

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Tatiana Maria Teodoro Rezende

Identificação de ligantes da toxina inseticida Cry48Aa/Cry49Aa de *Lysinibacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus* e de outras moléculas envolvidas no modo de ação deste biolarvicida

RECIFE

2018

Tatiana Maria Teodoro Rezende

Identificação de ligantes da toxina inseticida Cry48Aa/Cry49Aa de *Lysinibacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus* e de outras moléculas envolvidas no modo de ação deste biolarvicida

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de doutora em ciências.

Área de Concentração: Biologia celular e molecular básica e aplicada.

Orientadora: Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha

Coorientadora: Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo

RECIFE

2018

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

R467i	<p>Rezende, Tatiana Maria Teodoro Identificação de ligantes da toxina inseticida Cry48Aa/Cry49Aa de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> e de outras moléculas envolvidas no modo de ação deste biolarvicida / Tatiana Maria Teodoro Rezende. Recife: [s.n.], 2018 142 p. : ilus., graf., tab., 30 cm</p> <p>Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.</p> <p>Orientadora: Maria Helena Neves Lobo Silva Filha; coorientadora: Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo</p> <p>1. Mosquitos vetores. 2. Resistência à inseticidas. 3. Toxinas bacterianas. 4. <i>Culex</i>. 5. Controle biológico de vetores. I. Silva Filha, Maria Helena Neves Lobo. II. Melo, Tatiany Patrícia Romão Pompílio de. III. Título.</p> <p>CDU 504</p>	
-------	---	--

Tatiana Maria Teodoro Rezende

Identificação de ligantes da toxina inseticida Cry48Aa/Cry49Aa de *Lysinibacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus* e de outras moléculas envolvidas no modo de ação deste biolarvicida

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de doutora em ciências.

Área de Concentração: Biologia celular e molecular básica e aplicada.

Aprovado em: 23/03/2018

BANCA EXAMINADORA

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Depto. de Microbiologia/IAM-FIOCRUZ

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos
Depto. de Parasitologia/IAM-FIOCRUZ

Dr. Fernando Ariel Genta
Depto. de Bioquímica/IOC-FIOCRUZ

Dr. Tercílio Calsa Junior
Depto. de Genética /UFPE

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me acompanhado sempre, me iluminando e me encorajando em momentos nos quais os obstáculos eram tão grandes que me faziam pensar em desistir. Deus sempre me mostrou que está do meu lado e que nada é por acaso.

Ao meu esposo, Antonio principalmente por todo amor e paciência que foram necessários para me ajudar quando eu mais precisei e por sempre estar ao meu lado. Meu companheiro para toda a vida estamos juntos e cada vez mais fortes nesta caminhada.

Ao mais novo membro da família, Rafael, meu lindo filho que chegou em um momento muito especial e ainda em minha barriga já me proporciona amor e alegria e me ajuda a encarar a vida com mais leveza.

Aos meus pais, João e Márcia, por sempre terem sido a minha base e sempre terem confiado em mim contribuindo de maneira muito significativa na minha formação acadêmica e pessoal, além de sempre me darem todo o amor do mundo.

Aos meus irmãos, pelo carinho e disposição para ajudar nos momentos necessários.

Aos meus amigos do "Uber", "Bigodinho", "Peru da Vânia" e "Saúde" que com nomes tão diferentes fazem o meu dia-a-dia mais agradável e engraçado. Obrigada por toda a ajuda e pelos momentos vividos dentro e fora do Aggeu.

À minha orientadora, Dra. Maria Helena, pela oportunidade dada quando cheguei de Minas Gerais sem me conhecer. Sua paciência, compreensão, exigência e compartilhamento dos conhecimentos são fatores essenciais para a minha formação acadêmica e pessoal.

À minha coorientadora, Dra. Tatiany Romão, pelo apoio experimental, no desenvolvimento deste trabalho e pelos bons conselhos.

Aos meus coorientadores dos EUA Michael Adang e Gang Hua da Universidade da Geórgia, EUA pela disponibilidade e apoio durante meu doutorado sanduíche.

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

A todos que fazem parte do departamento de Entomologia em especial a Andréa pela colaboração e amizade, e Suzany pelas construções plasmidiais.

À Fabiana Cavalcante, pela contribuição essencial nos experimentos de proteômica, desde os primeiros testes e otimização à análise dos resultados.

Aos membros da banca Dr. Fernando Genta, Dr. Tercílio Junior, Dr. Luydson Vasconcelos, Dr. Osvaldo Pompílio, Dr. Christian Reis e Dra. Flávia Aburjaile pela disponibilidade e contribuição para este trabalho.

Ao departamento de Microbiologia pela colaboração e auxílios no dia-a-dia.

Aos colaboradores Michel Batista e Monique Trugilho membros das equipes de espectrometria de massas da Fiocruz-PR e Fiocruz-RJ, respectivamente, pela execução e análise desses dados.

A Cássia Docena coordenadora do Núcleo de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz-PE pelo auxílio na execução do RNAseq.

Ao colaborador Antonio Rezende pela realização das análises de transcriptoma e auxílio na interpretação dos resultados.

À FACEPE, pela bolsa de doutorado.

À CAPES, pela bolsa de doutorado sanduíche.

Ao IAM, pela infraestrutura que possibilitou a realização deste projeto.

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

REZENDE, Tatiana Maria Teodoro. **Identificação de ligantes da toxina inseticida Cry48Aa/Cry49Aa de *Lysinibacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus* e de outras moléculas envolvidas no modo de ação deste biolarvicida.** 2018. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

RESUMO

O *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) é um agente larvicida seletivo, cujo uso intensivo pode levar à seleção de resistência à toxina Binária (Bin), seu principal fator inseticida. Uma nova toxina Cry48Aa/Cry49Aa, caracterizada na cepa IAB59 do Lsp, demonstrou atividade para larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis e resistentes à toxina Bin indicando que ela interage com receptores, distintos da Bin. Todavia, o modo de ação desta toxina e seus receptores ainda são desconhecidos. Desta maneira, os principais objetivos deste trabalho foram identificar os ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa em larvas de *C. quinquefasciatus*, além de outras moléculas envolvidas no modo de ação de toxinas do Lsp, e realizar análises comparativas entre larvas suscetíveis (S) e resistentes (R) ao Lsp IAB59. Bioensaios demonstraram que Cry48Aa/Cry49Aa é ativa para larvas de *C. quinquefasciatus* da colônia S, possui ação reduzida para larvas da colônia R e larvas de *Aedes aegypti* são refratárias a esta toxina. Os ensaios de ligação revelaram que a toxina Cry48Aa/Cry49Aa liga-se à proteínas intestinais de *C. quinquefasciatus* como aminopeptidases, maltases e fosfatase alcalinas, que são classes de moléculas já identificadas como receptores de outras toxinas Cry, além de proteínas ainda não descritas como a panteteinase e vanin. A análise transcriptômica revelou moléculas que podem atuar no modo de ação das toxinas do Lsp e vias metabólicas associadas com a capacidade ampliada de replicação e reparo de DNA, modulação diferencial de autofagia, regulação de estresse, e baixa indução da via de apoptose como uma resposta adaptativa ao fenótipo de resistência. A validação funcional através de RNAi de alguns alvos foi promissora mas necessita ser aperfeiçoada para revelar efeitos *in vivo* mais significativos. Este conjunto de dados traz uma contribuição para o entendimento da ação das toxinas inseticidas do Lsp visando subsidiar o desenvolvimento de produtos e estratégias adequadas de utilização.

Palavras chave: Mosquitos vetores. Resistência à inseticidas. Toxinas bacterianas. *Culex*. Controle biológico de vetores.

REZENDE, Tatiana Maria Teodoro. **Identification of ligands of the insecticidal toxin Cry48Aa/Cry49Aa of *Lysinibacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae and other molecules involved in the mode of action of this biolarvicide.** 2018. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

ABSTRACT

Lysinibacillus sphaericus (Lsp) is a selective larvicidal agent, but its intensive use may lead to selection of mosquito resistance to Binary toxin (Bin), which is its main insecticidal factor. A novel Cry48Aa/Cry49Aa toxin, characterized in strain IAB59 of Lsp, has demonstrated activity for susceptible and Bin toxin resistant *Culex quinquefasciatus* larvae, indicating it interacts with different receptors of Bin. However, the mode of action of this toxin and its receptors are still unknown. Thus, the main objectives of this work were to identify the ligands of the Cry48Aa/Cry49Aa toxin in *C. quinquefasciatus* larvae, as well as other molecules involved in the action of Lsp toxins, and to perform comparative analyses between susceptible (S) and resistant larvae (R) to Lsp IAB59. Bioassays have shown that Cry48Aa/Cry49Aa is active for *C. quinquefasciatus* larvae of the S colony, and it has reduced action for R colony, besides *Aedes aegypti* larvae are refractory to this toxin. The binding assays showed that the Cry48Aa/Cry49Aa toxin binds to intestinal proteins of *C. quinquefasciatus*, as aminopeptidases, maltases and alkaline phosphatases which are classes of molecules already identified as receptors of other Cry toxins. However, proteins not yet described such as pantheteinase and vanin were also identified. Transcriptomic analysis revealed molecules that may act in the mode of action of Lsp toxins, and metabolic pathways associated with increased DNA replication and repair ability, differential modulation of autophagy, stress regulation, and low induction of the apoptosis pathway as an adaptive response to resistance phenotype. And finally, functional validation through RNAi of selected targets was promising but needs to be refined to reveal more significant *in vivo* effects. These findings contribute to the understanding of the action of the insecticidal toxins of the Lsp in order to support the development of products and appropriate strategies against the mosquito.

Keywords: Mosquito vectors. Insecticide resistance. Bacterial toxins. *Culex*. Biological control of vectors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo biológico do <i>Culex quinquefasciatus</i>	17
Figura 2 - Visão longitudinal em micrografia eletrônica de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> , em fase de esporulação.....	21
Figura 3 - Modo de ação da toxina Binária de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> em larvas de <i>Culex</i> sp.....	24
Figura 4 - Modelagem predita da proteína Cqm1.....	27
Figura 5 - Perfil protéico dos cristais e expressão dos componentes Cry48Aa e Cry49Aa do <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	31
Figura 6 - Estrutura tridimensional predita das toxinas Cry49Aa e Cry48Aa.....	32
Figura 7 - Perfis de processamentos proteolíticos das protoxinas Cry49Aa (A) e Cry48Aa (B).....	34
Figura 8 - Efeitos citopatológicos causados pela toxina Cry48Aa/Cry49Aa de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	35
Figura 9 - Representação esquemática da ligação de toxinas Cry de três domínios em receptores do intestino de larvas de lepidópteros.....	37
Quadro 1 - Receptores funcionais de toxinas inseticidas de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> (Lsp), <i>Bacillus thuringiensis</i> svar. <i>israelensis</i> (Bti) e <i>Bacillus thuringiensis</i> svar. <i>jegathesan</i> (Btjeg) presentes no epitélio intestinal de larvas de culicídeos.....	38
Quadro 2 - Sequência de iniciadores utilizados para as reações de qRT-PCR e para produção de dsRNA.....	57
Figura 10 - Proteínas recombinantes Cry48Aa, Cry49Aa e Bin.....	61
Figura 11 - Imunodeteção das proteínas recombinantes Cry48Aa e Cry49Aa.....	62
Figura 12 - Imunodeteção de ensaios de ligação entre as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa recombinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i> svar. <i>israelensis</i> e proteínas de microvilli intestinal (BBMF) de larvas de culicídeos, com o anticorpo anti-Cry49.....	64
Figura 13 - Imunodeteção de ensaios de ligação entre as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa recombinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i> svar. <i>israelensis</i> e proteínas de microvilli intestinal (BBMF) de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	65
Figura 14 - Imunodeteção de ensaio de ligação entre a mistura de toxinas	

Cry48Aa/Cry49Aa-His recombinantes e amostras de proteínas de microvilli intestinal de <i>Culex quinquefasciatus</i> íntegras (1 e 3) e tratadas com CHAPS (2, 4)....	66
Figura 15 - Proteínas identificadas através do ensaio de <i>pull-down</i>	67
Quadro 3 - Proteínas de intestino médio de <i>Culex quinquefasciatus</i> detectadas como ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa através de ensaios de <i>pull-down</i> e identificadas por LC-MS/MS.....	69
Quadro 4 - Proteínas de intestino médio de <i>Culex quinquefasciatus</i> identificadas como potenciais ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa extraídos da tabela 4 e seus ortólogos em espécies de <i>Aedes aegypti</i> ou <i>Anopheles</i> spp. descritos como receptores de outras toxinas Cry.....	71
Figura 16 - Ensaio de <i>pull-down</i> entre a proteína Cqm1 (0-1.5 µg) com diferentes toxinas recombinantes.....	72
Figura 17 - Separação eletroforética bidimensional de proteínas do microvilli intestinal (BBMF) de <i>Culex quinquefasciatus</i>	73
Quadro 5 - Coeficiente de correlação (r) obtido entre o perfil de proteínas do intestino de <i>Culex quinquefasciatus</i> das colônias suscetível (S2, S3 e S4) e resistente (R2, R3 e R4) dos géis 2D.....	73
Figura 18 - Separação eletroforética bidimensional de proteínas do microvilli intestinal (BBMF) das colônias suscetível e resistente de <i>Culex quinquefasciatus</i>	74
Quadro 6 - Proteínas identificadas por espectrometria de massas provenientes do perfil proteômico em gel 2D de proteínas intestinais de larvas das colônias de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetível e resistente ao Lsp IAB59.....	75
Figura 19 - Perfil de expressão gênica para as colônias de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistente (R) e suscetível (S) ao <i>Lysinibacillus sphaericus</i> IAB59.....	79
Figura 20 - Número de genes diferencialmente expressos (DEGs) para as colônias de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistente (R) e suscetível (S) ao <i>Lysinibacillus sphaericus</i> IAB59.....	79
Figura 21 - Classificação dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em <i>Culex quinquefasciatus</i> utilizando o Gene Ontology (GO) e termos enriquecidos na categoria “Processo Biológicos”.....	80
Quadro 7 - Termos KEGG enriquecidos associados à colônia de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistente (R) ao <i>Lysinibacillus sphaericus</i> IAB59.....	82
Quadro 8 - Termos KEGG enriquecidos associados à colônia de <i>Culex</i>	

<i>quinquefasciatus</i> suscetível (S) ao <i>Lysinibacillus sphaericus</i> IAB59.....	83
Figura 22 - Exemplos de vias metabólicas geradas pelo KEGG que exibem um conjunto de genes com expressão diferencial em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistentes ao <i>Lysinibacillus sphaericus</i> IAB59.....	84
Quadro 9 - Seleção de genes super expressos na colônia de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistente (R) ao <i>Lysinibacillus sphaericus</i> IAB59.....	86
Quadro 10 - Seleção de genes super expressos na colônia de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetível (S) ao <i>Lysinibacillus sphaericus</i> IAB59.....	87
Figura 23 - Expressão relativa dos transcritos do gene <i>cqm1</i> em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> das colônias S e R.....	88
Figura 24 - Curva de dissociação da qRT-PCR em tempo real do gene <i>Cqm1</i> e controle endógeno da reação (18S).....	88
Figura 25 - Mortalidade de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> após eclosão em dsRNA (<i>Cqm1</i> ou eGFP, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ou água.....	89
Figura 26 - Expressão relativa dos transcritos do gene <i>cqm1</i> após seu silenciamento em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	90
Figura 27 - Mortalidade de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> após eclosão em dsRNA (PTT, vanin, ou ALP, em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ou água.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade tóxica de biomassas contendo cristais da toxina Cry48Aa/Cry49Aa (1:1) para larvas de 4 ^o estágio das colônias de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetível (S) e resistente ao Lsp IAB59 (R) e larvas de <i>Aedes aegypti</i> (Ae) após 48h de exposição.....	63
Tabela 2 - Análise dos dados de expressão gênica para as colônias resistente e suscetível de <i>Culex quinquefasciatus</i>	78
Tabela 3 - Atividade da toxina Binária para larvas do 3 ^o instar de <i>Culex quinquefasciatus</i> (S_UGA) após 48h de exposição.....	90
Tabela 4 - Atividade da toxina Cry48Aa/Cry49Aa para larvas do 3 ^o instar de <i>Culex quinquefasciatus</i> (S_UGA) após 48h de exposição.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA -	Aminoácidos
Agm3 -	<i>Anopheles gambiae</i> maltase 3
ALP -	Fosfatase Alcalina
AMY -	Alfa amilase
APN -	Aminopeptidase-N
BBMF -	Frações ricas em microvilosidades intestinais de larvas de <i>Culex</i>
Bin -	Toxina Binária de <i>Bacillus sphaericus</i>
BSA -	Albumina sérica bovina
Bt -	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bti -	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i>
°C -	Grau Celsius
CAD -	Caderina
cDNA -	DNA complementar
CHAPS -	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CL ₅₀ -	Concentração letal para 50% dos indivíduos expostos
Cpm1 -	<i>Culex pipiens</i> maltase 1
Cqm1 -	<i>Culex quinquefasciatus</i> maltase 1
dsRNA -	Ácido ribonucleico de fita dupla
<i>E. coli</i> -	<i>Escherichia coli</i>
EDTA -	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA -	Ácido etilenoglicoltetracético
FIOCRUZ -	Fundação Oswaldo Cruz
g -	Força Gravitacional
g -	Grama
GFP -	Proteína verde fluorescente
GST -	Glutathione S-transferase
h -	Horas
His -	Histidina
IPTG -	Isopropiltiogalactosídeo
kDa -	Kilodalton
L -	Litro
LB -	Luria Bertani
Lsp -	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>

L _{1, 2, 3, 4} -	Larva em 1º, 2º, 3º, 4º estágio de desenvolvimento
M -	Molar
mA -	Mili Ampére
mg -	Miligramas
Min -	Minutos
mL -	Mili litro
mM -	Mili molar
Mtx -	Toxina mosquitocida
NaCl -	Cloreto de sódio
NaOH -	Hidróxido de sódio
OMS -	Organização Mundial de Saúde
pb -	Pares de bases
PBS -	Tampão fosfato salina
pH -	Potencial hidrogeniônico
PIPLC -	Fosfatidilinositol-fosfolipase C
PFT -	Toxinas formadoras de poros
RMR -	Região Metropolitana de Recife
RNA -	Ácido ribonucléico
RNAi -	RNA de interferência
s -	Segundos
SDS -	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE -	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
TA -	Temperatura ambiente
TBS-T -	Tampão Tris salina - Tween 20
UFRGS -	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
µg -	Micrograma
µl -	Micro litro
1D -	Unidimensional
2D -	Bidimensional

SUMÁRIO

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 O mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>.....	17
2.2 Papel do <i>Culex quinquefasciatus</i> na transmissão de patógenos.....	18
2.3 Controle de <i>Culex quinquefasciatus</i> com bactérias entomopatógenas.....	20
2.4 <i>Lysinibacillus sphaericus</i> e suas toxinas inseticidas	21
2.4.1 <i>S-Layer</i>.....	22
2.4.2 <i>Toxinas Mtx</i>.....	22
2.4.3 <i>Sphaericolisina</i>.....	22
2.4.4 <i>Toxina binária (Bin)</i>.....	23
2.4.4.1 Modo de ação.....	23
2.4.4.2 Receptores.....	26
2.4.4.3 Resistência.....	27
2.4.4.4 A colônia RIAB59.....	29
2.4.5 <i>Toxina Cry48Aa/Cry49Aa</i>.....	30
2.4.5.1 Identificação e caracterização.....	30
2.4.5.2 Modo de ação.....	32
2.5 Modo de ação das toxinas <i>Cry 3-D</i>.....	35
2.6 Receptores das toxinas <i>Cry</i> em mosquitos.....	37
3 JUSTIFICATIVA.....	41
4 PERGUNTA CONDUTORA.....	42
5 HIPÓTESE.....	43
6 OBJETIVOS.....	44
6.1 Geral.....	44
6.2 Específicos.....	44
7 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
7.1 Colônias de mosquitos.....	45
7.2 Amostras de proteínas de microvilli intestinal.....	45
7.3 Produção e processamento de toxinas recombinantes.....	46
7.4 Anticorpos anti-toxinas.....	48
7.5 Ensaios de toxicidade <i>in vivo</i>.....	49

7.6 Ensaio de ligação entre a toxina Cry48Aa/Cry49Aa e proteínas de BBMF.....	50
7.6.1 Ensaio de overlay assay.....	50
7.6.2 Ensaio de pull-down.....	51
7.7 Ensaio de ligação entre as toxinas Bin ou Cry48Aa/Cry49Aa e a proteína Cqm1.	52
7.8 Análise proteômica por eletroforese bidimensional.....	53
7.9 Análise transcriptômica por RNAseq.....	54
7.9.1 Extração de RNA, biblioteca e sequenciamento de mRNA.....	54
7.9.2 Análise dos dados.....	54
7.10 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	55
7.11 Silenciamento gênico por RNA de interferência.....	58
7.11.1 Produção de dsRNA.....	58
7.11.2 Tratamento das larvas com dsRNA.....	59
8 RESULTADOS.....	60
8.1 Expressão de toxinas recombinantes.....	60
8.2 Avaliação de anticorpos anti-Cry48 e anti-Cry49.....	61
8.3 Suscetibilidade das larvas à toxina Cry48Aa/Cry49Aa.....	62
8.4 Detecção de ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa por overlay assay.....	63
8.4.1 Imunodetecção com anti-Cry49.....	63
8.4.2 Imunodetecção com anti-histidina.....	65
8.5 Detecção de ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa por pull-down.....	66
8.6 Interação entre as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa e Bin e a proteína Cqm1.....	72
8.7 Perfil proteômico das larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> das colônias R e S.....	72
8.8 Perfil transcriptômico das larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> das colônias R e S.....	78
8.9 Avaliação funcional de genes por RNA de interferência.....	88
9 DISCUSSÃO.....	93
10 CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS.....	104
APÊNDICE A - Proteínas do intestino de <i>Culex quinquefasciatus</i> (266)	
identificadas como ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa.....	120
APÊNDICE B - Proteínas do intestino de <i>Aedes aegypti</i> (21) identificadas como	
ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa.....	132
APÊNDICE C – Artigo publicado.....	134
APÊNDICE D – Manuscrito em preparação.....	142

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

O *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) é um agente larvicida seletivo para espécies pertencentes ao gênero *Culex* e *Anopheles* devido à especificidade do modo de ação de seu principal fator inseticida, a protoxina binária (Bin). Esta proteína produzida sob a forma de cristal durante a esporulação bacteriana, tem ação larvicida por ingestão, é solubilizada em pH intestinal alcalino e processada por serino proteases para a forma de toxina ativa. A toxina Bin é o princípio ativo de diversos produtos comerciais disponíveis no mercado e estes têm sido utilizados no Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática do Recife, desde 2003, para reduzir a densidade populacional de *Culex quinquefasciatus*. No Recife esta espécie atua como vetor da *Wuchereria bancrofti*, e pode ser vetor primário de arbovírus de importância na saúde pública além de causar forte incômodo às populações humanas em muitas áreas urbanas. Para a ação inseticida do Lsp, a toxina Bin deve ligar-se a receptores específicos presentes no epitélio intestinal das larvas. Em *C. quinquefasciatus*, este receptor, denominado Cqm1 (*Culex quinquefasciatus* maltase 1), é uma α -glicosidase de 66 kDa ligada ao epitélio intestinal das larvas através de uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Contudo, a exposição contínua aos biolarvicidas a base de Lsp pode levar à seleção de populações resistentes à toxina Bin, o que se torna uma dificuldade para o controle de mosquitos vetores.

Uma nova toxina binária denominada Cry48Aa/Cry49Aa, foi caracterizada na cepa IAB59 do Lsp. Esta é formada por duas subunidades denominadas Cry48Aa (135 kDa) e Cry49Aa (49 kDa), que também são produzidas como protoxinas sob a forma de cristais. Estes componentes, individualmente, não apresentam atividade para as larvas de *C. quinquefasciatus*, porém, quando ambos são administrados de forma purificada e em concentração equimolar, eles agem em sinergia e passam a apresentar uma alta toxicidade para as larvas sendo considerados, por esta razão, como uma nova toxina binária do Lsp. Estudos anteriores demonstraram uma alta eficácia e espectro seletivo de ação da toxina Cry48Aa/Cry49Aa para larvas de *C. quinquefasciatus* suscetíveis e aqueles resistentes à toxina Bin indicando que ela age em receptores diferentes desta toxina. Este achado pode ter um papel estratégico para o manejo da resistência abrindo perspectivas para o desenvolvimento de novos compostos inseticidas para aplicação em programas de controle de vetores.

Além deste aspecto aplicado a toxina Cry48Aa/Cry49Aa tem despertado um interesse do ponto de vista evolutivo. Ela é composta por uma subunidade Cry48Aa típica das toxinas Cry de três domínios que, necessita da presença da subunidade Cry49Aa, que possui

homologia com as toxinas binárias como a Bin. Este é o primeiro registro de proteínas do tipo Cry identificados em Lsp, pois, estas toxinas são produzidas, em sua grande maioria, por cepas de *Bacillus thuringiensis* indicando uma possível troca de material genético entre estas espécies. Todavia, poucos estudos têm sido realizados com a toxina Cry48Aa/Cry49Aa e o seu modo de ação e seus receptores ainda são desconhecidos. A estrutura de três domínios, da toxina Cry48Aa, é conservada entre os membros da família Cry sugerindo que estas proteínas possuem um modo de ação semelhante que depende da interação com receptores específicos nas células do epitélio intestinal das larvas de insetos. Alguns dos receptores de toxinas Cry com ação em mosquitos já foram caracterizados no intestino de larvas de *Aedes aegypti*, e de anofelinos. Estas moléculas foram identificadas principalmente como caderinas, aminopeptidases, maltases e fosfatases alcalinas.

Desta maneira, o principal objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar os receptores da toxina binária Cry48Aa/Cry49Aa em larvas de *C. quinquefasciatus* e outras moléculas que possam estar envolvidas no modo de ação deste biolarvicida. Para este estudo também foi realizada uma análise comparativa entre larvas suscetíveis e resistentes ao Lsp IAB59, para subsidiar a identificação de moléculas e vias implicadas no modo de ação deste agente de controle. Para atingir estes objetivos foram realizadas análises de suscetibilidade *in vivo* de larvas à toxina Cry48Aa/Cry49Aa, ensaios de ligação entre a toxina Cry48Aa/Cry49Aa e proteínas de intestino (BBMF) de larvas para identificar proteínas ligantes, perfis de proteômica e transcriptômica comparativos de moléculas diferencialmente expressas pelas larvas de uma colônia suscetível e outra selecionada com a cepa IAB59 do Lsp e, finalmente, ensaios de validação funcional de algumas moléculas identificadas como possíveis ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa através de silenciamento gênico. Esta identificação e caracterização são fundamentais para a compreensão do modo de ação da nova toxina inseticida e para a geração de conhecimentos necessários para subsidiar a utilização deste biolarvicida a base de Lsp em programas de controle de vetores.

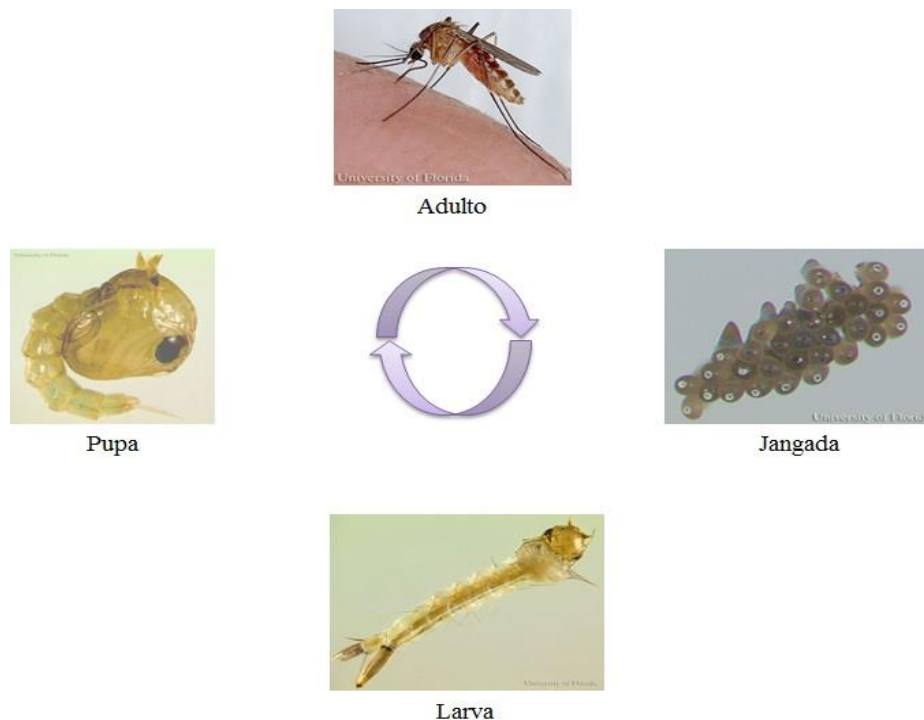
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O mosquito *Culex quinquefasciatus*

Culex quinquefasciatus Say, 1823 é uma espécie de mosquito da família Culicidae e, ordem Diptera, com distribuição cosmopolita, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo encontrado em todo território Brasileiro. As condições climáticas, associadas a fatores como o crescimento populacional desordenado e a falta de saneamento básico, que afetam a maioria das áreas urbanas do país (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994), propiciam um ambiente favorável para a proliferação desta espécie. Os criadouros de *C. quinquefasciatus* são bastante diversificados mas a espécie pode ser encontrada sobretudo em coleções de água rica em matéria orgânica decorrentes de saneamento precário, como por exemplo as fossas sépticas e, por isso, a sua abundância é um indicador de baixa qualidade ambiental (REGIS et al., 1996).

Similarmente à outros insetos da mesma família, os mosquitos do gênero *Culex* são holometábolos, ou seja, apresentam um processo de metamorfose completa e seu ciclo de vida compreende as fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto. Seu ciclo é considerado curto com duração média de 10 dias em condições ótimas (Figura 1) (FORATTINI et al., 1993).

Figura 1 - Ciclo biológico do *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Adaptado de Hill e Connelly, (2009).

A espécie *C. quinquefasciatus* ocorre predominante em áreas urbanas, sendo encontrado em maior abundância nos meses quentes e chuvosos. Este mosquito possui hábitos endofílicos e antropofílicos, em que machos e fêmeas abrigam-se nas habitações humanas durante o dia e, no período crepuscular vespertino e à noite, as fêmeas fazem o repasto sanguíneo preferencialmente em humanos. Cerca de 48h após o repasto, os ovos são depositados agrupados sob a forma de jangada sobre a superfície aquática dos criadouros (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). As fêmeas têm a preferência de realizar a oviposição em criadouros anteriormente colonizados, pois elas são atraídas pelo feromônio de agregação de oviposição, depositado em forma de gotículas sobre o pólo apical dos ovos de posturas prévias feitas por outras fêmeas (LAURENCE; PICKETT, 1982). Após a eclosão das larvas de 1º estágio (L1) elas evoluem, passando por mais três estágios larvais (L2, L3 e L4) com duração média de 24h cada. Nesta fase, as larvas se distribuem na superfície da água e se alimentam por filtração até atingirem a fase de pupa, que dura entre um e dois dias. As pupas não se alimentam porém, apresentam capacidade de deslocamento ativo na coluna d'água. Em seguida, ocorre a emergência dos adultos que permanecem em repouso na superfície da lâmina d'água até a esclerotinização da cutícula, sobretudo das asas. Após este período os adultos estão preparados para o vôo em busca de alimento, abrigo e para cópula. Em laboratório, a longevidade dos adultos pode atingir cerca de 100 dias e as fêmeas podem realizar cerca de quatro oviposições neste período, produzindo de 150 a 300 ovos por postura (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

2.2 Papel do *Culex quinquefasciatus* na transmissão de patógenos

C. quinquefasciatus possui grande importância na saúde pública, pois é o principal vetor do nematódeo *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose bancroftiana nas Américas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente cerca de 856 milhões de pessoas distribuídas em 52 países vivem em área de risco para a filariose linfática (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). Além disto, a presença dos vermes adultos alojados nos linfonodos e vasos linfáticos do indivíduo infectado, provocam efeitos de morbidade dolorosos e desfigurantes que podem levar à incapacidade permanente, tais como linfedema de membros inferiores, inchaço escrotal, entre outros (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). Desta maneira, sua importância na saúde pública é justificada tanto pelo número de casos como pela morbidade associada ao dano linfático. Em relação ao mecanismo de transmissão desse parasito pelo *C. quinquefasciatus*, este é

considerado um processo de baixa eficiência, pois necessita de uma exposição intensa e prolongada ao vetor (REGIS et al., 1996). Estima-se que o número potencial de picadas necessário para produzir um caso de microfilaremia deve ser muito elevado podendo chegar a 67.568 (SOUTHGATE, 1992). Esta estimativa indica que a transmissão desse parasita filarial ocorre em áreas com elevada proliferação do vetor e, que está portanto, associada à áreas de baixa qualidade ambiental.

A filariose linfática ainda é considerada uma doença endêmica na Região Metropolitana de Recife, (RMR), Brasil e, por esta razão, esta cidade tem sido um dos alvos do Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática no nível mundial até 2020, promovido pela Organização Mundial de Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2014). Diante deste cenário a RMR se inseriu no "Plano Nacional para Eliminação da Filariose Linfática no Brasil", com o objetivo de erradicar a doença a partir de ações de tratamento da população com drogas microfilaricidas e ações integradas para o combate ao vetor *C. quinquefasciatus* (ROCHA et al., 2010). Na década de 1990, o Recife apresentava índices de prevalência entre 0,6% e 14,9% segundo estimativa realizada em 21 zonas de interesse social (31 distritos) da cidade (MACIEL et al., 1996). Esta taxa caiu para 0,24% (RECIFE, 2011) e, em 2012, apenas cinco casos positivos para a infecção foram confirmados com percentual de positividade de 0,002% a partir de um monitoramento realizado na RMR (PERNAMBUCO, 2013). Atualmente, o Brasil interrompeu as ações de tratamento da população e se encontra em processo de certificação da eliminação da filariose no Estado, junto ao Ministério da Saúde (MS) e à Organização Mundial de Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). Estes resultados mostram que as ações tomadas para a eliminação desta doença estão sendo bem sucedidas e precisam ser mantidas para evitar a re-emergência de casos na região.

O *C. quinquefasciatus* também pode estar implicado na transmissão de arbovírus de grande importância como da encefalite de St. Louis, Rocio, Nilo Ocidental, Oropoche, Mayaro entre outros vírus que já estão circulando no Brasil (CARDOSO et al., 2015; FIGUEIREDO, 2007; HEINEN et al., 2015; SERRA et al., 2016). Estudos recentes demonstraram que *C. quinquefasciatus* pode transmitir o vírus Zika (GUEDES et al., 2017), que foi introduzido no Brasil no ano de 2014 (ZANLUCA et al., 2015), abrindo perspectivas para a ampliação do papel desta espécie como vetor de arboviroses. Ações para controlar a proliferação deste mosquito devem ser realizadas, de forma contínua pois sua presença representa um risco para surtos de arboviroses. Adicionalmente, a alta proliferação desta espécie em áreas urbanas, gera forte incômodo e causa problemas secundários de saúde,

contribuindo, dessa forma, para a diminuição da qualidade de vida da população (REGIS et al., 1996).

2.3 Controle de *Culex quinquefasciatus* com bactérias entomopatógenas

O controle de mosquitos vetores pode ser realizado através de diferentes abordagens, que podem incluir métodos de controle ambiental, uso de agentes químicos e biológicos, além de abordagens de controle genético (ACHEE et al., 2015). Contudo, o modelo tradicional de controle de mosquitos baseado no uso intensivo de inseticidas químicos desde 1950 tem se perpetuado até a atualidade. Diversas classes de inseticidas químicos tornaram-se disponíveis, porém muitos deles atuam sobre organismos não-alvo, acumulam-se na biosfera e causam o fenômeno de resistência detectado em populações de mosquitos, decorrentes do seu uso exclusivo e prolongado (HEMINGWAY et al., 2004). Aliado a esses fatores, também se constatou o risco à saúde humana, devido à exposição aos produtos que pode causar intoxicação, efeitos carcinogênicos entre outros (KING; AARON, 2015; LIMA et al., 2009). Os efeitos negativos destes compostos têm motivado o desenvolvimento e a utilização de bioinseticidas seletivos e de técnicas de manejo integrado (HEMINGWAY et al., 2006).

O controle de insetos com agentes biológicos pode ser uma alternativa eficaz, e se baseia na utilização de organismos, ou de toxinas resultantes de seu metabolismo, para reduzir a densidade populacional dos insetos (LACEY, 2007). Dentre as bactérias entomopatógenas, *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* (Bti) e *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) possuem ação inseticida para alguns dípteros e são consideradas agentes eficazes para o controle de culicídeos de importância médica, pois possuem atividade inseticida elevada e específica, além de apresentarem facilidades para a produção em larga escala, armazenamento, transporte e aplicação (BRAVO et al., 2011; LACEY et al., 2015). Elas têm sido os principais biolarvicidas utilizados em diversos programas de controle de mosquitos, inclusive com experiências bem sucedidas no Brasil (ARAÚJO-COUTINHO, 1995; MARDINI et al., 1999; REGIS et al., 2001). Os biolarvicidas produzidos a base destas bactérias têm como princípio ativo proteínas inseticidas produzidas sob a forma de cristais durante a esporulação. Estes são aplicados em ambientes aquáticos utilizados como criadouros pelas formas jovens do mosquito. As larvas ingerem os cristais protéicos, e as protoxinas liberadas no lúmen intestinal são processadas em toxinas que interagem com receptores específicos no intestino das larvas e desencadeiam os efeitos citopatológicos e a morte das larvas (BERRY, 2012; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

2.4 *Lysinibacillus sphaericus* e suas toxinas inseticidas

A bactéria entomopatígena *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp), foi descoberta em 1904, e inicialmente denominada *Bacillus sphaericus*. Posteriormente, passou a ser classificada como *Lysinibacillus sphaericus* devido a presença de lisina e aspartato no peptidoglicano da parede celular, o que a difere dos outros membros do gênero *Bacillus* (AHMED et al., 2007). É uma bactéria Gram-positiva, cosmopolita, saprófita e esporulante, geralmente encontrada em solos e ambientes aquáticos. Durante a esporulação, produz esporos arredondados no interior de um esporângio em forma de raquete além de cristais que contém as proteínas inseticidas (Figura 2).

