de cadeia curta, como acetato e butirato, são moduladores de processos de acúmulo de lipídios e estão envolvidos no metabolismo lipídico

(KASUBUCHI *et al.*, 2015). Embora não tenha sido possível explicar como as alterações encontradas em enzimas e transcritos poderiam impactar o acúmulo de lipídios, devido à complexidade das vias e modulação dos diferentes genes possíveis envolvidos, nossos dados sugerem sua relação com o status de resistência. Vale ressaltar que os fatores mais importantes que modulam diretamente essas reservas, como a dieta (HUCK; KLEIN; MEUTI, 2021; SASMITA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2019) e densidade larval (SILVA *et al.*, 2021), foram mantidos sob controle durante este estudo. Assim as características diferenciais encontradas podem ser o resultado de um processo de co-seleção de genes envolvidos em outros processos fisiológicos, podendo ter efeitos ou não no fitness dos insetos, como será discutido a seguir.

O acúmulo de lipídios significativamente menor em indivíduos resistentes pode ter impacto nos processos fisiológicos. A resistência a inseticidas podem impactar negativamente as reservas energéticas, devido ao gasto para gerar uma maior expressão de enzimas envolvidas no processo metabólico de detoxificação do inseticida (DINIZ *et al.*, 2015). Assim, insetos resistentes podem ter uma vantagem adaptativa em um ambiente onde estão expostos de forma constante a determinados inseticidas, mas em contrapartida, pode haver um custo biológico. Neste caso, os insetos resistentes podem demonstrar um desempenho reduzido, com efeitos negativos em certos processos fisiológicos, tais como a fecundidade e longevidade (KLIOT; GHANIM, 2012). Em larvas de *Anopheles stephensis* expostas a fitoextratos, foi observado um aumento de açúcares. Enquanto isso, em *Cx. quinquefasciatus* houve uma redução destas reservas. E para o conteúdo de lipídios, foi observada uma redução em ambas as espécies avaliadas (SHARMA *et al.*, 2011). Em outro estudo, com fêmeas de *Culex pipiens* resistentes a inseticidas pela superprodução de esterases, apresentaram uma menor quantidade de lipídios e açúcares e, conseqüentemente, menos energia total em relação a fêmeas suscetíveis (RIVERO *et al.*, 2011). O estudo de Diniz *et al.*, (2015) demonstrou que *Ae. aegypti* resistentes ao organofosforado temephos apresentaram recursos energéticos totais (lipídio e glicogênio) reduzidos. No nosso trabalho, o mecanismo e características da resistência à toxina Bin, uma proteína bacteriana com ação inseticida, são diferentes. Em relação às reservas, por exemplo, foi observado um padrão de redução no acúmulo de lipídios em paralelo a um aumento na quantidade de reservas de açúcares, ou seja, um padrão que não teria necessariamente custo biológico.

A avaliação da atividade de α -glicosidases e da reserva de açúcares redutores foi realizada, uma vez que larvas RIAB59 resistentes são caracterizadas pela ausência de expressão das α -glicosidases Cqm1 no intestino médio e apresentaram um perfil de termos enriquecidos nas vias do metabolismo de carboidratos. As larvas resistentes tiveram uma atividade significativamente menor usando substrato de sacarose, enquanto uma avaliação anterior de duas outras linhagens resistentes a Bin que também são caracterizadas pela falta de Cqm1, a atividade utilizando ambos os substratos foi similar à colônia suscetível (MENEZES *et al.*, 2021). Embora a avaliação da atividade α -glicosidase em larvas pareça conflitante, o aumento acentuado no armazenamento de açúcares redutores indica que, de alguma forma, o metabolismo de carboidratos em indivíduos resistentes apresenta alteração. As reservas de energia alteradas em indivíduos resistentes podem ter consequências importantes, uma vez que os lipídios e os açúcares são as principais fontes de energia para o desenvolvimento do mosquito. Além disso, a produção e utilização de lipídios e açúcares estão intrinsecamente ligados, sendo moléculas críticas para a sobrevivência e metabolismo (ARRESE; SOULAGES, 2010; GONDIM *et al.*, 2018). O glicogênio é acumulado no corpo gorduroso, sendo responsável por disponibilizar a glicose para outros tecidos (ARRESE; SOULAGES, 2010). Esta é a fonte direta de glicose para metamorfose, voo e uma fonte importante para a produção de ácidos graxos pelo mecanismo de síntese de novo (ARRESE; SOULAGES, 2010; GONDIM *et al.*, 2018). Seria possível hipotetizar, por exemplo, que a maior reserva de carboidratos dos indivíduos resistentes poderia ser uma fonte para produção de ácidos graxos e assim compensar o baixo acúmulo de lipídios. O processo de síntese de novo pode contribuir para a homeostase lipídica, ativando a síntese de ácidos graxos quando os carboidratos estão disponíveis. A síntese de novo de ácidos graxos também pode ocorrer pela incorporação de acetato, metabolizado em triacilglicerol, conforme descrito em insetos, incluindo *Ae. aegypti* (ARRESE *et al.*, 2001; BUCKNER; HAGEN, 2003; ZIEGLER; IBRAHIM, 2001).

O enriquecimento de DEGs de larvas resistentes RIAB59 nas vias metabólicas da *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) mostraram um cenário complexo. Para o metabolismo lipídico, foram encontradas quatro vias reguladas negativamente e uma regulada positivamente com termos enriquecidos. Para os carboidratos, seis vias

apresentaram termos regulados negativamente enriquecidos e quatro vias reguladas positivamente foram encontradas (REZENDE *et al.*, 2019). Portanto, a transcriptômica dessas larvas resistentes indica um painel amplo de informações envolvendo vários genes e vias metabólicas, enquanto que os dados deste estudo mostraram dados funcionais em escala limitada.

A microbiota do mosquito também vem sendo apontada como um importante componente que pode impactar as reservas energéticas. No caso do nosso modelo deve ser destacado que as larvas RIAB59 foram expostas cronicamente a *L. sphaericus*, um larvicida microbiano que pode afetar a microbiota intestinal do mosquito, como demonstrado anteriormente por Tetreau *et al.*, (2018). Um estudo recente mostrou que a microbiota reduzida em *Culex pipiens pipiens* em diapausa estava associada a maiores reservas de carboidratos e menor reserva lipídica, que por sua vez estava relacionada à incapacidade desses indivíduos de converter açúcares para acumular lipídios. Isto ocorre porque a microbiota é importante para preparar estes indivíduos para entrar no processo de diapausa. O estudo sugere que a microbiota esteja diretamente relacionada ao metabolismo dos carboidratos ingeridos para permitir o acúmulo de lipídios na preparação da diapausa, ou ainda, que a microbiota forneça vitaminas ou micronutrientes, necessários para o acúmulo de lipídios em *Cx. pipiens pipiens* (DIDION *et al.*, 2021). Em mamíferos, metabólitos da microbiota como ácidos graxos de cadeia curta (ex. butirato, acetato) são críticos na modulação de acúmulo de lipídeos (KASUBUCHI *et al.*, 2015). Uma revisão sobre os efeitos da exposição de mosquitos às toxinas bacterianas na microbiota mostra que, em larvas expostas ao Bti, por exemplo, pode ocorrer uma redução da microbiota que está associada a uma amplificação dos efeitos inseticidas nas larvas e alterações na suscetibilidade dos adultos a arbovírus (DACEY; CHAIN, 2020). Estudos recentes mostram que fêmeas de *Ae. aegypti* expostas ao Bti podem apresentar uma menor suscetibilidade a arbovírus, mas a microbiota não foi investigada nestes trabalhos (CARVALHO *et al.*, 2021; MOLTINI-CONCLOIS *et al.*, 2018). Outros estudos também apontaram a importância da microbiota no desenvolvimento e crescimento dos insetos (COON *et al.*, 2020; VALZANIA *et al.*, 2018). A nossa colônia resistente de *Cx. quinquefasciatus* RIAB59 apresentou um perfil de reservas alterado, e a investigação da microbiota das colônias é um aspecto interessante a ser investigado, em vista do potencial impacto que a exposição de mosquitos a bactérias usadas no controle de

mosquitos pode ter sobre a biologia, fisiologia e competência vetorial (DACEY; CHAIN, 2020).

Devido à importância dos lipídios e carboidratos em processos fisiológicos importantes como a reprodução (GONDIM *et al.*, 2018; HAHN; DENLINGER, 2007; HORNE; HARITOS; OAKESHOTT, 2009), no nosso estudo, a fecundidade e fertilidade das fêmeas resistentes foi determinada e comparada às suscetíveis. Esperávamos que o acúmulo reduzido de lipídios, encontrado nos indivíduos resistentes, pudesse afetar esses parâmetros reprodutivos como observado em outros estudos (KAWOOYA; LAW, 1988; PEREZ; NORIEGA, 2013). Porém a fecundidade e fertilidade das fêmeas de ambas as colônias foi similar e é possível que este efeito possa ser mais acentuado na produção de ovos naquelas espécies em entram em diapausa, como relatado para *Cx. pipiens pipiens* (BENOIT; DENLINGER, 2007). Outros parâmetros biológicos como a longevidade podem ser potencialmente afetados e avaliações adicionais são necessárias. Foi observada uma redução na quantidade de ovos produzidos nas fêmeas de ambas as linhagens, criadas sob condições de estresse. Portanto, este foi um efeito deletério direto da disponibilidade de alimentos na reprodução de *Cx. quinquefasciatus*, como demonstrado em outros estudos (AGNEW; HAUSSY; MICHALAKIS, 2000; DODSON; KRAMER; RASGON, 2012; UKUBUIWE *et al.*, 2019). Nossos ensaios revelaram um aspecto interessante que foi uma taxa relativamente alta de eclosão de larvas (~50%) de ovos armazenados por cinco dias em câmara úmida. A viabilidade do ovo sob estas condições não vem sendo investigada, pois *Cx. quinquefasciatus* não apresenta quiescência como encontrado para algumas espécies, como *Ae. aegypti* (FARNESI, *et al.*, 2017; 2015; VARGAS *et al.*, 2014). Este resultado mostra que, apesar de *Cx. quinquefasciatus* não ter quiescência, é possível manter a viabilidade dos ovos por alguns dias, o que pode facilitar a logística de experimentos em laboratório.

Neste estudo, a atividade de outro grupo de enzimas também foi avaliada, no caso, as aminopeptidases, tripsinas e quimotripsinas que são importantes proteases, envolvidas na digestão e imunidade de insetos (BALASUBRAMANIAN; TOUBARRO; SIMÕES, 2010; HENRIQUES *et al.*, 2020). As aminopeptidases e as quimotripsinas apresentaram maior atividade do que as tripsinas, mas todas as proteases apresentaram atividade semelhante nas amostras do intestino médio de ambas as linhagens. Portanto, nenhuma evidência de validação funcional de sua expressão

diferencial em larvas resistentes foi encontrada. Isso pode sugerir que outras formas de regulação da expressão podem estar envolvidas, como mecanismos pós-transcricionais ou pós-traducionais, que já foram descritos para a regulação das atividades de proteases intestinais em vetores de insetos (BRANDON *et al.*, 2008). Alternativamente, a compensação pela repressão de alguns genes pode ser superada pela super expressão de outros produtos gênicos nas famílias multigênicas de serina-proteases e aminopeptidases (ISOE *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2020). Outro grupo de enzimas cujo padrão de expressão diferencial não foi validado neste estudo foram as enzimas detoxificadoras GSTs. No perfil transcriptômico de larvas resistentes vários transcritos de GSTs estão super expressos (REZENDE *et al.*, 2019) mas ainda não há evidência da participação destas enzimas na metabolização de toxinas de larvicidas biológicos. A avaliação de uma colônia de *Ae. aegypti* submetida à exposição contínua ao Bti por mais de vinte gerações, por exemplo, não apontou alterações na atividade de quatro grupos de enzimas detoxificadoras, incluindo as GSTs (CARVALHO *et al.*, 2018). Assim, mais estudos são necessários para investigar o eventual papel destas enzimas na metabolização de toxinas bacterianas com ação inseticida.

Os estudos de resistência de mosquitos à inseticidas têm revelado três mecanismos principais: alterações no sítio alvo do inseticida (receptor), resistência metabólica que inviabiliza o inseticida de chegar ao alvo pela detoxificação e alterações da cutícula que reduzem a penetração do inseticida no tegumento (BLACK IV *et al.*, 2021). Em geral, as mudanças no sítio alvo do inseticida resultam em custo de aptidão, e a resistência metabólica ou de penetração reduzida de inseticida na cutícula pode estar relacionada à resistência cruzada. Nossos estudos sobre a resistência de *Cx. quinquefasciatus* à toxina Bin de *L. sphaericus* revelou um interessante modelo a ser explorado para gerar novos conhecimentos em relação a resistência a inseticidas. . O primeiro aspecto para reflexão é que o mecanismo de resistência de *Cx. quinquefasciatus* à toxina Bin resulta na supressão do sítio alvo, ou o receptor do epitélio intestinal, o que impedem a ligação e gera um nível de refratariedade total (FERREIRA; SILVA-FILHA, 2013). Este efeito é muito mais drástico do que o efeito de mutações no receptor que apenas reduzem sua afinidade da ligação aos inseticidas, que é a situação encontrada na resistência à inseticidas químicos (BRAGA; VALLE, 2007). O segundo aspecto diferencial é que a resistência

à Bin não parece estar relacionada a um custo dos principais parâmetros biológicos. O estudo transcriptômico e este estudo de validação funcional de indivíduos resistentes à toxina Bin mostram alterações significativas, como as atividades de enzimas e de reservas energéticas alteradas. Entretanto, estas alterações não parecem estar relacionadas com um custo de aptidão biológica relevante, em contraste com o frequente registro de custos biológicos reportados em populações resistentes a inseticidas químicos, que comprometem aspectos do desenvolvimento, reprodução e até a viabilidade das colônias (KLIOT; GHANIM, 2012). Um aspecto importante é que estas características da colônia resistente foram detectadas com indivíduos que não foram tratados com *L. sphaericus*, ou seja, os resultados funcionais não resultam de uma condição de indução. Assim o modelo de resistência toxina Bin/*Cx. quinquefasciatus*, apresentam peculiaridades que são importantes para compreender de uma forma mais ampla as consequências associadas ao status de resistência.