Figura 2 - Visão longitudinal em micrografia eletrônica de *Lysinibacillus sphaericus*, em fase de esporulação.



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

Legenda: E (esporo); C (cristal protéico).

A primeira cepa de Lsp com atividade inseticida foi isolada em larvas de *Culiseta incidens* por Kellen et al. (1965), mas esta não recebeu muita atenção devido a sua baixa toxicidade. Posteriormente, a partir do isolamento de cepas com alta atividade larvicida e potencial de produção comercial, como 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), o Lsp se tornou um agente promissor para o controle de mosquitos. A denominação das cepas ocorre de acordo com a sua origem geográfica e, além disto, elas são agrupadas em sorotipos baseados em teste de aglutinação flagelar (DE BARJAC; VÉRON; COSMAO-DUMANOIR, 1980). Os principais sorotipos estudados são o H5a5b (cepas 1593, 2362, 2317, 1691 e C3-41), o H25 (cepa 2297) e H6 (cepa IAB59) (CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELÉCLUSE, 1996; DE BARJAC et al., 1985). As principais cepas atualmente utilizadas para a produção de biolarvicidas são a 1593, 2362 e C3-41 do sorotipo H5a5b. O espectro de ação do Lsp é restrito às larvas de culicídeos, principalmente às espécies dos gêneros *Culex*, *Anopheles*, *Aedes*, *Mansonia* e *Psorophora* (LACEY, 2007). Do ponto de vista aplicado, as principais espécies alvos são dos gêneros *Culex* e *Anopheles* devido à importância destes mosquitos na saúde pública. O Lsp vem sendo sobretudo preconizado para o controle de *C. quinquefasciatus*, pois, apresenta ação larvicida

elevada e boa persistência em criadouros típicos desta espécie, ricos em matéria orgânica (LACEY, 2007). Até o momento, quatro classes de toxinas inseticidas produzidas por diferentes cepas de Lsp foram identificadas: toxina binária (Bin), toxinas mosquitocidas (Mtx), toxinas da família Cry e a sphaericolisina (BERRY, 2012). Além dessas classes, estudos recentes demonstraram que as proteínas S-layer associadas aos esporos de duas cepas do Lsp (2362 e C7) contribuem para a atividade larvicida em mosquitos (ALLIEVI et al., 2014). As principais características dessas proteínas inseticidas estão descritas a seguir.

2.4.1 S-Layer

As proteínas S-layer são produzidas tanto na fase vegetativa quanto na fase de esporulação e vêm sendo implicadas na patogenicidade de algumas cepas de *Lysinibacillus sphaericus* (LOZANO; AYALA; DUSSAN, 2001). Elas possuem alto peso molecular (120-130 kDa) e se mantêm associadas aos esporos de Lsp sendo que as cepas mais tóxicas do Lsp produzem esporos contendo maiores quantidades das proteínas S-layer. 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). Essas proteínas, sejam de culturas vegetativas ou associadas a esporos, possuem atividade para larvas do gênero *Culex*, sugerindo o seu potencial inseticida para esta espécie.

2.4.2 Toxinas Mtx

As toxinas mosquitocidas (Mtx) são produzidas durante a fase vegetativa de crescimento e secretadas no meio, e até o momento já foram identificadas as toxinas Mtx1 (100 kDa), Mtx2 (31,8 kDa) e Mtx3 (36 kDa) (LIU et al., 1996; THANABALU et al., 1991; THANABALU; PORTER, 1995). Pouca importância tem sido dada a estas toxinas, pois elas apresentam baixa atividade inseticida por serem degradadas por proteases presentes no meio de cultura quando as células entram na fase estacionária (CHARLES; NIELSEN-LEROUX, DELÈCLUSE, 1996). Entretanto, alguns estudos demonstraram que se essas toxinas forem produzidas sob a forma de proteínas recombinantes elas apresentam alta atividade larvicida para culicídeos (THANABALU; PORTER, 1995, WIRTH et al., 2007), podendo se tornar uma alternativa para o controle desses mosquitos.

2.4.3 Sphaericolisina

A toxina sphaericolisina é uma citolisina de 53 kDa que foi descoberta na cepa A3-2 de *Lsp* e, assim como as toxinas Mtx, tem sido pouco estudada. A cepa A3-2 não possui genes de outras toxinas já caracterizadas (NISHIWAKI et al., 2007), porém, o gene responsável pela produção da Sphaericolisina já foi encontrado em outras cepas de *Lsp* como a C3-41 (HU et al., 2008). Estudos preliminares demonstraram que a sphaericolisina não possui ação em dípteros, contudo apresenta toxicidade quando injetada nos insetos *Blatella germanica* (Blattodea) e *Spodoptera litura* (Lepidoptera) (NISHIWAKI et al., 2007).

2.4.4 Toxina binária (Bin)

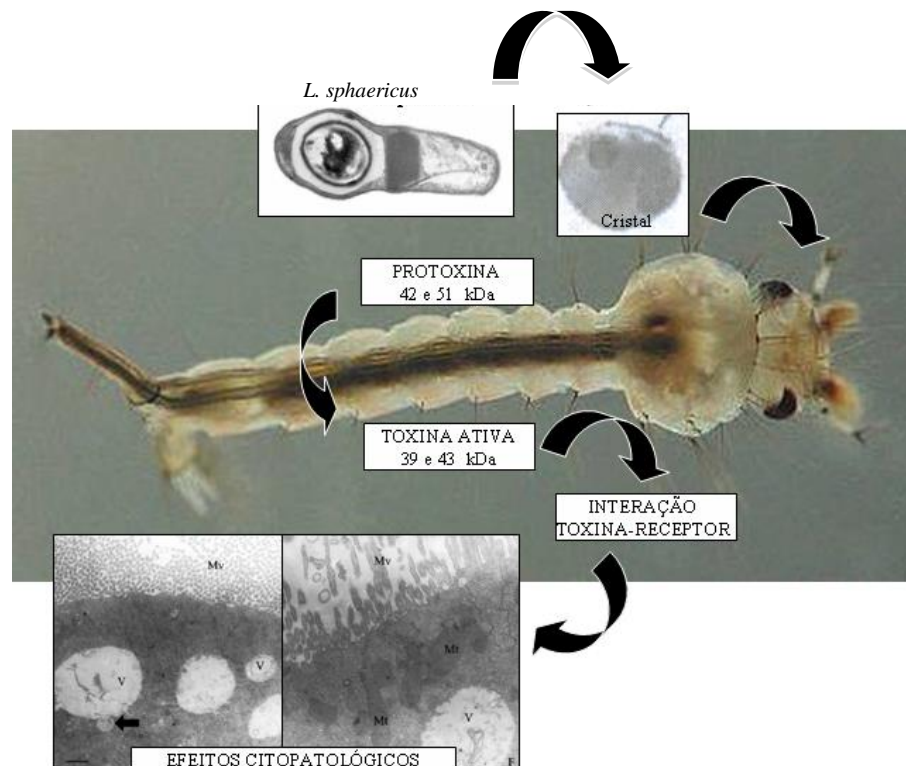
O principal fator inseticida produzido pelo *Lsp* é a protoxina Binária (Bin) (CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELÉCLUSE, 1996). Esta protoxina é o princípio ativo dos produtos comerciais hoje disponíveis (BERRY, 2012), pois é produzida de forma estável e abundante sob a forma de cristais protéicos, além de exibir a maior atividade registrada dentre as toxinas já identificadas nas cepas nativas de *Lsp*. Este fator inseticida, produzido durante a esporulação da bactéria, está presente em todas as cepas que possuem atividade elevada para larvas de culicídeos. A protoxina Bin é um heterodímero formado por dois polipeptídeos denominados de BinA (42 kDa) e BinB (51 kDa) que são sintetizadas de forma equimolar (BAUMANN; BROADWELL; BAUMANN, 1988; BAUMANN et al., 1985). Estas subunidades são pouco conservadas entre si, com apenas 25% de identidade e 40% de similaridade sendo que as regiões mais conservadas entre elas compreendem segmentos hidrofóbicos relacionados com a interação com a membrana (BAUMANN; BROADWELL; BAUMANN, 1988). Em contrapartida, os genes que codificam a toxina Bin são conservados entre as cepas de *L. sphaericus* e, a partir de algumas diferenças detectadas na sequência de aminoácidos, foram descritos quatro grupos de toxinas: Bin 1 (cepa IAB59), Bin 2 (cepas 2362 e 1593), Bin 3 (cepa 2297) e Bin 4 (cepa LP1-G) (BERRY et al., 1989; PRIEST et al., 1997; SILVA-FILHA et al., 2004). As toxinas mais utilizadas e estudadas são a Bin 1 e Bin 2 e suas principais características serão descritas nas seções seguintes.

2.4.4.1 Modo de ação

As espécies mais susceptíveis à protoxina Bin pertencem ao complexo *Culex pipiens* e estas vêm sendo as mais estudadas em relação ao modo de ação desta protoxina. Em *C. quinquefasciatus* os cristais ingeridos pelas larvas são solubilizados em pH intestinal alcalino

($\cong 10$), liberando as protoxinas no lúmen do intestino larval. Em seguida ocorre o processamento das protoxinas em toxinas ativas onde os polipeptídeos de 42 kDa (BinA) e 51 kDa (BinB) são clivados em componentes de 39 e 43 kDa respectivamente, devido à ação de serino proteases (BROADWELL; BAUMANN, 1987). A próxima etapa do modo de ação do Lsp é a interação das toxinas ativas com receptores específicos no epitélio intestinal das larvas susceptíveis. Estudos recentes demonstraram que separadamente, BinA e BinB são monoméricos, seja como protoxinas ou como toxinas ativadas porém quando elas são combinadas, eles formam um heterodímero. Isso sugere que esta é a forma que a toxina Bin interage com seu receptor nativo. Essa interação pode então desencadear outras mudanças conformacionais ou uma posterior oligomerização (SURYA et al., 2016). As principais etapas do modo de ação da toxina Bin estão representadas na Figura 3.

Figura 3 - Modo de ação da toxina Binária de *Lysinibacillus sphaericus* em larvas de *Culex* sp.



Fonte: Adaptado de De Melo et al. (2008) e Kalfon et al. (1984).

Larvas de *Aedes aegypti* são naturalmente refratárias pois a toxina Bin não apresenta capacidade de se ligar ao epitélio devido à ausência de receptores específicos (FERREIRA et al., 2010). Porém existem outras espécies do gênero que são susceptíveis ao Lsp como *Ae. atropalpus*, *Ae. triseriatus* e *Ae. vexans* (BERRY et al., 1993; WRAIGHT; MOLLOY; SINGER, 1987), embora seus receptores ainda não tenham sido identificados.

As subunidades da toxina agem em sinergia sendo o componente BinB responsável pela ligação aos receptores do epitélio intestinal das larvas, e o componente BinA pela

toxicidade às células (LEKAKARN; PROMDONKOY; BOONSERM, 2015; NICOLAS et al., 1993). Foi demonstrado uma forte interação da subunidade BinB com o receptor enquanto que a interação da subunidade BinA pode ser não-específica e transitória (CHARLES et al., 1997; SHARMA; GUPTA; KUMAR, 2018). Alguns domínios funcionais das subunidades necessários para as interações entre os componentes BinA e BinB e com o receptor já foram identificados (ROMÃO; MELO-NETO; SILVA-FILHA, 2011; SRISUCHARITPANIT et al., 2014). A subunidade BinA possui 286 aminoácidos e seu domínio C-terminal é responsável pela atividade tóxica para as células (ELANGO VAN et al., 2000), e os resíduos de triptofano (222 e 226) e cisteína (31, 47 e 195) são cruciais para esta atividade (KUNTHIC et al., 2011; PROMDONKOY et al., 2008). Ambos os domínios C-terminal e N-terminal estão relacionados com a sua interação com o componente BinB (OEI; HINDLEY; BERRY, 1992). A subunidade BinB é maior que a BinA com 448 AA onde a região C-terminal contém porções responsáveis pela interação entre as subunidades enquanto a porção N-terminal é responsável pela interação com os receptores no epitélio intestinal (ELANGO VAN et al., 2000; OEI; HINDLEY; BERRY, 1992), e os resíduos $^{85}\text{IRF}_{87}$, $^{147}\text{FQF}_{149}$ e Y_{150} são críticos para essa ligação (ROMÃO; MELO-NETO; SILVA-FILHA, 2011; SINGKHAMANAN et al., 2009). A estrutura cristalográfica da subunidade BinA ainda não foi elucidada mas, recentemente, a estrutura da BinA e BinB associadas ficou disponível mostrando que a ativação proteolítica e alcalinidade do meio desencadeiam uma série de rearranjos estruturais como a dissociação do heterodímero e progressão para a formação do poro facilitando a internalização das subunidades para atingir seus alvos (COLLETIER et al., 2016). A estrutura cristalográfica da subunidade BinB também foi elucidada e apresenta dois domínios, o N-terminal, com uma estrutura globular e o C-terminal, alongado, sendo que o domínio N-terminal possui características conservadas em relação a outras proteínas com função de ligação a carboidratos, corroborando a hipótese de que esta região é responsável pela interação com receptores (SRISUCHARITPANIT et al., 2014). Este trabalho demonstrou que a estrutura da subunidade BinB é semelhante às estruturas das toxinas formadoras de poro, sugerindo que a toxina Bin penetra nas células através da formação de poros na membrana com consequente desencadeamento dos efeitos citopatológicos como danos nas microvilosidades, intumescimento das cristas mitocondriais, fragmentação do retículo endoplasmático e vacuolização citoplasmática que resultam na morte das larvas (DE MELO et al., 2008). Além desses efeitos, sabe-se que a toxina Bin induz os processos de apoptose e de autofagia nos mosquitos (TANGSONGCHAROEN et al., 2017). Estudos anteriores demonstraram que a toxina Bin induz a vacuolização dos autolisossomas da via de autofagia

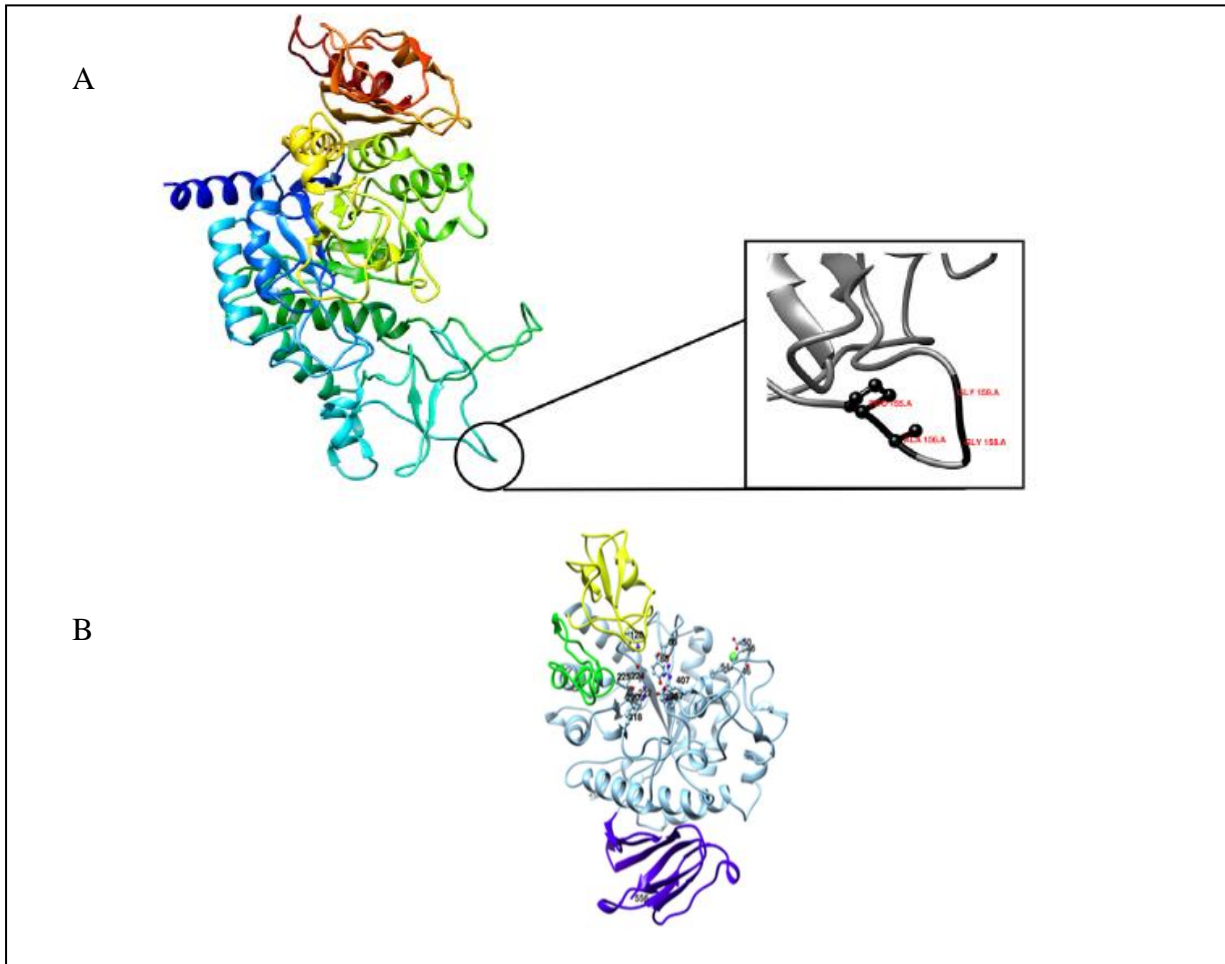
resultante da fusão entre autofagossoma com um lisossoma. Isso revela que a Bin induz autofagia como uma resposta da célula à intoxicação, enquanto se protege da degradação (OPOTA et al., 2011).

2.4.4.2 Receptores

A etapa crucial para a atividade larvívora da toxina Bin, e que também confere a seletividade de ação da mesma, é o reconhecimento e ligação da toxina à receptores específicos que são α -glicosidases (E.C. 3.2.1.20) ligadas ao epitélio intestinal através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Em *Culex quinquefasciatus*, o receptor foi identificado como *C. quinquefasciatus* maltase 1 (Cqm1), é codificado pelo gene *cqm1* que possui 1743 pares de bases (pb) e a proteína resultante tem 580 aminoácidos e peso molecular predito de 66 kDa (ROMÃO et al., 2006). A estrutura tridimensional da proteína Cqm1 é desconhecida, porém a modelagem estrutural desta proteína demonstrou que a região N-terminal, entre os resíduos S129 e A312, é responsável pela interação da Cqm1 com a toxina Bin, e que resíduos ₁₅₅PATGG₁₆₀ são críticos para esta interação (Figura 4A), pois a desnaturação provoca a perda desta habilidade (FERREIRA et al., 2014). Um segundo modelo estrutural proposto para a Cqm1 revelou uma estrutura de três domínios, resíduos de ligação ao Ca⁺² conservados e diferentes regiões de loop (Figura 4B), e foi demonstrado que o Ca⁺² proporciona estabilidade estrutural para a proteína Cqm1 (SHARMA; GUPTA; KUMAR, 2018). *Culex pipiens* maltase 1 (Cpm1) e *Anopheles gambiae* maltase 3 (Agm3) também são α -glicosidases identificadas como receptores da toxina Bin em larvas de *C. pipiens* e *An. gambiae* respectivamente (DARBOUX et al., 2001; OPOTA et al., 2008; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999). As sequências gênicas destes receptores possuem 1740 e 1764 pb, cujas proteínas possuem peso molecular aproximado de 66 kDa. Estas α -glicosidases são conservadas com similaridade de 97% entre a Cqm1 e Cpm1 e 78% entre a Cqm1 e Agm3 (ROMÃO et al., 2006). Ensaios de ligação *in vitro* demonstraram que a afinidade de ligação da toxina aos receptores e a sua concentração no microvilli intestinal estão diretamente relacionadas à susceptibilidade *in vivo* das larvas. Consequentemente, no intestino de larvas do complexo *C. pipiens*, que são altamente susceptíveis, existem muitos receptores que se ligam com alta afinidade à toxina Bin. Já em espécies menos susceptíveis como *An. gambiae* e *An. stephensi* a concentração de receptores e a afinidade de ligação são inferiores (SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997). Em ensaios de ligação realizados entre a toxina Bin e *Ae. aegypti* não foi evidenciada a

capacidade de interação entre estas moléculas e esta espécie foi considerada refratária (FERREIRA et al., 2010), apesar de possuir uma α -glicosidase ortóloga (*Ae. aegypti* maltase 1 - Aam1), com 74% de identidade ao receptor Cqm1 (ROMÃO et al., 2006), e que também é expressa como proteína ancorada ao epitélio intestinal das larvas.

Figura 4 - Modelagem predita da proteína Cqm1.



Fonte: Ferreira et al. (2014) e Sharma, Gupta e Kumar, (2018).

Legenda: A. Proteína Cqm1 selvagem mostrando resíduos de interação da Cqm1 com a toxina Bin. B. Proteína Cqm1, domínio A, ciano, domínio B, amarelo e domínio C, azul mostrando também os sítios ativos e os resíduos de ligação de Ca^{+2} na representação da bola e do bastão. Ca^{+2} é mostrado como esfera verde. O loop-4 que possui a maior flexibilidade é mostrado em verde.

2.4.4.3 Resistência

Apesar do excelente desempenho do Lsp como larvicida, o maior desafio para a sua utilização no controle de vetores é a seleção de populações resistentes à toxina Bin. A seleção é favorecida devido à toxina Bin agir em uma única classe de receptores as α -glicosidasas Cqm1 e mutações nesse gene podem provocar a falha de ligação da toxina ao receptor (FERREIRA; SILVA-FILHA, 2013). A resistência já foi registrada em colônias de *Culex*

pipiens e *C. quinquefasciatus* selecionadas artificialmente em laboratório (FERREIRA; SILVA-FILHA, 2013; PEI et al., 2002; WIRTH et al., 2000; YUAN et al., 2003) e em populações expostas a tratamentos em campo em diferentes países como França, Índia, Brasil, Tunísia e Tailândia (MULLA et al., 2003; NIELSEN-LEROUX et al., 1997, 2002; RAO et al., 1995; SILVA-FILHA et al., 1995).

A maioria dos casos de resistência envolve mutações nos genes que codificam os receptores da toxina Bin, o que pode levar a produção de receptores não funcionais, sem capacidade de ligação específica à toxina Bin ou ausência de expressão dos mesmos no epitélio intestinal. Oito alelos de resistência dos genes *cqm1* e *cpm1* já foram descritos em colônias selecionadas em laboratório ou em populações de campo do Brasil, França, EUA e China (CHALEGRE et al., 2012, 2015; DARBOUX et al., 2002, 2007; GUO et al., 2013; ROMÃO et al., 2006). Dentre as colônias de *C. quinquefasciatus* resistentes a toxina Bin, selecionadas em laboratório, duas delas foram obtidas no IAM/FIOCRUZ. A colônia R2362, apresentou uma alta razão de resistência (RR) > 162.000 à cepa 2362 e, a colônia RIAB59 apresentou uma RR de ≈40.000 à cepa IAB59, quando selecionadas e ambas vêm sendo utilizadas como modelos de estudos (AMORIM et al., 2007; PEI et al., 2002). Na colônia R2362 foram identificados dois alelos responsáveis pela resistência desta colônia, denominados *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*. O alelo *cqm1_{REC}* apresenta uma deleção de 19 nucleotídeos (posição 1334-1352), que causa uma mudança na fase de leitura e gera um códon de terminação da tradução prematuro (posição 443) (ROMÃO et al., 2006). O alelo *cqm1_{REC-2}* é caracterizado por uma mutação G1292A que gera um códon de terminação de tradução prematuro (posição 431) e também codifica para uma proteína truncada com 430 aminoácidos que seria solúvel (CHALEGRE et al., 2015). No caso da colônia RIAB59, resistente a todas as toxinas produzidas pela cepa IAB59 (Bin, Cry48Aa/Cry49Aa), o mecanismo de resistência à toxina Bin é idêntico aquele caracterizado na colônia R2362, enquanto que a resistência às toxinas Cry48Aa e Cry49Aa ainda não foi caracterizada, pois os seus sítios alvo e o modo de ação ainda são desconhecidos (JONES et al., 2007). Larvas da colônia RIAB59 são objeto deste estudo e esta será detalhada na seção 2.4.4.4. Todavia, outros mecanismos de resistência ainda não identificados podem estar atuando nas populações de mosquitos. Este é o caso de duas colônias de campo resistentes (SPHAE da França e TUNIS da Tunísia) que possuem receptores funcionais no epitélio intestinal das larvas e desta maneira a interação da toxina com o receptor não é afetada (NIELSEN-LEROUX et al., 1997, 2002).

Outros estudos mostraram a ocorrência de resistência cruzada entre cepas de Lsp comercialmente usadas (2362, 1593 e C3-41), pois, todas têm como princípio ativo a toxina

Bin que se liga ao mesmo receptor, a α -glicosidase Cqm1 (NIELSEN-LEROUX et al., 2001; SILVA-FILHA et al., 2004). Já o *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis*, por exemplo, não apresenta resistência cruzada com o Lsp, pois seu cristal é composto de toxinas distintas da Bin com ação em receptores do epitélio também diferentes, descritos na seção 2.6 (FERREIRA; SILVA-FILHA, 2013; LIKITVIVATANAVONG et al., 2011). Além disso, alguns estudos já mostraram que a associação da mistura da toxina Bin com a toxina Cyt, que é uma das toxinas produzidas pelo Bti, é letal para as larvas resistentes à toxina Bin, e também possuem atividade para *Ae. aegypti* considerado refratário à toxina Bin. Porém o mecanismo de sinergia que ocorre entre estas toxinas ainda está sendo estudado (WIRTH et al., 2004; 2005; WIRTH; FEDERICI; WALTON, 2000). Além do Bti, estudos prévios também revelaram que a cepa IAB59 do Lsp é ativa para colônias resistentes às cepas de Lsp produtoras de Bin como a 2362, 1593 e C3-41 (DE MELO et al., 2009; NIELSEN-LEROUX et al., 2001; PEI et al., 2002). Foi descoberto que a cepa IAB59 do Lsp produz outros fatores inseticidas (toxinas Cry48Aa e Cry49Aa) além da toxina Bin, o que justifica a ausência de resistência cruzada (JONES et al., 2007). Estas toxinas podem ter um papel estratégico para o manejo da resistência sendo um novo princípio ativo, que age em sítios alvo no intestino das larvas diferentes daqueles da toxina Bin e serão descritas no tópico 2.4.5.

2.4.4.4 A colônia RIAB59

Como descrito, o Lsp cepa IAB59 possui uma importância estratégica pois, tem ação em larvas resistentes à toxina Bin, Para o estudo desta cepa foi fundada uma colônia de *C. quinquefasciatus* (RIAB59) a partir de ovos da colônia CqSLAB, que foi selecionada com o Lsp cepa IAB59 que, além da Bin produz as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa. A colônia selecionada vêm sendo mantida e utilizada no IAM/FIOCRUZ desde 2002 como modelo de estudos. A avaliação da colônia RIAB59 mostrou que, após 12 gerações, houve uma alteração de apenas 4 vezes na susceptibilidade ao Lsp IAB59 (PEI et al., 2002). O mais alto nível de resistência com uma razão de 40.000 vezes, foi detectado apenas na geração 72 (AMORIM et al., 2007). No entanto deve ser ressaltados que, durante a seleção da colônia RIAB59, a resistência unicamente para a toxina Bin surgiu muito antes do que a resistência a todo o conjunto de toxinas presentes na cepa IAB59, pois, larvas da geração 18 apresentaram um nível de resistência de 162.000 vezes que estava associada a uma redução significativa de receptores da toxina Bin no epitélio intestinal (SILVA-FILHA et al., 2004). Nesta colônia a resistência à toxina Bin está associada ao alelo *cqm1_{REC}* em homozigose que impede a

expressão da α -glicosidase Cqm1 no epitélio intestinal das larvas. Embora larvas desta colônia não expressem a α -glicosidase Cqm1, que possui um papel primordial no metabolismo da glicose nos mosquitos (NASCIMENTO et al., 2017), a colônia têm sido mantida sob condições de laboratório por 212 gerações sob pressão de seleção intermitente com a cepa IAB59 do Lsp. A avaliação dos parâmetros biológicos como fecundidade, fertilidade e peso das pupas em indivíduos dessa colônia não revelaram significantes custos comparado com a colônia de referência CqSLAB (AMORIM et al., 2007). Esses resultados associados à manutenção desta colônia resistente por um longo período sugerem que indivíduos da colônia RIAB59 podem ter desenvolvido mecanismos para balancear os potenciais custos de resistência para sobreviver exibindo esse fenótipo em condições laboratoriais. De qualquer maneira, o mecanismo de resistência da colônia RIAB59 de *C. quinquefasciatus*, ainda é desconhecido e por isso, esta colônia é alvo de nossos estudos uma vez que ela tem importância estratégica para análises comparativas em relação à colônia suscetível que podem trazer informações valiosas sobre o modo de ação das toxinas do Lsp cepa IAB59, tanto da Bin como da nova toxina binária identificada nesta cepa e descrita abaixo.

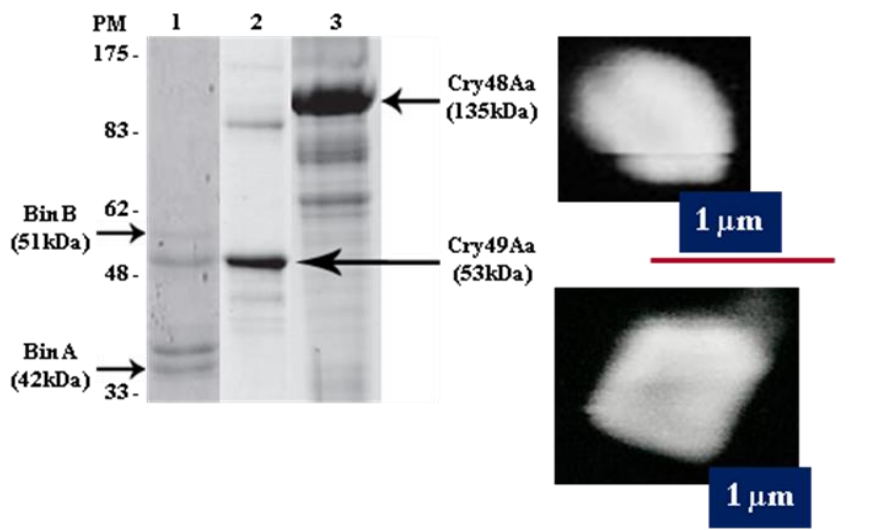
2.4.5 Toxina Cry48Aa/Cry49Aa

2.4.5.1 Identificação e caracterização

Como descrito anteriormente, a cepa IAB59 do Lsp mostrou atividade para larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes às cepas de Lsp 2362 e C3-41 as quais produzem apenas a toxina Bin como principal fator inseticida (PEI et al., 2002). Este dado sugeriu que a cepa IAB59 produzia outro fator tóxico, posteriormente, identificado e caracterizado (JONES et al., 2007). Esta nova toxina é formada por duas subunidades denominadas Cry48Aa (135 kDa) e Cry49Aa (53 kDa) e é também considerada binária, pois, os componentes na sua forma individual não possuem atividade larvicida sendo necessária a presença de ambos em concentração equimolar para alcançar esta ação (JONES et al., 2008). Assim como a toxina binária Bin, estes componentes são produzidos como protoxinas sob a forma de cristais durante a esporulação bacteriana, contudo, a produção destes fatores na cepa nativa IAB59 não é equimolar, pois a expressão da Cry48Aa é baixa e possivelmente instável (Figura 5). Adicionalmente, os cristais contendo esta toxinas são menores do que aqueles formados pela protoxina Bin que são grandes (Figura 2) e podem corresponder até 25% do conteúdo protéico

da célula em fase final de esporulação. Devido ao perfil de expressão das toxinas Cry48Aa e Cry49Aa nas cepas nativas não ser equimolar, a toxicidade da cepa IAB59 não é maior do que a das cepas que contém apenas a Bin. O acúmulo do componente Cry48Aa é baixo, e a presença de concentrações equimolares dos dois componentes é essencial para a expressão total da toxicidade (JONES et al., 2007). Para a caracterização das toxinas Cry48Aa e Cry49Aa, os seus genes foram clonados e as proteínas foram expressas de forma recombinante na linhagem de *B. thuringiensis* svar. *israelensis* 4Q7 acristalífero (Figura 5), (JONES et al., 2007). Um estudo de prospecção dos genes *cry48Aa* e *cry49Aa* mostrou sua presença em outras cepas de Lsp como 47-6b, IAB763, IAB769, LP1-G e 2173 (GE et al., 2011).

Figura 5 - Perfil protéico dos cristais e expressão dos componentes Cry48Aa e Cry49Aa do *Lysinibacillus sphaericus*.



Fonte: Adaptado de Jones et al. (2007).

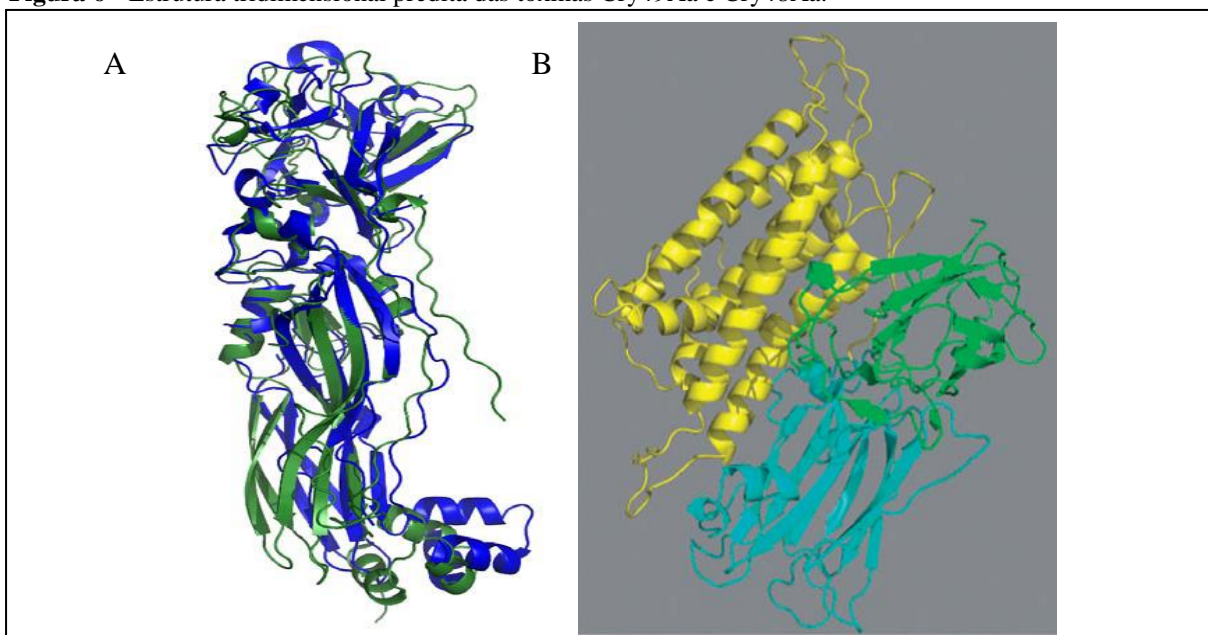
Legenda: Cepa nativa IAB59 com bandas das protoxinas Bin A, Bin B, Cry49Aa e ausência da banda da Cry48Aa (1); *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* 4Q7 transformado com o plasmídeo pHTP49 e pSTABP135 expressão recombinante da Cry49Aa (2) e da Cry48Aa (3), respectivamente. À direita aspecto dos cristais purificados a partir das linhagens recombinantes.

A subunidade Cry49Aa (GenBank: CAH56541) faz parte de uma família de toxinas consideradas binárias, pois requerem a presença de um par protéico para a expressão da atividade larvicida. A Cry49Aa possui 464 aminoácidos e peso molecular predito de \cong 53 kDa. Ela compartilha identidade com ambos os componentes da toxina Bin do Lsp (30%) e também com as toxinas Cry35Aa (20%) e Cry36Aa (34%) produzidas por alguns isolados de Bt (BERRY, 2012; JONES et al., 2007). A estrutura tridimensional da subunidade Cry49Aa ainda não foi elucidada, porém um modelo teórico proposto por Kelker et al. (2014) baseado apresentou similaridade com aquele proposto para a Cry35Aa contendo dois domínios (Figura 6A). O domínio N-terminal seria composto por α -hélices e três folhas β e o domínio C-

terminal consistiria predominantemente de folhas β antiparalelas e seis α -hélices, e pode estar relacionado com a formação de poros na membrana (KELKER et al., 2014).

O componente Cry48Aa (GenBank: CAJ18351) possui 1177 aminoácidos e \cong 135 kDa, é uma típica toxina de três domínios da família Cry e compartilha cerca de 33% de identidade com a toxina Cry4Aa de Bti (BOONSERM et al., 2006; JONES et al., 2007). A modelagem tridimensional da toxina Cry48Aa, predita por Jones et al. (2008) revelou uma estrutura típica das toxinas Cry de três domínios (Figura 6B). Nesta, o domínio I é formado por sete α -hélices e é responsável pela inserção da proteína à membrana e formação de poros. O domínio II, composto por folhas β antiparalelas com regiões em alças expostas envolvidas no reconhecimento e ligação ao receptor e, portanto, pela especificidade da toxina para o inseto-alvo (PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013; PIGOTT; ELLAR, 2007). O domínio III, também composto por folhas β , está relacionado à ligação ao receptor e parece estar envolvido com a função de promover estabilidade à molécula (DE MAAGD et al., 2003; FERNANDEZ et al., 2009; JONES et al., 2008).

Figura 6 - Estrutura tridimensional predita das toxinas Cry49Aa e Cry48Aa.



Fonte: Jones et al. (2008) e Kelker et al. (2014).

Legenda: A. Modelo teórico da Cry49Aa (verde) sobreposto com o modelo da Cry35Ab (azul). B. Modelo da Cry48Aa mostrando o domínio I (amarelo), o domínio II (azul) e o domínio III (verde).

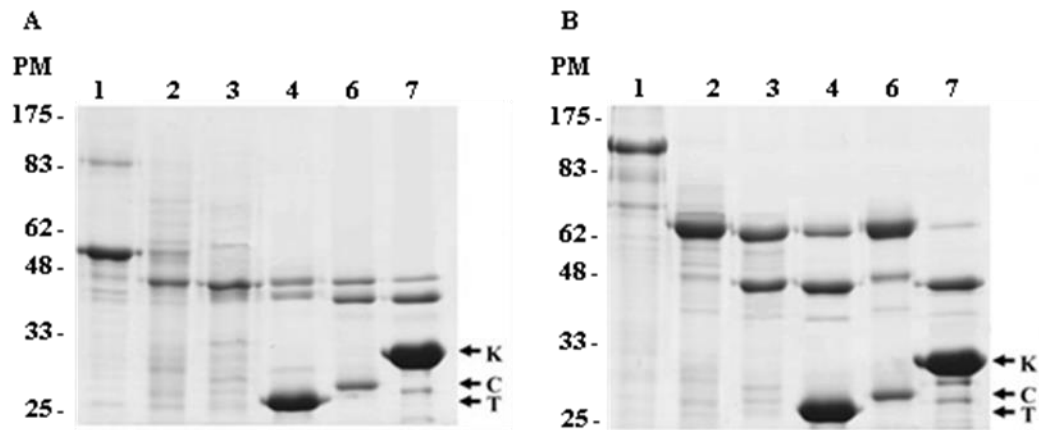
2.4.5.2 Modo de ação

A partir da expressão individual destes componentes em Bti foi demonstrado que estas toxinas isoladas não apresentam atividade para as larvas de *C. quinquefasciatus*, porém, quando ambas são administradas em concentração equimolar, elas agem em sinergia e passam

a apresentar uma alta atividade para as larvas sendo consideradas, portanto, uma nova toxina binária com ação mosquitocida produzida pelo Lsp (JONES et al., 2007, 2008). Em condições de expressão e utilização otimizadas, a toxina Cry48Aa/Cry49Aa tem atividade larvicida similar à da toxina Bin que é considerada uma das mais potentes toxinas inseticidas já identificadas (JONES et al., 2008).

A toxina Cry48Aa/Cry49Aa tem grande importância uma vez que ela tem ação letal para as larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes à toxina Bin, sendo um novo princípio ativo com modo de ação distinto e, portanto, estratégico para o manejo da resistência à toxina Bin (AMORIM et al., 2007; JONES et al., 2007, 2008). Em estudos anteriores, foi demonstrado que a toxina Cry48Aa/Cry49Aa provoca efeitos citopatológicos no epitélio intestinal e a morte de larvas resistentes desprovidas do receptor da toxina Bin no epitélio (Cqm1), comprovando que esta toxina age em sítios alvo no intestino das larvas, diferentes daqueles da toxina Bin (DE MELO et al., 2009). O espectro larvicida desta toxina Cry48Aa/Cry49Aa parece restrito a larvas do complexo *C. pipiens*, e a mesma não possui atividade para *Ae. aegypti* e *An. gambiae* (JONES et al., 2008), entretanto, este espectro inseticida necessita ser melhor investigado, pois, o estudo não apresentou dados quantitativos comparativos da atividade desta toxina para as espécies estudadas.

Alguns aspectos do modo de ação da toxina Cry48Aa/Cry49Aa já são conhecidos. Primeiramente ocorre a ingestão dos cristais pelas larvas seguida da solubilização em pH alcalino intestinal liberando as protoxinas no lúmen intestinal dos mosquitos. Essas protoxinas necessitam de processamento proteolítico para se tornarem toxinas ativas e ensaios *in vitro* com a toxina Cry48Aa/Cry49Aa demonstraram que tratamentos com tripsina, quimiotripsina, proteinase K, e extratos dos intestinos de *C. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* são eficazes. Após a clivagem com tripsina o polipeptídeo de 53 kDa (Cry49Aa) origina um fragmento de \cong 44 kDa e para a Cry48Aa o polipeptídeo de 135 kDa origina dois fragmentos de \cong 46 e 68 kDa (JONES et al., 2008) (Figura 7). Esta avaliação também demonstrou que apesar de *Ae. aegypti* não ser suscetível à toxina Cry48Aa/Cry49Aa, as protoxinas são corretamente processadas para a forma de toxina pela maquinaria enzimática intestinal. Este resultado sugere que a ausência de atividade larvicida desta toxina para *Ae. aegypti* pode ser devido à ausência de receptores específicos para a toxina Cry48Aa/Cry49Aa.

Figura 7 – Perfis de processamentos proteolíticos das protoxinas Cry49Aa (A) e Cry48Aa (B).

Fonte: Jones et al. (2008).

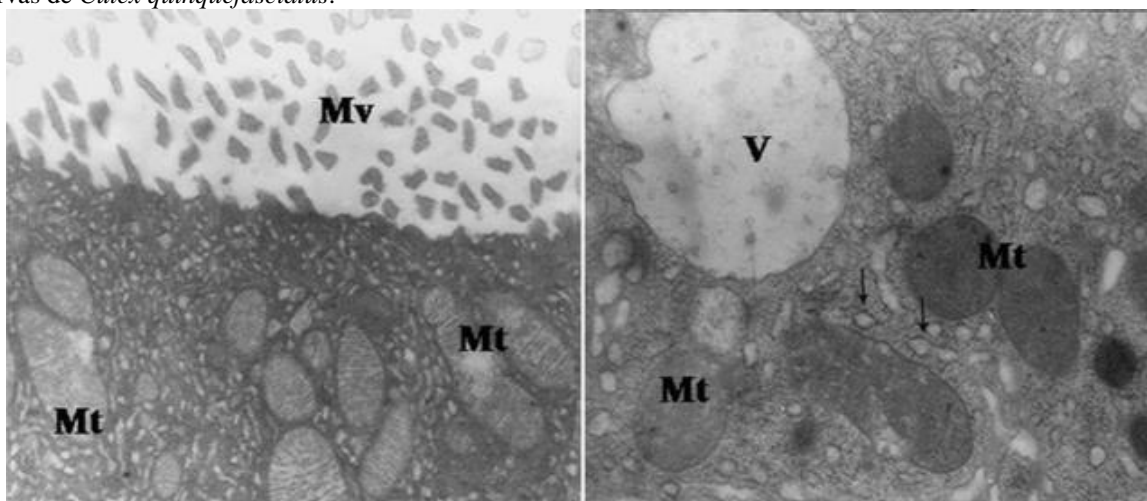
Legenda: Protoxinas Cry49Aa (A) e Cry48Aa (B) (1). As demais linhas representam o resultado do processamento com extrato intestinal de *Aedes aegypti* (2); de *Culex quinquefasciatus* (3), tripsina (T) (4), quimiotripsina (C) (6), proteinase k (K) (7). PM. Peso molecular em kDa.

Após o processamento as toxinas ativas Cry48Aa e Cry49Aa interagem com o epitélio intestinal do mosquito possivelmente através da ligação com receptores presentes no mesmo. Sabe-se que as subunidades das toxinas devem potencialmente interagir para formar o complexo Cry48Aa/Cry49Aa necessário para atividade desta toxina *in vivo* (JONES et al., 2007, 2008). Um estudo recente demonstrou que as subunidades individualmente apresentam capacidade de ligação com alta afinidade a receptores presentes no microvilli intestinal de *C. quinquefasciatus* através da região C-terminal (entre os aminoácidos S349- N464) da subunidade Cry49Aa e da região N-terminal (entre os resíduos N49-S149) da subunidade Cry48Aa (GUO et al., 2016). Este estudo também confirma que as subunidades interagem formando o complexo Cry48Aa/Cry49Aa através da porção N-terminal da subunidade Cry49Aa (GUO et al., 2016). Porém, ainda não se sabe se este complexo é formado antes ou após a interação das toxinas com os receptores do epitélio intestinal das larvas. A partir desta interação são desencadeados os efeitos citopatológicos no intestino de larvas de *C. quinquefasciatus* tratadas que são uma combinação de danos característicos de uma toxina Cry típica de 3-D, com os efeitos provocados por toxinas binárias (DE MELO et al., 2009). Células do epitélio intestinal de larvas tratadas apresentaram ruptura do retículo endoplasmático, formação de vacúolos citoplasmáticos e destruição de microvilosidades, que são característicos do tratamento com a toxina Bin, bem como vacúolos mitocondriais sem rompimento da membrana externa, que são característicos das toxinas Cry (DE MELO et al., 2009) (Figura 8).

Além de sua importância no manejo da resistência à toxina Bin, a toxina Cry48Aa/Cry49Aa tem despertado interesse do ponto de vista evolutivo, pois, as toxinas Cry

são produzidas, em sua grande maioria, por *Bacillus thuringiensis* (Bt) e este é o primeiro registro de proteínas do tipo Cry produzidas em Lsp. Alguns autores sugerem ter acontecido uma possível troca de material genético entre as espécies durante o processo evolutivo, e a aquisição dos genes *cry48Aa* e *cry49Aa* pelo Lsp pode ter ocorrido através de elementos de transposição, aos quais os genes poderiam estar associados (JONES et al., 2007; GE et al., 2011), a exemplo de outros genes de toxinas inseticidas (MAHILLON et al., 1994).

Figura 8 – Efeitos citopatológicos causados pela toxina Cry48Aa/Cry49Aa de *Lysinibacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: De Melo et al. (2009).

Legenda: Mv. Microvilosidades intestinais. Mt. Vacúolos mitocondriais. V. Vacúolos citoplasmáticos.

2.5 Modo de ação das toxinas Cry 3-D

As toxinas Cry, produzidas por diferentes sorovariedades de *Bacillus thuringiensis* (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/), são alvo de diversos estudos sobre seu modo de ação, devido à ampla utilização destes compostos para o controle de diferentes grupos de insetos (ex: lepidópteros, coleópteros e dípteros), bem como para o desenvolvimento de plantas transgênicas contendo genes de toxinas Cry (plantas Bt) (BRAVO et al., 2011; PIGOTT; ELLAR, 2007). A grande maioria das toxinas Cry de Bt são formadas por uma estrutura comum de três domínios (3-D), à exemplo da toxina Cry48Aa. Esta estrutura 3-D é conservada entre os membros da família Cry sugerindo que estas proteínas possuem um modo de ação semelhante (BRAVO et al., 2011). As toxinas Cry são conhecidas pela sua capacidade de formar poros (*pore forming toxins* - PFT) na membrana celular, causando choque osmótico na célula (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). Os primeiros passos para desencadear a ação das toxinas Cry são os mesmos descritos para a toxina Cry48Aa/Cry49Aa. Esta etapa de ativação tem sido considerada limitante para o modo de ação das toxinas de Bt, pois uma ativação ineficiente da toxina ou a ação proteolítica

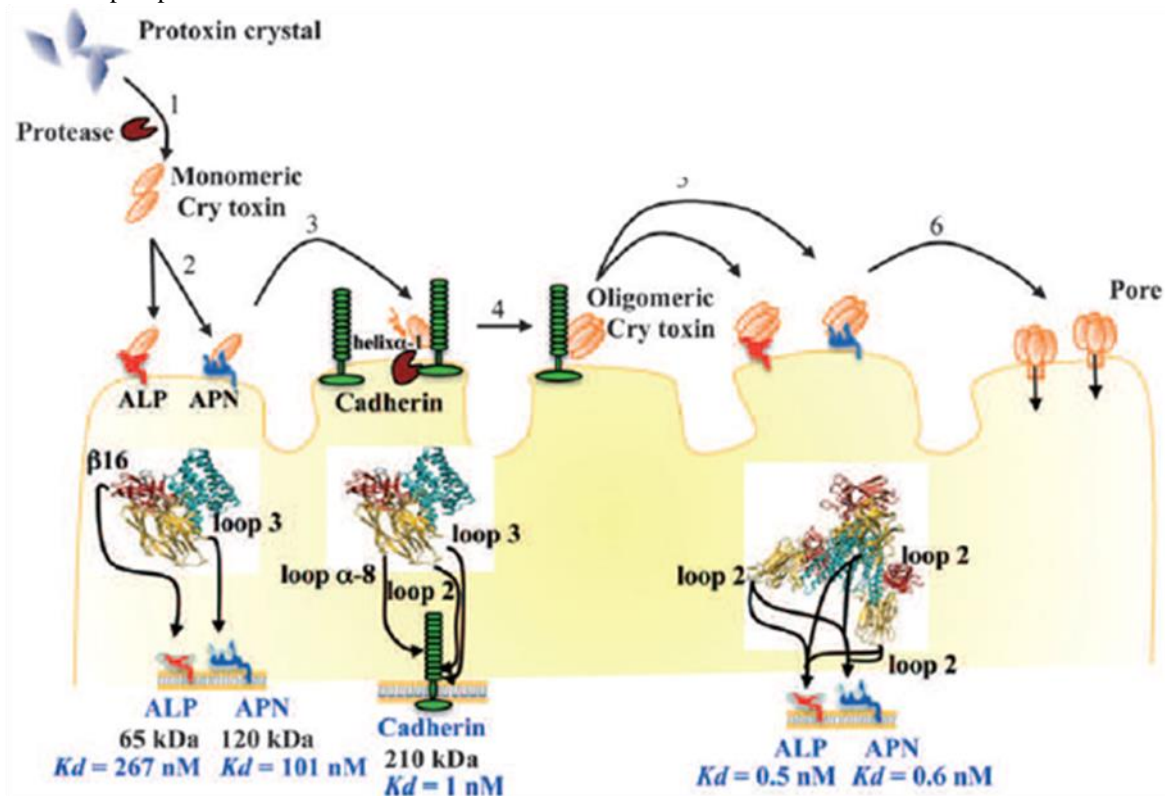
exacerbada pode, em alguns casos alterar a especificidade ao inseto alvo ou gerar resistência (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001).

Posteriormente, a toxina ativa interage com receptores específicos na membrana do microvilli intestinal das larvas. Nas toxinas Cry 3-D, vários epítomos importantes para a interação com os receptores foram identificados estando em regiões de alça dos domínios II e III (FERNANDEZ et al., 2005; GÓMEZ et al., 2002; LIKITVIVATANAVONG; AIMANOVA; GILL, 2009). Alças expostas do domínio II (α -8, β 2-3 (alça 1), β -4, β -8-9, alça 2 e β -10-11 (alça 3) parecem estar envolvidas na interação das toxinas Cry11Aa, Cry11Ba e Cry1C, com seus receptores em larvas de *A. aegypti* (CHEN et al., 2009a; FERNANDEZ et al., 2005; LIKITVIVATANAVONG; AIMANOVA; GILL, 2009; LIKITVIVATANAVONG et al. 2011). Além disto, mutações no domínio II (regiões de alças 1, 2 e 3) das toxinas Cry4Ba e Cry4Aa resultaram na alteração da toxicidade para o mosquito *C. quinquefasciatus* (ABDULLAH et al., 2003; DELÉCLUSE et al., 1993; VISITSATTAPONGSE et al., 2014) e regiões do domínio II (α -8, alça 2 e 3) foram incriminadas na interação da toxina Cry1Ab, com seus receptores do tipo caderinas de *Manduca sexta* e *Heliothis virescens* (GÓMEZ et al., 2003; XIE et al., 2005). Estes estudos demonstraram a importância destas regiões da toxina para a interação com seus respectivos receptores. Diferenças nas sequências, tamanho e conformação destes epítomos podem ser fatores determinantes para a seletividade da toxina (LIKITVIVATANAVONG; AIMANOVA; GILL, 2009).

O modelo de ligação sequencial da toxina Cry com receptores (PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013) é o mais aceito e leva a formação de poros na membrana intestinal e inserção da toxina na mesma. Os poros produzem a lise de células epiteliais e outros efeitos causando a morte das larvas (BRAVO et al., 2012; GÓMEZ et al., 2014; PALMA et al., 2014). Neste modelo, baseado na ligação da toxina Cry1Ab com o epitélio intestinal do lepidóptero *Manduca sexta* (Figura 9), os monômeros da toxina Cry1Ab se ligam a uma caderina (CAD) com alta afinidade funcionando como o primeiro receptor (BRAVO et al., 2011; GÓMEZ et al., 2006, 2014). Esta ligação provoca a clivagem da α -hélice 1 do domínio I da toxina e induz a formação de formas oligoméricas da toxina. Sob esta conformação os oligômeros da toxina ligam-se aos segundos receptores do tipo fosfatases alcalinas (ALP) e aminopeptidases (APN) com alta afinidade. A ligação da toxina à estes receptores leva a formação do poro e inserção da toxina na membrana (BRAVO et al., 2011; JIMÉNEZ-JUÁREZ et al., 2007). Um segundo modelo de ação proposto para as toxinas Cry com ação para mosquitos é semelhante mas, neste caso, a toxina Cyt também atuaria como primeiro receptor com capacidade de induzir as mudanças conformacionais nas toxinas Cry e

formar oligômeros com capacidade de ligação de alta afinidade aos segundos receptores (PEREZ et al., 2007).

Figura 9 – Representação esquemática da ligação de toxinas Cry de três domínios em receptores do intestino de larvas de lepidópteros.



Fonte: Pardo-Lopes, Soberón e Bravo, (2013).

Legenda: 1, a larva ingere a protoxina Cry 3-D que é processada por proteases e gera a toxina ativa. 2, a toxina monomérica se liga a receptores ALP e APN com baixa afinidade através das regiões de alça 3 e $\beta 16$. 3, a toxina monomérica se liga através das regiões de alça 2, 3 e α -8 a receptores do tipo caderina com alta afinidade através da região de alça 2, e esta interação induz a clivagem da α -hélice 1 do domínio I da toxina. 4, a toxina clivada sofre mudanças conformacionais formando oligômeros. 5, o oligômero se liga a receptores ALP e APN com alta afinidade. 6, estes oligômeros se inserem na membrana formando poros.

2.6 Receptores das toxinas Cry em mosquitos

O modo de ação das toxinas Cry do *B. thuringiensis* svar. *israelensis* (Bti) e *B. thuringiensis* svar. *jegathesan* (Btjeg) vem sendo investigado em dípteros e algumas moléculas presentes no epitélio intestinal de larvas dos mosquitos, principalmente em *Ae. aegypti* e *An. gambiae*, já foram caracterizadas como receptores para as toxinas (BRAVO et al., 2011; GÓMEZ et al., 2007). Estas moléculas são sobretudo das famílias das caderinas (CAD), aminopeptidases (APN), fosfatases alcalinas (ALP) e α -amilases (AMY), e estão sumarizadas no quadro 1.

Quadro 1 - Receptores funcionais de toxinas inseticidas de *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp), *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* (Bti) e *Bacillus thuringiensis* svar. *jegathesan* (Btjeg) presentes no epitélio intestinal de larvas de culicídeos.

Patógeno	Toxinas	Receptores/Ligantes		Espécie	Referências
		Classe	kDa		
Lsp	Bin	α -Gli ¹ (Cpm1)		<i>Culex pipiens</i>	SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999; DARBOUX et al., 2001 ROMÃO et al., 2006 OPOTA et al., 2008
		α -Gli (Cqm1)	66	<i>Culex quinquefasciatus</i>	
		α -Gli (Agm3)		<i>Anopheles gambiae</i>	
Bti	Cry11Aa	CAD ² (AaeCad)	250	<i>Aedes aegypti</i>	CHEN et al., 2009a FERNANDEZ et al., 2006; 2009
		ALP ³ (ALP1)	65		
		AMY ⁴ (Aamy1)	70	<i>An. albimanus</i>	FERNANDEZ-LUNA et al., 2010
		APN ⁵ (AaeAPN1)	140	<i>Ae. aegypti</i>	CHEN et al., 2009b
		APN (AaeAPN2)	104		CHEN et al., 2013
	Cry4Ba	CAD (BT-R3)	200	<i>An. gambiae</i>	IBRAHIM; GRIKO; BULLA, 2013 HUA et al., 2008 JIMENEZ et al., 2012
		CAD (AgCad1)	200		
		ALP (ALP1)	65		
		ALP (Aa-mALP)	58	<i>An. albimanus</i>	DECHKLAR et al., 2011 FERNANDEZ-LUNA et al., 2010
		AMY (Aamy1)	70		
		APN (2778)	112	<i>Ae. aegypti</i>	SAENGWIMAN et al., 2011; AROONKESORN et al., 2015
		APN (2783)	107		
		APN (5808)	108		
		Btjeg	Cry11Ba	CAD	88
CAD (AgCad2)	208			<i>An. gambiae</i>	HUA et al., 2013
ALP (AgALP1)	65				HUA et al., 2009
ALP (AaeALP1)	65			<i>Ae. aegypti</i>	LIKITVIVATANAVONG et al., 2011
AMY (Agamy1)	70				ZHANG et al., 2013
α -Gli (Agm3)	66			<i>An. gambiae</i>	
APN (AgAPN2)	106				ZHANG et al., 2008
APN (APN _{anq} 100)	100			<i>An. quadrimaculatus</i>	ABDULLAH; VALAITIS; DEAN, 2006
APN (AaeAPN1)	140	<i>Ae. aegypti</i>	LIKITVIVATANAVONG et al., 2011		

Fonte: Autora

Legenda: ¹ α -Gli - α -Glicosidase; ²CAD - Caderina; ³ALP - Fosfatase alcalina; ⁴Amy - α -Amylase; ⁵APN - Aminopeptidase.

As caderinas são amplamente conhecidas por estarem envolvidas em processos de adesão e sinalização celular, sendo glicoproteínas transmembranares. Além de suas funções primordiais as caderinas de insetos também podem atuar como receptores para as toxinas Cry através de seu domínio extracelular composto de sequências repetitivas (CR) expostas na superfície celular. Caderinas de *Ae. aegypti* e *An. gambiae* já foram identificadas como receptores para as toxinas Cry11Aa e Cry4Ba do Bti e para a toxina Cry11Ba do Btjeg (CHEN et al., 2009a; HUA et al., 2008, 2013; IBRAHIM; GRIKO; BULLA, 2013; LIKITVIVATANAVONG et al., 2011).

As aminopeptidases do epitélio intestinal de insetos atuam na digestão de proteínas e também podem ser receptores para toxinas Cry. Alguns fatores limitam a sua identificação, pois diferentes moléculas APN com peso molecular similar são simultaneamente expressas no intestino das larvas, dificultando a purificação desta proteína para estudos (PIGOTT; ELLAR, 2007). Apesar destas dificuldades APNs de *Ae. aegypti* e de anofelinos já foram identificados como receptores das toxinas Cry11Aa e Cry4Ba do Bti e Cry11Ba do Btjeg (ABDULLAH; VALAITIS; DEAN, 2006; AROONKESORN et al., 2015; BAYYAREDDY et al., 2009; CHEN et al., 2009b, 2013; SAENGWIMAN et al., 2011; ZHANG et al., 2008).

Fosfatases alcalinas são hidrolases que removem o grupo fosfato de muitas moléculas e ALPs de *Ae. aegypti* e *An. gambiae* também já foram caracterizadas como receptor das toxinas Cry11Aa e Cry4Ba do Bti e Cry11Ba do Btjeg (BAYYAREDDY et al., 2009; DECHKLAR et al., 2011; FERNANDEZ et al., 2006; HUA et al., 2009; JIMENEZ et al., 2012).

Na família das maltases, α -amilases de 70 kDa funcionam como receptores das toxinas Cry11Aa e Cry4Ba de Bti em *An. albimanus* (Amy1) (FERNANDEZ-LUNA et al., 2010) e como receptor para a toxina Cry11Ba do Btjeg em *An. gambiae* (Agamy1) (ZHANG et al., 2013). Algumas α -glicosidases ortólogas de 66 kDa foram apontadas como receptores da toxina Bin em *C. pippiens*, *C. quinquefasciatus* e *An. gambiae* (OPOTA et al., 2008; ROMÃO et al., 2006; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999). Nesta última espécie a α -glicosidase (Agm3) também foi apontada como receptor da toxina Cry11Ba do Btjeg (ZHANG et al., 2013). Além dessas classes de moléculas conhecidas como receptores de toxinas Crys, diferentes classes têm sido apontadas como ligantes destas toxinas, entre elas V-ATPases, actina, Prohibitin entre outras, porém, o papel destas moléculas como receptores funcionais para toxinas Cry ainda precisa ser avaliado.

Conforme descrito, poucos estudos têm sido realizados com a toxina Cry48Aa/Cry49Aa e os seus receptores ainda não foram caracterizados. Esta etapa é

fundamental para elucidar o seu modo de ação uma vez que a toxina Cry48Aa/Cry49Aa do *Lysinibacillus sphaericus* é estratégica para o manejo da resistência à toxina Bin. Em paralelo, a resistência à toxina Bin é um modelo que merece ser aprofundado por possuir algumas peculiaridades. A principal delas é a capacidade que as larvas altamente resistentes, desprovidas de uma α -glicosidase, têm de se manterem sob esta condição por um prolongado período. Além disso, a identificação de vias associadas a este fenótipo é também um aspecto essencial a ser investigado para se entender melhor esta condição. Desta maneira, moléculas de classes já conhecidas como receptores para outras toxinas do tipo Cry bem como outras moléculas ainda não caracterizadas podem estar envolvidas no modo de ação do *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) no epitélio intestinal de larvas de *Culex quinquefasciatus*.

3 JUSTIFICATIVA

O mosquito *Culex quinquefasciatus* é um problema de saúde pública no Brasil, onde atua como principal vetor da filariose linfática no Brasil bem como de uma série de arboviroses de grande importância médica como a encefalite de St. Louis, Rocio, febre do Nilo Ocidental, Oropoche, Mayaro entre outros. Recentemente esta espécie também foi considerada potencial vetor do vírus zika. Desta maneira, medidas para controlar a proliferação deste mosquito que representa um risco para surtos de arboviroses são necessárias. O *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) é um agente larvicida seletivo para espécies de *Culex* e *Anopheles* devido à especificidade do modo de ação de seu principal fator inseticida, a toxina binária (Bin). Entretanto, a utilização destes biolarvicidas em larga escala, demonstrou que populações de *Culex* podem apresentar resistência a este agente. Uma nova composição de toxina binária produzida pelo Lsp, denominada Cry48Aa/Cry49Aa, foi identificada e apresenta um potencial promissor, pois possui ação para larvas de *C. quinquefasciatus* e é ativa para larvas resistentes aos biolarvicidas a base da toxina Bin, que vêm sendo utilizados no controle destes mosquitos. A toxina Cry48Aa/Cry49Aa têm sido muito pouco estudada e a identificação dos seus receptores é essencial para o entendimento do seu modo de ação. A produção e utilização de agentes de controle contendo mais de um fator inseticida, com diferentes modos de ação, associado ao manejo integrado é, a abordagem mais recomendada para contornar a seleção de resistência.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Quais são as moléculas do epitélio intestinal de larvas de *Culex quinquefasciatus* que atuam como ligantes ou estão envolvidas no modo de ação das toxinas Cry48Aa/Cry49Aa e Bin do *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp)?

5 HIPÓTESE

As toxinas Cry48Aa/Cry49Aa e Bin do *Lysinibacillus sphaericus* tem ação inseticida específica através de receptores que são necessários para desencadear sua ação tóxica no epitélio intestinal de larvas de *Culex quinquefasciatus*, e através de moléculas ainda não caracterizadas que podem estar envolvidas no modo de ação destas toxinas.

6 OBJETIVOS

6.1 Geral

Identificar os ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa do *Lysinibacillus sphaericus* e outras moléculas do epitélio intestinal de larvas de *Culex quinquefasciatus*, que podem estar envolvidas no modo de ação deste agente de controle.

6.2 Específicos

- a. Avaliar a suscetibilidade de larvas de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia suscetível e outra selecionada com Lsp cepa IAB59, além de larvas de uma colônia de *Aedes aegypti*, à toxina Cry48Aa/Cry49Aa;
- b. Identificar proteínas que atuam como ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa no epitélio intestinal das larvas;
- c. Estabelecer o perfil proteômico de larvas de *C. quinquefasciatus* de uma colônia suscetível e outra selecionada com as toxinas de Lsp cepa IAB59;
- d. Caracterizar o perfil transcriptômico de larvas de *C. quinquefasciatus* de uma colônia suscetível e outra selecionada com as toxinas de Lsp cepa IAB59;
- e. Avaliar a funcionalidade das moléculas identificadas como potenciais receptores/ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Colônias de mosquitos

Foram utilizadas larvas de 4^o estágio de três colônias do insetário do Departamento de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ (IAM/FIOCRUZ), e de uma colônia do insetário da Universidade da Geórgia/EUA (UGA) mantidas a $26 \pm 1^{\circ}$ C, umidade relativa entre 65-85% e fotoperíodo 12h:12h (dia:noite). As larvas foram mantidas em recipientes contendo água desclorada e alimentadas com ração para gatos (Whiskas[®]) ou peixes (TetraMin[®]). Os adultos foram mantidos em uma solução de açúcar a 10%, e as fêmeas também foram alimentadas artificialmente com sangue de coelho, segundo descrito previamente (AMORIM et al., 2007). Informações sobre as colônias estão descritas abaixo:

- a. CqSLAB (S): colônia de referência de *C. quinquefasciatus* cujas larvas são suscetíveis às toxinas produzidas pelo Lsp. Esta colônia é mantida no IAM/FIOCRUZ desde 2010 e foi utilizada nos bioensaios, ensaios de ligação, análises de proteômica e transcriptômica.
- b. RIAB59 (R): colônia de *C. quinquefasciatus* selecionada com o Lsp cepa IAB59 que produz as toxinas Bin e Cry48Aa/Cry49Aa. As larvas apresentam uma resistência alta a toxina Bin e moderada às toxinas Cry48Aa/Cry49Aa (AMORIM et al., 2007; PEI et al., 2002). Esta colônia é mantida no IAM/FIOCRUZ desde 2002 e foi utilizada nos bioensaios, ensaios de ligação, análises de proteômica e transcriptômica.
- c. CqS (S_UGA): colônia de *C. quinquefasciatus* cujas larvas são suscetíveis às toxinas produzidas pelo Lsp. Esta colônia é mantida na UGA/EUA desde 2011 e foi utilizada nos ensaios de RNAi.
- d. RecLAB (Ae): colônia de *Aedes aegypti* cujas larvas são consideradas naturalmente refratárias à toxina Bin (FERREIRA et al., 2010) e possivelmente às toxinas Cry48Aa/Cry49Aa (JONES et al., 2008). Esta colônia é mantida no IAM/FIOCRUZ desde 1996 e foi utilizada nos bioensaios e como controle negativo nos ensaios de ligação.

7.2 Amostras de proteínas de microvilli intestinal

Amostras ricas em frações de microvilli intestinal (BBMF, *Brush Border Membrane Fraction*) foram preparadas utilizando-se larvas inteiras de 4^o estágio congeladas a -80° C (3-

5 g), utilizando o método de precipitação de magnésio e centrifugação diferencial, segundo Silva-Filha; Nielsen-Leroux; Charles, (1997). O conteúdo protéico das amostras foi mensurado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se uma curva padrão de albumina do soro bovino (BSA). A qualidade das amostras de BBMF foi avaliada através da determinação da atividade α -glicosidase (EC 3.2.1.20) segundo Ferreira et al. (2010). A atividade destas enzimas serve como um marcador enzimático de enriquecimento em microvilosidades intestinais, pois a atividade específica da amostra do extrato total de larvas foi comparada com a atividade em uma amostra rica em microvilosidades obtida ao final da preparação. As amostras foram armazenadas a -80°C até a sua utilização.

As amostras de BBMF também foram utilizadas após o tratamento com o detergente não iônico 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) que possui a capacidade de solubilizar proteínas ligadas ao epitélio das larvas, sem desnaturar as moléculas. Para tal as amostras de BBMF ($\cong 1$ mg) foram centrifugadas (100.000 g, 4°C , 10 min) e o sedimento foi incubado com o tampão TBSEA (Tris 19 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5) contendo CHAPS a 1%, sob agitação lenta, por 1.5 h a 4°C . Após a incubação, as preparações foram centrifugadas (100.000 g, 4°C , 14 min). Em seguida foram coletados o sedimento final da BBMF, que foi ressuspenso no volume inicial da amostra, e o respectivo sobrenadante que deve conter proteínas solubilizadas pelo CHAPS (extrato-CHAPS). Amostras de BBMF inicial e das frações após o tratamento (sedimento e sobrenadante) foram submetidas à determinação da dosagem de proteínas pelo método de Bradford e da atividade α -glicosidase, conforme descrito anteriormente, para avaliar o rendimento da solubilização das proteínas inicialmente contidas na BBMF. As amostras foram armazenadas a -80°C até a sua utilização.

7.3 Produção e processamento de toxinas recombinantes

Neste estudo foram produzidas seis toxinas do Lsp sob a forma recombinante que foram processadas *in vitro*, conforme descrito a seguir. As subunidades recombinantes Cry48Aa e Cry49Aa foram produzidas a partir de linhagens de *B. thuringiensis* svar. *israelensis* (Bti) 4Q7 acristalíferos, transformados individualmente com os plasmídeos pSTAB135 e pHTP49 que contêm os respectivos genes que codificam as toxinas. As linhagens foram cordialmente cedidas pelo Dr. Colin Berry (Universidade de Cardiff, Reino Unido) (JONES et al., 2007). As cepas foram cultivadas em meio para *Bacillus thuringiensis* (LECADET; BLONDEL; RIBIER, 1980) suplementado com glicose (1%) e eritromicina (25

$\mu\text{g/mL}$). As culturas foram mantidas (200 rpm, 30 °C, 72 h) até a esporulação ($\geq 80\%$), e concomitante expressão dos cristais que contém as protoxinas, que foram observados através de microscópio óptico. As biomassas contendo esporos e cristais obtidas ao final da esporulação, foram recuperadas por centrifugação, lavadas sequencialmente (NaCl 1 M/EDTA 10 mM e EDTA 10 mM) e armazenadas a -80 °C até a sua utilização (BELTRÃO; SILVA-FILHA, 2006).

A toxina Cry49Aa também foi expressa em *Escherichia coli*, a partir da construção plasmidial *cry49/pET21a*, que codifica a proteína Cry49Aa fusionada a uma cauda de poli-histidina (Cry49Aa-His), e da construção plasmidial *cry49/pGEX4T3* que codifica a proteína Cry49Aa fusionada com a glutathione S-transferase (Cry49Aa-GST). Essas construções foram transformadas em linhagens de *E. coli* cepa T7 express cells (New England Biolabs) e BL21 StarTM (DE3) (ThermoFischer Scientific), respectivamente. Para este propósito o gene *cry49* foi amplificado a partir do plasmídeo pHTP49 citado anteriormente usando os primers específicos contendo os sítios de restrição BamHI (negrito) e NotI (sublinhado) (Fwd 5' **CGAGGATCC**ATGGAAAATCAAATAAAAGAAGAATTTAAC-3', Rev 5'-CGAGCGGCCGCATTATAATATGGCTTTGAATTTTCATG-3') para Cry49Aa-His e (Fwd 5'-CGAGGATCCATGGAAAATCAAATAAAAGAAGAATTTAAC-3', Rev 5'-CGAGCGGCCGCCTTAATTATAATATGGCTTTGAATTTTCATG-3') para Cry49Aa-GST. Em seguida os genes foram subclonados nos vetores de expressão pET21a (Novagen®) e pGEX4T3 (Amersham), respectivamente. Após a transformação, as células foram incubadas em meio de cultura Luria-Bertani (LB) suplementado com ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) (200 rpm, 37°C) até atingir a densidade óptica (OD) de 0.5, e a expressão das proteínas foi induzida pela adição de isopropiltiogalactosídeo (IPTG) (0.1 mM, 30°C, 4h). Após indução as culturas foram centrifugadas (21.500 g, 4°C, 10 min), o sedimento contendo as células foi ressuspensão em tampão PBS pH 7.4, e as células foram lisadas em um sonicador (Vibra Cell Sonics) com amplitude de 20% através de 6 pulsos de 30s, com intervalos de 1 min entre os pulsos. Após a lise, a amostra foi tratada com Triton X-100 (final 1% vol/vol) e centrifugada (1.700 g, 30 min, 4°C). O sobrenadante obtido foi utilizado na purificação das proteínas por cromatografia de afinidade, utilizando a resina de agarose Ni-NTA (Qiagen) como suporte sólido para amostras com cauda de histidina e resina de Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) para amostras fusionadas a GST, de acordo com as instruções do fabricante. As proteínas recombinantes ligadas às resinas foram eluídas com imidazol (1 M) ou com glutathione reduzida, para as proteínas com cauda de histidina e GST respectivamente, em tampão de lavagem (tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol 10%, pH 6, 4°C, 1 h) e em

seguida dialisadas (fosfato de sódio dibásico 50 mM, fosfato de sódio monobásico 5 mM, NaCl 50 mM, Triton x-100 0.1%, glicerol 5%, pH 7.8) a 4 °C por 16 h.

Para a toxina Bin sua produção foi obtida a partir da linhagem de Bti 4Q7 acristalífera, transformada com os plasmídeos pGSP10 que contêm os respectivos genes que codificam as toxinas (BOURGOUIN et al., 1990), conforme descrito anteriormente para as subunidades Cry48Aa e Cry49Aa produzidas em Bt. A subunidade BinB recombinante também foi expressa em *E. coli*. Esta subunidade foi produzida fusionada com a glutathione S-transferase (GST), denominada BinB-GST, segundo Romão et al. (2006) e cordialmente cedidas para este estudo.