Dentre as características moleculares diferenciais dos indivíduos resistentes foram ainda identificadas as panteteinases, que são moléculas ainda praticamente desconhecidas em insetos. O gene da panteteinase foi o mais reprimido no transcriptoma de intestinos de larvas de *Cx. quinquefasciatus* resistentes à toxina Bin (REZENDE *et al.*, 2019). O perfil do transcriptoma comparativo de outras colônias resistentes à toxina Bin (REC e REC-2) também revelou o mesmo padrão, ou seja, as panteteinases foram os genes mais reprimidos. As panteteinases vêm sendo investigadas principalmente em humanos. A primeira panteteinase identificada em insetos, é a panteteinase de *Cx. quinquefasciatus* identificada neste estudo. Os ensaios de expressão de proteína recombinante em células *Sf9* revelaram uma panteteinase com 70 kDa, diferente do peso predito da sua sequência primária. A proteína candidata foi identificada com anticorpo anti-His, que tem alta especificidade por proteínas recombinantes com cauda de polihistidina, em diferentes amostras desde a sua detecção no meio total de cultivo até as proteínas purificadas em resina ativada com níquel. O reconhecimento destas proteínas com o anticorpo policlonal anti-Pan, também corroborou a identificação da panteteinase como uma proteína de 70 kDa. Finalmente os resultados de caracterização por espectrometria de massas consolidou a identificação da proteína de 70 kDa como sendo a panteteinase CPIJ017593. A principal panteteinase de humanos a *Vanin-like protein 1* tem um o

peso molecular predito (57 kDa) e o observado (70 kDa) (AURRAND-LIONS *et al.*, 1996). No caso da vanina humana foi comprovado que essa diferença no peso molecular se deu exclusivamente devido à N-glicosilação da proteína. Estas modificações pós traducionais já foram observadas em estudos posteriores com panteteinases (AURRAND-LIONS *et al.*, 1996; KASKOW *et al.*, 2012; RUAN *et al.*, 2010; SUZUKI *et al.*, 1999). Neste trabalho, foi demonstrado que a panteteinase de *Cx. quinquefasciatus* possui três sítios preditos de N-glicosilação e ensaios *in vitro* apontaram uma discreta deglicosilação que, neste caso não justificam a diferença de peso molecular observado. Portanto, outras modificações pós-traducionais ou aspectos ligados ao *foldig* das proteínas devem ser reponsáveis pelo peso aparente de 70 kDa desta proteína.

Outra característica investigada foi se esta panteteinase é expressa de forma secretada ou como proteína de membrana. As panteteinases humanas VNN1 e VNN2 são ligadas a membrana plasmática por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Porém, na análise *in silico* de predição da panteteinase CPIJ017593, não foi detectada a sinalização para esta âncora, apesar de já ter sido observado em outros estudos de panteteinases humanas (JANSEN *et al.*, 2013; KASKOW *et al.*, 2012; PACE; BRENNER, 2001). Estudos realizados em insetos detectaram panteteinases ou *Vanin-like proteins* em amostras de microvilli intestinal, dando suporte para a hipótese desta proteína ser expressa como uma proteína ligada a membrana (FERREIRA; NAQUET; MANAUTOU, 2015; TOPRAK *et al.*, 2016; YAO *et al.*, 2014, 2017). Além desses estudos, em avaliações realizadas em amostras do microvilli intestinal de *Cx. quinquefasciatus*, a panteteinase foi identificada (REZENDE *et al.*, 2017). No nosso estudo, as panteteinases também foram imunodetectadas em amostras do microvilli de *Cx. quinquefasciatus* o que indica a sua expressão como proteína de membrana. Sendo assim, seriam necessárias mais análises para que pudesse obter resultados mais específicos em relação a esta característica que é de grande importância considerando a seu potencial papel na interação com toxinas, patógenos e tráfico de proteínas na membrana celular .

Uma das hipóteses do trabalho é que a panteteinase pode estar envolvida no modo de ação das toxinas de *L. sphaericus*, visto que em estudos anteriores esta proteína foi detectada como possível ligante da toxina Cry48Aa/Cry49Aa em *Cx. quinquefasciatus* (REZENDE *et al.*, 2017) pela sua presença no microvilli de larvas

tratadas. Em seguida ela foi detectada como um segundo marcador de resistência pela seu status de alta repressão juntamente com o gene *cqm1* causador da resistência (REZENDE *et al.*, 2019). O único relato de detecção de uma panteteinase relacionada à larvicidas microbianos foi uma análise de transcritos diferencialmente expressos no lepidoptero *Ostrinia nubilalis* após tratamento com a toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*, ou uma linhagem resistente a esta toxina que detectou dois genes homólogos a panteteinase, dentre um amplo conjunto de moléculas diferencialmente expressas (YAO *et al.*, 2014, 2017), e relação destas proteínas com o modo de ação da toxina não foi discutida. No nosso estudo não foi possível avançar nos ensaios funcionais para avaliar se a panteteinase poderia estar implicada com a ligação à toxina Bin, devido à limitações de quantidade de proteína recombinante purificada. Para os estudos das panteteinases nativas a principal dificuldade é a detecção desta proteína utilizando o anticorpo policlonal produzido. Foi possível imunodetectar a proteína em amostras nativas e recombinantes com o anticorpo policlonal anti-Pan, mas com baixa capacidade de reconhecimento o que impossibilita ensaios robustos. Esta dificuldade pode ser devido a uma baixa expressão desta proteína nas amostras biológicas utilizadas ou a uma baixa especificidade do anticorpo produzido para o antígeno alvo. A primeira hipótese não parece ser a mais provável pois o perfil quantitativo dos transcritos em larvas individuais corrobora o seu perfil de expressão desta proteína. Outras proteínas de microvilli de intestino de mosquitos já estudadas pelo nosso grupo, o receptor Cqm1 de *Cx. quinquefasciatus* e seu ortólogo Aam1 de *Ae. aegypti*, foram detectadas com elevada especificidade e intensidade com anticorpos policlonais produzidos sob as mesmas condições (FERREIRA *et al.*, 2010, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2017; ROMÃO *et al.*, 2006). A ausência de anticorpos comerciais para estas análises não permitiu contornar este problema. Há disponível um anticorpo comercial contra a Vanin-1, a principal panteteinase de humanos (Anti-VNN1, AB1406746 Sigma-Aldrich), porém a identidade é baixa e os testes preliminares de utilizá-los para a detecção da panteteinase CPIJ017593 realizados não tiveram sucesso. Como descrito, a produção de transcritos da panteteinase em larvas da colônia suscetível e sua imunodetecção em microvilli de larvas indicam que a proteína é produzida em microvilli intestinal e, portanto, passível de ser detectada. Portanto é necessário um sistema mais robusto de detecção para o avanço da investigação das panteteinases nativas.

Neste contexto, para as panteteinases humanas que sendo bastante estudadas pelo seu envolvimento em diversas patologias, foram desenvolvidos ensaios de atividade catalítica da panteteinase de forma cromogênica ou fluorimétrica (DUPRÉ *et al.*, 1984; ROMMELAERE *et al.*, 2013; RUAN *et al.*, 2009). Apesar da existência destes métodos enzimáticos, os substratos utilizados não estão disponíveis comercialmente e talvez não seja adequados para as panteteinases de insetos. As panteteinases também podem ser investigadas através da imunodeteção e imunoadsorção com anticorpos monoclonais anti-vanin 1 e anti-vanin 2 (BORNHAUSER *et al.*, 2020; NITTO; INOUE; NODE, 2008; PITARI *et al.*, 2000; ROMMELAERE *et al.*, 2013). Como já descrito, estes anticorpos comerciais são específicos para panteteinases de humanos, cujas sequências possuem baixa identidade em relação à panteteinase investigada neste estudo.

A maioria das funções descritas das panteteinases e seu envolvimento em patologias foram investigados em humanos e camundongos. Estas proteínas foram inicialmente descritas devido ao seu papel na aderência de células do timo com células estromais perivasculares. A panteteinase vem sendo estudada em diversas frentes tais como sua função na síntese de cisteamina e seus produtos, antagonista do receptor peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), regulador da adipogênese, modulador do metabolismo de lipídios, regulador da sensibilidade a insulina e participante no processo de diferenciação de adipócitos (AHMADIAN *et al.*, 2013; SUWAKI *et al.*, 2007). Além disso, ela está envolvida em metabolismo de ácidos graxos (BERRUYER *et al.*, 2006; VAN DIEPEN *et al.*, 2014; POVERO *et al.*, 2013; ROMMELAERE *et al.*, 2014), regulação da oxidação da gordura hepática (BARTUCCI *et al.*, 2019; VAN DIEPEN *et al.*, 2014; RAKHSHANDEHROO *et al.*, 2010) e pode funcionar como um sensor de estresse oxidativo (CHEN *et al.*, 2020). Um estudo recente confirmou o papel da panteteinase promovendo o processo de lipólise. Ao comparar tecido adiposo branco de camundongos selvagens e camundongos inibidos da VNN 1 (Vanin-1-/-), Chen *et al.* (2020) mostrou uma maior acumulação de gordura em camundongos inibidos, sugerindo, portanto, o papel da panteteinase neste processo. Estes dados sobre as panteteinase humanas indicam perspectivas para o estudo do papel de panteteinases de insetos no metabolismo de lipídios. O nosso estudo mostrou um cenário promissor para investigar as panteteinases em *Cx. quinquefasciatus* com um alto nível de repressão associado a um fenótipo de

resistência à toxina Bin, perfil de outros transcritos envolvidos no metabolismo alterados, alteração na atividade de algumas lipases e das reservas lipídicas.

10 CONCLUSÕES

- A resistência das larvas de *Culex quinquefasciatus* à toxina Bin está associada a uma atividade enzimática diferencial de lipases e α -glicosidases, sendo uma validação funcional de alguns transcritos de destaque do transcriptoma obtido previamente.
- Larvas de *Cx. quinquefasciatus* resistentes a toxina Bin apresenta um perfil de reservas energéticas alterado em relação às larvas suscetíveis.
- A fecundidade e fertilidade, nos indivíduos resistentes a toxina Bin, não apresentaram variação, isso sugere que as alterações nas reservas energéticas não provocam um custo biológico relevante nestes aspectos reprodutivos.
- A panteteinase (CPIJ017593) de *Cx. quinquefasciatus* foi identificada como uma proteína de 70 kDa, que possui uma discreta N-glicosilação e outros fatores, ainda desconhecidos, são responsáveis pela discrepância em relação ao peso predito (57 kDa).
- A panteteinase é expressa em larvas de *Cx. quinquefasciatus* suscetíveis e está potencialmente localizada no microvilli intestinal, ou seja, a mesma localização dos receptores Cqm1 da toxina Bin. A identificação desta panteteinase associada à *status* de resistência à toxina Bin abre perspectivas para seu estudo em *Cx. quinquefasciatus*.

REFERÊNCIAS

- ACHEE, N. L. et al. A critical assessment of vector control for dengue prevention. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. e0003655, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003655>>.
- ACHEE, N. L. et al. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 13, n. 1, p. e0006822, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006822>>.
- AGNEW, P.; HAUSSY, C.; MICHALAKIS, Y. Effects of density and larval competition on selected life history traits of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu v. 37, n. 5, p. 732-735, 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1603/0022-2585-37.5.732>>.
- AHMADIAN, Maryam et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nature medicine**, Londres v. 19, n. 5, p. 557-566, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm.3159>>.
- 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. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres v. 57, n. 5, p. 1117–1125, 2007.
- ALLIEVI et al. Metal biosorption by surface-layer proteins from *Bacillus* species. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 21, n. 2, p. 147–153, 2011.
- ALLIEVI, M. C. et al. Contribution of S-layer proteins to the mosquitocidal activity of *Lysinibacillus sphaericus*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 10, 2014.
- ALPHEY, L. Genetic control of mosquitoes. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto. v. 59, n, p. 205–224, 2014.
- AMORIM, L. B. et al. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure. **Biological Control**, San Diego, v. 42, n. 2, p. 155-160, 2007.
- _____ et al. Stability of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* evaluated by molecular tools. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 311–316, 2010.
- ANDRADE, C. F.; NASCIMENTO, M. C. Controle de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) pela eliminação de criadouros no bairro da Graúna, Paraty – RJ. **Revista Controle Biológico**, São Paulo, v. 2, p.33-39, 2010.
- ARRESE, E. L. et al. Diacylglycerol transport in the insect fat body: Evidence of involvement of lipid droplets and the cytosolic fraction. **Journal of Lipid Research**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 225–234, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)31683-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2275(20)31683-7)>.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto. v. 55, p. 207–225, 2010.
- ATELLA, D. M. E K. C. G. CAPÍTULO 6 - Metabolismo de Lipídeos. — INCT-Entomologia Molecular. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT**, Rio de Janeiro, 2012. p. 22. Disponível em: <<http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1/capitulo-6-metabolismo-de-lipideos/view?searchterm=metabolis>>.
- AURRAND-LIONS, M. et al. Vanin-1, a novel GPI-linked perivascular molecule involved in

thymus homing. **Immunity**, West Allis, v. 5, n. 5, p. 391-405, 1996.

BALASUBRAMANIAN, N.; TOUBARRO, D.; SIMÕES, N. Biochemical study and in vitro insect immune suppression by a trypsin-like secreted protease from the nematode *Steinernema carpocapsae*. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 165–175, 2010.

BALDACCHINO, F. et al. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 71, n. 11, p. 1471-1485, 2015.

_____ et al. An integrated pest control strategy against the Asian tiger mosquito in northern Italy: a case study. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 73, n. 1, p. 87–93, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.25688>>.

BARTUCCI, R. et al. Vanin 1: Its physiological function and role in diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 16, p. 1–15, 2019.

BAUMANN, L.; BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 170, n. 5, p. 2045–2050, 1988.

BAUMANN, P. et al. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 163, n. 2, p. 738-747, 1985.

BAUMANN, P. A. U. L. et al. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. **Microbiological reviews**, Washington, v. 55, n. 3, p. 425-436, 1991.

BECKER, N. Ice granules containing endotoxins of microbial agents for the control of mosquito larvae - A new application technique. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 19, n. 1, p. 63–66, 2003.

BENOIT, J. B.; DENLINGER, D. L. Suppression of water loss during adult diapause in the northern house mosquito, *Culex pipiens*. **Journal of Experimental Biology**, Londres, v. 210, n. 2, p. 217–226, 2007. Disponível em: <<https://journals.biologists.com/jeb/article/210/2/217/17105/Suppression-of-water-loss-during-adult-diapause-in>>.

BERRY, C. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 109, n. 1, p. 1-10, 2012

BERRUYER, C. et al. Vanin-1 licenses inflammatory mediator production by gut epithelial cells and controls colitis by antagonizing peroxisome proliferator-activated receptor γ activity. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.203, p. 2817-2827, 2006. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/203/13/2817/46375>>

BIDESHI, D. K. et al. Highly Effective Broad Spectrum Chimeric Larvicide That Targets Vector Mosquitoes Using a Lipophilic Protein. **Scientific Reports**, Londres, v. 7, n. 1, p. 3–9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-11717-9>>.

BLACK IV, W. C. et al. From global to local—new insights into features of pyrethroid detoxification in vector mosquitoes. **Insects**, v. 12, n. 4, p. 276, 2021.

BOONSERM, P. et al. Association of the components of the binary toxin from *Bacillus sphaericus* in solution and with model lipid bilayers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 342, n. 4, p. 1273–1278, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X06003445>>

BORNHAUSER, B. et al. The hematopoietic stem cell marker VNN2 is associated with chemoresistance in pediatric B-cell precursor ALL. **Blood Advances**, Washington, v. 4, n.

17, p. 4052–4064, 2020. Disponível em: <
<https://ashpublications.org/bloodadvances/article/4/17/4052/463468>>

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v.16, n.4, 279-293 2007..