Para o processamento *in vitro* das amostras seguiu-se o procedimento descrito por Jones et al. (2008) com modificações. As amostras foram solubilizadas (NaOH 50 mM, 30 °C, 1 h, sob agitação à 150 rpm,) e o material insolúvel foi removido por centrifugação (21.000 g, 4 °C, 30 min). Em seguida o pH alcalino (pH 12-13) do sobrenadante contendo as protoxinas liberadas dos cristais foi ajustado para 8.5 com HCl (0.1 M) e as amostras foram tratadas com tripsina (1:100, 30 °C, 30 min). Após a incubação as amostras foram centrifugadas (21.000 g, 4 °C, 30 min). As toxinas ativadas foram dialisadas (tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 8.0, 4 °C, 16 h). As biomassas contendo os cristais de cada subunidade (Cry48Aa e Cry49Aa produzidas em Bti) foram processadas individualmente, ou em sua forma combinada, aqui denominada de mix. Para tal, as biomassas foram combinadas na proporção de 1:1 p/p (Cry49Aa/Cry48Aa) seguido do processamento descrito acima. Para a Cry49Aa-His produzida a partir de *E. coli* a mesma foi combinada com Cry48Aa produzida em Bti na proporção de 1:2 (mg proteína: mg proteína) que foi denominado de mistura e esta foi submetida ao processamento conforme descrito anteriormente. A biomassa contendo os cristais da toxina Bin foi processada conforme descrito acima. A concentração das proteínas produzidas em todos os sistemas foi mensurada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se uma curva padrão de albumina do soro bovino (BSA). A integridade e estabilidade das proteínas foi avaliada por SDS-PAGE 10% e as mesmas foram armazenadas a -80°C até sua utilização. O mix Cry48Aa/Cry49Aa foi utilizado nos bioensaios e ensaios de ligação *in vitro* descritos nas seções abaixo enquanto a mistura Cry48Aa/Cry49Aa-His foi utilizada apenas nos ensaios de ligação *in vitro*. As toxinas Cry49Aa-GST e BinB-GST foram utilizadas nos ensaios de ligação *in vitro*. A toxina Bin foi utilizada nos ensaios de toxicidade *in vivo* para comprovar o silenciamento gênico ambos descritos nas seções abaixo.

7.4 Anticorpos anti-toxinas

O anticorpo policlonal anti-Cry49Aa, produzido em coelho, já disponível no laboratório, foi avaliado quanto a sua capacidade de reconhecimento das toxinas Cry49Aa recombinantes por *western-blot*. Para o anticorpo anti-Cry48Aa, proteínas recombinantes Cry48Aa produzidas em *B. thuringiensis* foram produzidas e enviadas para o serviço de produção de anticorpos policlonais Célula B do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O soro policlonal de coelhos imunizados foi avaliado quanto a sua capacidade de reconhecimento da proteína Cry48Aa recombinante através de *western-blot*. Estes anticorpos foram imunoabsorvidos segundo MINSHAL; STANDARD, (2004) para melhorar sua especificidade. O anticorpo monoclonal comercial anti-poly-histidina (Sigma-Aldrich, H1029) foi utilizado para detectar a ligação da mistura Cry48Aa/Cry49Aa-His através da toxina Cry49-His. O anticorpo policlonal anti-Cqm1, produzido em coelho, já estava disponível no laboratório e foi utilizado para detectar a ligação das toxinas Bin e Cry48Aa/Cry49Aa-GST com o receptor Cqm1 em *C. quinquefasciatus*. Todos os anticorpos foram utilizados 1:100.

7.5 Ensaios de toxicidade *in vivo*

A susceptibilidade *in vivo* de larvas de *Culex quinquefasciatus* das colônias S, e R e de larvas de *Aedes aegypti* da colônia Ae para a toxina Cry48Aa/Cry49Aa foi avaliada através de bioensaios modificados a partir do protocolo padrão recomendado pela Organização Mundial De Saúde, (1985). Estes ensaios foram conduzidos no insetário do Departamento de Entomologia do IAM/FIOCRUZ ou da Universidade da Georgia (EUA). As biomassas das culturas de Bti recombinantes contendo esporos/cristais das toxinas Cry48Aa e Cry49Aa produzidas conforme descrito no item 7.3, foram misturadas na proporção de 1:1 (p/p) e usadas para preparar uma suspensão estoque (5 g/L) a ser posteriormente diluída para as concentrações (mg/L) utilizadas nos ensaios. Para cada tratamento, grupos de 20 larvas de 4º estágio jovens (coletadas em até 1 h após a muda) foram colocados em recipientes contendo 50 mL de água mineral, e tratados com uma alíquota da suspensão bacteriana necessária para atingir a concentração desejada. Nestes bioensaios foram usadas concentrações diagnósticas para comparar a mortalidade detectada nas colônias testadas, e um grupo controle não tratado, sendo cada grupo em triplicata. A mortalidade das larvas dos grupos foi registrada após 48h e apenas os resultados com mortalidade inferior a 10% no grupo controle foram utilizados nas análises. Cada bioensaio foi repetido pelo menos três vezes.

Bioensaios para avaliar o efeito do procedimento de RNAi na mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* (colônia S_UGA), tratadas e não tratadas com os dsRNAs conforme descrito no item 7.11, também foram realizados. Devido ao número limitado de larvas disponíveis para esta avaliação o procedimento foi realizado com modificações. Estes ensaios foram conduzidos no insetário do Departamento de Entomologia da Universidade da Geórgia (EUA). Para cada tratamento, grupos de 10 larvas de 3º estágio foram colocados em recipientes contendo 5 mL de água mineral, e tratados com uma alíquota da suspensão bacteriana estoque necessária para atingir a concentração letal para 50% das larvas expostas nos ensaios. As biomassas das culturas de Bti recombinantes, contendo esporos/cristais das toxinas Cry48Aa/Cry49Aa ou Bin produzidas conforme descrito no item 7.3, foram usadas neste procedimento. Em cada ensaio foram utilizados grupos de larvas em triplicatas e o grupo controle não tratado. A mortalidade das larvas foi registrada após 48 h.

7.6 Ensaios de ligação entre a toxina Cry48Aa/Cry49Aa e proteínas de BBMF

7.6.1 Ensaios de overlay assay

Os ensaios de ligação para identificar as proteínas das frações de microvilli intestinal (BBMF) das larvas de *C. quinquefasciatus* com capacidade de ligação à toxina Cry48Aa/Cry49Aa foram realizados de acordo com Krishnamoorthy et al. (2007), com modificações. Nestes ensaios as proteínas de BBMF (30-100 µg), tratadas ou não pelo detergente CHAPS, foram submetidas à separação eletroforética por SDS-PAGE em géis uni ou bidimensionais e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (ECL[®] ou Protan[®], GE Healthcare) para posterior imunodeteção. Neste procedimento a membrana foi bloqueada com leite desnatado (Molico[®]) a 5% em tampão TBS-T (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%) por 1h à TA e submetidas à incubação com as toxinas (4 °C, 16 h). Estas incubações foram realizadas com 100 µg do mix ativado de toxinas recombinantes Cry48Aa/Cry49Aa, produzidas em Bti ou da mistura ativada de toxinas recombinantes Cry48Aa/Cry49Aa-His, produzidas em *E. coli* conforme descritos no item 7.3, em tampão TBS (sem Tween). Após incubação com as toxinas a membrana foi lavada quatro vezes (TBS-T, 15 min) e as toxinas potencialmente ligadas às proteínas de BBMF foram imunodetectadas utilizando anticorpos primários anti-Cry49Aa (1:100) ou anti-histidina (1:5000) (incubação por 1h à TA). Em seguida as membranas foram lavadas uma vez por 15 min e duas vezes por 5 min em TBS-T e incubadas com um anticorpo secundário anti IgG de

coelho ou camundongo conjugados à peroxidase (1:10.000) (TA, 1 h). A membrana foi lavada uma vez por 15 min e quatro vezes por 5 min em TBS-T e a imunodeteção foi visualizada através do sistema de quimioluminescência (Luminata Forte®, Millipore). Membranas contendo as proteínas de BBMF sem incubação com as toxinas, foram usadas nos ensaios como controle negativo. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

7.6.2 Ensaio de pull-down

Ensaio de *pull-down* para identificar as proteínas das frações de microvilli intestinal (BBMF) das larvas de *C. quinquefasciatus* com capacidade de ligação à toxina Cry48Aa/Cry49Aa também foram realizados. Ensaio utilizando BBMF de *Ae. aegypti* também foram realizados como controle. Nestes ensaios o mix de toxinas ativado Cry48Aa/Cry49Aa produzidas em Bti conforme descrito no item 7.3 foi imobilizado nas esferas ativadas de CNBr sepharose 4B® (GE Healthcare) e incubadas com proteínas de BBMF solubilizadas (extrato-CHAPS) de acordo com Zhou et al. (2016) com modificações. Resumidamente, o mix de toxinas ativadas Cry48Aa/Cry49Aa (1 mg) foi imobilizado nas esferas (500 µL, 4°C, 16h). Após lavagens com tampão bicarbonato (NaHCO₃ 0.2 M pH 8.3) as esferas ativas remanescentes foram bloqueadas (glicina 0.1 M pH 8, TA, 6h), ressuspensas (volume final de 500 µL de PBS, pH 7.4) e armazenadas a 4°C. Os ensaios de ligação foram realizados entre as esferas Cry48Aa/Cry49Aa (50 µL) e os extrato-CHAPS (50 µg) contendo proteínas de BBMF de *C. quinquefasciatus* ou *Ae. aegypti* solubilizadas (4° C, 2 h). Após a incubação as proteínas não ligadas foram removidas por centrifugação (400 g, 30 s, 4° C) e lavagens (cinco lavagens com 500 µL de PBS pH 7.4/ NaCl 1 M, seguida de cinco lavagens com PBS pH 7.4). As esferas Cry48Aa/Cry49Aa contendo proteínas do extrato-CHAPS que potencialmente se ligaram às toxinas foram solubilizadas em tampão de Laemmli, fervidas por 10 min e avaliadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Amostras de esferas CNBr acopladas com Tris-HCl 0.1 M pH 8.5 foram utilizadas como controle negativo das reações. Os géis foram corados com azul de Coomassie ou prata (PlusOne Silver Staining kit®, GE Healthcare). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata. Após comparação dos géis as amostras de proteínas de um gel corado com prata foram seccionadas em oito partes de acordo com o intervalo de peso molecular e submetidas à identificação por espectrometria de massas pelo serviço de proteômica e espectrometria de massas (PAMS) da Universidade da Geórgia, EUA, onde foram tripsinizadas e analisadas por um espectrometro de massa Orbitrap Elite acoplado com um sistema de nanoLC Proxeon

(Thermo Scientific) para aquisição dos dados de MS. As amostras foram analisadas utilizando os proteomas de referência do NCBI para *C. quinquefasciatus* (acesso em outubro de 2016 contendo 18.883 proteínas) e *Ae. aegypti* (acesso em maio de 2017 contendo 22.858 proteínas) para se realizar a identificação e caracterização das proteínas usando o programa Thermo Proteome Discoverer (versão 1.4) com o programa Mascot (Matrix Science, London, UK).

7.7 Ensaios de ligação entre as toxinas Bin ou Cry48Aa/Cry49Aa e a proteína Cqm1

Ensaios de *pull-down* para avaliar comparativamente a capacidade de interação do receptor Cqm1 de larvas de *C. quinquefasciatus* com as proteínas recombinantes Cry48Aa/Cry49Aa-GST e BinB-GST foram realizados de acordo com Romão et al. (2006). Resumidamente, a toxina Cry49Aa-GST e a BinB-GST produzidas em *E. coli* conforme descrito no item 7.3 foram imobilizadas na esfera de glutathione sepharose (GS) 4B® (GE Healthcare) de acordo com protocolo estabelecido por Romão et al. (2006). Em seguida, as esferas Cry49Aa-GST foram pré-incubadas por 1 h TA com a toxina ativada Cry48Aa produzida em Bti. Após incubação as proteínas não ligadas foram removidas por centrifugação (1500 g, 2 min, 4 °C) e três lavagens em tampão BB3 (KCl, 100 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 50 mM, Nonidet P-40® 0.2%, glycerol 5%). Meios de culturas Sf9 enriquecidos com a proteína recombinante Cqm1, disponíveis no laboratório, foram obtidos conforme descrito por FERREIRA et al., (2014). O conteúdo protéico de Cqm1 nestes meios foi estimado baseado em uma curva padrão de proteínas Cqm1 purificadas e imunodetectadas com o anticorpo policlonal anti-Cqm1 conforme descrito em Romão et al. (2006). Os ensaios de ligação foram realizados incubando as esferas Cry48Aa/Cry49Aa-GST ou BinB-GST (10 µg) com amostras de meio contendo a proteína Cqm1 (0.015 - 1.5 µg) por 2 h a TA em tampão BB3. Amostras de proteína GST acopladas com esferas GS foram utilizadas como controle negativo das reações. Após incubações as esferas foram lavadas com tampão BB3 e as proteínas que se mantiveram ligadas à Cqm1 foram imunodetectadas através do anticorpo primário anti-Cqm1 (1:100) e anticorpo secundário antiIgG de coelho (1:10.000), de acordo com os procedimentos de imunodeteccção já descritos no item 7.6.1. Amostras contendo apenas a proteína Cqm1, foram usadas nos ensaios como controle positivo. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

7.8 Análise proteômica por eletroforese bidimensional

Neste estudo foi realizada uma análise comparativa do perfil eletroforético bidimensional (2D) de proteínas do intestino de larvas de *C. quinquefasciatus* das colônias S e R, baseada na metodologia de Bayyareddy et al. (2009) com modificações. Amostras de proteínas de BBMF (200 µg) foram tratadas com o Kit 2D Clean-Up (GE Biosciences), segundo as recomendações do fabricante. Em seguida a amostra foi ressuspensa em tampão de reidratação (ureia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2%, Ditiotretitol 40 mM, azul de bromofenol 0,002%, IPG buffer Plus-one GE Healthcare pH 3–10 0,5%), aplicada em uma tira de 13 cm de gradiente de pH imobilizado IPG, pH 3-10 não linear (GE Healthcare) e coberta com óleo mineral *cover fluid* (GE Healthcare). Após a hidratação das tiras (15-18 h), a focalização isoeletrica foi realizada utilizando o equipamento Ettan IPGphor 3[®] (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. As tiras foram equilibradas, por 20 min em tampão de equilíbrio (ureia 6 M, Tris-HCl pH 8,8, 75 mM, glicerol 29,3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%) adicionado de ditiotretitol 1% e em seguida foram novamente equilibradas por 20 min no tampão de equilíbrio contendo iodoacetamida 2,5%. Em seguida as tiras foram transferidas para o gel de acrilamida e submetidas à separação eletroforética (SDS-PAGE 12%) utilizando o sistema Protean[®] II xi (BIORAD). A eletroforese foi realizada à 20°C seguindo as três fases do programa: 15 mA for 15 min, 40 mA for 30 min, e 50 mA até o final do procedimento.

Para os experimentos de perfil proteômico para cada colônia os géis foram feitos em triplicata e corados com azul de Coomassie G250. As imagens foram obtidas com o ImageScanner[™] III e analisadas com o Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare), seguida por uma etapa de edição manual com correção, adição e remoção de *spots*. Os *spots* diferencialmente expressos bem como os exclusivos de cada colônia foram manualmente excisados do gel, e armazenados a 4°C até serem submetidos à identificação por espectrometria de massa na Plataforma de Espectrometria de Massa da Fiocruz – RJ (RPT02A). As amostras foram tripsinizadas, dessalinizadas e analisadas utilizando o banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=proteome:UP000002320>) para a uma busca com o programa Mascot *daemon*. As análises foram realizadas em colaboração com a Dra. Monique Trugilho da Plataforma de Espectrometria de Massa da FIOCRUZ–RJ.

Os géis 2D com o perfil proteômico de cada colônia também foram utilizados para realizar os ensaios de ligação com a toxina Cry48Aa/Cry49Aa e a imunodeteção específica conforme protocolo descrito no item 7.6.1.

7.9 Análise transcriptômica por RNAseq

7.9.1 Extração de RNA, biblioteca e sequenciamento de mRNA

O perfil transcriptômico do intestino de larvas de *C. quinquefasciatus* das colônias S e R foi obtido pela abordagem de RNAseq. Para cada colônia analisada amostras de 20 intestinos de larvas de 4º estágio em triplicata, não expostas ao Lsp foram dissecados. A colônia R tem sido submetida à pressão de seleção com Lsp cepa IAB59 a cada 5 gerações. As larvas da geração F194 foram usadas neste trabalho e a última exposição desta colônia ocorreu na geração F189. O RNA total de cada amostra foi extraído usando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. A pureza e concentração do RNA foi verificada utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000™ (Thermo Fischer Scientific) e o fluorômetro Qubit 2.0 (Thermo Fischer Scientific). A integridade das amostras de RNA obtido foi avaliada através da eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Bibliotecas do tipo *Paired-end* foram preparadas a partir do RNA total das larvas usando o kit TruSeq Stranded mRNA Library Prep® (Illumina) seguindo o procedimento do fabricante. Essas bibliotecas geradas foram sequenciadas utilizando-se o kit MiSeq™ Reagent V3 (150 ciclos) no equipamento MiSeq Sequencer (Illumina) disponível no Núcleo de Plataforma Tecnológicas/FIOCRUZ (NPT, IAM-FIOCRUZ).

7.9.2 Análise dos dados

A análise dos dados de RNAseq foi realizada em colaboração com o Dr. Antônio Rezende coordenador da Plataforma de Sequenciamento de Ácidos Nucléicos de Nova Geração (RPT01I) do IAM/FIOCRUZ. O primeiro passo da análise computacional consistiu em avaliar a qualidade das leituras das seqüências obtidas aplicando-se a ferramenta FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Baseado nestes resultados os parâmetros da ferramenta Trimmomatic versão 0.36 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) foram definidos com o objetivo de filtrar as bases de baixa qualidade e os adaptadores utilizados no sequenciamento. Em seguida, as leituras filtradas para cada amostra foram mapeadas utilizando-se a ferramenta STAR aligner versão 2.5.3 (DOBIN et al., 2013) contra o genoma de *C. quinquefasciatus* (Johannesburg strain CpipJ2) disponível do banco de dados VectorBase (<https://www.vectorbase.org/>). O programa STAR foi executado com os parâmetros padrão com exceção do quantMode o qual gera um arquivo de contagem de

leituras por gene. Esta etapa foi feita considerando que as bibliotecas construídas no sequenciamento possuíam a fita codificante identificada. O pacote R DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) foi utilizado para realizar a análise da expressão diferencial dos genes. Durante esta etapa, as replicatas biológicas das colônias foram comparadas e foram considerados na análise apenas aqueles genes que tivessem pelo menos cinco leituras para todas as replicatas, em uma das duas condições analisadas (S ou R). Os genes com valor absoluto de $\log_2\text{FoldChange}$, que é a proporção da expressão de um gene entre duas situações diferentes utilizando o logaritmo de base 2 para fornecer uma simetria entre os dados, igual ou maior que um e com p-valor corrigido abaixo de 0.05 (Teste Wald), foram selecionados para a análise funcional de enriquecimento usando o STRINGdb (FRANCESCHINI et al., 2013) e o Pathview. Estes são pacotes de análise implementados no ambiente de programação R (LUO; BROUWER, 2013). O STRINGdb foi usado para atribuir a ontologia do gene (GO) (<http://www.geneontology.org/>), e os termos das vias da base de dados Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>). O Pathview, foi utilizado para mapear os DEGs e suas medidas de expressão diferencial para as vias KEGG enriquecidas.

7.10 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

A análise para validação da expressão de genes observados no RNAseq foi realizada através de ensaios de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) do gene *cqm1*. Foram utilizados iniciadores específicos para o gene alvo e para o gene 18S, usado como controle endógeno, para amplificar fragmentos de 131 e 159 pb, respectivamente (Quadro 2). As reações foram realizadas em triplicata em placas de 96 poços a partir de amostras de RNA extraídas de *pools* contendo 10 larvas de 4º estágio de cada amostra da geração F212, conforme descrito no item 7.9.1. A reação de qRT-PCR foi realizada utilizando-se o kit QuantiTect® SYBR Green RT-PCR® one step (QIAGEN), segundo instruções do fabricante. Após a quantificação do RNA, as reações foram feitas usando o SYBRGreen Mix, enzima transcriptase reversa, RNA molde (100 ng), iniciadores *forward* e *reverse* (0,2 µM/iniciador) para os genes alvo e controle. As reações foram realizadas, no equipamento QuantStudio® 5 System (Thermo Fischer Scientific). A quantificação relativa foi feita através do método de $\Delta\Delta\text{Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) utilizando-se o programa Applied Biosystems™ Analysis software, Relative Quantification Analysis Module V. 3.3.

Para os ensaios de avaliação quantitativa do padrão de transcrição dos genes tratados com dsRNA para comprovação do silenciamento gênico descrito no item 7.11 foi realizada uma análise de qRT-PCR com modificações. Para estes ensaios foram desenhados iniciadores específicos para os genes selecionados após a análise do RNAseq. Como controle endógeno foi utilizado o gene 18S com os iniciadores específicos descritos (Quadro 2). As reações foram realizadas em triplicata em placas de 96 poços a partir de amostras de RNA extraídas individualmente de larvas de 3º estágio de cada amostra. A extração de RNA e preparação de cDNA foi realizada conforme descrito no item 7.11.1 e a reação de qRT-PCR foi realizada utilizando-se o Kit iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), segundo instruções do fabricante. Após a quantificação do RNA, as reações foram feitas usando o iQ™ SYBR® Green Mix, RNA molde (100 ng), iniciadores *forward* e *reverse* (0,25 µM/primer) para os genes alvo e controle. As reações foram realizadas, no equipamento CFX Connect™ Real Time PCR detection System (Bio-Rad). A quantificação relativa foi feita através do método de $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Quadro 2 - Sequência de iniciadores utilizados para as reações de qRT-PCR e para produção de dsRNA.

Gene alvo	Iniciadores (5'- 3')	Amplicom (pb)
CPIJ013173 (Cqm1)	dsRNA-Cqm1-F: CGCGAACCGGACTCGAAGGA dsRNA-Cqm1-R: GTCGCCGGAGGTCTCCACAC	404
	T7-Cqm1-dsRNA-F: TAATACGACTCACTATAGGGCGCGAACCGGACTCGAAGGA T7-Cqm1-dsRNA-R: TAATACGACTCACTATAGGGGTCGCCGGAGGTCTCCACAC	424
	¹ rt-PCR-Cqm1-F: CGTTCCTGACGGTGCTGAACATGG ¹ rt-PCR-Cqm1-R: GACCTCATTGCCCGCCTTCGACTTGG	131
CPIJ017593	dsRNA-PTT-F: TCCGGGGACGTACGTTGCGC dsRNA-PTT-R: ACATGCTCAGCCGAAACGGTAG	417
	T7-PTT-dsRNA-F: TAATACGACTCACTATAGGG TCCGGGGACGTACGTTGCGC T7-PTT-dsRNA-R: TAATACGACTCACTATAGGG ACATGCTCAGCCGAAACGGTAG	437
	rt-PCR-PTT-F: TCTTTGCCTGCACCGGGACCA rt-PCR-PTT-R: CGAATGGTTTGCCATCCTTCGT	294
CPIJ017592	CPIJ017592-F: CACATGGATCCCCAATAATTGCT CPIJ017592-R: CTCAAATTTTCATCCATTGTCACT	1205
	dsRNA-vanin-F: AACCGATACACCAGCGGTGTAC dsRNA-vanin-R: GCTCGACTGGAGAAGAGCGTG	426
	T7-vanin-dsRNA-F: TAATACGACTCACTATAGGGAACCGATACACCAGCGGTGTAC T7-vanin-dsRNA-R: TAATACGACTCACTATAGGGGCTCGACTGGAGAAGAGCGTG	446
	rt-PCR-vanin-F1: TGTTCAACTCGATTGAGCTTAAGG rt-PCR-vanin-R1: ACGATCAATTTGCCATCTGTTGTG	168
CPIJ001265	dsRNA-ALP62-F: CCGAGGAGGGTCATGAACGAG dsRNA-ALP62-R: CCTTGTGGCACTCTGCGCGTA	554
	T7-ALP62-dsRNA-F: TAATACGACTCACTATAGGGCCGAGGAGGGTCATGAACGAG T7-ALP62-dsRNA-R: TAATACGACTCACTATAGGGCCTTGTGGCACTCTGCGCGTA	574
	rt-PCR-ALP62-F1: GAGGACTGATAGATCTGGCTCAT rt-PCR-ALP62-R1: GTTGCCACGAGTCGGATACCCGTT	210
eGFP	² T7-eGFP-dsRNA-F: TAATACGACTCACTATAGGGCACGACGTTGTAAAACGAC ² T7-eGFP-dsRNA-R: TAATACGACTCACTATAGGGCACGACGTTGTAAAACGAC	≈250
CPIJ008169 (18S)	³ 18SrRNAF: CGCGGTAATTCCAGCTCCACTA ³ 18SrRNAR: GCATCAAGCGCCACCATATAGG	159

Fonte: Autora

Legenda: ¹Chalegre et al. (2015) ²Vogel, Brown e Strand, (2015) ³Liu et al. (2011). pb. pares de base. F. *primer forward*. R. *primer reverse*

7.11 Silenciamento gênico por RNA de interferência

7.11.1 Produção de dsRNA

A validação funcional de alguns genes de interesse revelados nas análises anteriores foi realizada através da técnica de silenciamento gênico por RNA de interferência. Para o estabelecimento da técnica em nosso modelo o gene *cqm1* foi escolhido como controle positivo para as análises em desenvolvimento que codifica a proteína Cqm1, cuja função como receptor já foi caracterizada. Esta técnica visa depletar o RNA mensageiro (mRNA) de interesse através da introdução de RNAs de fita dupla (dsRNA) que, baseado na complementariedade da sequência desses dsRNAs com uma sequência de nucleotídeos localizada no mRNA do gene alvo, ocasionará o silenciamento, por inibição da tradução e/ou degradação do mRNA (SEN; BLAU, 2006). Com exceção do gene *cqm1*, cujo plasmídeo já tinha sido produzido anteriormente (ROMÃO et al., 2006), os demais plasmídeos contendo os demais genes alvo selecionados foram produzidos durante este trabalho. Para este propósito a extração do RNA total das larvas foi realizada com o reagente Trizol segundo instruções do fabricante e este RNA foi utilizado para sintetizar cDNA usando o SuperScript® III First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen). Em seguida os genes que codificam as proteínas candidatas foram amplificados com iniciadores específicos (Quadro 2) e clonados no plasmídeo pGEM®-T Easy. Linhagens de *E. coli*, Top10 ou DH5 α , foram transformadas individualmente com os constructos para obtenção de um número suficiente de cópias dos genes de interesse. Esses plasmídeos foram extraídos através de reações de minipreparação plasmidial com o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante e usados como moldes para a produção dos dsRNAs, utilizando-se os iniciadores-dsRNA descritos no quadro 2. Outro método utilizado para a produção de dsRNA de um destes genes foi a amplificação do gene a partir do cDNA de larvas de *C. quinquefasciatus* e, em seguida, este amplicom foi utilizado em uma segunda reação de PCR com os iniciadores-dsRNA (Quadro 2). O produto de todas as reações realizadas com os iniciadores-dsRNA foi utilizado como molde para inserção da região T7 promotora nas amostras utilizando-se os iniciadores-T7 (Quadro 2). O produto desta reação foi utilizado para produção dos dsRNA utilizando-se o MEGAscript®RNAi kit (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza e concentração do dsRNA obtido foi verificada utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000™ (Thermo Fischer Scientific) e a integridade foi avaliada através da eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Como controle

negativo, amostras de dsRNA correspondendo a sequência da proteína *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP), foi utilizada. O produto amplificado deste gene foi cordialmente cedido pelo Dr. Gang Hua (University of Georgia, Athens, GA). Todas as amostras de dsRNA foram armazenadas a -20°C até sua utilização.

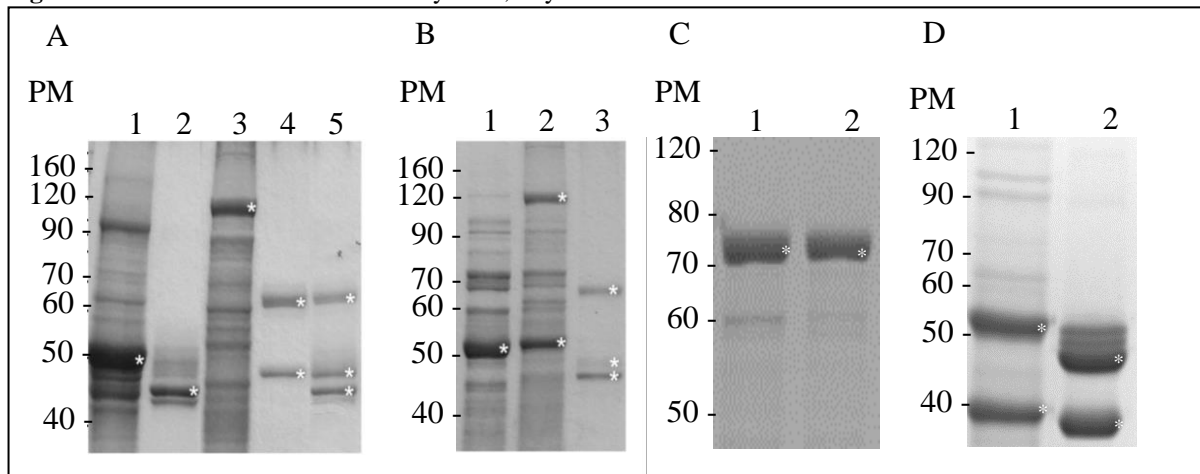
7.11.2 *Tratamento das larvas com dsRNA*

As larvas foram expostas ao dsRNA pela via oral através da alimentação, e o procedimento foi baseado em Meleshkevitch et al. (2013) com modificações. Neste protocolo, uma jangada contendo ovos de *C. quinquefasciatus* (≈ 75 -100 ovos) da colônia S_UGA foi submersa em uma gota de dsRNA (50 μl) nas concentrações de 0.5 e 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ em uma placa de Petri mantida em câmara úmida a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa entre 65-85% e fotoperíodo 12h:12h (dia:noite), por aproximadamente 16 h. Em seguida, uma segunda gota de dsRNA (50 μl) nas mesmas concentrações citadas foi acrescida na placa de Petri e mantida sob as mesmas condições por mais 8 h. Após este período foi acrescido um volume de 3,75 mL de água Mili Q[®] (Millipore) às placas juntamente com 5 mg de alimento para peixes (TetraMin Tropical Flakes). Os ovos que não eclodiram foram descartados neste momento. Após 24 h sob esta condição, as larvas foram transferidas para um recipiente plástico com 100 mL de água Mili Q[®] (Millipore) e 20 mg de alimento para peixes, onde foram mantidas até o 4^o estágio e a mortalidade foi registrada diariamente. Os controles positivos e negativos dos ensaios foram grupos de ovos que passaram pelo mesmo procedimento e a eclosão das larvas ocorreu respectivamente em amostras de dsRNA-eGFP e água apenas. Larvas de 3^o estágio, tratadas e não tratadas com os dsRNAs, foram submetidas para a avaliação pois, de acordo com Meleshkevitch et al. (2013) o pico do silenciamento gênico em *Ae. aegypti* foi obtido neste estágio. As larvas foram submetidas as reações de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) descrita na seção 7.10 para avaliar a ocorrência do silenciamento gênico. Ensaio de toxicidade *in vivo* descrito na seção 7.5, utilizando doses da toxina Cry48Aa/Cry49Aa ou Bin equivalente a concentração letal para 50% das larvas expostas, também foram realizados para avaliar o efeito do procedimento na mortalidade observada nos grupos experimentais.

8 RESULTADOS

8.1 Expressão de toxinas recombinantes

A primeira etapa deste estudo foi produzir toxinas do Lsp sob a forma recombinante através de diferentes sistemas, para a detecção de seus ligantes no epitélio intestinal de *C. quinquefasciatus*. A análise dos cristais produzidos em linhagens recombinantes de Bt mostrou a expressão das protoxinas esperadas a partir dos construtos *cry49/pHTP49* e *cry48/pSTAB135* que exibiram pesos moleculares esperados de $\cong 53$ kDa e $\cong 135$ kDa para as toxinas Cry49Aa e Cry48Aa, (Figura 10A, linhas 1 e 3), respectivamente. Após o processamento *in vitro* das protoxinas individualmente, simulando as etapas que ocorrem no intestino das larvas depois da ingestão dos cristais, foram obtidas as toxinas que apresentaram o tamanho esperado de $\cong 44$ kDa para a Cry49Aa e dois fragmentos de $\cong 68$ e $\cong 46$ kDa para a Cry48Aa (Figura 10A, linhas 2 e 4). O processamento *in vitro* das toxinas Cry em conjunto, aqui denominado de mix também foi realizado e apresentou o mesmo padrão de ativação obtido para as toxinas individualmente (Figura 10A, linha 5). A proteína Cry49Aa produzida em *E. coli* fusionadas à cauda de histidina (Cry49Aa-His), a partir do construto *cry49/pET21A*, foi expressa com peso esperado de $\cong 53$ kDa (Figura 10B, linha 1). Neste estudo também foi utilizado a mistura de protoxinas Cry48Aa e Cry49Aa-His produzidas em Bt e *E. coli*, respectivamente (Figura 10B, linha 2). A análise destas toxinas processadas *in vitro* (Figura 10B, linha 3) exibiu o mesmo padrão observado anteriormente (Figura 10A, linha 5), sendo observados os fragmentos de $\cong 68$ e $\cong 46$ kDa para Cry48Aa e de $\cong 44$ kDa para a Cry49Aa. A expressão da proteína Cry49 produzida em *E. coli* fusionada com a glutathione S-transferase (GST) (Cry49Aa-GST) a partir do construto *cry49/pGEX4T3* também apresentou o peso esperado de $\cong 73$ kDa (Figura 10C, linhas 1 e 2). Foram realizadas tentativas de produção da proteína Cry48Aa recombinante em *E. coli*, porém, sem sucesso. A produção da toxina Bin foi realizada a partir do construto pGSP10 de Bti cepa 4Q-7 e os cristais produzidos mostraram a presença das protoxinas esperadas BinA e BinB de $\cong 42$ e 51 kDa, respectivamente (Fig 10D, linha 1). Após o processamento *in vitro* das toxinas elas apresentaram o tamanho esperado (BinA $\cong 39$ kDa, BinB $\cong 43$ kDa, Figura 10D, linha 2).

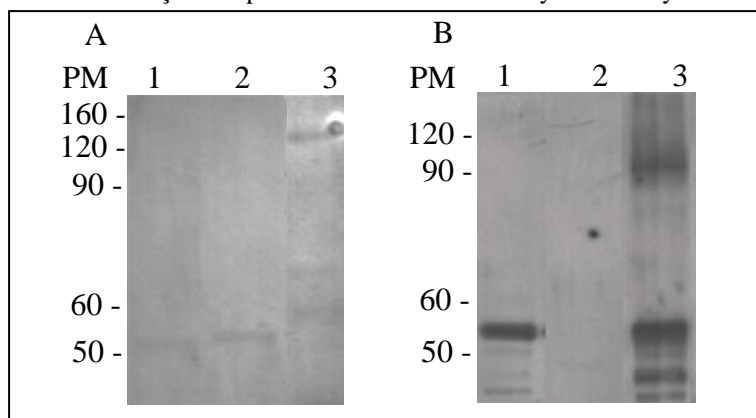
Figura 10 - Proteínas recombinantes Cry48Aa, Cry49Aa e Bin.

Fonte: Autora

Legenda: A. Proteínas produzidas em *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* (Bti) cepa 4Q7. Cry49Aa solubilizada (1); e ativada (2); Cry48Aa solubilizada (3); e ativada (4); mix Cry48Aa/Cry49Aa ativadas em conjunto (5). B. Cry49Aa com cauda de histidina produzida em *Escherichia coli*. Cry49Aa-His (1); mistura de protoxinas Cry48Aa/Cry49Aa-His (2); mistura Cry48Aa/Cry49Aa-His ativada em conjunto (3). C. Cry49Aa fusionada a GST produzida em *E. coli*. (1-2). D. Bin produzida em Bti 4Q7 solubilizada (1) e ativada (2). PM. Peso molecular em kDa. * representa as protoxinas e respectivas toxinas. Separação em SDS-PAGE 10% e coloração com azul de Coomassie.

8.2 Avaliação de anticorpos anti-Cry48 e anti-Cry49

O soro policlonal anti-Cry48 mostrou uma baixa capacidade de reconhecimento da toxina Cry48Aa recombinante produzida em Bt (Figura 11A, linha 3). Adicionalmente, este soro revelou um reconhecimento inespecífico da Cry49 recombinante produzida em Bt e em *E. coli* (Figura 11A, linhas 1 e 2). Por outro lado, o soro policlonal anti-Cry49 demonstrou um reconhecimento específico da proteína Cry49Aa recombinante produzida em Bt e em *E. coli* (\cong 53 kDa), bem como seu dímero (\cong 90 kDa) (Figura 11B, linhas 1 e 3). Este anticorpo não reconheceu a toxina Cry48Aa recombinante produzida em Bt (Figura 11B, linha 2). De acordo com esse perfil as imunodeteções deste estudo foram feitas a partir de soros dirigidos contra a toxina Cry49Aa e o anticorpo anti-Cry48 não foi utilizado.

Figura 11 - Imunodeteção das proteínas recombinantes Cry48Aa e Cry49Aa.

Fonte: Autora

Legenda: A. Anticorpo anti-Cry48 e proteínas Cry49Aa Bt (1), Cry49Aa-His (2) e Cry48Aa (3). B. Anticorpo anti-Cry49 e proteínas Cry49Aa-His (1), Cry48Aa (2) e Cry49Aa Bt (3). PM. Peso molecular em kDa.

8.3 Suscetibilidade das larvas à toxina Cry48Aa/Cry49Aa

A susceptibilidade das larvas de *C. quinquefasciatus* das colônias S e R e de *Ae. aegypti* à toxina Cry48Aa/Cry49Aa foi avaliada através de bioensaios de concentrações múltiplas, utilizando biomassas contendo esporos/cristais de protoxinas Cry49Aa e Cry48Aa recombinantes produzida em Bt, misturadas na proporção de 1:1 (p/p). Estes resultados mostram a susceptibilidade de *C. quinquefasciatus* da colônia S, com uma concentração letal para 50% das larvas em cerca de 30 mg/L, enquanto as larvas da colônia R apresentaram uma susceptibilidade reduzida visto que foi necessário uma concentração cerca de 10-16 vezes maior para produzir o mesmo efeito nas larvas da colônia R. Larvas de *Ae. aegypti* não mostraram mortalidade significativa nas concentrações usadas para as larvas de *C. quinquefasciatus*. A concentração letal estimada para 50% das larvas de *Ae. aegypti* só foi atingida com concentrações da toxina cerca de cem vezes superior do que àquela utilizada nas larvas de *C. quinquefasciatus* da colônia S e este resultado caracteriza a refratoriedade das larvas de *Ae. aegypti* à toxina Cry48Aa/Cry49Aa.