BRANDON, M. C. *et al.* TOR signaling is required for amino acid stimulation of early trypsin protein synthesis in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 38, n. 10, p. 916–922, 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174808001288>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. – 5. ed. rev. e atual. – Brasília : Ministério da Saúde, 2022.

_____. Ministério da Saúde. Doenças tropicais negligenciadas. **Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2021. p. 1–76.

_____. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica e estratégias de prevenção, controle e eliminação das doenças tropicais negligenciadas no Brasil, 1995 a 2016. **Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2018. v. 49, p. 1–15.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 3ª ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011. 76 p.

_____. Ministério da Saúde. Metodologia para Quantificação de Atividade de Enzimas Relacionadas com a Resistência a Inseticidas em *Aedes aegypti*. Brasília, 2006.

BRAVO, A., LIKITVIVATANAVONG S., GILL S. S., SOBERÓN M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, p. 423–431, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>>.

BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. A. U. L. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 6, p. 1333-1337, 1987. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC203865/>>

BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging infectious diseases**, Foster city, v. 4, n. 4, p. 605, 1998.

BUCKNER, J. S.; HAGEN, M. M. Triacylglycerol and phospholipid fatty acids of the silverleaf whitefly: Composition and biosynthesis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, New York, v. 53, n. 2, p. 66-79, 2003.

CANAVOSO, L. E. *et al.* Fat metabolism in insects. **Annual review of nutrition**, Palo Alto v. 21, n. 1, p. 23-46, 2001.

CARVALHO, K. S. *et al.* *Aedes aegypti* continuously exposed to *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* does not exhibit changes in life traits but displays increased susceptibility for Zika virus. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-021-04880-6>>.

CARVALHO, K. S. *et al.* Long-term exposure of *Aedes aegypti* to *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* did not involve altered susceptibility to this microbial larvicide or to other control agents. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 11, n. 1, p. 673, 2018.

- CHALEGRE, K. D. et al. Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1044-1049, 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. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 17, p. 6321-6326, 2012.
- CHALEGRE, K. D. et al. Co-selection and replacement of resistance alleles to *Lysinibacillus sphaericus* in a *Culex quinquefasciatus* colony. **The FEBS Journal**, Bethesda, v. 282, n 18, p. 3592–3602, 2015.
- CHANG, A. et al. BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: new developments and updates. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 49, n. D1, p. D498-D508, 2021.
- CHARLES, J. F. Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. **Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie**, Paris, v. 138, p. 471-484, 1987.
- CHARLES, J. F.; NIELSEN-LEROUX, C.; DELÉCLUSE, A. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 41, p. 451-472, 1996.
- CHARLES, J. F. et al. Binding of the 51-and 42-kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 156, n. 1, p. 153-159, 1997.
- CHEN, S. et al. Systemic Nanoparticle-Mediated Delivery of Pantetheinase Vanin-1 Regulates Lipolysis and Adiposity in Abdominal White Adipose Tissue. **Advanced Science**, Weinheim, v. 7, n. 14, p. 1–15, 2020.
- CHEVILLON, C. et al. Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): interaction between recessive mutants and evolution in southern France. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 657-664, 2001.
- CIÊNCIA, C. Da. Figura 1- Ciclo de vida de *Culex* sp. 2020. Disponível em: <<https://www.casadaciencia.com.br/o-fim-da-picada/>>. Acesso em: 22 out. 2020.
- CISNEROS, J. et al. Toxic effects of spinosad on predatory insects. **Biological Control**, San Diego, v. 23, n. 2, p. 156–163, 2002.
- CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction** (Vol. 1). 509 Chapman & Hall. London, 1992.
- COLLETIER, J. et al. *De novo* phasing with X-ray laser reveals mosquito larvicide BinAB structure. **Nature**, Londres, v. 539, n. 7627, p. 43, 2016.
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1994. 228p
- COON, K. L. et al. Predaceous Toxorhynchites mosquitoes require a living gut microbiota to develop. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v. 287, n. 1919, p. 20192705, 2020. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rspb.2019.2705>>
- COSTA, S. G. DA et al. Characterization of α -glucosidases from *Lutzomyia longipalpis* reveals independent hydrolysis systems for plant or blood sugars. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 10, n. , p. 1–15, 2019.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental-uma revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 995-1002, 2002.

DACEY, D. P.; CHAIN, F. J. J. The Challenges of Microbial Control of Mosquito-Borne Diseases Due to the Gut Microbiome. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 11, p. 504354, 2020.

DAHMANA, H.; MEDIANNIKOV, O. Mosquito-borne diseases emergence/resurgence and how to effectively control it biologically. **Pathogens**, Basel, v. 9, n. 4, p. 1–26, 2020.

DARBOUX, I., NIELSEN-LEROUX, C., CHARLES, J.F. and PAURON, D. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, 31: 981-990, 2001.

_____ *et al.* Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 99, n. 9, p. 5830-5835, 2002. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=122862&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

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

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

DE MONPEZAT, T. L. *et al.* A fluorimetric method for measuring lipase activity based on umbelliferyl esters. **Lipids**, New York, v. 25, n. 10, p. 661-664, 1990.

DHADIALLA, T. S.; CARLSON, G. R.; LE, D. P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 43, n. 134, p. 545–569, 1998.

DHALIA, R. *et al.* Translation initiation in *Leishmania major*: Characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 23–41, 2005.

DIDION, E. M. *et al.* Microbiome reduction prevents lipid accumulation during early diapause in the northern house mosquito, *Culex pipiens pipiens*. **Journal of Insect Physiology**, Londres, v. 134, p. 104295, 2021.

DINIZ, D. F. A. *et al.* Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1276-5>>.

DODSON, B. L.; KRAMER, L. D.; RASGON, J. L. Effects of larval rearing temperature on immature development and West Nile virus vector competence of *Culex tarsalis*. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 5, p. 1-6, 2012.

DU, Y. *et al.* Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 110, n. 29, p. 11785-11790, 2013

DUPRÉ, S. *et al.* Continuous spectrophotometric assay of pantetheinase activity. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 142, n. 1, p. 175–181, 1984.

EISENHABER, F.; BORK, P. Wanted: subcellular localization of proteins based on

sequence. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 169-170, 1998.

ELIZONDO-QUIROGA, D. *et al.* Zika Virus in Salivary Glands of Five Different Species of Wild-Caught Mosquitoes from Mexico. **Scientific Reports**, Londres, v. 8, n. 1, p. 809, 2018.

FARAJOLLAHI, A. *et al.* “Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 7, p. 1577–1585, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.013>>.

FARNESI, L. C. *et al.* Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Diego, v. 11, n. 10, p. e0006063, 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006063>>.

FARNESI, L. C. *et al.* Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. **Journal of Insect Physiology**, Londres, v. 83, p. 43–52, 2015.

FERREIRA, A. H. P. *et al.* Identification of midgut microvillar proteins from *Tenebrio molitor* and *Spodoptera frugiperda* by cDNA library screenings with antibodies. **Journal of Insect Physiology**, Londres, v. 53, n. 11, p. 1112–1124, 2007.

FERREIRA, D.; NAQUET, P.; MANAUTOU, J. Influence of Vanin-1 and Catalytic Products in Liver During Normal and Oxidative Stress Conditions. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 22, n. 20, p. 2407–2416, 2015.

FERREIRA, L. M. *et al.* The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI6 anchored alpha-glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 40, p. 604-610, 2010.

_____*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 Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 50, p. 34-42, 2014.

_____; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Bacterial larvicides for vector control: mode of action of toxins and implications for resistance. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 23, n. 10, p. 1137-1168, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2013.822472>>.

FFRENCH-CONSTANT, R. H. Which came first: insecticides or resistance? **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 1–4, 2007.

FILIETAZ, C. F. T.; LOPES, A. R. Caracterização de lipases em Arthropoda. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, São Paulo, v. 2, n. 1, 2010.

FLOWER, D. R. The lipocalin protein family: A role in cell regulation. **FEBS Letters**, Bethesda, v. 354, n. 1, p. 7–11, 1994.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 2002. 860p

FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. **Biomolecular Engineering**, New York, v. 23, n. 4, p. 149-169, 2006.

GABRIŠKO, M. Evolutionary history of eukaryotic α -glucosidases from the α -amylase family. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 76, n. 3, p. 129–145, 2013.

GALLAND, F. *et al.* Two Human Genes Related to Murine Vanin-1 Are Located on the Long

Arm of Human Chromosome 6. **Genomics**, Londres, v. 53, n. 2, p. 203–213, 1998. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754398954817>>.

GONDIM, K. C. *et al.* Lipid metabolism in insect disease vectors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 101, p. 108–123, 2018.

GUEDES, D.R.D *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging microbes & infections**, Philadelphia, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2017.

GUO, Q. Y. *et al.* Interaction of *Lysinibacillus sphaericus* Cry48Aa/Cry49Aa toxin with midgut brush-border membrane fractions from *Culex quinquefasciatus* larvae. **Insect molecular biology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 163–170, 2016.

GUO, Q. *et al.* Single nucleotide deletion of *cqm1* gene results in the development of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, Londres, v. 59, n. 9, p. 967-973, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022191013001546>>.

GUO, X. X. *et al.* *Culex pipiens quinquefasciatus*: A potential vector to transmit Zika virus. **Emerging Microbes and Infections**, Philadelphia, v. 5, n. 9, p. e102-5, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/emi.2016.102>>.

GURCEL, L. *et al.* Caspase-1 Activation of Lipid Metabolic Pathways in Response to Bacterial Pore-Forming Toxins Promotes Cell Survival. **Cell**, New York, v. 126, n. 6, p. 1135–1145, 2006.

HAHN, D. A.; DENLINGER, D. L. Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization. **Journal of Insect Physiology**, Londres, v. 53, n. 8, p. 760–773, 2007.

_____; _____. Energetics of insect diapause. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 56, p. 103–121, 2011.

HARDSTONE, M. C. *et al.* Differences in development, glycogen, and lipid content associated with cytochrome P450-mediated permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 47, n. 2, p. 188–198, 2010.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 45, p. 51–88, 2005.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 30, n. 11, p. 1009-1015, 2000.

_____ *et al.* The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 34, n. 7, p. 653–665, 2004.

_____ *et al.* The Innovative Vector Control Consortium: improved control of mosquito-borne diseases. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 7, p. 308–312, 2006.

HENRIQUES, B. S. *et al.* Characterization of the Temporal Pattern of Blood Protein Digestion in *Rhodnius prolixus*: First Description of Early and Late Gut Cathepsins. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 11, p. 1–20, 2021.

HERTLEIN, M. B. *et al.* A review of spinosad as a natural product for larval mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 26, n. 1, p. 67-87, 2010. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.2987/09-5936.1>>.

HIRE, R. S. *et al.* An oligomeric complex of BinA/BinB is not formed in-situ in mosquito-larvicidal *Lysinibacillus sphaericus* ISPC-8. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York,

v. 122, p. 44–47, 2014.

HORNE, I.; HARITOS, V. S.; OAKESHOTT, J. G. Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 547–567, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.06.002>>.

HUCK, D. T.; KLEIN, M. S.; MEUTI, M. E. Determining the effects of nutrition on the reproductive physiology of male mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, Londres, v. 129, n. January, p. 104191, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2021.104191>>.

IMANAKA, T. *et al.* Characterization of lysosomal acid lipase purified from rabbit liver. **The Journal of Biochemistry**, Abingdon, v. 96, n. 4, p. 1089-1101, 1984.

INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES. InsectSelect™ Glow System. 2013.

ISOE, J. *et al.* Molecular genetic analysis of midgut serine proteases in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 39, n. 12, p. 903–912, 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174809001556>>.

JANSEN, P. A. M. *et al.* Combination of pantothenamides with vanin inhibitors as a novel antibiotic strategy against gram-positive bacteria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Bethesda, v. 57, n. 10, p. 4794-4800, 2013.

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

JONES, G. W. *et al.* The Cry48Aa-Cry49Aa binary toxin from *Bacillus sphaericus* exhibits highly restricted target specificity. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 9, p. 2418-2424, 2008.

KALE, A. *et al.* Interaction between mosquito-larvicidal *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin components: Analysis of complex formation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 43, n. 11, p. 1045–1054, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.07.011>>.

KASKOW, B. J. *et al.* Diverse biological activities of the vascular non-inflammatory molecules - The Vanin pantetheinases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 417, n. 2, p. 653–658, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.099>>.

KASUBUCHI, M. *et al.* Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. **Nutrients**, Basel, v. 7, n. 4, p. 2839–2849, 2015.

KAWOOYA, J. K.; LAW, J. H. Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 263, n. 18, p. 8748–8753, 1988. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68369-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68369-3)>.

KELKER, M. S. *et al.* Structural and biophysical characterization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 11, 2014.

KELLEN, W. R. *et al.* *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 7, n. 4, p. 442–448, 1965.

KENT, R. J.; CRABTREE, M. B.; MILLER, B. R. Transmission of West Nile virus by *Culex quinquefasciatus* say infected with culex flavivirus izabal. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 5, p. e671, 2010.

KILLEEN, G. F. *et al.* Developing an expanded vector control toolbox for malaria elimination. **BMJ Global Health**, Londres, v. 2, n. 2, p. e000211, 2017. Disponível em: <<http://gh.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjgh-2016-000211>>.

- KING, A. M.; AARON, C. K. Organophosphate and carbamate poisoning. **Emergency Medicine Clinics**, Philadelphia, v. 33, n. 1, p. 133-151, 2015. Disponível em: <[https://www.emed.theclinics.com/article/S0733-8627\(14\)00080-7/abstract](https://www.emed.theclinics.com/article/S0733-8627(14)00080-7/abstract)>.
- KLIOT, A.; GHANIM, M. Fitness costs associated with insecticide resistance. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 68, n. 11, p. 1431–1437, 2012.
- KLOWDEN, M. J. **Physiological Systems in insects**. 3^a ed., 2013, p. 663.
- LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 23, n. 2, p. 133-163, 2007. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.2987/8756>>.
- LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 132, p. 1-41, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>>.
- LAURENCE, B. R.; PICKETT, J. A. Erythro-6-acetoxy-5-hexadecanolide, the major component of a mosquito oviposition attractant pheromone. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, Londres, n. 1, p. 59-60, 1982.
- LEKAKARN, H.; PROMDONKOY, B.; BOONSERM, P. Interaction of *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin with mosquito larval gut cells: Binding and internalization. **Journal of Invertebrate Pathology**, Londres, v. 132, p. 125–131, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.09.010>>.
- LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Reviews of Entomology**, Palo Alto, v. 52, p. 231-253, 2007.
- LIMA, T. A. et al. Digestive enzymes from workers and soldiers of termite *Nasutitermes corniger*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 176, p. 1-8, 2014.
- LIMA, E. P. et al. Pesticide exposure and its repercussion in the health of sanitary agents in the State of Ceará, Brazil. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 6, p. 2221–2230, 2009.
- LIU, N. Insecticide resistance in mosquitoes: Impact, mechanisms, and research directions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 60, p. 537–559, 2015.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LOPES, R. P.; LIMA, J. B. P.; MARTINS, A.R. J. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 in Brazil: A review. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3850-8>>.
- LOZANO, L. C.; AYALA, J. A.; DUSSÁN, J. *Lysinibacillus sphaericus* S-layer protein toxicity against *Culex quinquefasciatus*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 33, n. 10, p. 2037-2041, 2011.
- _____; DUSSÁN, J. Metal tolerance and larvicidal activity of *Lysinibacillus sphaericus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin. v. 29, n. 8, p. 1383–1389, 2013.
- MARTIN, F. et al. Vanin genes are clustered (human 6q22–24 and mouse 10A2B1) and encode isoforms of pantetheinase ectoenzymes. **Immunogenetics**, New York, v. 53, p. 296-306, 2001.

- MATEOS, J. C. *et al.* Mapping substrate selectivity of lipases from thermophilic fungi. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 49, n. 1-4, p. 104-112, 2007.
- MELO, D. C. T. V. **AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO BIOLÓGICO DE *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: CULICIDAE) RESISTENTE A *Bacillus sphaericus***: Universidade Federal de Pernambuco, 2013.
- MELO, J. V. *et al.* Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. **Micron**, New York, v. 39, p. 1342-1350, 2008.
- MELO, J. V. DE *et al.* Cytopathological effects of *Bacillus sphaericus* Cry48Aa/Cry49Aa toxin on binary toxin-susceptible and -resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 14, p. 4782–4789, 2009.
- MENEZES, H. S. G. *et al.* Molecular and biological features of *Culex quinquefasciatus* homozygous larvae for two *cqm1* alleles that confer resistance to *Lysinibacillus sphaericus* larvicides. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 77, n. 7, p. 3135-3144, 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10916293>>.
- MENEZES, H. S. G. *et al.* A new allele conferring resistance to *Lysinibacillus sphaericus* is detected in low frequency in *Culex quinquefasciatus* field populations. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 9, n. 1, p. 70, 2016.
- MINETTI, C.; INGHAM, V. A.; RANSON, H. Effects of insecticide resistance and exposure on *Plasmodium* development in *Anopheles* mosquitoes. **Current opinion in insect science**, Amsterdam, v. 39, p. 42-49, 2020.
- MINSHALL, N.; THOM, G.; STANDART, N. A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking. **Rna**, New York, v. 7, n. 12, p. 1728–1742, 2001.
- MOLTINI-CONCLOIS, I. *et al.* Larval exposure to the bacterial insecticide Bti enhances dengue virus susceptibility of adult *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insects**, Washington v. 9, n. 4, p. 1–8, 2018.
- MULLA, M. S. *et al.* Emergence of resistance and resistance management in field populations of tropical *Culex quinquefasciatus* to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 19, n. 1, p. 39-46, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12674533>>.
- NASCIMENTO, N. A. *et al.* N-glycosylation influences the catalytic activity of mosquito α -glucosidases associated with susceptibility or refractoriness to *Lysinibacillus sphaericus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 81, p. 62–71, 2017.
- _____. Functional *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa is necessary to synergize *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin (Bin) against Bin-resistant and-refractory mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 86, n. 7, p. e02770-19, 2020.
- NICOLAS, L. *et al.* Respective role of the 42- and 51-kDa component of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 106, p. 275-280, 1993.
- NIELSEN-LEROUX, C. *et al.* Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 210, n. 2, p. 585–590, 1992
- NIELSEN-LEROUX, C., J.F., CHARLES, I. T. AND GEORGHIOU, G. P. Resistance in the laboratory population of *Culex quinquefasciatus* to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 228, p. 206-210, 1995.

NIELSEN-LEROUX, C. et al. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* mosquito larvae (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu v. 34, p. 321-327, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9151498>>.

NIELSEN-LEROUX, C. et al. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west-Mediterranean countries. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 39, 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*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 10, p. 3404-3411, 2007.

NITTO, T.; INOUE, T.; NODE, K. Alternative spliced variants in the pantetheinase family of genes expressed in human neutrophils. **Gene**, Amsterdam, v. 426, n. 1-2, p. 57-64, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2008.08.019>>.

_____; ONODERA, K. The Linkage Between Coenzyme A Metabolism and Inflammation: Roles of Pantetheinase. **Journal of Pharmacological Sciences**, Kyoto, v. 123, n. 1, p. 1-8, 2013. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/123/1/123_13R01CP/_article>.

OLIVEIRA, C. M. F. et al. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* from China and Brazil (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 41, n. 1, p. 58-64, 2004.

OPOTA, O., et al. Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B - Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 149, p. 419-427, 2008

_____. *et al.* *Bacillus sphaericus* binary toxin elicits host cell autophagy as a response to intoxication. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 2, e14682, 2011.

PACE, H. C.; BRENNER, C.. The nitrilase superfamily: classification, structure and function. **Genome biology**, Londres, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2001.

ORR, H. A. Fitness and its role in evolutionary genetics. **Nature Reviews Genetics**, Londres, v. 10, n. 8, p. 531-539, 2009.. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrg2603>>.

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

PEREZ, M. H.; NORIEGA, F. G. *Aedes aegypti* pharate 1st instar quiescence: A case for anticipatory reproductive plasticity. **Journal of Insect Physiology**, Londres, v. 59, n. 3, p. 318-324, 2013.

PITARI, G. et al., Pantetheinase activity of membrane- bound Vanin-1: lack of free cysteamine in tissues of Vanin-1 deficient mice. **FEBS Letter**, Bethesda, v. 483, n. 2-3, p. 149-154, 2000.

PORTUGAL, L. *et al.* Toxicity of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis* to CF1 cells does not involve activation of adenylate cyclase/PKA signaling pathway. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 80, p. 21-31, 2017.

POVERO, D. *et al.* Lipid-induced toxicity stimulates hepatocytes to release angiogenic microparticles that require vanin-1 for uptake by endothelial cells. **Science Signaling**, Washington, v. 6, n. 296, p. 1-15, 2013.

PROFETA, G. S. *et al.* Standardization of a continuous assay for glycosidases and its use for screening insect gut samples at individual and populational levels. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 8, p. 308, 2017.

RAABO, B. E.; TERKILDSEN, T. C. On the enzymatic determination of blood glucose. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Londres, v. 12, n. 4, p. 402–407, 1960.

RAKHSHANDEHROO, M. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. **PPAR research**, New York, v. 2010, 2010.

RAO, D. R. *et al.* Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. **Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News**, Fresno, v. 11, n. 1, p. 1-5, 1995.

RAWAL, D. A review on different strategies used for biological control of mosquitoes. **International Journal of Mosquito Research**, New Delhi, v. 6, n. 5, p. 41–43, 2019.

REGIS, L. *et al.* Bacteriological Larvicides for Vector Control: Fundamental and Practical Aspects. **Trends Parasitology**, New York, v. 17, n. 8, p. 377-380. 2001.

REZENDE, T. M. T. *et al.* Identification of Cry48Aa/Cry49Aa toxin ligands in the midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 88, p. 63–70, 2017.

_____ *et al.* A differential transcriptional profile by *Culex quinquefasciatus* larvae resistant to *Lysinibacillus sphaericus* IAB59 highlights genes and pathways associated with the resistance phenotype. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 12, n. 1, p. 1–17, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3661-y>>.

RIVERA-PÉREZ, C. *et al.* Purification and characterization of an intracellular lipase from pleopods of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 158, n. 1, p. 99-105, 2011.

RIVERO, A. *et al.* Energetic cost of insecticide resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 48, n. 3, p. 694–700, 2011.

RODCHAROEN, J.; MULLA, M. S. Resistance development in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus*. **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 87, n. 5, p. 1133-1140, 1994.

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

_____; DE-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 Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 321, n. 2, p. 167-174, 2011.

ROMMELAERE, S. *et al.* PPARalpha regulates the production of serum Vanin-1 by liver. **FEBS Letters**, Bethesda, v. 587, n. 22, p. 3742–3748, 2013.

_____ *et al.* Sox17 regulates liver lipid metabolism and adaptation to fasting. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 8, p. 1–10, 2014.

RUAN, B. H. *et al.* A fluorescent assay suitable for inhibitor screening and vanin tissue quantification. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 399, n. 2, p. 284–292, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2009.12.010>>.

RUIZ, C. *et al.* Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I. 4 bacterial lipase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 217, n. 2, p. 263-267, 2002.

SANTOS, V. S. V.; PEREIRA, B. B. Properties, toxicity and current applications of the biolarvicide spinosad. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, Londres. v. 23, n. 1, p. 13–26, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10937404.2019.1689878>>.

SASMITA, H. I. *et al.* Effects of larval diets and temperature regimes on life history traits, energy reserves and temperature tolerance of male *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): optimizing rearing techniques for the sterile insect programmes. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2019.

SCHWARTZ, J. L. *et al.* Permeabilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitocidal binary toxin and its individual components. **Journal of Membrane Biology**, Nova York. v. 184, n. 2, p. 171–183, 2001.

SHARMA, M. *et al.* Mosquito-larvicidal binary toxin receptor protein (Cqm1): crystallization and X-ray crystallographic analysis. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, Chester, v. 74, n. 9, p. 571-577, 2018.

_____; KUMAR, A.; KUMAR, V. Liposome-Based Study Provides Insight into Cellular Internalization Mechanism of Mosquito-Larvicidal BinAB Toxin. **Journal of Membrane Biology**, Nova York, v. 253, n. 4, p. 331–342, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00232-020-00131-4>>.

_____; KUMAR, V. Crystal structure of BinAB toxin receptor (Cqm1) protein and molecular dynamics simulations reveal the role of unique Ca(II) ion. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 140, p. 1315–1325, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.126>>.

SHARMA, P. *et al.* Status of carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Longhua District, v. 4, n. 4, p. 301-304, 2011.

SILVA, E. R. M. N. *et al.* The influence of larval density on triacylglycerol content in *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 106, n. 2, p. e21757, 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/arch.21757>>.

SILVA-FILHA, M. H. *et al.* Low-level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park MD, v. 88, n. 3, p. 525-530, set. 1995.

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

SILVA-FILHA, M. H., NIELSEN-LEROUX, C. and CHARLES, J. F. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Insect Biochemistry Molecular Biology**, Oxford, v. 29, p. 711-721, 1999.

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: **Advances in Insect Physiology**. Academic Press, Cambridge, 2014. p. 89-176.

- SILVA-FILHA, M. H. N. L. Resistance of mosquitoes to entomopathogenic bacterial-based larvicides: current status and strategies for management. In: ***Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus***. Springer International Publishing, Berlin, 2017. p. 239-257.
- SILVA-FILHA, M. H. N. L. *et al.* Bacterial toxins active against mosquitoes: Mode of action and resistance. **Toxins**, Basel, v. 13, n. 8, p. 523, 2021.
- SINÈGRE, G. *et al.* First field occurrence of *Culex pipiens* resistance to *Bacillus sphaericus* in southern France. **Abstracts of VIIITH European Meet Society of Vector Ecology**, Cambridge, v. 17, p.5-8, 1994.
- SINGER, Samuel. Isolation and development of bacterial pathogens of vectors. **Biological regulation of vectors**, p. 3-18, 1977.
- SINGH, G. J. P., GILL, S. S. An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 52, p. 237-247, 1988.
- SINGKHAMANAN, K. *et al.* Identification of amino acids required for receptor binding and toxicity of the *Bacillus sphaericus* binary toxin. **FEMS Microbiology letters**, Amsterdam, v. 303, n. 1, p. 84-91, 2010
- SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, San Diego. v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.
- SOUZA, R. S. *et al.* Microorganism-based larval diets affect mosquito development, size and nutritional reserves in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 10, p. 152, 2019.
- SPARKS, T. C. *et al.* Resistance and cross-resistance to the spinosyns—a review and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 102, n. 1, p. 1-10, 2012.
- SU, T. *et al.* Resistance to *Lysinibacillus sphaericus* and Other Commonly Used Pesticides in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Chico, California. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 55, n. 2, p. 423–428, 2018.
- _____ *et al.* High Resistance to *Bacillus sphaericus* and Susceptibility to Other Common Pesticides in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Salt Lake City, UT. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 56, n. 2, p. 506–513, 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jme/article/56/2/506/5154673>>.
- _____; CHENG, M.-L. Laboratory selection of resistance to spinosad in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 51, n. 2, p. 421-427, 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1603/ME13173>>.
- SURYA, W. *et al.* Binary toxin subunits of *Lysinibacillus sphaericus* are monomeric and form heterodimers after in vitro activation. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 6, p. 1–14, 2016.
- SUWAKI, N. *et al.* Expression and Potential Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in the Placenta of Diabetic Pregnancy. **Placenta**, Amsterdam, v. 28, n. 4, p. 315–323, 2007.
- SUZUKI, K. *et al.* A novel glycosylphosphatidyl inositol-anchored protein on human leukocytes: a possible role for regulation of neutrophil adherence and migration. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 162, n. 7, p. 4277-4284, 1999.
- TABASHNIK, B. E. *et al.* Insect resistance to Bt crops: Evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, Londres, v. 26, n. 2, p. 199–202, 2008.

- TANGSONGCHAROEN, C. et al. *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin induces apoptosis in susceptible *Culex quinquefasciatus* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 128, p. 57–63, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.04.008>>.
- TETREAU, G. et al. Bacterial microbiota of *Aedes aegypti* mosquito larvae is altered by intoxication with *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Parasites & vectors**, Londres, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2018.
- THANABALU, T. et al. Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 9, p. 2776–2785, 1991.
- THANABALU, T.; PORTER, A. G. A *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8 kDa. **Gene**, Amsterdam, v. 170, n. 1, p. 85–89, 1996.
- TOPRAK, U. et al. Identification of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix proteins and enzymes involved in peritrophic matrix chitin metabolism. **Insect science**, Victoria, v. 23, n. 5, p. 656–674, 2016.
- UKUBUIWE, A. C. et al. Quantifying the Influence of Larval Density on Disease Transmission Indices in *Culex quinquefasciatus*, the Major African Vector of Filariasis. **International Journal of Insect Science**, Thousand Oaks, v. 11, p. 117954331985602, 2019.
- VALZANIA, L. et al. Both living bacteria and eukaryotes in the mosquito gut promote growth of larvae. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 7, p. e0006638, 2018. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006638>>.
- VAN DER HORST, D. J.; RYAN, R. t O. Lipid transport. In: **Insect molecular biology and biochemistry**. Academic Press, Oxford, 2017. p. 225–246.
- VAN DIEPEN, J. A. et al. PPAR-alpha dependent regulation of vanin-1 mediates hepatic lipid metabolism. **Journal of Hepatology**, New York, v. 61, n. 2, p. 366–372, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.04.013>>.
- VAN HANDEL, E. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 1, n. 3, p. 302–304, 1985.
- VARGAS, H. C. M. et al. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, Londres, v. 62, p. 54–60, 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022191014000195>>.
- WANG, M. et al. Global gene expression changes induced by knockout of a protease gene cluster in *Helicoverpa armigera* with CRISPR/Cas9. **Journal of Insect Physiology**, Londres, v. 122, p. 104023, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022191019303439>>.
- WEISER, J. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, Alemanha, v. 139, n. 1, p. 57–60, 1984. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0232-4393\(84\)80033-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0232-4393(84)80033-5)>.
- WICKREMESINGHE, R. S. B.; MENDIS, C. L. *Bacillus sphaericus* spore from Sri Lanka demonstrating rapid larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus*. **Mosquito News**, Albany, v. 40, n. 3, p. 387–389, 1980.
- WIRTH, M. C. et al. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 37, p. 534-540, 2000.