Tabela 1 - Atividade tóxica de biomassas contendo cristais da toxina Cry48Aa/Cry49Aa (1:1) para larvas de 4º estágio das colônias de *Culex quinquefasciatus* suscetível (S) e resistente ao Lsp IAB59 (R) e larvas de *Aedes aegypti* (Ae), após 48h de exposição.

Concentração (mg/L)	Mortalidade (%) ^a		
	<i>C. quinquefasciatus</i>		<i>Ae. aegypti</i>
	S	R	Ae
0	4	3	3
5	7	4	–
10	23	–	18
30	47	7	–
50	71	13	–
75	83	–	–
100	92	29	21
300	100	45	40
500	–	59	–
1000	–	76	52
3000	–	89	59
10000	–	–	71

Fonte: Autora

Legenda: ^a valores correspondentes à média de três avaliações

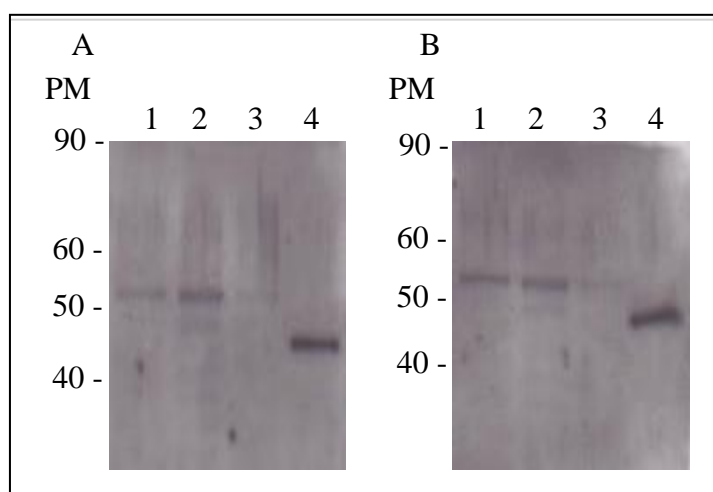
8.4 Detecção de ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa por *overlay assay*

8.4.1 Imunodetecção com anti-Cry49

Os ensaios de ligação foram conduzidos inicialmente entre as toxinas recombinantes Cry48Aa e Cry49Aa, produzidas em Bt, e as proteínas de BBMF de *C. quinquefasciatus* da colônia S e de *Ae. aegypti* da colônia Ae. Neste caso, amostras de biomassas contendo cristais com as protoxinas foram processadas *in vitro* para a forma ativa conforme descrito no item 7.3, de forma individualizada, ou combinada (mix). Os ensaios de ligação conduzidos com o mix Cry48Aa/Cry49Aa ativado demonstraram o reconhecimento de uma proteína na BBMF de *C. quinquefasciatus* com peso molecular aparente de 53 kDa, a partir da imunodetecção com anticorpo anti-Cry49 (Figura 12A, linhas 1 e 2). A redução significativa do sinal de ligação detectada na BBMF de *Ae. aegypti* (Figura 12A, linha 3), uma espécie refratária, sugeriu que a ligação encontrada em *C. quinquefasciatus* seria específica. O controle positivo da imunodetecção mostrou o reconhecimento da Cry49Aa pelo anticorpo em uma amostra do

mix de toxinas que foi utilizado em todos os ensaios apresentados nesta seção (Figura 12A, linha 4). Entretanto, o controle negativo da imunodeteção da membrana com amostras de BBMF sem incubação com o mix de toxinas, apresentou as mesmas interações observadas na presença das toxinas (Figura 12B linhas 1-4) indicando que o sinal observado no ensaio resulta do reconhecimento inespecífico de proteínas da BBMF pelo anticorpo. Portanto, a proteína de $\cong 53$ kDa identificada nos ensaios não foi considerada candidata a receptor da toxina, apesar da aparente especificidade da interação.

Figura 12 - Imunodeteção de ensaios de ligação entre as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa recombinantes de *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* e proteínas de microvilli intestinal (BBMF) de larvas de culicídeos, com o anticorpo anti-Cry49.



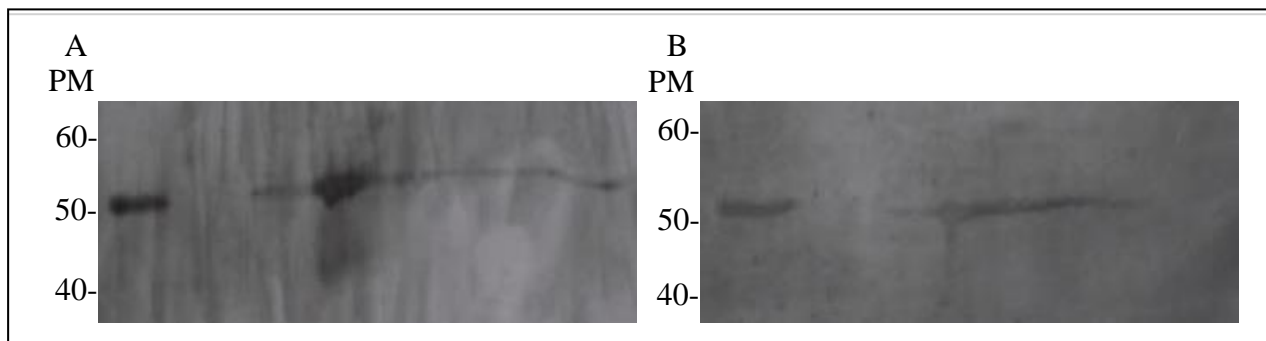
Fonte: Autora

Legenda: A. BBMF de *Culex quinquefasciatus* (1-2) e *Aedes aegypti* (3), incubada com mix Cry48Aa/Cry49Aa ativado em conjunto (4). B. Controle negativo dos ensaios sem incubação com as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa. PM. Peso molecular em kDa. Separação eletroforética unidimensional.

Os géis bidimensionais obtidos na análise proteômica descrita na seção 7.8 também foram submetidos à ensaios de ligação com o mix de toxina Cry48Aa/Cry49Aa e imunodeteção com o anti-Cry49. Nos géis contendo proteínas de BBMF de *C. quinquefasciatus* da colônia S foram detectados spots de $\cong 53$ kDa localizados em cadeia, migrando com o mesmo peso molecular, o que poderia representar distintas proteínas ou uma mesma proteína com modificações pós-traducionais (Figura 13A). Entretanto, este sinal também foi detectado no controle negativo (Figura 13B) em amostras de BBMF de *C. quinquefasciatus*, sem incubação com o mix de toxina. Estes resultados confirmam aqueles anteriormente obtidos com o gel unidimensional e demonstram que o anticorpo anti-Cry49 reconhece de forma inespecífica proteínas na BBMF de *C. quinquefasciatus*, portanto, outro anticorpo foi utilizado nos próximos ensaios de ligação.

Figura 13 - Imunodeteção de ensaios de ligação entre as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa recombinantes de *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* e proteínas de microvilli intestinal (BBMF) de larvas de *Culex quinquefasciatus*.

Fonte: Autora



Legenda: A. BBMF incubada com mix Cry48Aa/Cry49Aa ativado em conjunto (4). B. Controle negativo do ensaios sem incubação com as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa. PM. Peso molecular em kDa. Separação eletroforética bidimensional.

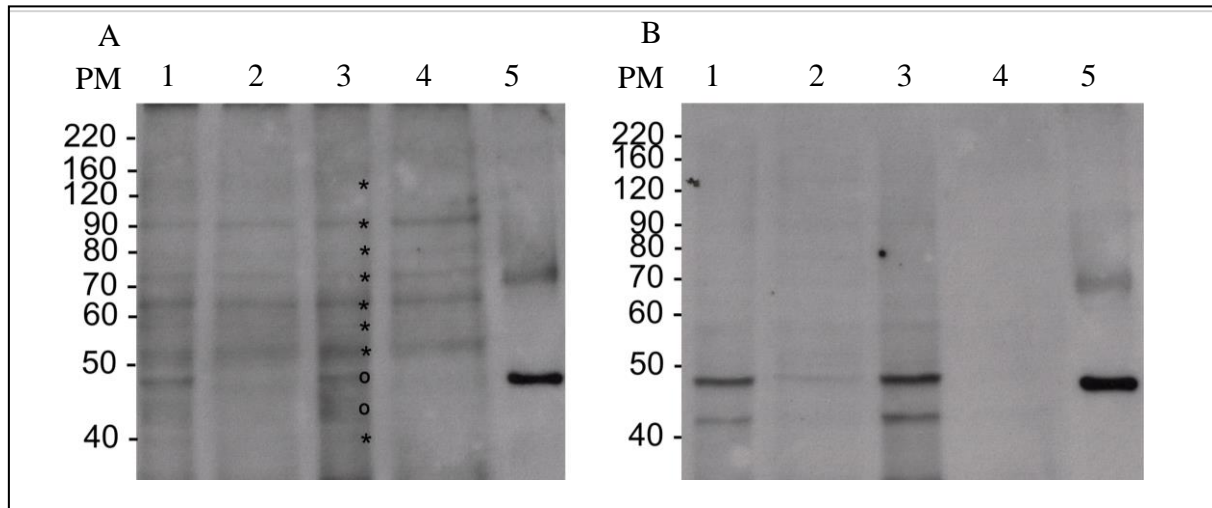
8.4.2 Imunodeteção com anti-histidina

Em virtude do problema metodológico verificado na seção anterior, a toxina recombinante Cry49Aa-His foi obtida e um novo grupo de ensaios do tipo *overlay assay* foi realizado para identificar proteínas na BBMF de *C. quinquefasciatus* com capacidade de ligação à mistura ativada de toxinas Cry48Aa/Cry49Aa-His. Estes ensaios mostraram que a mistura Cry48Aa/Cry49Aa-His se ligou a uma série de proteínas do microvilli intestinal de *C. quinquefasciatus* com pesos moleculares aparentes de \cong 52, 58, 65, 73, 80, 90, 100-125 kDa, conforme evidenciado através da imunodeteção da toxina Cry49Aa-His. (Figura 14A, linhas 1 e 3). Nestes ensaios foram utilizadas tanto proteínas de BBMF, quanto proteínas solubilizadas pelo detergente CHAPS (Figura 14A, linhas 2 e 4), e a maioria das proteínas foram detectadas em ambas amostras. Como controle positivo da imunodeteção, a proteína Cry49Aa-His foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal contra a cauda de poli-histidina desta proteína (Figura 14A, linha 5). Na imunodeteção de proteínas do microvilli intestinal sem a incubação prévia com as toxinas, utilizada como controle negativo, a maioria das bandas detectadas na presença das toxinas não foi detectada, mostrando a especificidade das ligações observadas. Contudo, deve-se observar que foram imunodetectadas duas principais proteínas (\cong 44 e 48 kDa) na BBMF de *C. quinquefasciatus* tratada e não tratadas com o detergente CHAPS (Figura 14B, linhas 1-4) que foram descartadas das análises como possíveis candidatos a receptores da toxina Cry48Aa/Cry49Aa-His por serem inespecíficas. Proteínas de peso molecular abaixo de 40 kDa também foram descartadas das análises, uma vez que elas também foram observadas no controle negativo, indicando uma ligação inespecífica do anticorpo com as amostras intestinais. Estes conjuntos de ensaios de *overlay*

assay demonstraram que a Cry48Aa/Cry49Aa ligou-se com uma série de proteínas de BBMF de pesos moleculares variáveis, que seriam potenciais receptores.

Figura 14 - Imunodeteção de ensaio de ligação entre a mistura de toxinas Cry48Aa/Cry49Aa-His recombinantes e amostras de proteínas de microvilli intestinal de *Culex quinquefasciatus* íntegras (1 e 3) e tratadas com CHAPS (2, 4).

Fonte: Autora



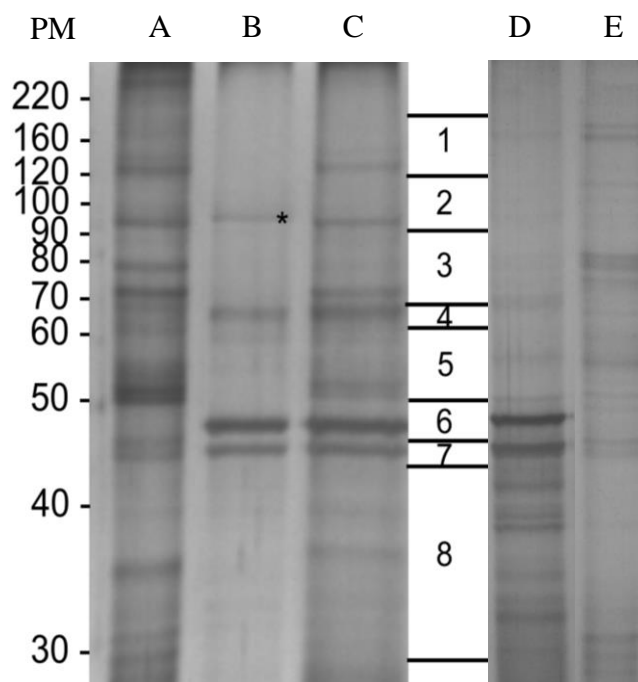
Legenda: A. Incubação com mix Cry48Aa/Cry49Aa-His ativado em conjunto. B. Controle negativo sem incubação com as toxinas. Detecção com o anticorpo anti-histidina. PM. Peso molecular em kDa. (*) Principais proteínas detectadas. (o) e aquelas observadas no controle negativo, mistura Cry48Aa/Cry49Aa-His ativada em conjunto (5). Separação eletroforética unidimensional.

8.5 Detecção de ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa por *pull-down*

Foram feitos ensaios de ligação do tipo *pull-down* entre proteínas da BBMF de *C. quinquefasciatus* solubilizadas com CHAPS (Figura 15, linha A) e toxinas Cry48Aa/Cry49Aa ativadas e immobilizadas nas esferas CNBr (Figura 15, linha B). O mesmo ensaio foi realizado utilizando as proteínas da BBMF de *Ae. aegypti* solubilizadas com CHAPS (Figura 15, linha E) como controle, uma vez que esta espécie é refratária à toxina Cry48Aa/Cry49Aa conforme dados da seção 8.3. As proteínas ligadas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e visualizadas através de coloração com prata. O perfil de proteínas das esferas Cry48Aa/Cry49Aa (Figura 15, linha B) apresentou bandas de $\cong 68$, 46 e 44 kDa, consistente com o perfil anteriormente obtido para as toxinas ativadas Cry48Aa/Cry49Aa (Figura 10A, linha 5). A banda observada de $\cong 90$ kDa, é provavelmente, o dímero da toxina Cry49Aa que é estável nas condições deste ensaio. Proteínas intestinais de *C. quinquefasciatus* que se ligaram as toxinas immobilizadas nas esferas (Figura 15, linha C) apresentaram peso molecular consistentes com as proteínas imunodetectadas no ensaio de ligação do tipo *overlay assay* (Figura 14A). Como controle negativo proteínas do extrato-CHAPS foram incubadas com esferas immobilizadas com tampão

Tris apenas (sem as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa) e nenhuma proteína foi visualizada após a separação eletroforética e coloração com prata (dados não apresentados). As proteínas intestinais de *Ae. aegypti* que se ligaram as toxinas imobilizadas nas esferas foram bem mais escassas (Figura 15, linha D). As proteínas das linhas C e D (Figura 15) foram excisadas do gel em oito partes e enviadas para análise por MS/MS.

Figura 15 - Proteínas identificadas através do ensaio de *pull-down*.



Fonte: Autora

Legenda: Proteínas do extrato-CHAPS de *C. quinquefasciatus* (A); mix de toxinas ativadas Cry48Aa/Cry49Aa imobilizadas em esferas CNBr (B); proteínas ligantes resultantes dos ensaios (C e D); Proteínas do extrato-CHAPS de *Ae. aegypti* (E). PM. Peso molecular em kDa. (*) Dímero da Cry49Aa. As oito amostras das linhas C e D foram enviadas para espectrometria de massas.

A partir desta análise foram identificadas 266 proteínas de *C. quinquefasciatus* (Apêndice A), e de apenas 21 proteínas de *Ae. aegypti* (Apêndice B). As proteínas destas listas foram selecionadas a partir dos seguintes critérios de análise: *score* maior que 67 e pelo menos 2 peptídeos únicos, limiar aceito para garantir que a identificação foi significativa com identificação aleatória com uma frequência inferior a 5% ($p < 0.05$). As seções 7 e 8 do gel (30-48 kDa) de ambas as espécies apresentaram, proporcionalmente, o maior número de proteínas identificadas e isto pode ser relacionado a presença de polipeptídeos resultantes da degradação de proteínas de alto peso molecular.

Um grupo de 49 proteínas de *C. quinquefasciatus* (Quadro 3) foi selecionado manualmente a partir das 266 classificadas, na maioria dos casos, por elas pertencerem a uma classe de proteínas previamente identificadas como ligantes/receptores para toxinas Cry, ou,

por elas já terem sido citadas como moléculas envolvidas no modo de ação destas toxinas. Nesta tabela, as proteínas detectadas em mais de uma seção foram citadas na seção correspondente ao seu peso molecular esperado. Quando uma proteína foi detectada em seções cuja faixa de peso molecular difere do seu peso molecular predito, ela foi citada na seção onde ela foi detectada com o maior *score*. Parte das proteínas selecionadas na tabela 4 pertencem a classes de proteínas já descritas como receptores funcionais para toxinas Cry de 3 domínios incluindo aminopeptidases (APN), maltases e fosfatases alcalinas (ALPs). A análise também revelou que oito dessas proteínas são ortólogos de receptores funcionais para toxinas Cry de *B. thuringiensis* *svar. israelensis* ou *B. thuringiensis* *svar. jegathesan*, anteriormente identificados em larvas de *Ae. aegypti* ou *Anopheles* spp. (Quadro 4). Moléculas APN foram detectadas em todas as seções analisadas apesar do fato de seus pesos moleculares preditos serem maiores que 100 kDa. Maltases incluindo as α -glicosidases também foram encontradas em quase todas as seções e *C. quinquefasciatus* maltase 1 (Cqm1), o receptor da toxina Bin, foi detectado nas seções 5 e 6. Em contrapartida, as ALPs foram detectadas apenas na seção 5. Outras proteínas já descritas como ligantes para toxinas Cry como apolipoforina, actina, dipeptidil-peptidase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, glicosil transferase, miosina-Id, proibitina, ATP sintase (alpha ou beta subunidade), e V-ATP sintase (subunidade E ou H) foram encontradas com alto *score* em uma ou mais seções analisadas. Além disso, proteínas não caracterizadas anteriormente como receptores de toxinas Cry também foram identificadas como aldeído desidrogenase, ATPase transportadora de cálcio do retículo sarcoplasmático/endoplasmático, carboxilesterase 6, carboxipeptidase A1, fasciclina, maltose fosforilase, panteteinase, ATPase alpha transportadora de sódio e potássio, sodio-potássio-dependente de ATPase beta-2 subunidade, transferrina, lectina ligadora de manose, e vanin-semelhante a proteína 1.

No grupo de 21 proteínas de *Ae. aegypti* (Apêndice B) foram identificadas apenas proteínas não caracterizadas e aminopeptidases, sendo três APNs já descritas como receptores funcionais para toxinas Cry de 3 domínios. Nas seções 3 e 4 nenhuma proteína foi identificada.

Quadro 3 - Proteínas de intestino médio de *Culex quinquefasciatus* detectadas como ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa através de ensaios de *pull-down* e identificadas por LC-MS/MS

Seção	Acesso nº	Descrição	Score	Cobertura (%)	Nº peptídeos únicos	PM predito (kDa)	continuação
							Outras seções
1 (110-180 kDa)	EDS27419.1 ^a	protease m1 zinc metalloprotease	365,96	18,00	9	113,2	2,3,4,5,7,8
	EDS27892.1	calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/ER type	146,88	7,74	4	88,8	2,4
2 (90-110 kDa)	EDS27418.1 ^a	protease m1 zinc metalloprotease	93,25	11,25	6	101,2	
	EDS40798.1	CHP	78,46	2,96	2	100,1	
	EDS36841.1 ^a	aminopeptidase N	74,67	8,38	3	105,0	
3 (70-90 kDa)	EDS38951.1 ^a	alpha-glucosidase	619,19	40,83	25	69,4	4,5,6,8
	EDS30018.1	apolipoporphorins	374,88	6,41	18	366,8	4,5
	EDS38952.1	alpha-glucosidase	374,85	25,37	12	70,6	4,5
	EDS32575.1	maltose phosphorylase	277,49	18,29	10	85,4	
	EDS45210.1	dipeptidyl peptidase 4	250,82	19,19	12	84,1	
	EDS32578.1	maltose phosphorylase	206,18	15,58	11	85,1	
	EDS32127.1	alpha-glucosidase	199,35	20,66	10	70,7	
	EDS32576.1	maltose phosphorylase	172,15	7,89	5	84,8	
	EDS26147.1	sodium/potassium-transporting ATPase alpha chain	97,64	5,44	3	80,3	5,6,7,8
	EDS35643.1	glutamyl aminopeptidase	93,53	6,02	5	116,5	
EDS37148.1	dipeptidyl-peptidase	88,24	6,05	5	88,2	2	
4 (62-70 kDa)	EDS38950.1 ^a	maltase 1	183,05	11,26	6	69,4	5
	EDS45922.1	pantetheinase	113,26	16,47	9	57,1	
5 (50-62 kDa)	EDS35272.1	CHP: ATP synthase subunit alpha	1914,86	59,17	40	59,3	6,8
	EDS27254.1	ATP synthase beta subunit	1100,18	56,16	21	54,6	2,6,8
	EDS29323.1	alkaline phosphatase	563,81	27,30	14	62,9	
	ABC59609.1 ^b	maltase 1 (Cqm1)	528,27	29,31	18	66,2	6
	EDS39442.1	V-type ATP synthase beta chain	515,83	38,82	15	54,7	8
	EDS29322.1 ^a	alkaline phosphatase	485,67	17,04	13	100,6	
	EDS29972.1	ATP synthase alpha subunit vacuolar	474,63	31,76	15	68,1	3,4,5,6,8
	EDS27420.1 ^a	protease m1 zinc metalloprotease	215,56	8,23	6	102,7	4
	EDS35286.1	CHP: Aldehyde dehydrogenase	200,25	12,86	2	58,1	
	EDS29320.1	alkaline phosphatase	186,96	15,91	5	28,9	
	EDS45921.1	Vanin-like protein 1	166,86	7,21	4	61,6	
	EDS28386.1	transferrin	158,64	15,15	5	51,4	4
	EDS42579.1	glucosyl transferase	98,98	6,01	3	58,2	
	EDS44961.1	myosin-Id	113,40	3,18	2	77,9	6
	EDS31007.1	aminopeptidase N	68,48	4,43	4	105,4	

Seção	Acesso nº	Descrição	Score	Cobertura (%)	Nº peptídeos únicos	PM predito (kDa)	conclusão
							Outras seções
6 (48-50 kDa)	EDS31006.1 ^a	aminopeptidase N	984,52	13,66	23	210,0	2,3,5,8
	EDS27170.1	truncated ER mannose-binding lectin	279,17	18,26	8	53,4	5,7,8
	EDS35706.1	vacuolar ATP synthase subunit H	243,87	15,19	6	54,5	8
7 (45-48 kDa)	EDS44431.1	fasciclin	71,84	7,08	2	48,4	
8 (30-45 kDa)	EDS26297.1	calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/ER type	2335,41	32,46	4	109,1	3,5,6
	EDS44094.1	actin 1	1699,07	48,94	3	41,7	
	EDS25844.1	actin-2	1689,34	47,61	6	41,6	3,5
	EDS38275.1	CHP	755,20	34,77	10	33,0	3,5
	EDS28370.1	sodium/potassium-dependent ATPase beta-2 subunit	602,81	34,05	10	37,9	
	EDS28367.1	sodium/potassium-dependent ATPase beta-2 subunit	521,83	35,65	10	36,2	
	EDS36304.1	sodium/potassium-dependent ATPase beta-2 subunit	447,15	24,66	7	33,4	
	EDS29666.1	vacuolar ATP synthase subunit e	389,43	27,88	7	25,8	
	EDS45475.1	CHP: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	225,43	20,78	6	35,4	
	EDS28502.1	carboxylesterase-6	177,38	5,06	3	71,1	6
	EDS26618.1	prohibitin-2	164,97	15,38	5	33,1	
	EDS34662.1	carboxypeptidase A1	96,08	9,18	3	48,4	

Fonte: Autora

Quadro 4 - Proteínas de intestino médio de *Culex quinquefasciatus* identificadas como potenciais ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa extraídas da tabela 4 e seus ortólogos em espécies de *Aedes aegypti* ou *Anopheles* spp. descritos como receptores de outras toxinas Cry.

Acesso nº	Descrição	Ortólogos (id)	Identidade (%)	Espécie	Toxina	Referência
EDS31006.1	aminopeptidase N	AAEL008155	31,4	<i>Ae. aegypti</i>	Cry11Aa	Chen et al. 2013
EDS36841.1	aminopeptidase N	AAEL005808	63,6	<i>Ae. aegypti</i>	Cry4Ba	Saengwinan et al. 2011
EDS27418.1	protease m1 zinc metalloprotease	AAEL012783	70,9	<i>Ae. aegypti</i>		
EDS27419.1	protease m1 zinc metalloprotease	AAEL012778	65,1	<i>Ae. aegypti</i>	Cry11Aa Cry4Ba	Chen et al. 2009 e Saengwinan et al. 2011
EDS27420.1	protease m1 zinc metalloprotease	AAEL012776	63,4	<i>Ae. aegypti</i>	Cry4Ba	Bayyareddy et al. 2009
EDS38951.1	alpha-glucosidase	AALB015771	64,3	<i>An. albimanus</i>	Cry11Aa	Fernandez-Luna et al. 2010
		AGAP008963	64,9	<i>An. gambiae</i>	Cry11Ba	Zhang et al. 2013
EDS38950.1	maltase 1	AALB015771	61,3	<i>An. albimanus</i>	Cry11Aa	Fernandez-Luna et al. 2010
		AGAP008963	62,8	<i>An. gambiae</i>	Cry11Ba	Zhang et al. 2013
EDS29322.1	alkaline phosphatase	AAEL003313	67,1	<i>Ae. aegypti</i>	Cry4Ba	Bayyareddy et al. 2009

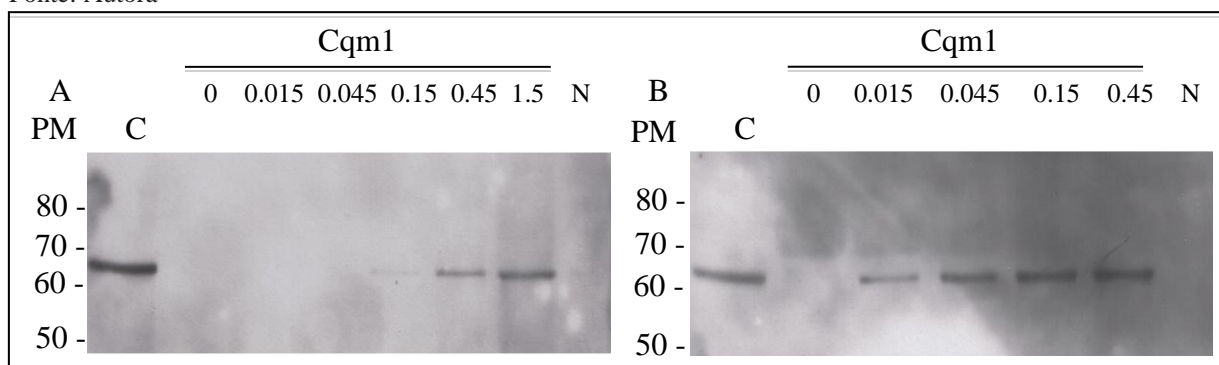
Fonte: Autora

8.6 Interação entre as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa e Bin e a proteína Cqm1

A identificação da Cqm1 entre os ligantes identificados na BMMF de *C. quinquefasciatus* levou à investigação como ligante da toxina Cry48Aa/Cry49Aa. Uma vez que esta toxina é ativa contra larvas resistentes a *L. sphaericus* devido à perda de Cqm1, seria esperado que sua ação não dependesse desta molécula (DE MELO et al., 2009). Os ensaios de *pull-down* entre a proteína recombinante Cqm1 e Cry49Aa-GST imobilizada em esferas de sepharose previamente pré-incubadas com a Cry48Aa, foram comparados com o respectivo ensaio entre Cqm1 e a subunidade BinB-GST. Como esperado, a Cqm1 se ligou a BinB-GST, e embora essa ligação também tenha sido observada entre o receptor Cqm1 e a toxina Cry48Aa/Cry49Aa-GST, a ligação foi muito fraca e só foi detectada usando quantidade de Cqm1 cerca de 30 vezes maiores, em comparação àquela usada para detectar a ligação à BinB-GST (Figura 16). Estes ensaios de *pull-down* realizados revelaram um conjunto de moléculas em *C. quinquefasciatus* que podem ser ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa, ou estarem de alguma forma envolvidos no seu modo de ação.

Figura 16 - Ensaios de *pull-down* entre a proteína Cqm1 (0-1.5 µg) com diferentes toxinas recombinantes.

Fonte: Autora



Legenda: Cry48Aa/Cry49Aa-GST (A), BinB-GST (B) ou GST (N, controle negativo). Cqm1 (0.15 µg) (C). Detecção com o anticorpo anti-Cqm1. PM. Peso molecular em kDa.

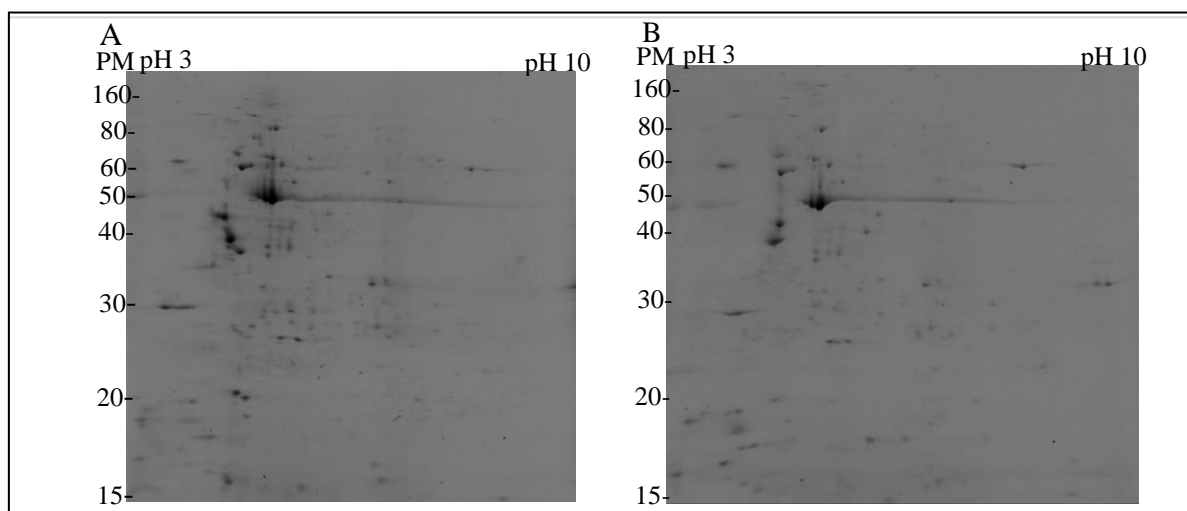
8.7 Perfil proteômico das larvas de *Culex quinquefasciatus* das colônias R e S

O perfil das proteínas expressas no microvilli intestinal de larvas de *C. quinquefasciatus* da colônia suscetível (S) e resistente (R) foi comparado através da análise proteômica em géis bidimensionais (2D), com a finalidade de fornecer dados a respeito dos possíveis receptores da toxina Cry48Aa/Cry49Aa a partir desta análise comparativa. A boa reprodutibilidade dos ensaios, ou seja, a semelhança do perfil protéico entre as réplicas é essencial para a análise, pois facilita a sobreposição das imagens dos géis. Foram obtidos oito géis dos quais três de cada colônia foram analisados. Os *spots* de proteínas resolvidos apresentaram pontos

isoeletrícos variados e estavam distribuídos ao longo do gel de eletroforese 2D. Houve uma grande concentração de proteínas na parte ácida do gel o que poderia ser minimizado com a utilização de uma quantidade inicial menor de proteínas no extrato (ex: 100 µg). A detecção dos *spots* realizada com o software Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare), resultou em uma média de 150 e 100 *spots* de proteínas para as colônias suscetível (Figura 17A) e resistente (Figura 17B), respectivamente. Dentro de cada grupo, o gel com maior número de *spots* foi escolhido como referência para as comparações (*matches*) entre os *spots* das réplicas de cada grupo. Foi estimado o índice de correlação que reflete a relação entre os valores dos *spots* entre dois géis que pode variar entre -1 e 1, sendo o valor mais próximo de 1 aquele que indica a melhor correlação de todos os *spots* comparados nos dois géis. Nessas análises o perfil da replicata 3 de larvas resistente (R3) foi utilizado como referência e foram obtidos os índices entre 0,71 e 0,92 demonstrando uma boa correlação entre os géis (Quadro 5).

Figura 17 - Separação eletroforética bidimensional de proteínas de microvilli intestinal (BBMF) de *Culex quinquefasciatus*.

Fonte: Autora



Legenda: A. colônia suscetível (S). B. colônia resistente (R). Coloração com azul de Comassie R250. PM. Peso molecular em kDa.

Quadro 5 - Coeficiente de correlação (*r*) obtido entre o perfil de proteínas do intestino de *Culex quinquefasciatus* das colônias suscetível (S2, S3 e S4) e resistente (R2, R3 e R4) dos géis 2D. O gel R3 foi utilizado como referência.

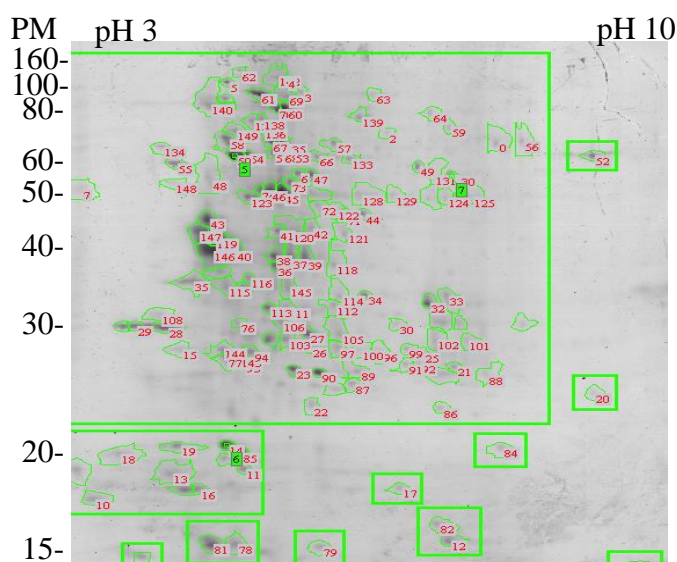
Tipo de comparação	Valor <i>r</i>
R3 vs R2	0,92
R3 vs R4	0,91
R3 vs S2	0,77
R3 vs S3	0,71
R3 vs S4	0,89

Fonte: Autora

Após estas comparações procedeu-se a análise de classes que forneceu a diferença

estatística entre os grupos experimentais. Durante esta análise diferencial, foi possível verificar que 173 *spots* tiveram correspondentes nos géis (Figura 18). Destes 63 *spots* foram coincidentes entre os grupos e apenas 12 estavam diferencialmente expressos (t-test, $p < 0,05$). A análise qualitativa revelou que 87 e 23 *spots* eram exclusivos dos grupo suscetível e resistente, respectivamente. Das 122 amostras enviadas para MS (proteínas diferencialmente expressas $n=12$, exclusivas $S=87$ e $R=23$) 118 delas geraram espectros e o resultado da busca realizada com o Mascot conseguiu identificar 53 *spots* (Quadro 6). Nesta tabela, dos 12 *spots* selecionados como diferencialmente expressos, todos foram identificados. Dos 87 *spots* exclusivos do grupo suscetível 38 foram identificados enquanto que dos 23 *spots* exclusivos do grupo resistente apenas 3 foram identificados. Apesar deste número relativamente baixo de *spots* algumas proteínas como V-ATPases, α e β -ATP sintases, apolipopforinas e proteínas *heat shock* foram identificadas na colônia S concordando com os resultados obtidos de *pull-down* e no transcriptoma. Porém, a grande maioria dos *spots* foram identificados como actina ou como proteínas não caracterizadas. Alguns *spots* também foram identificados como duas ou mais proteínas diferentes (ex. 22, 69) provavelmente, por elas compartilharem alguns dos peptídeos utilizados na identificação. Além disso, uma mesma proteína foi encontrada em diferentes *spots* podendo indicar modificações pós- traducionais. Neste estudo comparativo o baixo número de *spots* identificados, na colônia resistente, não possibilitou a identificação de candidatos a receptores da toxina Cry48Aa/Cry49Aa.

Figura 18 - Separação eletroforética bidimensional de proteínas de microvilli intestinal (BBMF) das colônias suscetível e resistente de *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Autora

Legenda: *Spots* marcados de verde com numeros em vermelho correspondem aos 173 *spots* correspondentes entre os géis e o número de identificação deste *spot* (*match id*). *Spots* marcados de verde sem numeração indicam *spots* que não tiveram correspondentes nos outros géis. Numeração em preto são apenas *spots* de referência para alinhamento dos géis durante a análise de classes. PM. Peso molecular em kDa.

Quadro 6 - Proteínas identificadas por espectrometria de massas provenientes do perfil proteômico em gel 2D de proteínas intestinais de larvas das colônias de *Culex quinquefasciatus* suscetível e resistente ao Lsp IAB59.

							continuação
Grupo	Spot id	Descrição	Acesso n° Uniprot	Acesso n° Vector base	PM [kDa]	N° peptídeos únicos	Score
DEP	1	Phenoloxidase subunit 1	BOWT82	CPIJ009878	83	5	35
	14	Apolipoporphin-III	B0WKP4	CPIJ007775	22	6	358
	17	Putative uncharacterized protein	B0X184	CPIJ013333	26	1	48
	22	Putative uncharacterized protein	B0VZX7	CPIJ000341	25	3	77
		Ubiquitination factor E4	B0WSH6	CPIJ009605	122	1	36
	25	Elastase-2B	B0W3W1	CPIJ002127	29	3	262
	27	Ferritin	B0WAG5	CPIJ004069	25	4	289
		Actin-87E	B0WEY5	CPIJ005785	42	1	101
	40	Tropomyosin-1	B0X3L3	CPIJ013361	32	5	502
		Actin-87E	B0WEY5	CPIJ005785	42	1	105
	45	Actin	B0WZI7	CPIJ012573	42	6	379
	46	Actin-87E	B0WEY5	CPIJ005785	42	7	397
	52	ATP synthase subunit alpha	B0W5F2	CPIJ002271	59	5	302
	55	Calreticulin	B0WJE0	CPIJ007376	47	6	277
62	Putative uncharacterized protein	B0X229	CPIJ013179	26	1	38	
S	63	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	B0WUI5	CPIJ010868	80	3	114
		78 kDa glucose-regulated protein	B0W934	CPIJ003550	72	1	75
	66	ATP synthase subunit beta	B0WGW0	CPIJ006209	55	1	42
	67	Actin-87E	B0WEY5	CPIJ005785	42	1	82
		Alkaline phosphatase	B0W2L2	CPIJ001262	29	1	66
	68	B subunit V-ATPase	O44427	CPIJ003418	55	6	336
		Actin-87E	B0WEY5	CPIJ005785	42	1	99
		Leucine-rich transmembrane protein	B0X0G6	CPIJ012722	53	1	52
	69	Heat shock 70 kDa protein cognate 4	B0WP93	CPIJ008915	72	4	134
		Actin-87E	B0WEY5	CPIJ005785	42	2	105
		ATP synthase alpha subunit vacuolar	B0WKP1	CPIJ007772	68	1	54
		78 kDa glucose-regulated protein	B0W934	CPIJ003550	72	1	34
	70	ATP synthase alpha subunit vacuolar	B0WKP1	CPIJ007772	68	7	363
	71	Actin-87E	B0WEY5	CPIJ005785	42	1	90
		Acyl-CoA dehydrogenase	B0WQ26	CPIJ009148	46	1	70
	72	Actin-87E	B0WEY5	CPIJ005785	42	2	114
73	Actin-5	B0WZI4	CPIJ012570	42	4	219	
74	Actin-1	B0XB41	CPIJ016462	42	6	422	

continuação

Grupo	Spot id	Descrição	Acesso n° Uniprot	Acesso n° Vector base	PM [kDa]	N° peptídeos únicos	Score
	75	Actin-87E	B0WEY5	CPIJ005785	42	1	107
		Putative uncharacterized protein	B0VZX6	CPIJ000340	43	2	88
		Mast cell protease 6	B0WFK8	CPIJ006078	30	1	60
	76	Actin-5	B0WZI4	CPIJ012570	42	3	248
		14-3-3 protein	B0WNP7	CPIJ008589	28	2	139
	77	Actin-87E	B0WEY5	CPIJ005785	42	2	167
		Glutathione S-transferase 1	B0XAJ0	CPIJ016212	25	3	156
	78	60S acidic ribosomal protein P2	B0X3D8	CPIJ014062	11	2	178
	79	V-type proton ATPase subunit F	B0XA89	CPIJ016432	14	2	46
	81	Putative uncharacterized protein	B0W0A4	CPIJ000468	40	1	33
	82	Allergen	B0X309	CPIJ013698	15	1	181
	83	Troponin C	B0W6W0	CPIJ003058	17	2	127
	84	NADH dehydrogenase	B0WCI6	CPIJ004810	19	1	33
	85	Apolipoprotein III	B0WKP4	CPIJ007775	22	5	284
	86	B subunit V-ATPase	O44427	CPIJ003418	55	3	214
	87	B subunit V-ATPase	O44427	CPIJ003418	55	3	240
	88	Serine collagenase 1	B0W647	CPIJ002512	27	1	79
		Serine protease inhibitor, serpin	B0WIA6	CPIJ007017	43	1	30
	89	Cationic trypsin	B0WW44	CPIJ011378	26	2	103
		ATP synthase subunit alpha	B0W5F2	CPIJ002271	59	1	75
		Ferritin	B0WAG6	CPIJ004070	25	1	69
		B subunit V-ATPase	O44427	CPIJ003418	55	1	69
	90	Ferritin	B0WAG6	CPIJ004070	25	7	393
	91	Glutathione S-transferase	B0W6D0	CPIJ002681	25	2	57
	92	60S acidic ribosomal protein P0	B0WQZ4	CPIJ009501	34	2	104
	93	Actin-5	B0WZI4	CPIJ012570	42	4	315
		Glutathione s-transferase	B0WFX0	CPIJ006160	27	2	202
		Glutathione S-transferase 1	B0XAJ0	CPIJ016212	25	2	127
		Odorant receptor	B0WJ72	CPIJ006992	43	1	43
		Zinc finger and BTB domain-containing protein 6	B0X6F9	CPIJ015067	79	1	37
		WD repeat protein 23	B0WYG6	CPIJ011731	53	1	34
	94	Actin-5	B0WZI4	CPIJ012570	42	3	227
		Trypsin delta/gamma	B0W771	CPIJ002937	27	4	221
	95	Serine-type endopeptidase	B0WW49	CPIJ011383	34	3	124
	96	Elastase-2B	B0W3W1	CPIJ002127	29	3	189
		Serine protease 1/2	B0W9S9	CPIJ003826	30	1	101

							conclusão
Grupo	Spot id	Descrição	Acesso n° Uniprot	Acesso n° Vector base	PM [kDa]	N° peptídeos únicos	Score
	97	Glutathione S-transferase 1-1	B0XGJ8	CPIJ018627	25	2	163
		Cationic trypsin	B0WW44	CPIJ011378	26	3	157
		Elastase-2B	B0W3W1	CPIJ002127	29	1	42
	98	Actin-87E	B0WEY5	CPIJ005785	42	2	66
		Mast cell protease 6	B0WFK8	CPIJ006078	30	1	67
		Metalloendopeptidase	B0W776	CPIJ002942	32	1	33
	99	Triosephosphate isomerase	B0W5W4	CPIJ002354	24	2	89
		Serine-type endopeptidase	B0WW49	CPIJ011383	35	1	38
	100	Cationic trypsin	B0WW44	CPIJ011378	26	3	122
	107	Putative uncharacterized protein	B0XC38	CPIJ016553	40	1	15
	119	Tropomyosin invertebrate	B0X3L6	CPIJ013364	33	5	358
	143	Actin-87E	B0WEY5	CPIJ005785	42	1	68
R	156	Trypsin II-P29	B0W1J1	CPIJ000769	30	1	40
	158	Voltage-dependent anion-selective channel	B0W1Q3	CPIJ000967	31	1	30
	165	Actin-87E	B0WEY5	CPIJ005785	42	1	54

Fonte: Autora

Legenda: *Spots* exclusivos da colônia resistente (R), suscetível (S) e diferencialmente expressos entre elas (DEP).

8.8 Perfil transcriptômico das larvas de *Culex quinquefasciatus* das colônias R e S

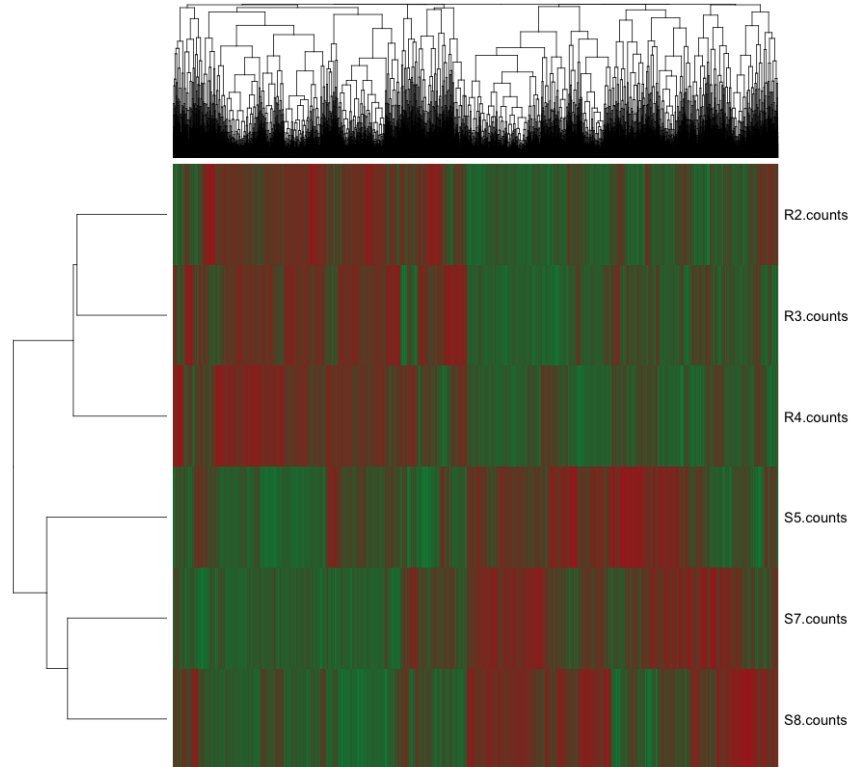
O perfil transcriptômico de larvas de *C. quinquefasciatus* da colônia suscetível (S) e resistente (R) foi comparado através da análise de RNAseq para identificar moléculas diferencialmente expressas entre estas colônias. Neste ensaio, um total de 19.288.276 leituras foram sequenciadas e mais de 95% foram mapeadas contra o genoma de *C. quinquefasciatus*. É importante observar que os dados obtidos das replicatas para cada colônia foram bastante similares possibilitando uma análise comparativa robusta entre elas. A partir deste mapeamento, 7045 genes (correspondente à $\approx 36\%$ do repertório total de *C. quinquefasciatus*) atenderam aos parâmetros de ter pelo menos 5 leituras em cada replicata e estar presente em pelo menos uma condição experimental (Tabela 2). As colônias possuem um perfil distinto de expressão gênica, que pode ser observado no *heatmap* gerado (Figura 19). Dentre estes 7045 genes mapeados, a análise daqueles diferencialmente expressos (DEGs) gerou um total de 1355 genes com P valor ≤ 0.05 e valor absoluto de $\log_2\text{Foldchange} \geq 1$. Entre eles 682 genes estavam super expressos e 673 genes sub-expressos na colônia RIAB59 (Figura 20).

Tabela 2 – Análise dos dados de expressão gênica para as colônias resistente e suscetível de *Culex quinquefasciatus*.

Amostra	Resistente		Suscetível	
Total leituras	9,699,067		9,589,209	
Total pares de bases	1,454,860,050		1,438,381,350	
	Nº leituras	%	Nº leituras	%
Resultados mapeamento				
Total mapeado	9,219,975	95.06	9,171,639	95.65
Unico mapeado	7,800,201	84.60	7,061,254	76.99
Multiplo mapeado	1,419,774	15.40	2,110,385	23.01
Não mapeado	478,663	4.94	417,804	4.35
Total mapeado em genes	6,402,370	82.08	5,642,580	79.91
Total mapeado sem gene	1,364,484	17.49	1,385,678	19.62

Fonte: Autora

Figura 19 - Perfil de expressão gênica para as colônias de *Culex quinquefasciatus* resistente (R) e suscetível (S) ao *Lysinibacillus sphaericus* IAB59.



Fonte: Autora

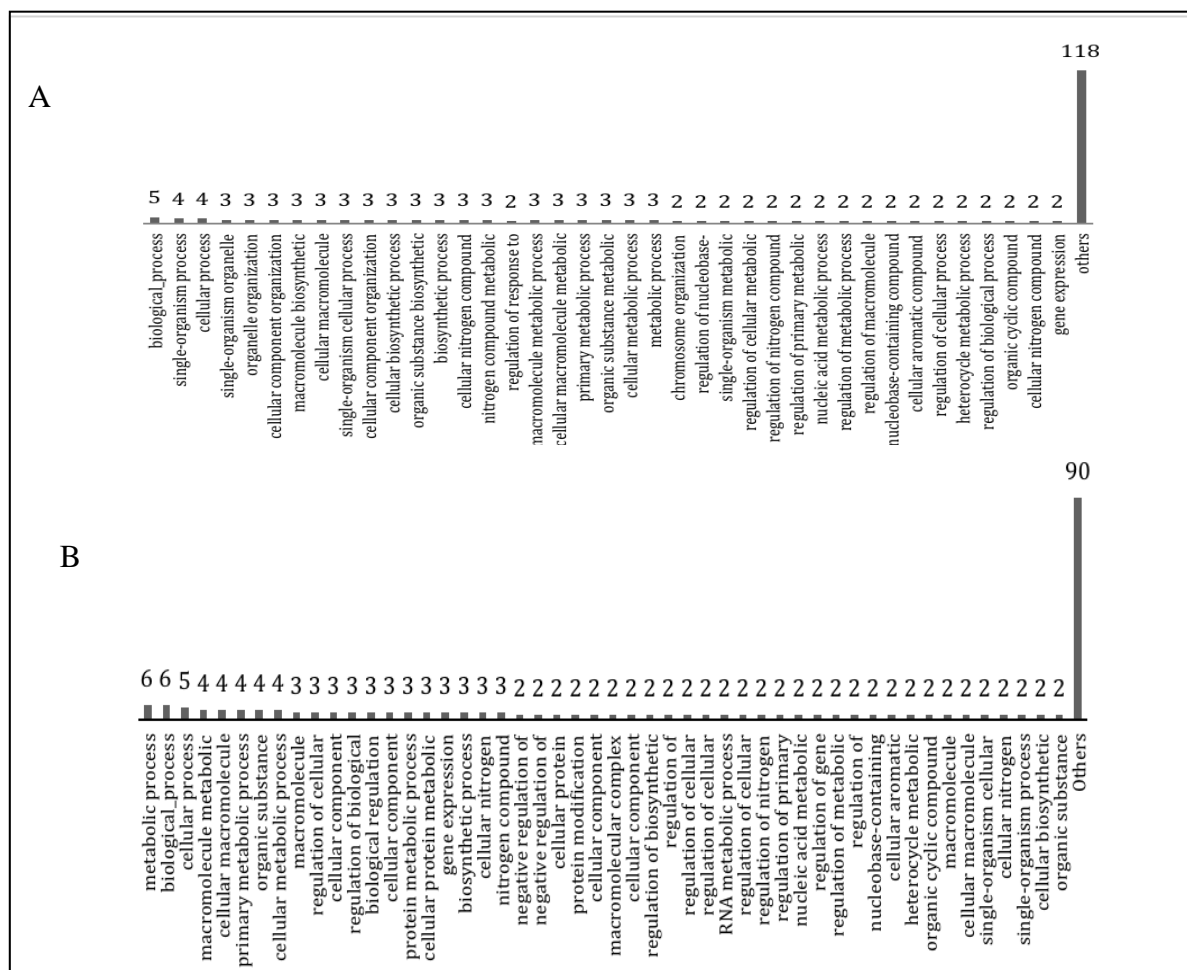
Figura 20 - Número de genes diferencialmente expressos (DEGs) para as colônias de *Culex quinquefasciatus* resistente (R) e suscetível (S) ao *Lysinibacillus sphaericus* IAB59.



Fonte: Autora

É importante mencionar que no grupo de DEGs (1355) um número significativo (471) foi identificado como genes codificadores de proteínas hipotéticas. Estes DEGs foram primeiramente classificados em três categorias do Gene Ontology (GO): Processos Biológicos (BP), Componente celular (CC) e Função Molecular (MF). Nas duas colônias analisadas, para a categoria BP (Figura 21), um dos termos mais representativo foi “processos celulares”. Na categoria CC, os termos mais representativos foram “genes envolvidos em partes intracelulares” e “organelas ligadas a membrana”, e para MF, o termo “ligação à ion” foi o mais representado (dados não apresentados). Diversos termos que apareceram nestas três categorias agruparam apenas um gene sendo considerados pouco informativos para a comparação das colônias e por isso foram considerados como “outros” na figura 21.

Figura 21 – Classificação dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em *Culex quinquefasciatus* utilizando o Gene Ontology (GO) e termos enriquecidos na categoria “Processo Biológicos”.



Fonte: Autora

Legenda: A. colônia R. B. colônia S.

As análises baseadas nas vias metabólicas do KEGG possibilitou um maior entendimento sobre os processos biológicos nos quais esses genes DEGs poderiam desempenhar funções relevantes. O conjunto de 1355 genes foi mapeado em 122 vias KEGG

dos quais 38 apresentaram termos enriquecidos associados com a colônia R (Quadro 7), e 39 na colônia S (Quadro 8), e perfil de processos detectados para cada colônia é bastante distinto. Na colônia R destacaram-se vias metabólicas como proteólise mediada por ubiquitina (04120), *mTOR* (04150), *FoxO* (04068) e regulação de autofagia (04140) que são exemplos de processos biológicos que podem ser críticos para as larvas dessa colônia resistente. Análise das vias *mTOR* e *FoxO* mostrou que estas estão sob forte regulação pois, há vários genes super expressos. Estes podem ter um papel tanto na ativação, como na inibição, de fatores de diferentes processos envolvidos nestes mapas KEGG, como autofagia, lipólise, apoptose entre outros, sendo uma tarefa complexa compreender o efeito final da expressão diferencial nessas vias para o inseto (Figura 22 A e B). Além disso, essas vias são relacionadas com a defesa imune dos mosquitos e podem ser a primeira linha de defesa de *C. quinquefasciatus* contra as toxinas Bin ou Cry48Aa/Cry49Aa, ou, pelo menos, elas podem estar envolvidas de alguma maneira no modo de ação dessas toxinas. Outro grupo de vias que foi significativamente representado na colônia R foram aquelas relacionadas com síntese e manutenção do DNA como *DNA replication* (03030), *homologous recombination* (03440), *non-homologous end-joining* (03450), *mismatch repair* (03430), *base excision repair* (03410), *fanconi anemia pathway* (03460) e *nucleotide excision repair* (03420). Nestes casos, vários genes DEGs estão claramente envolvidos na promoção de replicação de DNA, reparação e processos relacionados, sendo um achado de expressão diferencial de destaque para esta colônia. Já as categorias mais representativas associados com a colônia S (Quadro 8) são distintas da colônia R e relacionadas com processos metabólicos com destaque para aqueles relacionados à síntese proteica. Além disso, diversos genes *heat shock* estão entre os genes mais representativos dessa colônia S.

Quadro 7 - Termos KEGG enriquecidos associados à colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente (R) ao *Lysinibacillus sphaericus* IAB59.

Termos Kegg enriquecidos	nº Genes	P valor_fdr	nº Via*
Metabolic pathways	21	2.90E-09	01100
Ubiquitin mediated proteolysis	8	1.69E-07	04120
FoxO signaling pathway	7	1.47E-07	04068
mTOR signaling pathway	6	1.47E-07	04150
Endocytosis	6	2.52E-05	04144
Base excision repair	5	3.33E-07	03410
Fanconi anemia pathway	5	1.14E-05	03460
Nucleotide excision repair	5	1.29E-05	03420
Glycerophospholipid metabolism	5	3.64E-05	00564
Spliceosome	5	1.30E-03	03040
RNA transport	5	2.16E-03	03013
Homologous recombination	4	6.85E-05	03440
Inositol phosphate metabolism	4	1.25E-04	00562
RNA degradation	4	9.87E-04	03018
Ribosome biogenesis in eukaryotes	4	3.19E-03	03008
Protein processing in endoplasmic reticulum	4	6.61E-03	04141
Mismatch repair	3	6.69E-04	03430
Starch and sucrose metabolism	3	1.18E-03	00500
DNA replication	3	2.61E-03	03030
Phosphatidylinositol signaling system	3	3.52E-03	04070
Glutathione metabolism	3	4.46E-03	00480
Amino sugar & nucleotide sugar metabolism	3	5.95E-03	00520
Wnt signaling pathway	3	7.24E-03	04310
mRNA surveillance pathway	3	1.27E-02	03015
Carbon metabolism	3	1.32E-02	01200
Microbial metabolism diverse environments	3	3.25E-02	01120
Purine metabolism	3	4.19E-02	00230
Non-homologous end-joining	2	2.17E-03	03450
Folate biosynthesis	2	5.95E-03	00790
Regulation of autophagy	2	7.60E-03	04140
Jak-STAT signaling pathway	2	7.60E-03	04630
MAPK signaling pathway - fly	2	9.28E-03	04013
Fructose and mannose metabolism	2	9.98E-03	00051
Dorso-ventral axis formation	2	1.27E-02	04320
TGF-beta signaling pathway	2	1.63E-02	04350
Basal transcription factors	2	2.97E-02	03022
Biosynthesis of amino acids	2	4.75E-02	01230
Steroid biosynthesis	1	3.98E-02	00100

Fonte: Autora

Legenda: *Aa vias podem ser consultadas em www.genome.jp/kegg/

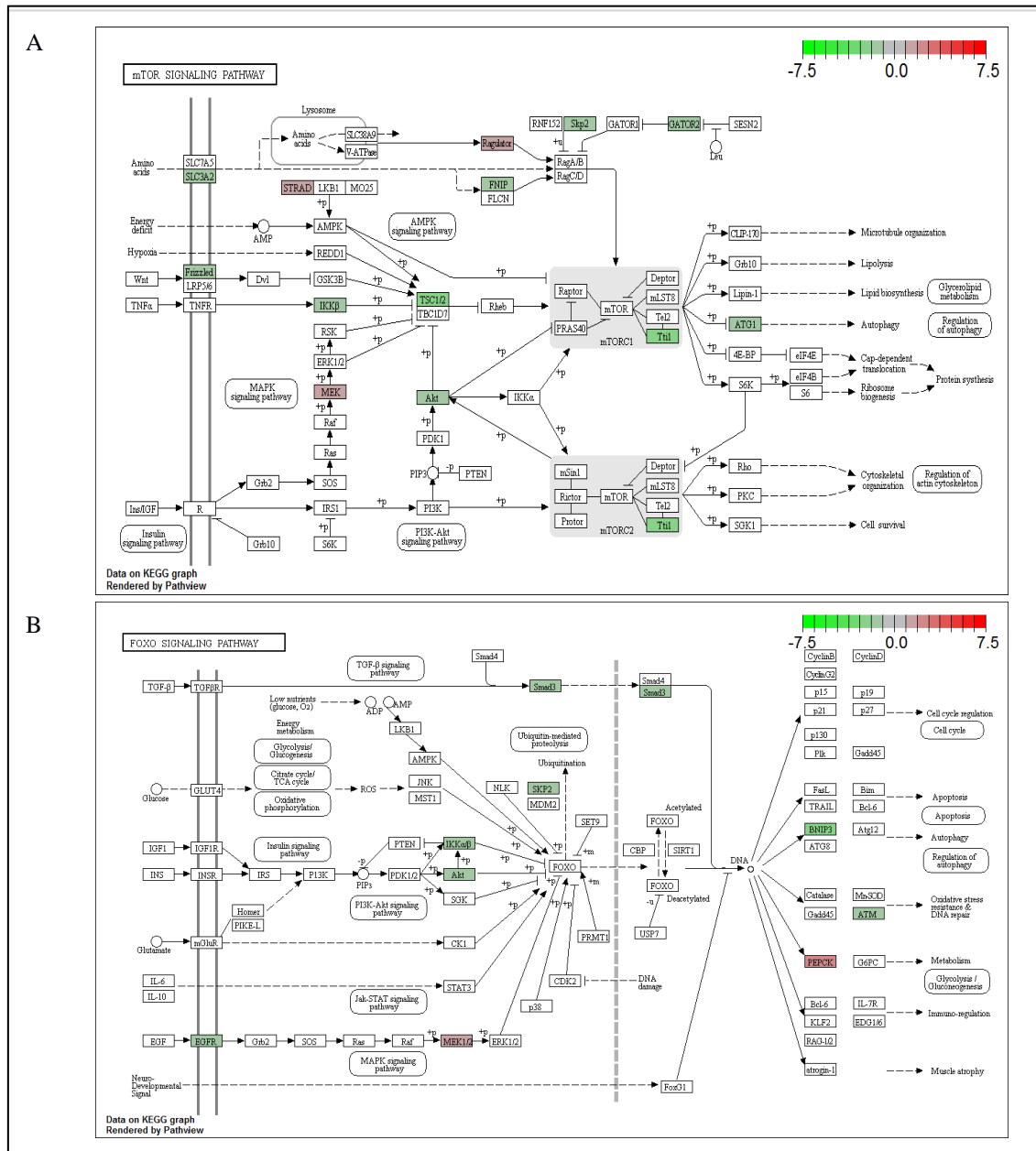
Quadro 8 - Termos KEGG enriquecidos associados à colônia de *Culex quinquefasciatus* suscetível (S) ao ao *Lysinibacillus sphaericus* IAB59.

Termos Kegg enriquecidos	n° Genes	P value_fdr	N° via*
Metabolic pathways	46	2.73E-28	1100
Protein processing in endoplasmic reticulum	22	7.47E-24	4141
Ribosome biogenesis in eukaryotes	12	4.82E-11	3008
Purine metabolism	13	1.26E-10	230
Pyrimidine metabolism	11	2.51E-10	240
Ribosome	11	3.91E-08	3010
RNA transport	10	6.58E-07	3013
Microbial metabolism in diverse environments	9	1.14E-06	1120
Pyruvate metabolism	6	1.52E-06	620
Protein export	5	4.70E-06	3060
Spliceosome	8	1.98E-05	3040
RNA degradation	6	2.89E-05	3018
Glutathione metabolism	5	1.16E-04	480
Endocytosis	6	1.83E-04	4144
Phagosome	5	2.12E-04	4145
RNA polymerase	4	3.40E-04	3020
Glycolysis / Gluconeogenesis	4	4.77E-04	10
Synthesis and degradation of ketone bodies	2	2.58E-03	72
Cysteine and methionine metabolism	3	2.59E-03	270
Sphingolipid metabolism	3	3.52E-03	600
Peroxisome	3	4.46E-03	4146
Citrate cycle (TCA cycle)	3	5.95E-03	20
Selenocompound metabolism	3	7.24E-03	450
Carbon metabolism	3	1.27E-02	1200
Arginine and proline metabolism	3	1.32E-02	330
ABC transporters	3	3.25E-02	2010
Ubiquitin mediated proteolysis	3	4.19E-02	4120
Glycerophospholipid metabolism	2	2.17E-03	564
FoxO signaling pathway	2	5.95E-03	4068
Ether lipid metabolism	2	7.60E-03	565
Butanoate metabolism	2	7.60E-03	650
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2	9.28E-03	630
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	2	9.98E-03	980
Drug metabolism - cytochrome P450	2	1.27E-02	982
Fructose and mannose metabolism	2	1.63E-02	51
Caffeine metabolism	2	2.97E-02	232
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	2	4.75E-02	250
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	1	3.98E-02	471
Glycine, serine and threonine metabolism	2	4.86E-02	260

Fonte: Autora

Legenda: *Aa vias podem ser consultadas em www.genome.jp/kegg

Figura 22 – Exemplos de vias metabólicas geradas pelo KEGG (www.genome.jp/kegg) que exibem um conjunto de genes com expressão diferencial em larvas de *Culex quinquefasciatus* resistentes ao *Lysinibacillus sphaericus* IAB59.



Fonte: Autora
 Legenda: A. Via mTOR n° 04068. B. e via FoxO n° 04150.

O terceiro nível de análise foi uma curadoria manual de 51 genes, a partir do conjunto de 1355 genes DEGs (Quadros 9 e 10), que apresentaram valor elevado de *log2Foldchange*, p-valor significativo nas colônias S ou R e pelo sua potencial associação com respostas biológicas à seleção pelas toxina Bin ou Cry48Aa/Cry49Aa. Esses genes foram selecionados a partir de vias KEGG anteriormente apresentadas, enquanto que outros não fazem parte de nenhum dos mapas KEGG visto que muitos processos biológicos não estão

contemplados por esta abordagem mas podem ter relevância biológica no modelo investigado. Um exemplo é o gene CPIX013173, que codifica o receptor Cqm1, o qual não está representado em nenhum mapa KEGG disponível e é de extrema relevância para este estudo. É importante ainda mencionar que este gene está anotado nas bases de dados como *neutral and basic amino acid transport protein rBAT* embora sua caracterização como α -glicosidase que atua como o receptor da toxina Bin tenha sido previamente descrita.

Dentre os genes selecionados na colônia R como super expressos, destaca-se o gene que codifica a *2-hydroxyacyl-CoA lyase 1* (Quadro 9, nº 1) envolvido no metabolismo lipídico na via do peroxissoma (Via KEGG nº 04146), e mostrou o maior nível de super-expressão nesta colônia, embora outros genes envolvidos neste processo tenham sido encontrados sub expressos nestas larvas (Quadro 10, nº 36-39). Conforme demonstrado pela análise de KEGG, vários DEGs super-expressos nas larvas resistentes são genes envolvidos na replicação, recombinação e reparo de DNA (Quadro 9, nº 2-14). Do mesmo modo, proteínas *zinc finger*, relacionadas à estabilidade e manutenção da estrutura de DNA e proteínas, também estão super expressos nas colônias resistentes (Quadro 9, nº 15-17). Serino proteases exibiram um padrão de super-expressão nas colônias resistentes (Quadro 9, nº 18-23). Essas proteínas podem estar potencialmente envolvidas no processamento de protoxinas, bem como na resposta imune dos mosquitos. Kinases e enzimas relacionadas (Quadro 9, nº 24-29) envolvidas na resposta imune, como *rac serine/threonine kinase* e Tsc1 envolvidas nas vias *mTOR*, *FoxO* e vias de autofagia, são também exemplos de genes super expressos na colônia resistente, bem como genes pertencentes à família citochrome P450 (Quadro 9, nº 30-32).

Entre os genes sub expressos nas larvas resistentes os genes da panteteinase e vanin (Quadro 10, nº 33-34) apresentaram os maiores níveis, mas a função destas proteína ainda é pouco conhecida. Esses genes codificam proteínas que atuam na catálise da D-panteteina em pantotenato (vitamina B5) cuja função tem sido associada à mecanismos de adaptação ao estresse. A detecção deste gene nas condições de expressão diferencial em larvas da colônia R foi um achado inédito pois, não há relato na literatura de seu envolvimento no modo de ação de toxinas do Lsp ou de Bt. O gene que codifica a α -glicosidase Cqm1 (Quadro 10, nº 35), que é o receptor de toxina Bin, foi um dos genes com maior valor de sub-expressão na colônia resistente (*log2foldchange* 4.64 e p-valor 9,14E-304) sendo um marcador robusto da alta resistência desta colônia à toxina Bin. Um grande número de genes *heat shock* também foram encontrados sub-expressos nas larvas R (Quadro 10, nº 40-48), bem como genes envolvidos na via de apoptose mediada por dano mitocondrial como o cytochrome c, caspase-3 precursor,

e apoptosis-inducing factor 1 mitochondrial (Quadro 10, nº 49-51), que é um processo diretamente relacionado ao modo de ação da toxina Bin.

Quadro 9 – Seleção de genes super expressos na colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente (R) ao *Lysinibacillus sphaericus* IAB59.

Nº	gene_id	Descrição	Log2 Fold change	p-valor
1	CPIJ014172	2-hydroxyacyl-CoA lyase 1 (HPCL2)	-5,33	1,61E-24
2	CPIJ019303	transcription termination factor 2	-3,45	2,06E-08
3	CPIJ015649	DNA-binding protein smubp-2, putative	-3,38	4,23E-08
4	CPIJ010133	structural maintenance of chromosomes smc2	-3,18	1,81E-08
5	CPIJ005091	DNA replication licensing factor MCM8	-2,66	4,77E-08
6	CPIJ018287	DNA polymerase delta catalytic subunit	-2,40	3,08E-15
7	CPIJ008363	DNA replication licensing factor MCM1	-2,30	3,06E-05
8	CPIJ004115	DNA repair protein (RAD50)	-1,95	2,13E-10
9	CPIJ004184	DNA-repair protein complementing XP-G cells	-1,90	3,54E-07
10	CPIJ017892	replication factor C large subunit, putative	-1,88	4,96E-07
11	CPIJ007658	werner syndrome helicase	-1,75	9,12E-05
12	CPIJ000972	DNA-directed RNA polymerase, mitoc. precursor	-1,75	5,83E-14
13	CPIJ011036	helicase	-1,65	4,37E-04
14	CPIJ010018	DNA topoisomerase 2	-1,60	1,66E-06
15	CPIJ000178	zinc finger protein 60	-2,03	2,86E-06
16	CPIJ017035	zinc finger protein 141	-2,00	2,35E-04
17	CPIJ017371	phd finger protein	-2,00	2,69E-07
18	CPIJ013616	trypsin 5 precursor	-2,17	1,61E-04
19	CPIJ006542	chymotrypsin-2	-1,23	7,80E-04
20	CPIJ002098	chymotrypsin BI precursor	-1,65	1,15E-05
21	CPIJ011720	dipeptidyl-peptidase	-3,18	3,49E-07
22	CPIJ008523	serine-type endopeptidase, putative	-2,21	1,55E-04
23	CPIJ012013	serine protease inhibitor, serpin	-1,71	3,00E-04
24	CPIJ009147	serine/threonine-protein kinase chk2	-2,52	4,86E-05
25	CPIJ007517	protein kinase C-binding protein 1	-1,78	1,15E-14
26	CPIJ006434	dihydroxyacetone kinase	-1,71	1,12E-18
27	CPIJ003639	S-phase kinase-associated protein 2	-1,54	3,85E-03
28	CPIJ007754	rac serine/threonine kinase (AKT)	-1,35	1,41E-04
29	CPIJ000640	Tsc1 (Tsc1)	-1,24	2,53E-12
30	CPIJ006721	CYP4H37: cytochrome P450 4H37	-2,19	4,38E-49
31	CPIJ019765	CYP9M14: cytochrome P450 9M14	-2,18	2,85E-05
32	CPIJ019751	CYP6AG16: cytochrome P450 6AG16	-2,01	1,08E-05

Fonte: Autora

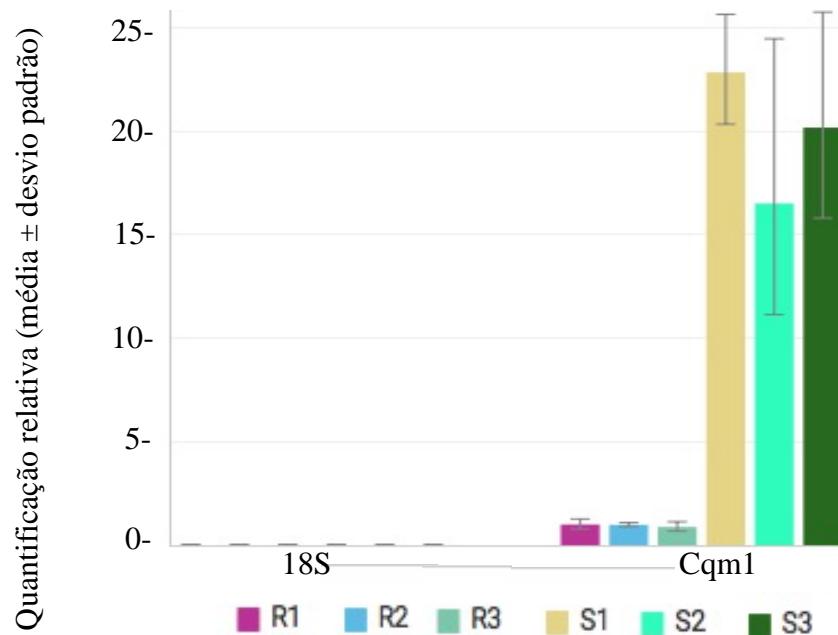
Quadro 10 – Seleção de genes super expressos na colônia de *Culex quinquefasciatus* suscetível (S) ao *Lysinibacillus sphaericus* IAB59.

Nº	gene_id	Descrição	Log2 Fold change	p-valor
33	CPIJ017593	pantetheinase precursor	7,13	1,51E-49
34	CPIJ017592	Vanin-like protein 1 precursor, putative	6,14	1,06E-31
35	CPIJ013173	neutral & basic amino acid transport protein rBAT-Cqm1	4,65	9,14E-304
36	CPIJ018744	apolipoprotein D, putative	4,10	6,54E-13
37	CPIJ011083	apolipoprotein D, putative	3,34	4,17E-10
38	CPIJ008659	lipase 3 precursor	3,52	8,39E-18
39	CPIJ005643	lipase	2,94	4,80E-71
40	CPIJ011083	heat shock protein 70 B2	4,58	1,90E-13
41	CPIJ018624	heat shock protein 22	3,63	1,38E-08
42	CPIJ016451	heat shock protein 70 B2	3,37	1,95E-07
43	CPIJ015727	heat shock protein 83	3,16	4,56E-17
44	CPIJ019704	heat shock protein 83	3,05	4,56E-14
45	CPIJ007228	heat shock protein, putative	2,58	1,52E-32
46	CPIJ011246	heat shock protein 83	2,20	7,83E-09
47	CPIJ008889	60 kDa heat shock protein, mit. precursor	2,19	5,88E-09
48	CPIJ011247	heat shock protein 82	2,12	4,55E-11
49	CPIJ019024	cytochrome c	2,23	2,20E-94
50	CPIJ012580	Caspase-3 precursor	2,05	1,41E-12
51	CPIJ002642	apoptosis-inducing factor 1, mit. precursor	1,08	3,04E-05

Fonte: Autora

Nos ensaios de validação dos dados obtidos pela análise de RNAseq foi realizada a análise de qRT-PCR para comparar os níveis de expressão relativa do transcrito Cqm1 nas colônias S e R analisadas (Figura 23). Como esperado a expressão relativa deste gene foi ≈ 21 vezes superior nas larvas da colônia S, quando comparado com sua expressão nas larvas da colônia R. Além disso, a curva de dissociação dos primers mostrou apenas um pico de melting (temperatura de dissociação) nas amostras das duas colônias, indicando um sinal específico para o alvo (Figura 24). E, para o gene endógeno, também ocorre boa eficiência de amplificação (LIU et al., 2011). Estes dados afirmam que a análise dessas colônias S e R de *C. quinquefasciatus* através da metodologia de RNAseq foi eficiente mostrando que as colônias possuem um perfil distinto de expressão gênica. No entanto deve ser ressaltado que, dentre os potenciais receptores identificados para a toxina Cry48Aa/Cry49Aa nos ensaios de *pull-down*, nenhum deles apresentou uma diferença significativa no seu perfil de expressão, com exceção de duas proteínas (panteteinase e vanin) que tiveram um grande destaque nas análise de RNAseq pelo sua significativa super expressão na colônia S em relação à colônia R.