WIRTH, M. C. *et al.* Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 19, p. 6066-6071, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.003>>.

WIRTH, M. C. *et al.* Mtx toxins from *Lysinibacillus sphaericus* enhance mosquitocidal cry-toxin activity and suppress cry-resistance in *Culex quinquefasciatus*. **Journal of invertebrate pathology**, New York, v. 115, p. 62-67, 2014.

YAMADA, T. *et al.* Fat body glycogen serves as a metabolic safeguard for the maintenance of sugar levels in *Drosophila*. **Development**, Cambridge, v. 145, n. 6, p. dev158865, 2018.

YAMASHITA, N. *et al.* Metabolic pathway catalyzed by Vanin-1 pantetheinase plays a suppressive role in influenza virus replication in human alveolar epithelial A549 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 489, n. 4, p. 466–471, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X17310811>>.

YAO, J. *et al.* Changes in gene expression in the larval gut of *Ostrinia nubilalis* in response to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protoxin ingestion. **Toxins**, Basel, v. 6, n. 4, p. 1274-1294, 2014.

_____ *et al.* Comparisons of transcriptional profiles of gut genes between Cry1Ab-resistant and susceptible strains of *Ostrinia nubilalis* revealed genes possibly related to the adaptation of resistant larvae to transgenic Cry1Ab corn. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 2, p. 1–17, 2017.

YAVAŞOĞLU, S. İ.; ŞİMŞEK, F. M. Insecticide Resistance and Mechanisms of *Culex pipiens* Populations in the Mediterranean and Aegean Regions of Turkey During 2017–2018. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, Tehran v. 15, n. 4, p. 405-420, 2021.

YUAN, Z. *et al.* High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from southern China. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 10, n. 1, p. 41-49, 2000.

ZHANG, P. *et al.* Proteome analysis of silk gland proteins from the silkworm, *Bombyx mori*. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 8, p. 2586–2599, 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200500348>>.

ZHANG, Y. *et al.* Isolation of two highly toxic *Bacillus sphaericus* strains. **Insecticidal Microorg**, 1987. v. 1, p. 98–99.

ZIEGLER, R.; VAN ANTWERPEN, R.. Lipid uptake by insect oocytes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 36, n. 4 SPEC. ISS., p. 264–272, 2006.

ZIEGLER, R.; IBRAHIM, M. M. Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of insect physiology**, Londres, v. 47, n. 6, p. 623-627, 2001.

APÊNDICE A – Outras atividades desenvolvidas

- Cursos, estágios e participações em congressos:

- Estágio de mobilidade estudantil para o Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do IOC-FIOCRUZ/RJ sob a supervisão do Dr. Fernando Ariel Genta e Dra. Samara Graciane da Costa Latgé. Colaboração realizada com o financiamento do edital de mobilidade discente da Fiocruz. Período: setembro a novembro 2019.
- Curso de capacitação em Biossegurança na plataforma EAD da Fiocruz. Carga horária: 45h. Período: abril a maio 2020
- Curso EAD: Mosquitos, bases da Vigilância e Controle. Carga horária: 30h.
- Participação no 1º Simpósio virtual em Biociências e Biotecnologia em Saúde. Carga horária: 15h. Período: junho a julho 2020
- Estágio à docência no Instituto Federal da Paraíba na disciplina “Gestão ambiental dos recursos hídricos” sob a supervisão da docente Dra. Karine da Silva Carvalho. Período: setembro a dezembro 2021 e maio a setembro 2022.
- Participação e apresentação oral de trabalho no 57º Congresso de Medicina Tropical; Belém, 14-16 de novembro de 2022.

- Formação em recursos humanos:

- Co-orientação do aluno de mestrado Hyago Luiz Rique do PPG-BBS do IAM-FIOCRUZ. Período: abril 2021 até o presente.
- Co-orientação da aluna de iniciação científica do programa PIBIC-FIOCRUZ Nicolly Oliveira Magalhães graduanda do curso de Ciências Biológicas/UPE. Período: julho 2021 a setembro 2022
- Co-orientação do aluno de iniciação científica do programa PIBIC-FIOCRUZ Yuri Mateus Garcia graduando do curso de Biomedicina/UFPE. Período: outubro 2022 até o presente.
- Participação em banca de graduação da aluna Karinna Ketylim Nunes Figueredo na Faculdade Frassinete do Recife em dezembro de 2022.

APÊNDICE B – Artigo submetido

Heliyon

A *Culex quinquefasciatus* strain resistant to the Binary toxin displays lower lipase activity and altered energy reserves --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	HELIYON-D-22-30731
Article Type:	Original Research Article
Section/Category:	Life Sciences
Keywords:	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> ; Cqm1; transcriptome; fitness; α -glucosidases; lipases; lipids; glycogen
Manuscript Classifications:	110.140.110: Entomology; 110.140.110.100: Insects; 110.220.120: Phenotyping; 110.260: Biochemistry; 110.350.100: Animal Physiology
Corresponding Author:	Maria Helena N L Silva-Filha, Ph.D Aggeu Magalhães Institute Recife, PE BRAZIL
First Author:	Heverly Suzany Gouveia Menezes, MSc
Order of Authors:	Heverly Suzany Gouveia Menezes, MSc Samara Grazielle Costa-Latgé, PhD Fernando Ariel Genta Thiago Henrique Napoleão, PhD Patrícia Maria Guedes Paiva, PhD Tatiany Patrícia Romão, PhD Maria Helena N L Silva-Filha, PhD
Abstract:	The resistance of a <i>Culex quinquefasciatus</i> strain to the Binary (Bin) toxin from <i>Lysinibacillus sphaericus</i> IAB59 larvicide is due to the lack of expression of the toxin's receptors, the membrane-bound Cqm1 α -glucosidases. A previous transcriptomic profile of the resistant larvae showed several differentially expressed genes including those coding Cqm1, lipases and proteases as well as enriched terms from lipid and carbohydrate metabolism pathways. This study aimed to investigate metabolic features of the Bin-resistant individuals by comparing the activity of some enzymes, energy reserves, fertility and fecundity to a susceptible strain. Catalytic assays showed that the lipase activity in the midgut of resistant larvae was significantly lower than susceptible ones using acetate, butyrate, heptanoate, as substrates. The α -glucosidase activity was reduced in resistant larvae when sucrose was used as substrate. No difference in protease activity towards trypsin, chymotrypsin and aminopeptidases substrates was detected between resistant and susceptible larvae. In larval and adult stages, the resistant strain showed an altered profile of energy reserves characterized by significantly reduced levels of lipids and a greater amount of reducing sugars. The fertility and fecundity of females, reared during their larval stage under controlled and nutritional stress conditions were similar for both strains, indicating that those changes in energy reserves did not affect these reproductive parameters. Our dataset showed that Bin-resistant insects display differential metabolic features co-selected with that phenotype that can potentially have effects on mosquito fitness, in particular due to reduced lipid accumulation.
Suggested Reviewers:	Kátia C Gondim, PhD professor, Federal University of Rio de Janeiro katia@bioqmed.ufrj.br Expertise on mosquito biochemistry Juan Luis Jurat-Fuentes, PhD The University of Tennessee Knoxville jurat@utk.edu Expertise on insect control using entomopathogenic bacteria, mode of action of toxins

Research Article



Received 14 December 2020

Revised 26 January 2021

Accepted article published 18 March 2021

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/pa.6349

Molecular and biological features of *Culex quinquefasciatus* homozygous larvae for two *cqm1* alleles that confer resistance to *Lysinibacillus sphaericus* larvicides

Heverly Suzany G Menezes,^a Nathaly A Nascimento,^a
Milena Paiva-Cavalcanti,^b Samara G da Costa-Latgé,^c Fernando A Genta,^c
Cláudia MF Oliveira,^a Tatianny P Romão^a and Maria Helena NL Silva-Filha^{a*}



Abstract

BACKGROUND: *Culex quinquefasciatus* resistance to the binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus* larvicides can occur because of mutations in the *cqm1* gene that prevents the expression of the toxin receptor, Cqm1 α -glucosidase. In a resistant laboratory-selected colony maintained for more than 250 generations, *cqm1*_{BR1} and *cqm1*_{BR2} resistance alleles were identified. The major allele initially found, *cqm1*_{BR1}, became minor and was replaced by *cqm1*_{BR2}. This study aimed to investigate the features associated with homozygous larvae for each allele to understand the reasons for the allele replacement and to generate knowledge on resistance to microbial larvicides.

RESULTS: Homozygous larvae for each allele were compared. Both larvae displayed the same level of resistance to the binary toxin (3500-fold); therefore, a change in phenotype was not the reason for the replacement observed. The lack of Cqm1 expression did not reduce the total specific α -glucosidase activity for homozygous *cqm1*_{BR1} and *cqm1*_{BR2} larvae, which were statistically similar to the susceptible strain, using artificial or natural substrates. The expression of eight Cqm1 paralogs α -glucosidases was demonstrated in resistant and susceptible larvae. Bioassays in which *cqm1*_{BR1} or *cqm1*_{BR2} homozygous larvae were reared under stressful conditions showed that most adults produced were *cqm1*_{BR2} homozygous (69%). Comparatively, in the offspring of a heterozygous sub-colony reared under optimal conditions for 20 generations, the *cqm1*_{BR1} allele assumed a higher frequency (0.72).

CONCLUSION: Homozygous larvae for each allele exhibited a similar resistant phenotype. However, they presented specific advantages that might favor their selection and can be used in designing resistance management practices.

© 2021 Society of Chemical Industry.

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keyword: binary toxin; α -Glucosidases; receptor; Cqm1; fitness

1 INTRODUCTION

Lysinibacillus sphaericus-based larvicides are among the most effective and safe agents for controlling *Culex quinquefasciatus* in urban areas.¹ The active ingredient of these larvicides is the binary protoxin (Bin). Some *L. sphaericus* strains can produce this protoxin deposited in crystalline form during sporulation. After ingestion of crystals by *C. quinquefasciatus* larvae, the protoxin is processed into an active toxin.^{2,3} Bin binds to its receptor Cqm1 (*Culex quinquefasciatus* maltase 1), a membrane-bound α -glucosidase from the midgut epithelial cells.⁴ The binding of the Bin toxin to this receptor mediates its cell internalization, producing cytopathological effects and larval mortality.^{5–8} The absence of Cqm1 receptors on the midgut epithelium has been reported as the main responsible factor for *C. quinquefasciatus* resistance to the Bin toxin.^{10–12} The most common mutations in the *cqm1* gene that confer resistance are those causing premature stop codons. Therefore, such

transcripts encode for truncated proteins without the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor, which is required for the location of Cqm1 on the cell membrane.^{10–19}

* Correspondence to: MHLN Silva-Filha, Department of Entomology, Instituto Aggeu Magalhães-ROCIUZ, Av. Moraes Rego s/n, Recife, PE 50670-920 Brazil. E-mail: mhnsf@pq.cnpq.br

#GGM and NAN should be considered joint first authors.

^a Department of Entomology, Instituto Aggeu Magalhães-ROCIUZ, Recife, Brazil

^b Department of Microbiology, Instituto Aggeu Magalhães-ROCIUZ, Recife, Brazil



^c Laboratory of Insect Biochemistry and Physiology, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

APÊNDICE D – Artigo publicado 2



Review

Bacterial Toxins Active against Mosquitoes: Mode of Action and Resistance

Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha ^{1,*}, Tatiany Patricia Romão ¹, Tatiana Maria Teodoro Rezende ¹, Karine da Silva Carvalho ¹, Heverly Suzany Gouveia de Menezes ¹, Nathaly Alexandre do Nascimento ² , Mario Soberón ² and Alejandra Bravo ² 

¹ Department of Entomology, Instituto Aggeu Magalhães FIOCRUZ, Recife 51240-665, PE, Brazil; tatiany.romo@fiocruz.br (T.P.R.); tatiana.teodoro@fiocruz.br (T.M.T.R.); karine.carvalho@fiocruz.br (K.d.S.C.); suzanyromenezes@pq.fiocruz.br (H.S.G.d.M.)

² Department of Molecular Microbiology, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca 62250, MX, Mexico; nathaly.nascimento100@gmail.com (N.A.d.N.); mario.soberon@ibt.unam.mx (M.S.); alejandra.bravo@ibt.unam.mx (A.B.)

* Correspondence: mhlobo@pq.fiocruz.br

Abstract: Larvicides based on the bacteria *Bacillus thuringiensis* ssw. *israelensis* (Bti) and *Lysinibacillus sphaericus* are effective and environmentally safe compounds for the control of dipteran insects of medical importance. They produce crystals that display specific and potent insecticidal activity against larvae. Bti crystals are composed of multiple protoxins: those from the three-domain Cry type family which bind to different cell receptors in the midgut, and one cytolytic (CytIAa) protoxin that can insert itself into the cell membrane and act as surrogate receptor of the Cry toxins. Together, these toxins display a complex mode of action that shows a low risk of resistance selection. *L. sphaericus* crystals contain one major binary toxin that display an outstanding persistence in field conditions, which is superior to Bti. However, the action of the Bin toxin based on its interaction with a single receptor is vulnerable for resistance selection in insects. In this review we present the most recent data on the mode of action and synergism of these toxins, resistance issues, and examples of their use worldwide. Data reported in recent years improved our understanding of the mechanism of action of these toxins, showed that their combined use can enhance their activity and counteract resistance, and reinforced their relevance for mosquito control programs in the future years.

Keywords: Bti; *Lysinibacillus sphaericus*; cry toxin; Cyt toxin; binary toxin; receptors

Key Contribution: This review discusses major aspects of the toxins produced by the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* ssw. *israelensis* (Bti) and *Lysinibacillus sphaericus* with emphasis on the novel knowledge about their specific modes of action on the midgut tissue of mosquito larvae, synergism, and their application in integrated control programs.



Citation: Silva-Filha, M.H.N.L.; Romão, T.P.; Rezende, T.M.T.; Carvalho, K.d.S.; Gouveia de Menezes, H.S.; Alexandre do Nascimento, N.; Soberón, M.; Bravo, A. Bacterial Toxins Active against Mosquitoes: Mode of Action and Resistance. *Toxins* **2021**, *13*, 523. <https://doi.org/10.3390/toxins13060523>

Received: 18 May 2021

Accepted: 16 June 2021

Published: 27 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Entomopathogenic Bacteria Active against Mosquito Larvae

Insects can act as vectors of etiological agents of different diseases and can be a nuisance to humans, being responsible for health burdens worldwide [1]. Re-emergent and emergent diseases, in particular arboviruses, remain a global challenge as recently shown for the epidemic problems caused by the Zika virus [2]. Microbial larvicides based on entomopathogen bacteria have been successfully used for controlling mosquito and black-fly populations, as an alternative to the conventional classes of chemical insecticides, due to their high effectiveness and environmental safety [3–5]. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti) de Barjac was the first *B. thuringiensis* (Bt) bacterial serotype identified as active against some Diptera larvae [6]. Subsequently, *Lysinibacillus sphaericus* (*L. sphaericus*) Neide strains, with activity against Culicidae larvae were discovered [7]. Since the 1980s, products based on these two bacteria have been considered the most

APÊNDICE E – Artigo em preparação

1 To: Insect Biochemistry and Molecular Biology
2
3 Identification of a pantetheinase from *Culex quinquefasciatus* associated with the
4 resistance to *Lysinibacillus sphaericus*
5
6 Tatiana Maria Teodoro Rezende, Heverly Suzany Gouveia Menezes, Tatiany Patricia
7 Romão, Antônio Mauro Rezende, Osvaldo Pompílio de Melo-Neto, Maria Helena
8 Neves Lobo Silva-Filha*
9
10 *Department of Entomology, Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Recife, PE, 50740-
11 465, Brazil
12
13 *Corresponding author
14 Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha
15 Department of Entomology, Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ
16 Av. Moraes Rego s/n, Recife, PE, 50670-420, Brazil
17 Tel.: +55-81-21012553
18 Email: mhelena.neves@fiocruz.br
19

APÊNDICE F – Dados brutos

Tabela Suplementar 1 - Conjunto de dados dos ensaios catalíticos para medir a atividade da lipase em intestino médio individual de larvas de *Culex quinquefasciatus* no início do 4º ínstar de uma colônia suscetível e resistente a Bin, usando cinco substratos. Atividade da lipase (A; mU/intestino). Proteína (P; µg/intestino). Atividade Específica (SA; U/g de proteína).

Suscetível															
N	Acetato			Butirato			Heptanoato			Palmitato			Oleato		
	A	P	SA	A	P	SA	A	P	SA	A	P	SA	A	P	SA
1	7.446	11.192	665.341	4.775	20.489	233.073	2.475	19.842	124.717	0.062	33.316	1.856	0.047	7.608	6.194
2	7.128	15.711	453.707	4.068	17.048	238.635	2.951	19.325	152.692	0.122	37.712	3.226	0.034	3.892	8.677
3	7.767	34.920	222.436	4.491	18.318	245.188	2.999	19.653	152.580	0.036	31.386	1.137	0.023	4.477	5.185
4	8.857	9.996	886.076	4.632	17.055	271.606	2.723	14.487	187.957	0.049	32.791	1.500	0.022	2.019	11.099
5	8.049	15.780	510.099	5.126	21.921	233.836	3.180	21.725	146.366	0.091	18.487	4.907	0.025	6.988	3.525
6	7.914	21.643	365.650	4.676	18.502	252.739	3.288	7.984	411.777	0.077	20.006	3.845	0.020	7.465	2.622
7	6.739	12.721	529.762	4.606	18.460	249.504	4.457	26.267	169.697	0.088	22.367	3.946	0.014	0.862	16.665
8	6.364	18.029	353.004	4.671	30.407	153.604	3.404	23.503	144.844	0.084	54.136	1.549	0.019	7.433	2.512
9	6.629	10.724	618.180	3.945	24.864	158.647	3.644	22.038	165.370	0.089	52.623	1.696	0.028	17.724	1.584
10	7.405	16.716	443.003	3.837	15.712	244.195	3.906	38.035	102.687	0.088	24.117	3.645	0.073	11.395	6.433
11	6.676	14.025	476.022	3.982	20.028	198.803	3.169	51.471	61.573	0.097	20.197	4.807	0.069	26.155	2.655
12	7.031	16.629	422.795	4.786	9.631	496.896	3.881	17.698	219.272	3.078	20.981	0.927	0.050	11.775	4.246
13	6.568	12.218	537.567	3.078	17.513	223.210	3.078	16.229	189.632	3.276	12.739	1.356	0.067	18.303	3.659
14	5.394	22.523	239.503	3.276	25.295	115.855	3.276	26.730	122.561	2.949	21.588	0.722	0.017	20.915	0.808
15	5.544	22.902	242.071	2.949	27.079	127.067	2.949	17.259	170.852	2.907	26.857	0.593	0.066	17.626	3.739
16	5.593	17.763	314.861	2.907	26.429	130.271	2.907	20.225	143.717	3.012	23.140	0.811	0.044	21.927	2.012
17	6.712	22.957	292.366	3.012	20.511	183.190	3.012	20.097	149.892	3.281	25.432	0.691	0.027	19.693	1.364
18	6.318	59.457	106.263	3.281	16.722	206.788	3.281	29.750	110.284	2.893	27.406	0.548	0.031	20.430	1.528
19	6.216	24.446	254.278	2.893	22.564	169.359	2.893	18.149	159.399	3.160	19.602	0.862	0.009	17.140	0.549
20	5.048	24.455	206.438	3.160	25.644	148.620	3.160	19.184	164.711	2.822	21.412	0.810	0.007	15.843	0.437
21	6.134	42.246	145.197	2.822	21.299	148.896	2.822	43.192	65.347	3.304	12.838	1.432	0.011	26.275	0.433
22	6.183	25.515	242.313	3.304	19.610	201.954	3.304	22.825	144.736	3.159	37.810	0.451	0.009	11.178	0.769

23	5.891	30.955	190.304	3.159	21.256	193.440	3.159	22.553	140.085	2.896	23.247	0.756	0.031	15.716	1.966
24	6.130	16.111	380.452	2.896	17.087	218.317	2.896	36.637	79.043	0.011	21.632	0.495	0.020	14.935	1.371
25	5.750	14.499	396.619	3.848	13.789	279.078	3.311	16.928	195.562	0.007	14.742	0.473	0.033	6.948	4.787
26	7.212	22.105	326.249	3.847	7.319	525.646	2.834	13.767	205.872	0.009	12.481	0.736	0.009	18.978	0.455
27	7.453	11.313	658.796	4.518	11.436	395.073	2.900	15.860	182.819	0.007	14.811	0.482	0.008	26.194	0.297
28	7.269	15.911	456.861	4.789	16.789	285.270	2.730	10.713	254.870	0.007	19.791	0.346	0.009	17.133	0.553
29	6.981	13.803	505.746	4.740	7.712	614.631	2.706	10.579	255.795	0.007	9.093	0.754	0.010	27.370	0.359
30	5.662	10.626	532.871	4.557	16.476	276.595	2.507	7.117	352.255	0.007	19.795	0.344	0.062	18.504	3.328
31	5.586	11.566	482.988	4.530	7.309	619.869	2.567	4.562	562.754	0.006	8.454	0.673	0.034	17.101	1.990
32	6.912	12.368	558.890	4.601	10.871	423.208	2.629	5.854	449.016	0.009	11.918	0.751	0.031	35.679	0.858
33	6.994	12.926	541.054	4.434	12.137	365.313	2.705	7.246	373.311	0.011	11.846	0.906	0.062	35.987	1.723
34	6.007	14.092	426.264	4.604	10.575	435.385	3.200	12.035	265.879	0.011	11.428	0.946	0.095	30.192	3.162
35	6.558	16.622	394.552	4.701	14.144	332.331	3.160	17.946	176.096	0.010	11.874	0.840	0.042	25.593	1.640
36	7.480	20.536	364.265	4.697	20.584	228.203	3.483	17.760	196.102	0.007	15.848	0.466	0.085	8.835	9.585
37	7.481	41.105	181.987	4.680	22.598	207.085	2.644	20.810	127.057	0.006	28.315	0.195	0.063	22.170	2.853
38	7.351	24.310	302.399	4.984	25.369	196.464	2.868	27.804	103.138	0.007	9.846	0.759	0.054	17.062	3.175
39	7.209	18.798	383.482	4.714	35.496	132.793	2.725	22.468	121.266	0.006	21.431	0.296	0.083	32.183	2.571
40	7.340	33.387	219.847	4.785	20.610	232.188	2.655	20.941	126.772	0.005	24.583	0.206	0.104	35.525	2.917
41	7.109	24.095	295.021	4.704	20.113	233.872	2.302	11.222	205.098	0.005	32.080	0.147	0.119	43.854	2.711
42	7.387	18.100	408.122	4.687	24.060	194.785	2.914	24.806	117.487	0.008	25.941	0.317			
43	7.289	23.580	309.134	4.640	25.213	184.038	2.593	9.686	267.647	0.006	21.546	0.271			
44	7.449	23.594	315.710	4.742	21.569	219.845	2.688	13.450	199.831	0.008	26.513	0.287			
45	7.194	24.031	299.369	4.927	23.751	207.428	2.851	20.769	137.247	0.007	25.414	0.294			
46	7.415	24.471	303.011	4.827	19.939	242.077	2.750	24.303	113.147	0.007	31.282	0.227			
47	7.186	39.208	183.277	4.727	19.849	238.153				0.007	20.579	0.330			

Resistente

N	Acetato			Butirato			Heptanoato			Palmitato			Oleato		
	A	P	SA	A	P	SA	A	P	SA	A	P	SA	A	P	SA

1	7.278	8.588	847.538	4.906	21.755	225.500	0.628	12.074	52.019	0.064	41.804	1.540	0.050	9.359	5.295
2	7.619	30.939	246.266	4.727	27.740	170.407	0.612	13.311	45.980	0.054	29.904	1.801	0.056	11.557	4.849
3	7.151	16.669	429.033	4.594	25.625	179.277	0.638	17.284	36.923	0.072	30.753	2.336	0.062	33.250	1.855
4	7.691	22.393	343.465	4.590	15.094	304.072	0.613	12.588	48.725	0.054	12.594	4.302	0.050	27.667	1.806
5	7.563	23.790	317.917	4.907	22.989	213.469	0.585	14.580	40.107	0.051	27.894	1.834	0.035	10.556	3.327
6	7.736	11.119	695.690	4.731	32.112	147.342	0.573	13.061	43.884	0.053	21.521	2.451	0.050	25.615	1.935
7	7.115	21.897	324.913	4.931	17.108	288.223	0.591	32.122	18.402	0.057	27.952	2.028	0.046	22.566	2.031
8	7.372	35.689	206.568	4.961	23.284	213.075	0.601	11.245	53.459	0.094	18.352	5.101	0.062	14.828	4.195
9	5.921	19.981	296.321	4.751	21.343	222.582	0.561	21.315	26.300	0.061	17.130	3.572	0.041	25.341	1.637
10	7.090	8.332	850.932	5.104	26.789	190.534	0.580	14.230	40.737	0.022	24.962	0.895	0.046	37.791	1.209
11	7.404	30.912	239.515	4.783	21.738	220.054	0.561	17.302	32.398	0.020	18.836	1.039	0.065	31.311	2.074
12	7.035	26.477	265.720	4.889	20.510	238.380	0.577	25.757	22.394	0.018	23.892	0.744	0.053	10.046	5.286
13	5.678	13.469	421.583	4.452	31.079	143.237	3.174	23.408	135.597	0.020	26.394	0.769	0.017	11.434	1.521
14	5.777	38.866	148.631	2.991	23.975	124.757	3.038	13.748	220.960	0.019	21.084	0.923	0.023	2.764	8.435
15	6.178	24.481	252.363	4.013	20.972	191.370	2.918	19.514	149.523	0.020	30.356	0.645	0.036	3.348	10.659
16	6.213	24.406	254.561	4.005	25.060	159.831	3.301	22.292	148.068	0.020	25.593	0.765	0.052	4.773	10.860
17	9.938	27.937	355.733	3.844	21.080	182.335	3.295	16.709	197.183	0.020	15.069	1.351	0.017	14.066	1.227
18	5.847	54.378	107.522	3.745	15.992	234.206	3.406	22.593	150.772	0.018	22.195	0.801	0.019	3.409	5.706
19	6.307	47.136	133.796	3.485	20.569	169.430	2.961	24.008	123.346	0.019	22.774	0.816	0.015	6.306	2.360
20	5.900	16.087	366.785	3.506	20.266	172.996	2.898	10.528	275.239	0.019	19.511	0.973	0.031	4.377	7.135
21	5.746	28.514	201.527	3.306	23.967	137.937	2.123	25.470	83.350	0.019	8.869	2.160	0.008	1.285	6.348
22	5.610	16.359	342.930	4.075	17.727	229.882	3.228	17.622	183.175	0.010	21.407	0.479	0.025	2.887	8.576
23	5.877	38.845	151.296	3.948	15.371	256.838	5.256	19.197	273.798	0.008	34.467	0.241	0.007	22.133	0.726
24	5.782	15.856	364.672	3.799	12.478	304.421	3.139	12.791	245.414	0.010	23.879	0.408	0.016	30.152	0.649
25	7.210	18.453	390.744	4.835	23.159	208.788	3.271	29.570	110.625	0.009	27.480	0.318	0.020	35.476	0.744
26	7.318	15.813	462.799	4.503	16.991	264.997	2.794	16.680	167.482	0.011	30.793	0.342	0.026	29.158	0.722
27	8.012	23.571	339.893	4.979	10.907	456.488	3.196	24.422	130.868	0.010	35.362	0.273	0.021	28.053	0.992
28	7.570	38.000	199.216	5.118	23.928	213.893	3.251	31.791	102.261	0.009	24.816	0.367	0.028	22.243	0.709
29	7.185	28.490	252.204	4.772	17.862	267.153	2.654	17.233	154.020	0.009	21.736	0.407	0.016	45.673	0.488
30	6.872	18.299	375.517	4.840	27.455	176.273	2.688	17.220	156.074	0.010	21.401	0.457	0.022	23.080	0.621

31	7.160	17.149	417.526	4.937	21.864	225.794	2.587	9.495	272.508	0.010	25.396	0.385	0.014	15.399	0.520
32	7.247	21.456	337.747	4.771	11.919	400.319	2.596	11.530	225.179	0.010	30.331	0.330	0.008	30.150	1.124
33	7.301	28.827	253.267	4.861	20.414	238.132	2.920	15.979	182.760	0.009	21.521	0.409	0.034	35.448	0.824
34	7.494	10.939	685.082	4.974	20.218	246.032	3.350	25.518	131.274	0.011	25.442	0.418	0.029	17.977	0.711
35	7.433	27.476	270.514	5.333	53.194	100.252	3.032	23.249	130.412	0.006	18.580	0.348	0.013	17.943	1.729
36	7.015	9.762	718.649	5.136	43.462	118.166	2.744	22.461	122.188	0.007	22.665	0.308	0.031	20.798	3.554
37	6.771	29.343	230.774	4.945	31.473	157.127	2.520	26.579	94.815	0.007	22.369	0.319	0.074	28.898	1.712
38	6.952	23.243	299.115	4.752	35.780	132.801	3.092	31.861	97.047	0.007	18.765	0.385	0.049	15.655	2.308
39	7.273	24.951	291.470	4.840	33.239	145.629	2.871	26.709	107.476	0.008	31.320	0.244	0.036	26.669	1.728
40	6.792	35.153	193.202	4.778	25.925	184.285	2.902	32.742	88.637	0.006	33.922	0.163	0.046	20.934	2.581
41	6.848	33.445	204.748	4.934	25.699	191.976	2.825	36.448	77.519	0.007	30.829	0.234	0.054	24.552	2.827
42	7.050	40.153	175.586	4.805	28.007	171.562	2.894	34.030	85.040	0.008	33.350	0.232	0.069	22.695	4.867
43	7.009	26.717	262.357	5.375	26.888	199.922	2.587	21.465	120.543	0.007	35.490	0.194	0.110	24.728	3.543
44	7.487	27.229	274.967	5.060	32.937	153.642	2.795	27.779	100.625	0.008	23.921	0.333	0.088	24.084	3.730
45	7.060	23.266	303.454	4.840	27.840	173.844	2.895	31.128	92.998	0.008	28.143	0.283	0.090	24.220	2.368
46	7.196	23.845	301.764	4.936	29.736	165.989	2.528	22.760	111.053				0.057	18.820	3.128
47	6.911	29.267	236.150	5.210	27.721	187.940	2.758	30.170	91.425						
48	6.960	25.639	271.456	4.865	23.908	203.498	2.386	11.337	210.426						

Tabela Suplementar 2 - Conjunto de dados dos ensaios catalíticos para medir a atividade de α -glicosidase em intestino médio individual de larvas de *Culex quinquefasciatus* no início do 4º instar de uma colônia suscetível e uma colônia resistente a Bin usando diferentes substratos. Atividade da glicosidase (A; mU/intestino). Proteína (P; μ g/intestino). Atividade Específica (SA; U/g de proteína).