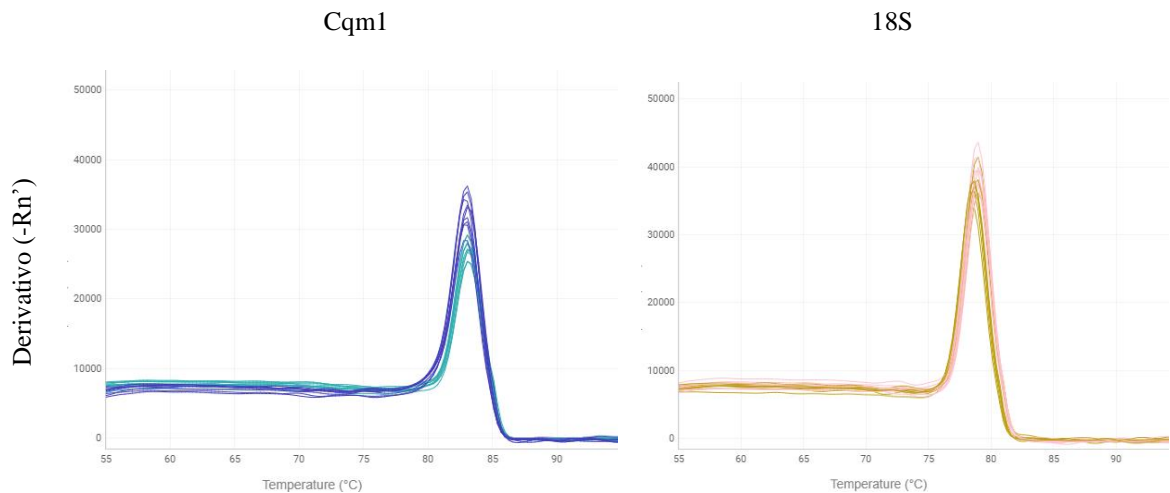
Figura 23 - Expressão relativa dos transcritos do gene *cqm1* em larvas de *Culex quinquefasciatus* das colônias S e R.



Fonte: Autora

Legenda: Replicatas biológicas da colônia resistente (R1; R2; R3) e suscetível (S1; S2; S3) normalizadas a partir da expressão do gene endógeno 18S.

Figura 24 - Curva de dissociação da qRT-PCR em tempo real do gene *Cqm1* e controle endógeno da reação (18S).



Fonte: Autora

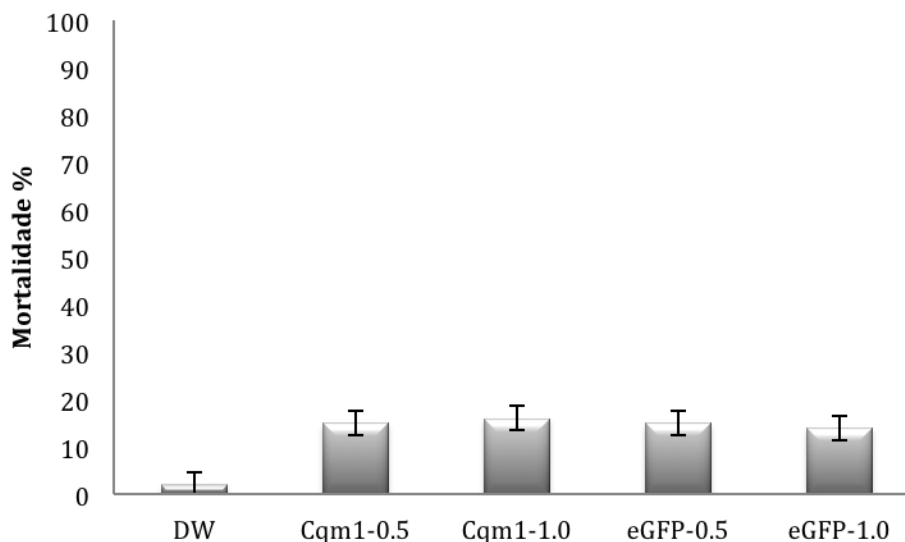
Legenda: Gene *Cqm1* $T_m = 83,05^\circ \text{C}$. Gene 18S $T_m = 78,81^\circ \text{C}$.

8.9 Avaliação funcional de genes por RNA de interferência

Neste estudo foi feita uma avaliação inicial da função de algumas proteínas apontadas nas análises através de silenciamento gênico por RNA de interferência em larvas de *Culex*

quinquefasciatus. A aplicação desta técnica para larvas de mosquitos ainda não foi amplamente padronizada e ainda representa desafios em relação a alguns parâmetros como a entrega adequada dos RNAs de dupla fita (dsRNA) para o alvo e mortalidade elevada de insetos tratados. Desta maneira, primeiramente foi necessário validar a metodologia descrita na seção 7.11, baseada na eclosão das larvas em uma gota de dsRNA adaptada de Meleshkevitch et al. (2013) para larvas de *C. quinquefasciatus*. A técnica foi padronizada utilizando-se como alvo o gene *cqm1* por codificar o receptor já conhecido nesta espécie de mosquito para a toxina Bin, pelo fenótipo comprovado de resistência das larvas e por este gene ter sido um marcador robusto de expressão diferencial nas análises de RNAseq. Os grupos de ovos teste (dsRNA-Cqm1) e controle (dsRNA-eGFP) tiveram uma média de eclosão das larvas equivalente e suficiente para realização das análises. A eclosão de larvas na presença de dsRNA induziu a mortalidade (14-16%) nos grupos teste e controle independente da concentração de dsRNA utilizada, quando comparado com a mortalidade das larvas que eclodiram em água (2%) (Figura 25). Apesar desta mortalidade ter sido mais elevada nos grupos testados ela não foi crítica na execução dos experimentos.

Figura 25 - Mortalidade de larvas de *Culex quinquefasciatus* após eclosão em dsRNA (Cqm1 ou eGFP, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ou água.



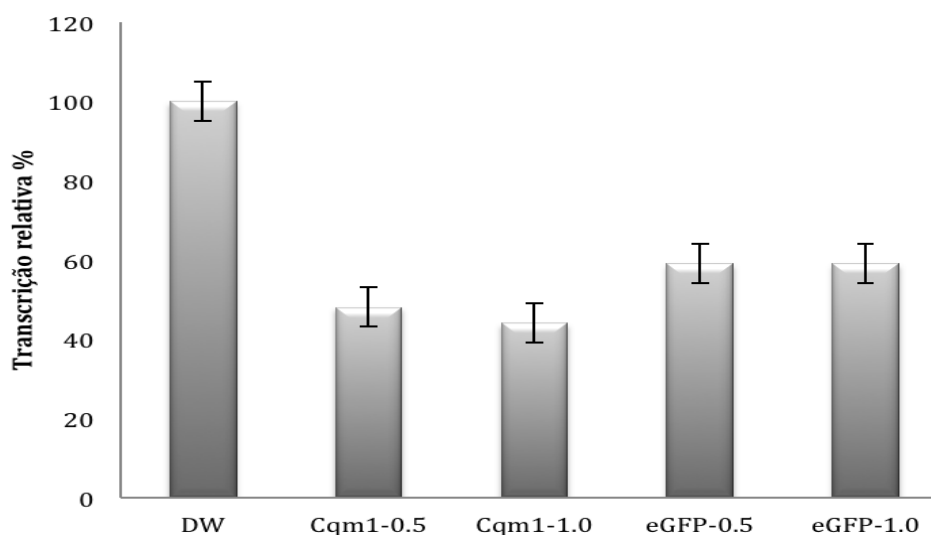
Fonte: Autora

Legenda: Média dos valores normalizados para a água (DW) \pm erro padrão para $n = 3$.

Para se determinar o efeito do RNAi sobre os transcritos analisados foi realizada a qRT-PCR. As amostras tratadas com dsRNA-Cqm1 silenciaram o gene alvo *cqm1* em 52 e 56% dependendo da concentração utilizada do dsRNA quando comparado com o controle água (Figura 26). O controle com dsRNA-eGFP também apresentou transcrição reduzida. O efeito da redução da expressão de Cqm1 sobre a toxicidade da toxina Bin para larvas de 3º

estádio de *C. quinquefasciatus* foi avaliada através dos ensaios de toxicidade *in vivo*. A mortalidade 48h após tratamento das larvas alimentadas com dsRNA-Cqm1 mostrou que estas se tornaram mais tolerantes à toxina Bin quando comparadas com aquelas alimentadas com dsRNA-eGFP. A toxicidade da Bin foi reduzida entre 10-20% após as larvas terem sido alimentadas com dsRNA-Cqm1 comparado com o grupo controle (Tabela 3). Os resultados obtidos nestes ensaios indicam que a metodologia de RNAi utilizada pode ser viável para larvas de *C. quinquefasciatus* e que o efeito pode ter sido causado pela absorção inicial dos dsRNA após eclosão das larvas dos mosquitos. O método visa otimizar o contato dos dsRNA neste período do ciclo quando as larvas absorvem uma quantidade significativa de partículas.

Figura 26 - Expressão relativa dos transcritos do gene *cqm1* após seu silenciamento em larvas de *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Autora

Legenda: Larvas eclodidas em dsRNA (*cqm1* ou *eGFP*, µg/µl) ou água (DW) e normalizadas utilizando o gene endógeno 18S. Quantidade relativa média dos transcritos ± desvio padrão para n= 3

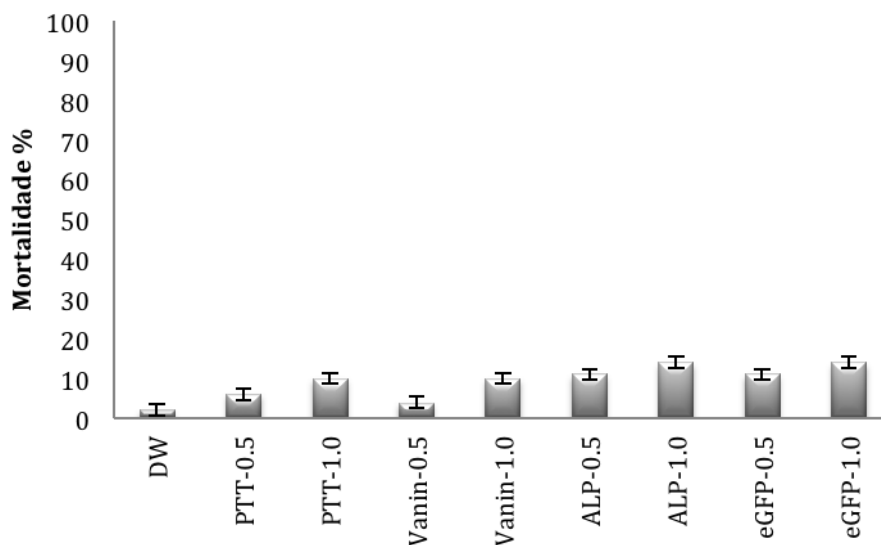
Tabela 3 - Atividade da toxina Binária para larvas do 3º instar de *Culex quinquefasciatus* (S_UGA) após 48h de exposição. As larvas foram submetidas ao silenciamento gênico por RNAi (dsRNA) durante o 1º instar.

Concentração da toxina (mg/L)	Mortalidade (%)			
	dsRNA-Cqm1 (µg/µl)		dsRNA-eGFP (µg/µl)	
	0.5	1.0	0.5	1.0
0	10	10	10	10
0.005	57	43	67	67
0.01	37	60	57	73

Fonte: Autora

A partir destes resultados, foi realizado o silenciamento gênico por RNAi para alguns alvos selecionados como possíveis receptores para a toxina Cry48Aa/Cry49Aa de Lsp em *Culex quinquefasciatus* a saber: panteteinase (PTT, CPIJ017593), vanin (Vanin, CPIJ017592) e fosfatase alcalina (ALP, CPIJ001265). O mesmo procedimento realizado para o gene *cqm1* foi adotado nesta avaliação. Estes alvos foram selecionados, pois, a panteteinase e vanin são novas proteínas reveladas em todas as análises realizadas neste trabalho e a ALP foi revelada pelo ensaio de *pull-down* como um dos possíveis ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa, cujo ortólogo em outros insetos já foi descrito como receptor para outras toxinas Cry. Apesar do estudo ter revelado outros candidatos, foi feita uma seleção reduzida de alvos devido às limitações de execução da técnica. Todos os grupos testados tiveram uma média de eclosão das larvas equivalente e suficiente para realização das análises. A eclosão das larvas na presença de dsRNA induziu a mortalidade nos grupos experimentais (dsRNA-PTT, vanin e ALP) e no grupo controle (dsRNA-eGFP) (4-14%) quando comparado com a mortalidade das larvas que eclodiram em água (2%) (Figura 27).

Figura 27 - Mortalidade de larvas de *Culex quinquefasciatus* após eclosão em dsRNA (PTT, vanin, ou ALP, em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ou água.



Fonte: Autora

Legenda: Média dos valores normalizados para a água (DW) \pm erro padrão para n= 3.

Devido a problemas operacionais não foi possível realizar a qRT-PCR desses alvos para determinar o efeito do RNAi sobre os transcritos analisados em tempo hábil, durante o doutorado sanduíche no exterior. Contudo os ensaios de toxicidade *in vivo* foram realizados e mostraram que a mortalidade registrada após 48h foi similar (40-60%) entre o alvo dsRNA-PTT e o controle dsRNA-eGFP na maior concentração (5 mg/L) utilizada da toxina Cry48Aa/Cry49Aa (Tabela 4). Em contrapartida, larvas alimentadas com dsRNA-vanin ou

dsRNA-ALP tornaram-se mais tolerantes à toxina Cry48Aa/Cry49Aa para a dose de 5.0 mg/L pois a toxicidade da Cry48Aa/Cry49Aa foi reduzida entre 10-30%, comparado com os grupos controle. Os valores observados na menor concentração de toxina testada (1 mg/L) não apresentaram dados coerentes nem para o grupo controle e nem para os alvos tratados. Estes dados são promissores e sugerem que essas moléculas podem estar envolvidas de alguma maneira no modo de ação da toxina Cry48Aa/Cry49Aa. Neste sentido novos experimentos devem ser realizados para se ajustar melhor esta técnica e confirmar a importância destes alvos bem como de outros ligantes identificados neste estudo.

Tabela 4 - Atividade da toxina Cry48Aa/Cry49Aa para larvas do 3° instar de *Culex quinquefasciatus* (S_UGA) após 48h de exposição. As larvas foram submetidas ao silenciamento gênico por RNAi (dsRNA) durante o 1° instar.

Concentração da toxina (mg/L)	Mortalidade (%)							
	dsRNA-PTT		dsRNA-vanin		dsRNA-ALP		dsRNA-eGFP	
	(µg/µl)							
	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0
0	10	10	10	10	10	10	10	10
1	40	47	30	10	37	10	10	23
5	60	40	23	30	20	23	40	50

Fonte: Autora

9 DISCUSSÃO

No âmbito dos estudos do modo de ação das toxinas inseticidas produzidas por bactérias entomopatógenas, a identificação dos receptores e de outras proteínas dos insetos envolvidas na interação com estas toxinas é um aspecto essencial para o desenvolvimento de estratégias capazes de contornar o fenômeno de resistência. A detecção de populações de *Culex quinquefasciatus* resistentes ao *Lysinibacillus sphaericus*, pode limitar o uso deste biolarvicida que é uma ferramenta efetiva que vem sendo empregada no controle de mosquitos vetores. A toxina Cry48Aa/Cry49Aa demonstrou uma alta eficácia para larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes à toxina Bin e a caracterização do seu modo de ação é, portanto, fundamental para o manejo da resistência a outras toxinas já utilizadas.

A primeira etapa deste estudo visou avaliar a suscetibilidade de larvas de *C. quinquefasciatus* de uma colônia suscetível (S), e outra resistente ao Lsp IAB59 (R) e de larvas da colônia de *Aedes aegypti* (Ae) à toxina Cry48Aa/Cry49Aa. Nossos resultados comprovaram que as protoxinas Cry48Aa/Cry49Aa recombinantes produzidas neste estudo exibiram atividade *in vivo* para larvas de *C. quinquefasciatus* da colônia S enquanto que larvas da colônia R apresentaram uma resistência moderada. Esses resultados estão de acordo com dados da literatura, contudo, o nível de resistência encontrado para a colônia R foi inferior àquele detectado em avaliações prévias (AMORIM et al., 2007; DE MELO et al., 2009). A colônia R tem sido mantida sob pressão de seleção com a cepa IAB59 do Lsp que produz ambas as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa e Bin. A resistência à toxina Bin foi selecionada muito antes (PEI et al., 2002, SILVA-FILHA et al., 2004) do que a resistência a todo conjunto de toxinas produzido pela cepa IAB59 de Lsp (AMORIM et al., 2007). É possível que a ausência de concentrações equimolares dos dois componentes nos pós liofilizados da cepa IAB59 do Lsp usados no procedimento de seleção não ofereça as condições ideais para manter um nível ótimo de toxicidade e, conseqüentemente, de pressão de seleção da resistência a este composto. Estes ensaios também visaram fazer uma avaliação da suscetibilidade de *Ae. aegypti* à toxina Cry48Aa/Cry49Aa, pois, o único registro do espectro de ação desta toxina para alguns culicídeos feito por Jones et al. (2008), descreve que esta espécie é refratária à toxina Cry48Aa/Cry49Aa porém não apresenta dados comparativos das concentrações letais da toxina. Nossos resultados estão em acordo com Jones et al. (2008) pois, as larvas de *Ae. aegypti* não mostraram uma mortalidade significativa, em concentrações da Cry48Aa/Cry49Aa que foram letais para as larvas de *C. quinquefasciatus*. A concentração letal estimada para 50% das larvas de *Ae. aegypti* foi cerca de cem vezes superior àquela

detectada para *C. quinquefasciatus* da colônia S. Estes dados mostraram ainda que larvas de *Ae. aegypti* e de *C. quinquefasciatus* da colônia R poderiam ser utilizadas em análises comparativas com larvas de *C. quinquefasciatus* suscetíveis, para investigar moléculas relevantes no modo de ação da toxina Cry48Aa/Cry49Aa.

O principal objetivo deste estudo foi identificar os ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa do Lsp, bem como outras moléculas envolvidas no seu modo de ação, considerando que esses receptores são distintos do receptor Cqm1 da toxina Binária, visto que não ocorre resistência cruzada entre estas toxinas (DE MELO et al., 2009). Para esta avaliação as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa ativadas *in vitro* foram obtidas para seu emprego nos ensaios de ligação. As protoxinas Cry necessitam de um processamento proteolítico para exercer sua atividade inseticida (BERRY, 2012; TABASHNIK et al., 2015) e um padrão de ativação correto das toxinas é essencial uma vez que, em alguns casos já foi observado que uma ativação ineficiente ou exacerbada, pode resultar em perda de atividade ou de especificidade da toxina para a espécie alvo (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001). As toxinas Cry48Aa e Cry49Aa processadas *in vitro* neste estudo exibiram um padrão de ativação semelhante aquele observado em um estudo prévio em que toxinas exibindo este mesmo padrão exibiram atividade *in vivo* para larvas, comprovando sua funcionalidade (JONES et al., 2008). Outro estudo mostrou que as subunidades ativadas individualmente apresentaram a capacidade de se ligar com alta afinidade a receptores do microvilli intestinal (BBMF) de *C. quinquefasciatus* (GUO et al., 2016). Por outro lado, uma avaliação feita em nosso estudo demonstrou que o mix Cry48Aa/Cry49Aa liga-se à BBMF de *C. quinquefasciatus* com uma afinidade de ligação maior do que àquela detectada pelas toxinas individualmente (REZENDE et al., 2017). Este resultado sugere que ambas as subunidades desta toxina seriam necessárias para atingir a máxima capacidade de ligação à BBMF, ao contrário da toxina Bin cuja capacidade de ligação ao receptor depende exclusivamente da subunidade BinB (CHARLES et al., 1997). Outros estudos devem ser conduzidos para uma caracterização precisa dos domínios funcionais destas toxinas que são estruturalmente muito distintas.

Em razão desses achados, o mix Cry48Aa/Cry49Aa contendo as duas toxinas ativadas foi utilizado nos ensaios de ligação deste estudo e mostrou capacidade de ligação às proteínas intestinais de larvas de *C. quinquefasciatus* com tamanhos entre 50 e 120 kDa, que foram reveladas tanto por ensaios de ligação do tipo de *overlay* como de *pull-down*. A identificação por MS-MS e posterior refinamento manual apontou um grupo mais restrito de proteínas candidatas a receptor da toxina Cry48Aa/Cry49Aa, inclusive algumas que pertencem à classes previamente caracterizadas como receptores de toxinas Cry mosquitocidas, bem como

moléculas que podem estar potencialmente envolvidas no modo de ação desta toxina, mas que ainda não foram caracterizadas como tal.

Os principais candidatos revelados por esta análise compreendem APNs/metaloproteases que podem atuar como receptores para toxinas Cry em diferentes insetos. Em mosquitos foram identificados APNs como receptores para as toxinas Cry11Ba, Cry11Aa e Cry4Ba em *Anopheles quadrimaculatus* (ABDULLAH; VALAITIS; DEAN, 2006), *An. gambiae* (ZHANG et al., 2008) e *Ae. aegypti* (AROONKESORN et al., 2015; CHEN et al., 2009b, 2013; LIKITVIVATANAVONG et al., 2011). O tamanho aparente de algumas APNs identificadas foi diferente de seu tamanho predito sugerindo que degradação proteolítica e/ou formação de dímeros com alto peso molecular possa ser responsável por estas diferenças. Algumas das APNs detectadas em nosso estudo são ortólogos, com mais de 60% de identidade, dos receptores conhecidos citados acima, o que enfatiza seu possível papel como receptores da toxina Cry48Aa/Cry49Aa.

Maltases tais como α -glicosidases e α -amilases, embora menos numerosas que as APNs, também foram identificadas entre os potenciais ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa. Proteínas desta classe exercem um papel primordial na digestão de carboidratos de culicídeos (FOSTER, 1995) e, elas também têm sido descritas como receptores de toxinas inseticidas. As α -amilases já foram identificadas como receptores para as toxinas Cry11Aa e Cry4Ba em *An. albimanus* (FERNANDEZ-LUNA et al., 2010) e para a toxina Cry11Ba em *An. gambiae* (ZHANG et al., 2013). As α -glicosidases ortólogas Cpm1, Cqm1 e Agm3 são, por exemplo, os receptores da toxina Bin em *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus* e *An. gambiae*, respectivamente (DARBOUX et al., 2001; OPOTA et al., 2008; ROMÃO et al., 2006). A proteína Agm3 também foi identificada como receptor para a toxina Cry11Ba em *An. gambiae* (ZHANG et al., 2013). Em nosso trabalho α -glicosidases também foram identificadas como ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa incluindo a proteína Cqm1, que é o receptor da toxina Bin em *C. quinquefasciatus*. Como a toxina Cry48Aa/Cry49Aa é ativa para larvas resistentes a toxina Bin que não possuem o receptor Cqm1, este achado pode indicar que a ligação da Cry48Aa/Cry49Aa ao Cqm1 não é específica ou ainda que esta toxina pode se ligar a receptores alternativos. De fato, os nossos resultados confirmaram que a Cqm1 pode ligar-se a toxina Cry48Aa/Cry49Aa, porém, de uma forma muito reduzida comparada à ligação da subunidade BinB da toxina Bin a este receptor.

Em contraste com os grupos de APNs e maltases, somente três fosfatases alcalinas (ALPs) foram detectadas neste trabalho, e uma delas é um ortólogo em *Ae. aegypti* o qual foi identificado previamente como receptor da proteína Cry4Ba (BAYYAREDDY et al., 2009).

Este resultado foi inesperado uma vez que ALPs são proteínas abundantes em BBMFs de insetos (FERNANDEZ et al., 2006). Um grande número de ALPs tem sido identificado como receptores funcionais de toxinas Cry no epitélio intestinal de larvas de mosquitos tais como os receptores para as toxinas Cry11Aa e Cry4Ba em *Ae. aegypti* (BAYYAREDDY et al., 2009; DECHKLAR et al., 2011; FERNANDEZ et al., 2006) e Cry11Ba em *An. gambiae* (HUA et al., 2009).

Algumas outras proteínas detectadas em nosso estudo como ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa em *C. quinquefasciatus* já foram identificadas como ligantes de toxinas Cry em outros insetos, porém, sua caracterização como receptor funcional ainda não foi realizada. Este é o caso da apolipoporfina, previamente identificada como ligante para a toxina Cry8Ea (SHU et al., 2015), dipeptidil-peptidase e glicosil transferase para a toxina Cry1Aa (ZHOU et al., 2016), e proibitina para as toxinas Cry4Ba e Cry3Aa (KUADKITKAN; SMITH; BERRY, 2012; OCHOA-CAMPUZANO et al., 2013). Nosso estudo também detectou, em acordo com trabalhos realizados anteriormente, proteínas intracelulares que fazem parte do citoesqueleto, como ligantes de toxinas Cry, tais como actina, miosina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (BAYYAREDDY et al., 2009; CHEN et al., 2010; KRISHNAMOORTHY et al., 2007; SHU et al., 2015; ZHOU et al., 2016). Proteínas mitocondriais também foram detectadas em nosso trabalho e as mais relevantes foram as V-ATPases e α e β -ATP sintases, que por sua vez já foram identificadas como ligantes de toxinas Cry (BAYYAREDDY et al., 2009; CHEN et al., 2010; KRISHNAMOORTHY et al., 2007; ZHOU et al., 2016). Entretanto, a presença dessas proteínas entre os ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa em *C. quinquefasciatus* sugere uma evidência de contaminação nas preparações de BBMF. Além destas, outras proteínas não caracterizadas anteriormente como proteínas de ligação às toxinas Cry também foram identificadas em nosso trabalho, incluindo aldeído desidrogenase, ATPase transportadora de cálcio do retículo sarcoplasmático/endoplasmático, carboxilesterase 6, carboxipeptidase A1, fasciclina, maltose fosforilase, panteteinase, ATPase alpha transportadora de sódio e potássio, sodio-potássio-dependente de ATPase subunidade beta-2, transferrina, lectina ligadora de manose, e vanin-semelhante a proteína 1. Contudo, a relevância funcional dessas proteínas no modo de ação de toxinas Cry ainda é desconhecida.

O perfil proteômico comparativo das larvas de *C. quinquefasciatus* das colônias S e R foi obtido para indicar proteínas diferencialmente expressas entre as colônias que pudessem subsidiar a identificação de ligantes/receptores da toxina Cry48Aa/Cry49Aa. Porém, o número de *spots* encontrados no nosso estudo, 150 e 100 para as colônias S e R

respectivamente, foi considerado reduzido comparado a outros trabalhos que avaliaram o perfil protéico intestinal de larvas de *Ae. aegypti* (BAYYAREDDY et al., 2009, 2012). Os diferentes métodos de coloração usados nestes estudos pode ter sido um fator que contribuiu para tais diferenças. Apesar deste número reduzido de *spots* foi observada uma boa correlação entre os géis e, após análise diferencial, foi possível verificar *spots* coincidentes entre os grupos, alguns spots diferencialmente expressos, além daqueles exclusivos de larvas suscetíveis e resistentes. Dos 122 *spots* enviados para MS, contendo os *spots* exclusivos e diferencialmente expressos, apenas 53 foram identificados e, destes, apenas três eram de larvas resistentes. A proteína Cqm1, marcador diferencial das colônias S e R, não foi detectado entre aquelas proteínas identificadas por este método. Análises proteômicas baseadas na metodologia de 2DE/MS são indicadas para detectar mudanças quantitativas na expressão de proteínas. No entanto, a separação de proteínas através de 2DE possui limitações como, por exemplo, a separação e detecção ineficiente de proteínas de membrana em pequenas quantidades, ou com valores extremos de pI ou de massa molecular. Assim, quando a 2DE/MS é comparada com outras metodologias como a LC/MS, por exemplo, ela é considerada menos sensível e detecta um número menor de proteínas (GARBIS; LUBEC; FOUNTOULAKIS, 2005).

Em contrapartida, a análise comparativa dessas colônias através da metodologia de RNAseq foi eficiente e gerou 7045 genes (correspondente à 36% do repertório total de *C. quinquefasciatus*) e os dados demonstraram que as colônias possuem um perfil distinto de expressão gênica. Fenótipos de resistência a agentes químicos ou biológicos podem ser encontrados após a exposição contínua dos insetos a estes componentes. Embora um grande número de estudos tenha como objetivo determinar quais são os mecanismos moleculares envolvidos em tais fenótipos, apenas alguns conseguiram identificar genes diretamente relacionados a eles. Um desses exemplos é o atual modelo de estudo relativo à caracterização da resistência de *C. quinquefasciatus* à toxina Bin do Lsp que está diretamente associada à ausência/redução dos receptores Cqm1 devido à mutações no seu gene (CHALEGRE et al., 2012, 2015; DARBOUX et al., 2007; GUO et al., 2013; ROMÃO et al. 2006). No presente estudo a abordagem de RNAseq revelou a expressão alterada deste gene bem como outros genes e vias que podem estar associadas com este fenótipo de resistência às toxinas mosquitocidas da cepa IAB59 do Lsp, na colônia R de *C. quinquefasciatus* mantida por um longo período (212 gerações) sob condições de laboratório. Como descrito a análise de RNAseq identificou um baixo padrão de expressão do transcrito *cqm1*, resultado que está de acordo com os dados biológicos (AMORIM et al., 2007) e moleculares (AMORIM et al.,

2010, CHALEGRE et al., 2015) os quais indicam que a resistência dessa colônia à toxina Bin é devido à baixa expressão do gene *cqm1* (CPIJ01317). Portanto este gene foi um marcador de expressão robusto, tendo em conta a sua concordância com o fenótipo de resistência e sua significância estatística expressiva nas larvas resistentes. Por outro lado deve ainda ser ressaltado que os candidatos identificados como possíveis ligantes para a toxina Cry48Aa/Cry49Aa nos nossos ensaios de ligação tais como aminopeptidases e α -glicosidases não apresentaram uma diferença significativa no seu perfil de expressão através da análise de RNAseq.

Apesar da baixa expressão comprovada do gene constitutivo *cqm1* a colônia R tem sido mantida por longo período indicando uma adaptação dos indivíduos resistentes a esta condição (AMORIM et al., 2010; CHALEGRE et al., 2015). Neste contexto este estudo também revelou vias metabólicas e genes que foram possivelmente co-selecionados para conferir a esta colônia a capacidade biológica de superar os efeitos inseticidas das toxinas da cepa IAB59 do Lsp, ou pelo, menos daqueles provocados pela toxina Bin. Dados do RNAseq revelaram outras proteínas com uma marcada redução de expressão na colônia R em relação à colônia S, com destaque para a panteteinase e vanin. Este achado foi mais significativo pois elas também foram identificadas nos ensaios de *pull-down* como potenciais ligantes para a toxina Cry48Aa/Cry49Aa. Estas são membros da família de proteínas denominadas *vanin-like* que podem ser expressas associadas às membranas celulares (PITARI et al., 2000). Embora sua função não seja muito conhecida, elas podem estar relacionadas com a regulação de respostas ao estresse oxidativo, a processos de detoxificação e reciclagem (BAYYAREDDY et al., 2012; PITARI et al., 2000; POPOVA-BUTLER; DEAN, 2009). Esses genes tiveram uma expressão diferencial cujo valor de *log2foldchange* foi ainda mais significativo do que o receptor *Cqm1* e este é um achado inédito visto que essas proteínas nunca foram relatadas como moléculas envolvidas no modo de ação das toxinas inseticidas de bactérias entomopatógenas. Esta expressão diferencial significativa no contexto deste estudo indica claramente a necessidade de uma investigação desses alvos.

Ainda em relação aos genes diferencialmente expressos e o modo de ação das toxinas Bin ou Cry, este estudo demonstrou que diversos genes codificantes de serino proteases estão super expressos nas larvas da colônia R. A ativação das protoxinas em toxinas ativas por serino proteases é o primeiro passo no processamento dessas toxinas no intestino das larvas (BERRY, 2012; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007) e dados prévios já relataram mudanças no processamento proteolítico em larvas resistentes às toxinas Cry do Bti (TETREAU et al., 2013). Os mecanismos de resistência envolvendo proteases podem provocar alteração na

ativação da protoxina ou a degradação de toxinas ativadas (FORCADA et al., 1996; RAJAGOPAL et al., 2009). A alta expressão de tais moléculas neste trabalho ainda necessita ser investigada, pois, elas podem estar diretamente relacionadas à capacidade proteolítica das larvas de processar as toxinas da cepa IAB59 do Lsp mas, também podem ainda estar envolvidas na defesa imune visto que algumas serino proteases e seus inibidores, como serpinas, são responsáveis pela regulação de diversas proteases relacionadas com imunidade em mosquitos (GULLEY; ZHANG; MICHEL, 2013; ZOU; JIANG, 2005). Em *Ae. aegypti* por exemplo já foi demonstrado que as serino proteases têm a capacidade de bloquear a infecção pelo vírus dengue (CONWAY et al., 2014; LUPLERTLOP, 2014). A super-expressão de genes diretamente envolvidos na resposta imune como quinases e enzimas relacionadas também foi detectada na colônia resistente. As principais vias de transdução de sinal utilizadas pelos mosquitos como resposta imune para lutar contra alguma invasão são as vias Toll, imunodeficiência (IMD) e jak-stat (CHRISTOPHIDES et al., 2002). Em nosso trabalho três vias relacionadas com a defesa imune, *mTOR*, *FoxO* e *jak-stat* estão enriquecidas na colônia resistente com destaque para alguns genes envolvidos nessas vias como *rac serine/threonine kinase* (CPIJ007754) e *Tsc1* (CPIJ000640). Esses dados sugerem que essas vias podem ser a primeira linha de defesa de *C. quinquefasciatus* contra as toxinas Bin ou Cry48Aa/Cry49Aa ou, pelo menos, estarem envolvidas na modulação da ação dessas toxinas.

É importante mencionar que, em nosso resultado, a categoria mais representativa obtida nas análises de GO ou KEGG foram relacionadas com metabolismo. Estas análises revelaram que o gene codificando a *2-hydroxyacyl-CoA lyase*, envolvida no metabolismo lipídico dentro da via do peroxissoma (via KEGG nº *cqu04146*), foi aquele com maior expressão na colônia resistente. Este achado pode estar relacionado com estudos anteriores que revelaram um grande acúmulo de inclusões lipídicas nas células epiteliais do intestino de larvas de outra colônia, a R2362, resistente exclusivamente à toxina Bin (DE MELO et al., 2008). O estudo revelou uma média de 185 inclusões por célula nas larvas da colônia resistente contra apenas seis inclusões por célula em larvas suscetíveis, indicando uma clara alteração no metabolismo de lipídeos. Contudo, a detecção de outros genes relacionados com metabolismo lipídico, mas que estão sub expressos na colônia resistente indica que a relação entre esses genes e o modo de ação das toxinas da cepa IAB59 do Lsp ainda necessita ser elucidada. Alguns desses genes, por exemplo, podem estar relacionados com outros processos tais como a perda da produção de energia, responsável pela redução da motilidade observada em larvas tratadas com a toxina Bin (TANGSONGCHAROEN et al., 2017).

Genes relacionados com metabolismo de DNA foram também um destaque no perfil de super expressão nas larvas resistentes. Em geral, a ação de toxinas formadoras de poro (*Pore Forming Toxins*-PFT) envolve mecanismos de apoptose como demonstrado para as toxinas Cry (PORTUGAL et al., 2017) e Bin (TANGSONGCHAROEN et al., 2015). Recentemente foi demonstrado que a ação da Cry1A em células tratadas com esta toxina induz apoptose e provoca a fragmentação do DNA, que pode ser utilizado como um marcador desse processo (PORTUGAL et al., 2017). No nosso trabalho a super expressão de um conjunto significativo de genes relacionados com a replicação, recombinação e reparo do DNA indicam que as larvas da colônia resistente possuem um padrão de resposta altamente específica para danos no DNA. Paralelamente dois genes diretamente relacionados com o processo de apoptose, citocromo c (CPIJ019024) e caspase-3 (CPIJ012580) estavam sub expressos nas larvas resistentes. Essa via de apoptose é ativada em resposta a danos mitocondriais resultando na liberação do citocromo c por essas organelas e ativação das caspases que desencadeiam outros eventos incluindo a degradação do DNA (PORTUGAL et al., 2017). A falta de receptores funcionais Cqm1 para a toxina Bin, na membrana das células, previne a ação dessa toxina e conseqüentemente os danos mitocondriais, que são efeitos citopatológicos proeminentes causados pela ação desta toxina nas larvas tratadas (CHARLES, 1987; DE MELO et al., 2008; SILVA-FILHA et al., 2003). Tangsongcharoen et al. (2017) mostrou uma alta expressão do gene caspase 3 em larvas suscetíveis tratadas com a toxina Bin.