N	MU α Glu			Sacarase		
	A	P	SA	A	P	SA
1	0.493	45.704	10.778	4.152	54.682	75.939
2	0.293	30.994	9.466	1.013	14.986	67.583
3	0.480	37.931	12.642	3.162	44.241	71.471
4	0.563	45.304	12.429	4.314	38.160	113.056
5	0.543	35.823	15.158	4.907	52.257	93.899
6	0.569	45.497	12.508	3.217	49.099	65.515
7	0.151	21.277	7.103	2.270	21.492	105.611
8	0.634	36.790	17.226	3.283	57.180	57.419
9	0.596	51.872	11.483	3.167	27.529	115.030
10	0.256	26.274	9.732	2.805	27.536	101.864
11	0.469	40.823	11.491	3.208	20.312	157.915
12	0.176	22.249	7.915	2.365	18.407	128.482
13	0.119	26.425	4.485	3.533	30.843	147.924
14	0.187	37.656	4.960	2.083	29.255	139.671
15	0.089	34.113	2.611	2.794	29.418	124.256
16	0.196	18.484	10.583	4.162	45.956	112.843
17	0.205	29.663	6.916	4.652	54.750	127.433
18	0.173	20.950	8.235	2.723	23.339	111.427
19	0.118	15.024	7.866	3.711	28.219	112.607
20	0.219	22.149	9.905	2.054	16.379	168.717
21	0.190	25.547	7.451	2.932	40.782	76.453
22	0.151	21.913	6.889	3.197	24.047	144.832
23	0.262	29.482	8.886	3.910	18.035	121.435
24	0.283	23.284	12.171	2.280	16.195	70.008
25	0.210	17.735	11.849	2.344	15.232	74.640
26	0.400	32.215	12.428	3.110	21.897	131.503
27	0.112	21.197	5.277	4.737	33.708	125.427
28	0.381	37.768	10.091	2.572	21.151	71.883
29	0.472	44.649	10.561	3.451	33.078	132.937
30	0.464	39.748	11.680	3.237	21.083	216.813
31	0.461	36.985	12.475	2.119	23.443	140.771
32	0.327	28.585	11.451	2.460	26.208	153.859

33	0.244	25.384	9.594	2.400	28.456	142.026
34	0.629	53.196	11.820	4.147	28.035	140.535
35	0.533	40.469	13.165	3.323	23.789	121.594
36	0.276	31.567	8.758	3.201	25.761	104.320
37	0.468	42.118	11.104	3.628	32.148	153.553
38	0.496	35.580	13.952	3.228	25.329	90.402
39	0.451	36.543	12.329	3.974	35.666	93.871
40	0.492	30.184	16.311	4.964	44.079	84.324
41				5.382	31.897	114.544
42				1.872	24.488	71.205
43				5.295	36.560	94.988
44				3.390	27.920	90.559
45				4.111	58.721	84.963
46				3.115	41.727	116.689

Resistente

N	MU α Glu			Sacarase		
	A	P	SA	A	P	SA
1	0.417	66.476	6.268	2.517	19.506	129.055
2	0.290	43.824	6.626	1.082	12.560	86.144
3	0.402	46.985	8.546	2.975	32.775	90.783
4	0.156	27.861	5.600	1.947	16.092	120.979
5	0.600	55.674	10.783	3.206	41.201	77.804
6	0.352	55.148	6.388	3.397	35.486	95.718
7	0.265	43.937	6.036	2.455	33.962	72.288
8	0.227	41.796	5.437	1.852	41.093	45.067
9	0.357	43.834	8.143	2.711	24.569	110.353
10	0.253	37.684	6.704	2.755	26.430	104.224
11	0.161	20.901	7.712	2.267	26.943	84.153
12	0.343	36.680	9.348	1.112	20.063	55.446
13	0.293	37.086	7.898	4.357	50.901	27.904
14	0.241	30.586	7.895	2.666	25.474	40.615
15	0.295	27.402	10.762	3.729	40.359	50.165
16	0.242	33.040	7.321	4.803	45.319	41.709
17	0.311	34.548	9.011	4.603	48.624	54.082
18	0.377	39.841	9.464	4.156	36.690	57.015
19	0.320	28.570	11.199	1.089	36.741	32.311
20	0.260	30.902	8.407	0.697	35.118	50.615
21	0.351	29.335	11.965	3.911	32.027	39.178

22	0.240	35.816	6.694	1.325	38.307	77.458
23	0.317	32.256	9.823	0.881	40.226	72.216
24	0.452	27.775	16.256	0.777	33.712	28.461
25	0.397	27.471	14.459	0.880	27.242	68.721
26	0.281	25.134	11.170	1.252	35.713	29.650
27	0.236	92.110	2.565	1.507	60.957	19.858
28	0.244	46.775	5.224	1.006	41.292	122.131
29	0.447	54.820	8.155	2.024	40.613	34.588
30	0.289	33.365	8.647	1.107	58.170	21.900
31	0.256	31.290	8.197	1.056	33.923	23.047
32	0.484	38.713	12.492	1.273	31.858	32.300
33	0.245	34.052	7.181	1.853	39.634	35.061
34	0.353	27.994	12.626	1.598	57.264	24.730
35	0.265	48.477	5.475	1.659	40.837	24.351
36	0.275	31.639	8.698	3.341	66.600	49.841
37	0.267	29.529	9.028	2.205	52.861	19.036
38	0.256	25.627	9.991	1.842	34.061	31.125
39				2.196	38.509	39.943
40				1.378	42.657	46.741
41				1.932	38.165	85.588
42				2.076	52.983	104.670
43				2.324	29.999	92.391
44				1.865	25.821	105.981
45				1.289	45.298	94.656
46				2.756	40.108	113.277

Tabela Suplementar 3 - Conjunto de dados dos ensaios catalíticos para medir a atividade da protease com substratos para tripsinas (Z-Phe-Arg), quimotripsinas (Ala-Ala-Phe) e aminopeptidases (L-Leu) em intestino médio individual de larvas de *Culex quinquefasciatus* no início do 4º ínstar em um colônia suscetível e uma colônia resistente a Bin usando diferentes substratos. Atividade de protease (A; mU/intestino). Proteína (P; µg/intestino). Atividade Específica (SA; U/g de proteína).

Suscetível									
N	Z-Phe-Arg			Ala-Ala-Phe			L-Leu		
	A	P	SA	A	P	SA	A	P	SA
1	0.002	4.980	0.322	0.212	21.586	9.822	0.260	17.743	14.670
2	0.001	2.543	0.481	0.160	19.622	8.133	0.767	36.262	21.160
3	0.018	19.524	0.921	0.727	53.950	13.473	0.118	6.915	17.100
4	0.066	35.016	1.887	0.295	29.842	9.888	0.484	27.450	17.617
5	0.016	13.776	1.127	0.557	47.970	11.609	0.249	13.764	18.101
6	0.023	33.949	0.685	0.198	32.433	6.095	0.511	44.380	11.504
7	0.032	23.411	1.363	0.078	19.539	3.993	0.369	21.266	17.337
8	0.005	8.349	0.578	0.043	9.046	4.786	0.154	23.295	6.630
9	0.002	13.205	0.184	0.337	18.040	18.653	0.518	49.578	10.451
10	0.044	25.114	1.764	0.401	38.620	10.371	0.556	36.378	15.296
11	0.051	34.666	1.461	0.204	32.870	6.219	0.459	30.527	15.035
12	0.055	32.871	1.661	0.619	42.315	14.628	0.595	26.100	22.789
13	0.008	10.414	0.759	0.387	30.466	12.687	0.206	12.720	16.233
14	0.033	22.839	1.425	0.492	34.969	14.077	0.239	14.784	16.160
15	0.049	19.693	2.484	0.373	30.835	12.092	0.119	9.904	12.062
16	0.012	29.529	0.398	0.055	15.855	3.450	0.054	18.829	2.879
17	0.001	10.063	0.133	0.017	4.798	3.464	0.035	10.838	3.206
18	0.001	8.892	0.122	0.033	13.119	2.537	0.072	19.188	3.745
19	0.006	15.837	0.361	0.066	22.541	2.922	0.039	17.237	2.254
20	0.009	21.931	0.427	0.064	30.358	2.121	0.083	18.646	4.451
21	0.010	32.221	0.297	0.050	18.798	2.654	0.071	22.707	3.113
22	0.006	22.544	0.274	0.063	14.274	4.392	0.066	20.082	3.293
23	0.000	3.352	0.078	0.048	20.917	2.311	0.064	21.201	3.030

24	0.006	17.207	0.355	0.054	24.297	2.240	0.081	23.447	3.452
25	0.008	17.781	0.459	0.019	8.441	2.279	0.019	6.547	2.827
26	0.001	10.410	0.122	0.058	15.708	3.671	0.019	14.757	1.316
27	0.007	27.043	0.260	0.074	30.612	2.421	0.066	14.534	4.525
28	0.006	26.280	0.383	0.086	42.388	4.352	0.055	19.149	9.955
29	0.004	26.654	0.485	0.031	16.234	4.296	0.150	28.528	6.925
30	0.001	10.250	0.363	0.027	18.764	5.411	0.060	18.063	3.795
31	0.010	42.716	0.314	0.129	34.887	4.089	0.047	16.659	6.607
32	0.010	29.061	0.302	0.107	37.145	3.163	0.122	25.958	4.463
33	0.004	20.100	0.386	0.055	35.739	2.811	0.102	19.131	5.969
34	0.008	19.712	0.681	0.198	45.552	4.381	0.098	27.978	5.824
35	0.014	28.602	0.520	0.159	36.945	2.700	0.084	24.118	4.855
36	0.010	28.182	0.343	0.222	40.949	5.543	0.128	33.502	4.932
37	0.008	25.778	0.566	0.126	30.928	4.368	0.108	37.452	5.888
38	0.008	28.019	0.611	0.082	25.865	3.225	0.028	8.026	6.122
39	0.007	17.069	0.582	0.037	13.036	4.726	0.106	27.061	6.771
40	0.014	20.132	0.243	0.112	25.600	2.034	0.226	22.751	2.877
41	0.018	34.991	0.151	0.079	29.100	1.880	0.131	18.954	5.264
42	0.006	16.264	0.106	0.199	35.896	1.417	0.107	28.295	3.296
43	0.010	17.421	0.238	0.159	36.315	3.702	0.176	26.704	2.839
44	0.025	41.092	0.361	0.064	19.781	2.879	0.105	23.459	4.691
45	0.021	36.862	0.180	0.128	27.157	1.541	0.219	36.700	5.310
46							0.193	33.142	3.486
47							0.146	30.090	3.468
48							0.160	32.342	3.822
49							0.085	14.505	2.889
50							0.135	22.005	3.513
51							0.242	35.788	3.900

Resistente

N	Z-Phe-Arg			Ala-ala-Phe			L-Leu		
	A	P	SA	A	P	SA	A	P	SA
1	0.062	36.220	1.700	0.081	6.718	12.059	0.162	8.969	18.079
2	0.096	52.495	1.824	0.286	21.601	13.233	0.087	6.251	13.913
3	0.028	23.944	1.187	0.194	19.329	10.058	0.238	12.748	18.651
4	0.028	22.021	1.252	0.335	28.711	11.651	0.216	13.270	16.310
5	0.048	35.195	1.355	0.193	16.846	11.433	0.168	14.654	11.452
6	0.011	22.649	0.505	0.106	18.307	5.772	0.174	12.749	13.652
7	0.006	10.406	0.539	0.421	38.997	10.791	0.213	18.505	11.496
8	0.009	11.694	0.803	0.083	10.543	7.849	0.288	18.104	15.903
9	0.007	9.048	0.728	0.114	19.103	5.990	0.180	13.398	13.404
10	0.019	23.641	0.798	0.145	13.440	10.757	0.263	16.291	16.174
11	0.056	37.553	1.499	0.411	21.632	18.999	0.429	32.671	13.117
12	0.036	30.949	1.173	0.048	11.182	4.269	0.220	16.913	13.009
13	0.047	30.977	1.510	0.531	29.701	17.868	0.214	16.326	13.104
14	0.018	26.621	0.659	0.243	14.124	17.222	0.184	15.156	12.158
15	0.017	17.476	0.976	0.156	10.730	14.584	0.276	23.259	11.867
16	0.005	29.078	0.170	0.018	5.816	3.141	0.026	14.953	1.762
17	0.022	30.389	0.711	0.058	21.102	2.751	0.031	14.303	2.191
18	0.010	29.501	0.336	0.077	21.986	3.502	0.055	37.425	1.468
19	0.026	44.967	0.575	0.030	11.045	2.683	0.028	34.467	0.811
20	0.013	39.622	0.318	0.030	17.686	1.720	0.068	41.902	1.613
21	0.007	25.964	0.277	0.106	39.419	2.681	0.043	36.088	1.180
22	0.006	20.103	0.323	0.019	14.699	1.297	0.048	51.255	0.941
23	0.011	28.614	0.385	0.084	53.846	1.562	0.050	34.618	1.431
24	0.012	27.427	0.445	0.064	40.056	1.606	0.064	29.210	2.194
25	0.005	14.788	0.345	0.047	28.734	1.621	0.018	25.850	0.697
26	0.021	31.858	0.663	0.051	43.710	1.160	0.015	37.317	0.400
27	0.013	49.949	0.252	0.049	37.686	1.311	0.054	15.124	3.551

28	0.002	12.157	0.169	0.050	20.267	2.459	0.053	14.129	3.751
29	0.006	14.953	0.416	0.036	10.972	3.305	0.053	29.549	1.802
30	0.004	11.240	0.316	0.123	32.646	3.777	0.054	15.732	3.418
31	0.004	15.803	0.260	0.106	17.949	5.884	0.095	18.961	5.007
32	0.005	18.750	0.276	0.070	10.741	6.497	0.105	29.704	3.531
33	0.022	43.437	0.504	0.106	17.700	5.972	0.076	15.642	4.847
34	0.010	21.826	0.452	0.188	28.348	6.615	0.109	17.331	6.271
35	0.005	18.541	0.259	0.274	39.653	6.906	0.079	14.283	5.565
36	0.007	20.778	0.334	0.107	25.051	4.260	0.135	18.455	7.337
37	0.004	18.005	0.238	0.118	23.551	5.006	0.103	19.342	5.321
38	0.005	19.712	0.274	0.034	10.413	3.312	0.095	21.779	4.356
39	0.023	38.934	0.589	0.052	15.476	3.367	0.081	20.970	3.866
40	0.007	19.798	0.343	0.029	16.404	1.741	0.147	27.303	5.386
41	0.002	9.965	0.168	0.016	15.094	1.077	0.070	13.351	5.215
42	0.002	12.235	0.132	0.208	43.418	4.799	0.123	24.112	5.096
43	0.004	18.498	0.219	0.140	33.250	4.215	0.080	15.990	4.973
44	0.002	10.537	0.199	0.051	14.410	3.574	0.132	18.752	7.018
45	0.003	19.311	0.131	0.090	34.403	2.605	0.149	34.901	4.267
46							0.095	28.102	3.395
47							0.203	40.664	5.003
48							0.080	19.549	4.080
49							0.102	22.836	4.447
50							0.118	21.792	5.424
51							0.062	17.094	3.636

Tabela suplementar 4 - Conjunto de dados dos ensaios catalíticos para medir a atividade da Glutaciona-S-transferase em intestino médio individual de larvas de *Culex quinquefasciatus* no início do 4º ínstar de uma colônia suscetível e uma colônia resistente a Bin. Atividade de GST (A; mU/intestino). Proteína (P; µg/intestino). Atividade Específica (SA; U/g de proteína).

N	Suscetível			Resistente		
	A	P	SA	A	P	SA
1	58.94792	14.2082	4148.866	38.06335	15.14179	2513.794
2	42.92666	16.45395	2608.897	45.32586	26.30863	1722.852
3	62.07339	18.84483	3293.921	96.14679	20.56231	4675.875
4	121.3761	41.51583	2923.611	82.89567	14.68462	5645.068
5	97.26668	34.83831	2791.946	42.80044	12.03648	3555.895
6	84.28772	35.83237	2352.279	98.54401	28.61485	3443.807
7	83.52283	25.64164	3257.312	44.34781	21.49096	2063.557
8	86.90238	23.49704	3698.44	50.71969	23.81385	2129.84
9	124.9126	36.20306	3450.334	25.43791	14.2388	1786.521
10	66.48917	34.93579	1903.182	42.24313	20.40454	2070.28
11	90.86915	34.62282	2624.545	54.12685	15.78954	3428.02
12	127.2629	38.75683	3283.624	82.49892	16.83362	4900.842
13	1.941971	8.274718	234.6873	18.3912	10.95597	1678.647
14	2.702916	10.91007	247.745	16.99389	17.33708	980.2048
15	20.80157	30.82477	674.8331	19.40722	22.88909	847.8807
16	2.022996	12.50905	161.7226	22.32478	26.82732	832.1658
17	8.70337	8.283601	1050.675	7.554063	16.81889	449.1415
18	2.603484	6.163473	422.4053	33.70164	22.33389	1508.991
19	0.253429	5.261826	48.16373	21.71241	14.77575	1469.462
20	8.632206	11.00779	784.1908	25.72684	12.04416	2136.042
21	30.10992	13.92296	2162.608	11.61649	12.11079	959.1854
22	99.75742	25.1099	3972.833	48.39117	12.76963	3789.553
23	35.82095	11.07589	3234.137	12.38039	15.50122	798.6724
24	47.27736	20.17231	2343.676	57.56031	19.93542	2887.338
25	41.22727	15.19771	2712.73	20.32791	17.60062	1154.955
26	69.55103	19.47497	3571.302	26.42533	19.72963	1339.373
27	77.58927	20.36774	3809.42	13.35582	18.24761	731.9214
28	31.85894	14.49593	2197.785	71.29002	18.23577	3909.352
29	133.0605	194.2701	684.9255	35.32494	16.9018	2090.01
30	98.31162	43.57959	2255.91	12.574	15.5249	809.9244
31	24.48073	24.14163	1014.047	20.27351	20.5306	987.478
32	65.40692	23.48723	2784.787	35.71609	33.57116	1063.892
33	50.77245	17.36373	2924.052	14.35047	12.28549	1168.083
34	29.16512	18.17062	1605.07	24.95538	18.61182	1340.835
35	71.35155	24.38147	2926.466	26.99218	14.13616	1909.442
36	17.15024	10.85973	1579.251	33.05394	31.58872	1046.384
37	55.76351	19.59638	2845.603	48.4642	22.11033	2191.925
38	96.29657	28.81864	3341.468	65.47485	14.05029	4660.035
39	63.04607	29.58704	2130.868	47.33708	26.7681	1768.414
40	59.45073	25.34382	2345.768	129.7844	34.11748	3804.044

41	39.17048	19.0545	2055.707	39.76132	21.42484	1855.851
42	29.4953	13.1294	2246.508	66.47427	35.28858	1883.733
43	37.28028	14.41598	2586.038	76.80898	16.25629	4724.878
44	44.99392	20.14862	2233.102	107.3981	36.56333	2937.319
45	28.34189	15.66852	1808.843	41.76689	22.1281	1887.505
46				78.04671	19.37578	4028.055
47				50.24149	29.09402	1726.866
48				67.9863	26.90875	2526.55

Tabela Suplementar 5 - Conjunto de dados de ensaios realizados para quantificação de lipídios em *pools* de larvas do 4º ínstar (n= 20) e em amostras individuais de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia suscetível e uma resistente a Bin.

Larva				
N	Absorbancia (505 nm)		Lipídios (µg)	
	Suscetível	Resistente	Suscetível	Resistente
1	0.27	0.292	47.70	50.99
2	0.713	0.408	113.82	68.30
3	0.379	0.385	63.97	64.87
4	0.652	0.77	104.72	122.33
5	0.827	1.052	130.84	164.42
6	1.335	1.029	206.66	160.99
7	0.792	0.402	125.61	67.40
8	0.746	0.368	118.75	62.33
9	0.956	0.391	150.09	65.76
10	0.405	0.366	67.85	62.03
11	0.679	0.202	108.75	37.55
12	0.4	0.529	67.10	86.36
13	0.712	0.463	113.67	76.51
14	0.795	0.362	126.06	61.43
15	1.178	0.342	183.22	58.45
16	1.034	0.317	161.73	54.72
17	0.952	0.22	149.49	40.24
18	1.116	0.384	173.97	64.72
19	0.375	0.329	63.37	56.51
20	0.556	0.439	90.39	72.93
21	0.641	0.483	103.07	79.49
22	0.37	0.313	62.63	54.12
23	0.897	0.44	141.28	73.07
24	0.951	0.359	149.34	60.99
25	0.964	0.357	151.28	60.69
26	0.908	0.453	142.93	75.01
27	0.969	0.400	152.03	67.10
28	1.204	0.482	187.10	79.34
29	0.997	0.389	156.21	65.46
30	1.002	0.37	156.96	62.63
Adultos				
N	Absorbancia (505 nm)		Lipídios (µg)	
	Suscetível	Resistente	Suscetível	Resistente
1	0.497	0.264	81.58	46.81
2	0.539	0.277	87.85	48.75
3	0.458	0.25	75.76	44.72
4	0.548	0.282	89.19	49.49
5	0.53	0.288	86.51	50.39
6	0.506	0.224	82.93	40.84
7	0.545	0.266	88.75	47.10
8	0.427	0.304	71.13	52.78
9	0.455	0.298	75.31	51.88
10	0.562	0.293	91.28	51.13
11	0.591	0.279	95.61	49.04
12	0.479	0.221	78.90	40.39
13	0.492	0.239	80.84	43.07
14	0.507	0.311	83.07	53.82
15	0.464	0.267	76.66	47.25

16	0.508	0.263	83.22	46.66
17	0.4	0.2	67.10	37.25
18	0.545	0.232	88.75	42.03
19	0.532	0.283	86.81	49.64
20	0.536	0.302	87.40	52.48
21	0.446	0.221	73.97	40.39
22	0.567	0.315	92.03	54.42
23	0.532	0.239	86.81	43.07
24	0.427	0.233	71.13	42.18
25	0.488	0.305	80.24	52.93
26	0.556	0.311	90.39	53.82
27	0.485	0.278	79.79	48.90
28	0.454	0.266	75.16	47.10
29	0.514	0.298	84.12	51.88
30	0.465	0.254	76.81	45.31

Tabela Suplementar 6 - Conjunto de dados de ensaios realizados para a quantificação de açúcares redutores em *pools* de larvas de 4^o ínstar (n=40) e em *pools* de fêmeas (n=5) de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia suscetível e uma colônia resistente a Bin. Absorvância a 580 nm (Abs). Amostra de teste incubada com amiloglucosidase (T). Amostra controle incubada sem enzima (C). Quantidade final de açúcar (S).

Suscetível											
Larva						Adultos					
N	Absorbância (540 nm)		Açúcar (µg)			Absorbância (540 nm)		Açúcar (µg)			
	T	C	T	C	S	T	C	T	C	S	
1	0.737	0.538	0.553	0.373	252.90	0.582	0.426	0.413	0.271	198.26	
2	0.651	0.506	0.475	0.344	184.28	0.516	0.409	0.353	0.256	135.98	
3	0.619	0.412	0.446	0.258	263.07	0.403	0.382	0.25	0.231	26.69	
4	0.718	0.504	0.536	0.342	271.97	0.306	0.128	0.162	0.001	226.22	
5	0.836	0.667	0.643	0.49	214.78	0.44	0.337	0.284	0.19	130.90	
6	0.714	0.564	0.532	0.396	190.63	0.421	0.297	0.267	0.154	157.59	
7	0.744	0.549	0.56	0.383	247.82	0.515	0.388	0.352	0.237	161.40	
8	0.721	0.58	0.539	0.411	179.19	0.444	0.347	0.287	0.199	123.28	
9	0.725	0.488	0.542	0.327	301.20	0.527	0.388	0.363	0.237	176.65	
10	0.387	0.206	0.236	0.071	230.03	0.414	0.307	0.26	0.163	135.98	
11	0.712	0.577	0.531	0.408	171.57	0.356	0.299	0.208	0.156	72.44	
12	0.6	0.415	0.429	0.261	235.11	0.484	0.29	0.324	0.148	246.55	
13	0.665	0.508	0.488	0.345	199.53	0.464	0.203	0.306	0.069	331.70	
14	0.678	0.433	0.5	0.277	311.37	0.524	0.339	0.36	0.192	235.11	
15	0.769	0.54	0.582	0.375	291.03	0.406	0.349	0.253	0.201	72.44	
Resistente											
Larva						Adultos					
N	Absorbância (540 nm)		Açúcar (µg)			Absorbância (540 nm)		Açúcar (µg)			
	T	C	T	C	S	T	C	T	C	S	
1	1.081	0.8	0.866	0.611	357.12	0.566	0.341	0.398	0.194	285.95	
2	0.909	0.764	0.71	0.578	184.28	0.587	0.366	0.417	0.217	280.86	
3	1.048	0.71	0.836	0.529	429.56	0.593	0.34	0.423	0.193	321.53	
4	1.099	0.703	0.882	0.523	503.27	0.599	0.32	0.428	0.175	354.58	
5	1.088	0.925	0.872	0.724	207.15	0.533	0.347	0.368	0.199	236.38	
6	1.333	0.978	1.094	0.772	451.16	0.526	0.397	0.362	0.245	163.94	
7	0.874	0.548	0.678	0.382	414.31	0.409	0.291	0.256	0.149	149.96	
8	0.867	0.75	0.671	0.565	148.69	0.532	0.312	0.367	0.168	279.59	
9	1.22	0.72	0.992	0.538	635.44	0.444	0.291	0.287	0.149	194.44	
10	1.27	0.872	1.037	0.676	505.81	0.549	0.375	0.383	0.225	221.13	
11	1.197	0.962	0.971	0.758	298.66	0.59	0.398	0.42	0.246	244.01	
12	1.162	0.873	0.939	0.677	367.28	0.577	0.335	0.408	0.188	307.55	
13	1.206	1.059	0.979	0.846	186.82	0.44	0.249	0.284	0.11	242.74	
14	0.958	0.757	0.754	0.572	255.45	0.51	0.365	0.347	0.216	184.28	
15	1.351	1.093	1.111	0.877	327.89	0.501	0.338	0.339	0.191	207.15	

Tabela Suplementar 7 - Conjunto de dados de ensaios para determinar a fecundidade e a fertilidade de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia suscetível e resistente a Bin sob condição de criação controlada ou estresse. Dias após a oviposição (DPO). Porcentagem de larvas de primeiro ínstar (L1%). Replicação (R). Desvio Padrão (DP).

Condição de criação controlada												
Suscetível												
DPO		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	Média	DP
0	N° ovos	194	248	251	245						235	23.48
	L1%	97	95	95	98						96.3	1.30
3	N° ovos	247	229	238	279	268					252	18.63
	L1%	60	51	83	74	75					68.6	11.50
5	N° ovos	214	246	242	226	228					231	11.57
	L1%	41	52	57	59	60					53.8	6.97
8	N° ovos	276	238	223							246	22.31
	L1%	4	2	2							2.67	0.94
Resistente												
DPO		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	Média	DP
0	N° ovos	239	201	272	254						242	26.14
	L1%	90	95	91	94						92.5	2.06
3	N° ovos	242	224	238	279	268					250	20.24
	L1%	50	51	72	73	82					65.6	12.82
5	N° ovos	205	237	278	229	259					242	25.09
	L1%	50	43	61	51	57					52.4	6.18
8	N° ovos	215	243	262							240	19.30
	L1%	1	2	3							2	0.82
Condição de criação sob estresse												
Suscetível												
DPO		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	Média	DP
0	N° ovos	106	93	96	94	115	95				99.8	8.03
	L1%	90	88	90	91	91	89				89.8	1.07
3	N° ovos	98	118	113	126	115	112	124	34	99	104	26.47
	L1%	40	42	43	64	64	56	58	59	58	53.8	8.95
5	N° ovos	123	115	118	109	104	113	131	126	111	117	8.18
	L1%	30	27	30	28	31	30	35	33	32	30.7	2.31
8	N° ovos	119	106	112	107	114	118	106	127	109	113	6.74
	L1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
Resistente												
DPO		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	Média	DP
0	N° ovos	142	137	104	98	110	98				115	17.97
	L1%	95	91	96	98	91	90				93.5	2.99

3	N° ovos	135	128	147	118	127	121	108	102	111	122	13.29
	L1%	60	55	60	72	73	64	70	69	69	65.8	5.92
5	N° ovos	132	141	136	132	126	119	109	121	103	124	11.85
	L1%	40	40	32	46	42	35	34	39	32	37.8	4.54
8	N° ovos	129	133	144	125	118	116	115	133	99	124	12.44
	L1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