Vários genes codificando as enzimas citocromo P450 exibiram um perfil de super expressão na colônia resistente, porém seu envolvimento direto no modo de ação das toxinas da cepa IAB59 do Lsp ainda não é conhecido. Essas enzimas estão envolvidas na detoxificação de mosquitos em resposta à mudanças no ambiente celular (YUAN et al., 2016), contudo, elas também podem estar envolvidas no metabolismo de outros componentes como biossíntese de hormônio juvenil e metabolismo do colesterol (HELVIG et al., 2004; REWITZ; O'CONNOR; GILBERT, 2007). Em termos de perfil de expressão reduzida na colônia resistente foram detectados inúmeros genes codificantes das proteínas *heat shock* indicando que essas larvas respondem diferentemente ao estresse metabólico, comparadas às larvas da colônia suscetível, o que é compatível com o baixo desafio que as toxinas representam para a colônia resistente, comparado aos danos que esta toxina pode causar em larvas suscetíveis. A ação da toxina Bin induz um processo de autofagia nas células do intestino das larvas que resulta na formação de vacúolos citoplasmáticos (OPOTA et al., 2011, TANGSONGCHAROEN et al., 2015). Na colônia resistente, doze genes do mapa de

KEGG de autofagia foram encontrados na condição de super expressão (cqu04146), alguns deles desempenhando um papel na ativação e outros na repressão de fatores dessa via. Este processo é diretamente causado pela ação da toxina Bin sobre as células e foi detectada uma regulação diferencial nas larvas resistentes que são, provavelmente, adaptadas à redução da indução da autofagia causada pela toxina Bin devido à falta de receptores, enquanto que em células suscetíveis a autofagia é modulada de forma distinta (TANGSONGCHAROEN et al., 2017). O conjunto de dados obtidos na análise de RNAseq demonstrou que a colônia resistente desenvolveu um perfil de expressão gênica diferencial, correlacionada não apenas com a ausência do receptor Cqm1 que confere o fenótipo de resistência à toxina Bin, mas também com outros processos potencialmente associados à capacidade das larvas sobreviverem aos efeitos das toxinas do Lsp IAB59.

A partir dos dados obtidos nas análises relativas à identificação de proteínas potencialmente envolvidas no modo de ação da toxina Cry48Aa/Cry49Aa, quatro delas foram escolhidas para sua validação funcional através da metodologia de RNA de interferência (RNAi). O silenciamento gênico através de RNAi é uma ferramenta robusta para análise de genes e função das respectivas proteínas. Ele tem sido aplicado em várias espécies de mosquitos, sobretudo, através de estratégias de microinjeção de dsRNA em adultos, mas também sobre larvas através de sua alimentação com dsRNA. O tratamento de insetos com dsRNA pela via oral têm sido eficiente e inclusive adotado como método para o controle de insetos praga na agricultura (ZHANG et al., 2015). No caso de mosquitos, o maior desafio para alimentação das larvas com dsRNAs está no sistema de entrega (*delivery*) desses dsRNAs para as larvas uma vez que, alguns sistemas possuem baixa eficiência em razão da hidrofília e carga negativa do dsRNA, de sua absorção reduzida pelas larvas e possível degradação devido ao pH alcalino do intestino, tal como ocorre em larvas de mosquitos (DAS et al., 2015). Duas abordagens têm sido amplamente utilizadas para adequar o procedimento experimental de RNAi em larvas de mosquito, a alimentação de larvas com nanopartículas de dsRNA acopladas a quitosano (ZHANG; ZHANG; ZHU, 2010; ZHANG et al., 2015) e a indução de estresse osmótico durante a entrega de dsRNA para as larvas (LOPEZ-MARTINEZ; MEUTI; DENLINGER, 2012) porém, ambas técnicas induzem uma mortalidade considerável dos indivíduos tratados dificultando a execução dessa técnica. Em nosso estudo, baseado na metodologia de indução da eclosão das larvas em uma gota de dsRNA de Meleshkevitch et al. (2013) não foi detectada uma mortalidade elevada nos grupos testados (inferior a 15%). Os dados obtidos apontaram que este sistema de entrega de dsRNA para as larvas de *C. quinquefasciatus* foi eficiente e induziu um silenciamento em torno de

50% através de qRT-PCR para o gene *cqm1*. No entanto a redução na toxicidade da Bin para as larvas foi relativamente baixa (10-20%) considerando que o receptor é essencial para a ação da toxina. Por outro lado também é possível hipotetizar que a disponibilidade de um número reduzido de receptores disponíveis já seria o suficiente para permitir um certo nível de toxicidade da Bin para as larvas. Para os demais alvos (panteteinase, vanin e ALP), ainda não foi possível avaliar a eficiência do silenciamento gênico, porém, os ensaios de toxicidade *in vivo* foram promissores visto que larvas silenciadas com dsRNA-vanin e dsRNA-ALP apresentaram uma redução da suscetibilidade à toxina Cry48Aa/Cry49Aa (10-30%). Nestes ensaios não foram obtidos resultados no sentido de validar o envolvimento da PTT na ação tóxica da Cry48Aa/Cry49Aa, apesar de ela ser muito relacionada com a vanin. Os dados obtidos neste trabalho sugerem que a metodologia de RNAi padronizada para larvas de *C. quinquefasciatus* pode ser eficiente mas necessita ser aperfeiçoada para alcançar efeitos *in vivo* mais significativos. De forma comparativa com o Cqm1, os resultados obtidos para os genes vanin e ALP foram promissores e indicam que eles poderiam atuar como receptores ou ter um papel para o modo de ação da toxina Cry48Aa/Cry49Aa no intestino das larvas.

O conjunto de dados obtidos neste trabalho mostram que toxina Cry48Aa/Cry49Aa age através de um grupo receptores (APNs, ALPs e maltases) no intestino de larvas de *C. quinquefasciatus*, alguns destes são ortólogos de receptores já descritos para outras toxinas Cry mosquitocidas porém, a validação funcional do papel das proteínas identificadas neste modelo ainda necessita ser melhor investigada. O estudo revelou ainda novas proteínas intestinais com promissor potencial no modo de ação das toxinas, sendo a detecção das proteínas panteteinase- e vanin um achado inédito cuja função neste modelo resta a ser desvendada. O padrão de expressão diferencial associado à resistência a longo termo da colônia R revelou novas vias metabólicas relacionadas à ação das toxinas abrindo perspectivas para novos estudos que possam subsidiar estratégias de manejo de resistência.

10 CONCLUSÕES

- a. A toxina Cry48Aa/Cry49Aa possui ação para *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* é considerado refratário em vista de sua LC50 ser pelo menos 100 vezes superior aquela observada para *C. quinquefasciatus*;
- b. A toxina Cry48Aa/Cry49Aa interage especificamente com proteínas do microvilli intestinal de *C. quinquefasciatus* que podem atuar como ligantes desta toxina;
- c. Proteínas das classes de APNs, ALPs e maltases foram identificadas como ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa em *C. quinquefasciatus*;
- d. O estudo revelou outras classes de proteínas que podem estar envolvidas no modo de ação da toxina Cry48Aa/Cry49Aa com destaque para a panteteinase e vanin cuja descrição neste modelo é inédita;
- e. A colônia RIAB59 exibe um perfil de expressão gênica peculiar caracterizado por uma capacidade ampliada de replicação e reparo de DNA, modulação diferencial de autofagia e, regulação de estresse, baixa indução da via de apoptose e de proteínas *heat-shock*. Este perfil parecem ser respostas adaptativas ao fenótipo de resistência ao *L. sphaericus* IAB59, mantido a longo termo.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, M. A. F. et al. Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5343–5353, 2003.
- ABDULLAH, M. A. F.; VALAITIS, A. P.; DEAN, D. H. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. **BMC Biochem.**, London, v. 7, p. 16, 2006.
- ACHEE, N. L. et al. A Critical assessment of vector control for dengue prevention. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 9, n. 5, e0003655, 2015. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003655>>. Acesso em: 19 fev. 2018.
- AHMED, I. et al. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov. and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, London, v. 57, n. 5, p. 1117-1125, 2007.
- 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, e111114, 2014. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0111114> >. Acesso em: 06 fev. 2018.
- AMORIM, L. B. et al. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure. **Biol. Control**, San Diego, v. 42, n. 2, p. 155-160, 2007.
- _____. Stability of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* evaluated by molecular tools. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 40, n. 4, p.311- 316, 2010.
- ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. Biological Control Program against Simuliidae in the state of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, p. 131–133, 1995.
- AROONKESORN, A. et al. Two specific membrane-bound aminopeptidase N isoforms from *Aedes aegypti* larvae serve as functional receptors for the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin implicating counterpart specificity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 461, n. 2, p. 300-306, 2015.
- BAUMANN, P. et al. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 163, p. 738-747, 1985.
- BAUMANN, L.; BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Sequence analysis of the mosquitocidal genes encoding 51.4- and 41.9-Kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 170, n. 5, p. 2045-2050, 1988.
- BAYYAREDDY, K. et al. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes* (*Stegomyia*)

aegypti Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 279-86, 2009.

_____. Proteome analysis of Cry4Ba toxin-interacting *Aedes aegypti* lipid rafts using ge LC-MS/MS. **J. Proteome Res.**, Washington, v. 11, n. 12, p. 5843-5855, 2012.

BELTRÃO, H. B. M.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 266, p. 163-169, 2006.

BERRY, C. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 109, p. 1-10, 2012.

BERRY, C. et al. Genetic determinants of host ranges of *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxins, **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, n. 2, p. 510-518, 1993.

_____. Nucleotide sequence of two toxin genes from *Bacillus sphaericus* IAB59: sequence comparisons between five highly toxinogenic strains. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 17, n. 18, p. 7516, 1989.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BOONSERM, P. et al. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Å resolution. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 188, n. 9, p. 3391-3401, 2006.

BOURGOUIN, C. et al. Transfer of the toxin protein genes of *Bacillus sphaericus* into *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and their expression. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 56, p. 340-344, 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.

_____. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microb. Biotechnol.**, Oxford, v. 6, n.1, p. 17-26, 2012.

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

CARDOSO, B. F. et al. Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 6, p. 745-754, 2015.

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

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

CHARLES, J. F. Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.**, Paris, v. 138, n. 4, p. 471-484, 1987.

CHARLES, J. F.; NIELSEN-LEROUX, C.; DELÉCLUSE, A. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. **Annu. Rev. Entomol.**, 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 Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.156, p. 153-159, 1997.

CHEN, J. et al. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. **Biochem. J.**, London, v. 424, n. 2, p. 191-200, 2009a.

_____. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 39, n. 10, p. 688-96, 2009b.

_____. A 104 kDa *Aedes aegypti* aminopeptidase N is a putative receptor for the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 43, p. 1201-1208, 2013.

CHEN, L. Z. et al. Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera* (Hubner). **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, New York, v. 73, n. 2, p. 61-73, 2010.

CHRISTOPHIDES, G. K. et al. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. **Science**, New York, v. 298, n. 5591, p. 159-165, 2002.

COLLETIER, J. P. et al. De novo phasing with X-ray laser reveals mosquito larvicide BinAB structure. **Nature**, London, v. 539, n. 7627, p. 43-47, 2016.

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

CONWAY, M. J. et al. Mosquito saliva serine protease enhances dissemination of dengue virus into the mammalian host. **J. Virol.**, Baltimore, v. 88, n. 1, p. 164- 175, 2014.

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

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

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

DAS, S. et al. Chitosan, carbon quantum dot, and silica nanoparticle mediated dsRNA delivery for gene silencing in *Aedes aegypti*: a comparative analysis. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, Washington, v.7, n. 35, p. 19530–19535, 2015.

DE BARJAC, H.; VÉRON, M; COSMAO-DUMANOIR, V. Biochemical and serological characterization of "*Bacillus sphaericus*" strains, pathogenic or non-pathogenic for mosquitoes (author's transl). **Ann. Microbiol.**, Milano, v. 131B, n. 2, p. 191-201, 1980.

DE BARJAC, H. et al. Serological classification of *Bacillus sphaericus* strains in relation with toxicity in mosquito larvae. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 21, p. 85-90, 1985.

DECHKLAR, M. et al. Functional expression in insect cells of glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: a *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 159-166, 2011.

DELÉCLUSE, A. et al. Expression of cryIVA and cryIVB genes, independently or in combination, in a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 59, n. 11, p. 3922-3927, 1993.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends Genet.**, Amsterdam, v. 17, n.4, p. 193-199, 2001.

DE MAAGD, R. A. et al. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 37, p. 409-433, 2003.

DE MELO, J. V. et al. Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. **Micron**, Oxford, v. 39, p. 1342–1350, 2008.

_____. Cytopathological effects of *Bacillus sphaericus* Cry48Aa/Cry49Aa toxin on binary toxin-susceptible and -resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 75, n. 14, p. 4782-4789, 2009.

DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 15-21, 2013.

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

FERNANDEZ, L. E. et al. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop alpha-8 of domain II. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 579, n. 17, p. 3508-3514, 2005.

_____. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. **Biochem. J.**, London, v. 394, n. 1, p. 77-84, 2006.

_____. Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*. **Biochemistry**, Washington, v. 48, n. 37, p. 8899-8907, 2009.

FERNANDEZ-LUNA, M. T. et al. An alpha-amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). **Environ. Microbiol.**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 746-757, 2010.

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

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

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

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

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

FORCADA, C. et al. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, New York, v. 31, n. 3, p. 257-272, 1996.

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

FRANCESCHINI, A. et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 41, p. D808 -D815, 2013

GARBIS, S.; LUBEC, G.; FOUNTOULAKIS, M. Limitations of current proteomics technologies. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1077, n. 1, p. 1-18, 2005.

GE, Y. et al. Allelic diversity and population structure of *Bacillus sphaericus* as revealed by multilocus sequence typing. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 77, n. 15, p. 5553-5556, 2011.

GÓMEZ, I. et al. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 513, n. 2-3, p. 242-246, 2002.

_____. Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops alpha-8 and 2 in domain II of Cry1Ab toxin. **Biochemistry**, Washington, v. 42, n. 35, p. 10482-10489, 2003.

_____. Specific epitopes of Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 281, n. 45, p. 34032-34039, 2006.

_____. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, Fayetteville, v. 28, n. 1, p. 169-73, 2007.

_____. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. **Biochem. J.**, London, v. 459, p. 383-396, 2014.

GUEDES, D. R. D. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerg. Microbes Infect.**, New York, v. 6, n. 8, p. 1-11, 2017.

GULLEY, M. M.; ZHANG, X.; MICHEL, K. The roles of serpins in mosquito immunology and physiology. **J. Insect Physiol.**, London, v. 59, n. 2, p. 138-147, 2013.

GUO, Q. Y. et al. Single nucleotide deletion of *cqm1* gene results in the development of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus*. **J. Insect Physiol.**, London, v. 59, n. 9, p. 967-73, 2013.

_____. Interaction of *Lysinibacillus sphaericus* Cry48Aa/Cry49Aa toxin with midgut brush-border membrane fractions from *Culex quinquefasciatus* larvae. **Insect Mol. Biol.**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 163-170, 2016.

HEINEN, L. B. S. et al. Saint louis encephalitis virus in Mato Grosso, central-western Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, São Paulo, v. 57, n.3, p.215-220, 2015.

HELVIG, C. et al. CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach corpora allata. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 101, n. 12, p. 4024-4029, 2004.

HEMINGWAY, J. et al. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 34, n. 7, p. 653-665, 2004.

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

HILL, S.; CONNELLY, R. **Southern house mosquito: *Culex quinquefasciatus* Say** (Insecta: Diptera: Culicidae). 2. ed., Gainesville: University of Florida, 2009. Disponível em: <http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/southern_house_mosquito.htm#life>. Acesso em: 07 mar. 2016.

HU, X. et al. Complete genome sequences of the mosquitocidal bacterium *Bacillus sphaericus* C3-41 and comparisons with closely related *Bacillus* species. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 190, p. 2892-2902, 2008.

HUA, G. et al. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. **Biochemistry**, Washington, v. 47, n. 18, p. 5101-5110, 2008.

_____. *Anopheles gambiae* alkaline phosphatase is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis jegathesan* Cry11Ba toxin. **Biochemistry**, Washington, v. 48, n. 41, p. 9785-93, 2009.

_____. AgCad2 cadherin in *Anopheles gambiae* larvae is a putative receptor of Cry11Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 153-61, 2013.

IBRAHIM, M. A., GRIKO, N. B., BULLA, L. A., JR. Cytotoxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin is mediated by the cadherin receptor BT-R(3) of *Anopheles gambiae*. **Exp. Biol. Med.**, Basel, v. 238, n. 7, p. 755-764, 2013.

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

JIMÉNEZ-JUÁREZ, N. et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 282, n. 29, p. 21222-21229, 2007.

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

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

KALFON, A. et al. Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297: an electron microscope study of crystal-like inclusions biogenesis and toxicity to mosquito larvae. **J. Gen. Microbiol.**, London, v. 130, p. 893-900, 1984.

KELLEN, W. et al. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 7, p. 442-448, 1965.

- 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, e112555, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0112555>>. Acesso em: 16 mar. 2016.
- KING, A. M., AARON, C. K. Organophosphate and carbamate poisoning. **Emerg. Med. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 33, n. 1, p. 133-151, 2015.
- KUADKITKAN, A.; SMITH, D. R.; BERRY, C. Investigation of the Cry4B-prohibitin interaction in *Aedes aegypti* cells. **Curr. Microbiol.**, New York, v. 65, n. 4, p. 446-454, 2012.
- KUNTHIC, T. et al. Essential role of tryptophan residues in toxicity of binary toxin from *Bacillus sphaericus*. **BMB Rep.**, Seoul, v. 44, n. 10, p. 674-679, 2011.
- KRISHNAMOORTHY, M. et al. Identification of novel CryIAC binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 189-201, 2007.
- LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 23, n. 2, p. 133-163, 2007.
- LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 132, p. 1-41, 2015.
- LAURENCE, B. R.; PICKETT, J. A. Erythro-6-acetoxy-5-hexa- decanolide, the major component of a mosquito oviposition attractant pheromone. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, London, v.1, p. 59-60, 1982.
- LECADET, M. M.; BLONDEL, M. O.; RIBIER, J. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715 using bacteriophage CP-54Ber. **J. Gen. Microbiol.**, London, v. 121, n. 1, p. 203-212, 1980.
- LEKAKARN, H.; PROMDONKOY, B.; BOONSERM, P. Interaction of *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin with mosquito larval gut cells: Binding and internalization. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 132, p. 125-131, 2015.
- LIKITVIVATANAVONG, S.; AIMANOVA, K.; GILL, S. S. Loop residues of the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin are important for mosquitocidal activity. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 583, n. 12, p. 2021-2030, 2009.
- LIKITVIVATANAVONG, S. et al. Cadherin, alkaline phosphatase, and aminopeptidase N as receptors of Cry11Ba toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Aedes aegypti*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 77, n. 1, p. 24-31, 2011.
- LIMA, E. P. et al. Pesticide exposure and its repercussion in the health of sanitary agents in the State of Ceará, Brazil. **Cien. Saude. Colet.**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 6, p. 2221-2230, 2009.

- LIU, J. W. et al. New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8-kilodalton mosquitocidal toxins. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 62, n. 6, p. 2174-2176, 1996.
- LIU, N. et al. Multiple cytochrome P450 genes: their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 8, e23403, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0023403>>. Acesso em: 09 mar. 2016.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LOPEZ-MARTINEZ, G.; MEUTI, M.; DENLINGER, D. L. Rehydration driven RNAi: a novel approach for effectively delivering dsRNA to mosquito larvae. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 49, n. 1, p. 215-218, 2012.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol.**, London, v. 15, n. 12, p. 1-21, 2014.
- LOZANO, L. C.; AYALA, J. A.; DUSSAN, J. *Lysinibacillus sphaericus* S-layer protein toxicity against *Culex quinquefasciatus*. **Biotechnol. Lett.**, Kew, v. 33, n.10, p. 2037-2041, 2001.
- LUO, W; BROUWER, C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. **Bioinformatics**, Oxford, v. 29, n. 14, p. 1830-1831, 2013.
- LUPLERTOP, N. *Aedes* mosquito salivary immune peptides: boost or block dengue viral infections. **Journal of coastal life medicine**, Haikou, v. 2, n. 2, p. 163–168, 2014.
- MACIEL, A. et al. Epidemiological study of bancroftian filariasis in Recife, Northeastern Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 4, p. 449-455, 1996.
- MAHILLON, J. et al. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review. **Genetica**, s'-Gravenhage, v. 93, n. 1-3, p. 13–26, 1994.
- MARDINI, B.L.F. et al. Field studies with the bacterial larvicide INPALBAC for Simulium spp. control in Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 679–681, 1999.
- MELESHKEVITCH, E. A. et al. A novel eukaryotic Na⁺ methionine selective symporter is essential for mosquito development. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 43, p. 755-767, 2013.
- MINSHALL, N.; STANDART, N. The active form of Xp54 RNA helicase in translational repression is an RNA-mediated oligomer. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 32, n. 4, p. 1325-1334, 2004.

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*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 19, n. 1, p. 39-46, 2003.

NASCIMENTO, N. A. et al. N-glycosylation influences the catalytic activity of mosquito α -glucosidases associated with susceptibility or refractoriness to *Lysinibacillus sphaericus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 81, p. 62-71, 2017.

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

NIELSEN-LEROUX, C. et al. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* mosquito larvae (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 34, p. 321-327, 1997.

_____. Various levels of cross-resistance to *Bacillus sphaericus* strains in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) colonies resistant to *B. sphaericus* strain 2362. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 67, n. 11, p. 5049-5054, 2001.

_____. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west-mediterranean countries. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 39, 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*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 73, n. 10, p. 3404-3411, 2007.

OCHOA-CAMPUZANO, C. et al. Prohibitin, an essential protein for Colorado potato beetle larval viability, is relevant to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxicity. **Pestic. Biochem. Physiol.**, New York, v. 107, n.3, p. 299-308, 2013.

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

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

_____. *Bacillus sphaericus* binary toxin elicits host cell autophagy as a response to intoxication. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 2, e14682, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0111114>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as microbial larvicide**. Geneva, 1985. 24 p.

_____. **Eliminate filariasis: attack poverty**. Geneva, 2000. 41 p.

_____. **Lymphatic filariasis**. Geneva, 2017. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en/>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Lymphatic Filariasis Elimination: Regional Program Manager's Meeting**. San Jose, 2014. 52 p.

PALMA, L. et al. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An overview of their biocidal activity. **Toxins**, Basel, v. 6, p. 3296-3325, 2014.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 3-22, 2013.

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

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

PEREZ, C. et al. *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. **Cell. Microbiol.**, Oxford, v. 9, n. 12, p. 2931-2937, 2007.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

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

POPOVA-BUTLER, A.; DEAN, D. H. Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles. **J. Insect Physiol.**, London, v. 55, n. 3, p. 264-272, 2009.

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 Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 80, p. 21-31, 2017.

PRIEST, F. G. et al. Distribution and characterization of mosquitocidal toxin genes in some strains of *Bacillus sphaericus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 63, n. 4, p. 1195-1198, 1997.

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

RAJAGOPAL, R. et al. Resistance of *Helicoverpa armigera* to Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis* is due to improper processing of the protoxin. **Biochem. J.**, London, v. 419, n. 2, p. 309-316, 2009.

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. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 11, p. 1-5, 1995.

RECIFE. Secretaria de Saúde do Recife. **Filariose quase extinta no Recife-Notificações de casos**. Recife, 2011. Disponível em: www.recife.pe.gov.br/2011/2012/Filariose_quase_extinta_no_recife_180091.php Acesso em: 30 jan. 2014.

REGIS, L. et al. Integrated control of the filariasis vector with community participation in an urban area of Recife, Pernambuco, Brazil. **Cad. Saude Publica**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 4, p. 473-482, 1996.

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

REWITZ, K. F.; O'CONNOR, M. B.; GILBERT, L. I. Molecular evolution of the insect Halloween family of cytochrome P450s: phylogeny, gene organization and functional conservation. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 37, n. 8, p. 741-753, 2007.

REZENDE, T. M. T. et al. Identification of Cry48Aa/Cry49Aa toxin ligands in the midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 88, p. 63-70, 2017.

ROCHA, A. et al. Programa de controle e eliminação da filariose linfática: uma parceria da Secretaria de Saúde de Olinda-Pe, Brasil, com o serviço de referência nacional em filarioses. **Rev. Patol. Trop.**, Goiania, v. 39, n. 3, p. 233-249, 2010.

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

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

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Insetos. In: RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 7. ed. São Paulo: Roca, 2005. 1168 p.

SAENGWIMAN, S. et al. In vivo identification of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptors by RNA interference knockdown of glycosylphosphatidylinositol-linked aminopeptidase N transcripts in *Aedes aegypti* larvae. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 407, n. 4, p. 708-713, 2011.

SEN, G. L.; BLAU, H. M. A brief history of RNAi: The silence of the genes. **Faseb J.**, Bethesda, v. 20, n. 9, p. 1293-1299, 2006.

SERRA, O. P. et al. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 1, p. 20-29, 2016.

SHARMA, M.; GUPTA, G. D.; KUMAR, V. Receptor protein of *Lysinibacillus sphaericus* mosquito-larvicidal toxin displays amyloamylase activity. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 93, p. 37-46, 2018.

SHU, C. et al. Assembling of *Holotrichia parallela* (dark black chafer) midgut tissue transcriptome and identification of midgut proteins that bind to Cry8Ea toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 99, n. 17, p. 7209-7218, 2015.

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. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 247, n. 3, p. 754-761, 1997.

_____. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* binary toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 711-721, 1999.

SILVA-FILHA, M. H. N. L.; PEIXOTO, C. A. Immunocytochemical localization of the *Bacillus sphaericus* toxin components in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. **Pestic. Biochem. Physiol.**, New York, v. 77, n. 3, p. 138-146, 2003.

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

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

SINGER, S. Bacterial pathogens of Culicidae (mosquitos). **Bull. World Health Org.**, Geneva, v. 55 Suppl. 1, p. 47-56, 1977.

SINGKHAMANAN, K. et al. Identification of amino acids required for receptor binding and toxicity of the *Bacillus sphaericus* binary toxin. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 303, n. 1, p. 84-91, 2009.

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

SOUTHGATE, B. A. Intensity and efficiency of transmission and the development of microfilaraemia and disease: their relationship in lymphatic filariasis. **J. Trop. Med. Hyg.**, Oxford, v. 95, n. 1, p. 1-12, 1992.

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, e0158356, 2016. Disponível em:

<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0158356>>. Acesso em: 06 fev. 2018.

TANGSONGCHAROEN, C. et al. *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin induces apoptosis in susceptible *Culex quinquefasciatus* larvae. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 128, p. 57–63, 2015.

_____. Molecular analysis of *Culex quinquefasciatus* larvae responses to *Lysinibacillus sphaericus* Bin toxin. **PLoS One**, San Francisco, v. 12 n. 4, e0175473, 2017. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175473>>. Acesso em: 04 dez. 2017.

TETREAU, G. et al. Increase in larval gut proteolytic activities and Bti resistance in the dengue fever mosquito. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, New York, v. 82, n. 2, p. 71–83, 2013.

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

THANABALU, T. et al. Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 173, p. 2776-2785, 1991.

VISITSATTAPONGSE, S. et al. Single-reversal charge in the β 10- β 11 receptor-binding loop of *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa and Cry4Ba toxins reflects their different toxicity against *Culex* spp. Larvae. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 450, p. 948–952, 2014.

VOGEL K. J.; BROWN M. R.; M. R. STRAND. Ovary ecdysteroidogenic hormone requires a receptor tyrosine kinase to activate egg formation in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 112, n. 16, p. 5057-5062, 2015.

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

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

WIRTH, M. C., FEDERICI, B. A.; WALTON, W. E. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 66, n. 3, p. 1093-1097, 2000.

WIRTH, M. C. et al. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 37, n. 4, p. 534-40, 2000.

_____. Synergy between toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 41, n. 5, p. 935-941, 2004.

_____. Evolution of resistance toward *Bacillus sphaericus* or a mixture of *B. sphaericus* + Cyt1A from *Bacillus thuringiensis*, in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 88, n. 2, p. 154-162, 2005.

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

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

YUAN, L. V, et al. Comparative transcriptome analyses of deltamethrin susceptible and resistente *Culex pipiens pallens* by RNA-seq. **Mol. Genet. Genomics**, Berlin, v. 291, n. 1, p. 309-321, 2016.

YUAN, Z. M. et al. Cross-resistance between strains of *Bacillus sphaericus* but not *B. thuringiensis israelensis* in colonies of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Med. Vet. Entomol.**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 251-256, 2003.

XIE, R. et al. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 280, n. 9, p. 8416-8425, 2005.

ZANLUCA C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, p.569–572, 2015.

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

ZHANG, Qi. et al. Analyses of α -amylase and α -glucosidase in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*, as receptors of Cry11Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 43, n. 10, p. 907-15, 2013.

ZHANG, R. et al. A 106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Biochemistry**, Washington, v. 47, n. 43, p. 11263-72, 2008.

ZHANG, X.; ZHANG, J.; ZHU, K. Y. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). **Insect Mol. Biol.**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 683-693, 2010.

ZHANG, X. et al. Chitosan/interfering RNA nanoparticle mediated gene silencing in disease vector mosquito larvae. **J. Vis. Exp.**, Boston, v. 97, p. 1-20, 2015.

ZHOU, Z. et al. Identification of ABCC2 as a binding protein of Cry1Ac on brush border membrane vesicles from *Helicoverpa armigera* by an improved pull-down assay. **Microbiologyopen**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 659-669, 2016.

ZOU, Z.; JIANG, H. *Manduca sexta* serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP-8. cDNA cloning, protein expression, inhibition kinetics, and function elucidation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 280, n. 14, p. 14341–14348, 2005.

**APÊNDICE A - PROTEÍNAS DO INTESTINO DE *Culex quinquefasciatus* (266)
IDENTIFICADAS COMO LIGANTES DA TOXINA Cry48Aa /Cry49Aa.**

Quadro 1 - Proteínas do intestino de *Culex quinquefasciatus* (266) identificadas como ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa.

continuação

Seção	Acesso nº	Descrição	Score	Cobertura (%)	Nº Peptídeos únicos	Nº Aminoácidos	PM predito [kDa]	pI
1	EDS27419.1	protease m1 zinc metalloprotease	365.96	18.00	9	1011	113.2	5.12
	EDS27892.1	calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type	146.88	7.74	4	814	88.8	6.00
2	EDS31006.1	aminopeptidase N	316.58	14.69	13	1852	210.0	5.08
	EDS27419.1	protease m1 zinc metalloprotease	271.97	14.05	8	1011	113.2	5.12
	EDS27892.1	calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type	144.70	13.27	5	814	88.8	6.00
	EDS27418.1	protease m1 zinc metalloprotease	93.25	11.25	6	898	101.2	5.14
	EDS37148.1	dipeptidyl-peptidase	90.93	10.09	4	793	88.2	6.47
	EDS40798.1	conserved hypothetical protein	78.46	2.96	2	911	100.1	7.30
	EDS41405.1	angiotensin-converting enzyme	78.22	3.09	2	1229	142.8	5.22
	EDS27254.1	ATP synthase beta subunit	77.51	8.22	2	511	54.6	5.12
EDS36841.1	aminopeptidase N	74.67	8.38	3	919	105.0	5.01	
3	EDS29972.1	ATP synthase alpha subunit vacuolar	744.99	51.63	23	614	68.1	5.39
	EDS27419.1	protease m1 zinc metalloprotease	632.33	26.51	20	1011	113.2	5.12
	EDS38951.1	alpha-glucosidase	619.19	40.83	25	605	69.4	5.20
	EDS39731.1	78 kDa glucose-regulated protein	415.13	28.31	16	657	72.3	5.20
	EDS30018.1	apolipoporphins	374.88	6.41	18	3324	366.8	7.36
	EDS38952.1	alpha-glucosidase	374.85	25.37	12	611	70.6	5.31
	EDS35981.1	endoplasmin	354.28	25.69	20	794	91.0	4.98
	EDS26297.1	calcium-transporting atpase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type	346.17	14.97	13	995	109.1	5.59
	EDS34040.1	fatty acid oxidation complex subunit alpha	329.63	27.69	19	744	79.7	9.06
	EDS35048.1	conserved hypothetical protein	308.85	27.29	14	645	71.4	6.86
	EDS26512.1	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit. mitochondrial	278.70	19.21	9	661	72.1	6.46
	EDS32575.1	maltose phosphorylase	277.49	18.29	10	760	85.4	5.78
	EDS31006.1	aminopeptidase N	258.73	6.26	10	1852	210.0	5.08
	EDS45210.1	dipeptidyl peptidase 4	250.82	19.19	12	745	84.1	5.01
EDS32578.1	maltose phosphorylase	206.18	15.58	11	764	85.1	5.67	

continuação								
Seção	Acesso nº	Descrição	Score	Cobertura (%)	Nº Peptídeos únicos	Nº Aminoácidos	PM predito [kDa]	pI
	EDS32127.1	alpha-glucosidase	199.35	20.66	10	610	70.7	4.92
	EDS32576.1	maltose phosphorylase	172.15	7.89	5	760	84.8	6.37
	EDS32138.1	heat shock 70 kDa protein cognate 4	140.16	9.16	3	655	71.4	5.52
	EDS42649.1	long-chain-fatty-acid coa ligase	139.79	10.06	6	696	78.0	8.18
	EDS39919.1	disulfide isomerase	135.33	11.16	5	493	55.4	4.91
	EDS33460.1	carnitine O-palmitoyltransferase 2. mitochondrial	132.79	14.92	9	657	74.5	7.97
	EDS42654.1	5' nucleotidase	120.83	11.54	5	546	59.9	4.84
	EDS39080.1	beta-galactosidase	112.60	9.69	6	650	73.7	4.89
	EDS36767.1	CD98hc amino acid transporter protein	112.54	6.73	4	639	70.2	5.08
	EDS25844.1	actin-2	106.42	18.09	3	376	41.6	5.48
	EDS40938.1	integrin alpha-ps	103.28	4.86	4	1112	124.5	5.53
	EDS38275.1	conserved hypothetical protein	100.53	17.22	4	302	33.0	9.72
	EDS26147.1	sodium/potassium-transporting ATPase alpha chain	97.64	5.44	3	735	80.3	5.67
	EDS26794.1	conserved hypothetical protein	94.97	3.06	7	2324	249.4	4.96
	EDS35643.1	glutamyl aminopeptidase	93.53	6.02	5	1030	116.5	6.25
	EDS37148.1	dipeptidyl-peptidase	88.24	6.05	5	793	88.2	6.47
	EDS31874.1	neurotactin	84.61	5.83	4	857	94.2	5.01
	EDS35272.1	conserved hypothetical protein	76.96	8.53	4	551	59.3	8.94
	EDS36798.1	long-chain-fatty-acid coa ligase	76.18	6.47	4	649	72.3	7.93
	EDS28166.1	elongation factor 2	72.03	4.07	4	1031	114.4	6.71
	EDS31200.1	nodal modulator 3	70.21	2.88	2	868	93.8	6.54
4	EDS38950.1	maltase 1	382.03	37.42	20	604	69.4	4.94
	EDS27892.1	calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type	206.55	13.76	10	814	88.8	6.00
	EDS28386.1	transferrin	176.12	21.21	8	462	51.4	6.67
	EDS38952.1	alpha-glucosidase	156.43	27.00	14	611	70.6	5.31
	EDS25721.1	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	139.13	16.31	9	607	66.1	6.54

Seção	Acesso nº	Descrição	Score	Cobertura (%)	Nº Peptídeos únicos	Nº Aminoácidos	continuação	
							PM predito [kDa]	pI
	EDS36767.1	CD98hc amino acid transporter protein	132.75	11.42	7	639	70.2	5.08
	EDS39919.1	disulfide isomerase	129.60	8.72	4	493	55.4	4.91
	EDS38951.1	alpha-glucosidase	121.82	11.90	7	605	69.4	5.20
	EDS45922.1	pantetheinase	113.26	16.47	9	516	57.1	5.39
	EDS27419.1	protease m1 zinc metalloprotease	101.76	4.45	4	1011	113.2	5.12
	EDS27420.1	protease m1 zinc metalloprotease	99.42	9.34	7	899	102.7	5.59
	EDS29972.1	ATP synthase alpha subunit vacuolar	91.37	11.40	5	614	68.1	5.39
	EDS42654.1	5' nucleotidase	82.25	8.97	5	546	59.9	4.84
	EDS30018.1	apolipoporphins	78.86	1.11	3	3324	366.8	7.36
5	EDS35272.1	conserved hypothetical protein - ATP synthase subunit alpha	1914.86	59.17	40	551	59.3	8.94
	EDS27254.1	ATP synthase beta subunit	1100.18	56.16	21	511	54.6	5.12
	BAI77924.1	cytochrome P450	923.53	48.39	24	496	56.3	7.69
	EDS31872.1	lactase-phlorizin hydrolase	779.33	44.92	22	532	61.4	5.20
	EDS26297.1	calcium-transporting atpase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type	660.27	22.61	2	995	109.1	5.59
	EDS27419.1	protease m1 zinc metalloprotease	596.77	20.57	17	1011	113.2	5.12
	EDS29323.1	alkaline phosphatase	563.81	27.30	14	564	62.9	5.01
	ABC59609.1	maltase 1	528.27	29.31	18	580	66.2	5.95
	EDS39442.1	V-type ATP synthase beta chain	515.83	38.82	15	492	54.7	5.49
	EDS29322.1	alkaline phosphatase	485.67	17.04	13	904	100.6	5.63
	EDS36767.1	CD98hc amino acid transporter protein	485.29	25.20	17	639	70.2	5.08
	EDS29972.1	ATP synthase alpha subunit vacuolar	474.63	31.76	15	614	68.1	5.39
	EDS31870.1	lactase-phlorizin hydrolase	453.52	19.35	11	920	105.6	5.27
	EDS35287.1	conserved hypothetical protein	416.13	26.74	8	460	51.2	7.08
	EDS37279.1	croquemort	375.07	24.31	10	469	52.6	4.67
	EDS42910.1	disulfide isomerase	347.91	35.54	14	484	53.8	6.25
	EDS38951.1	alpha-glucosidase	339.73	20.83	12	605	69.4	5.20
	EDS25844.1	actin-2	313.78	37.77	4	376	41.6	5.48

		continuação						
Seção	Acesso nº	Descrição	Score	Cobertura (%)	Nº Peptídeos únicos	Nº Aminoácidos	PM predito [kDa]	pI
	EDS45363.1	cytochrome P450	310.42	30.46	16	522	58.6	7.15
	EDS36420.1	cytochrome p450 family protein 44A1	286.50	27.05	13	499	57.6	8.62
	EDS34125.1	conserved hypothetical protein	271.63	31.91	2	376	41.8	5.48
	EDS38514.1	sarcalumenin	248.99	8.66	7	958	107.6	3.93
	EDS31006.1	aminopeptidase N	241.43	5.62	9	1852	210.0	5.08
	EDS35981.1	endoplasmín	235.94	14.99	10	794	91.0	4.98
	EDS27504.1	5' nucleotidase	219.42	18.77	9	554	60.8	5.53
	EDS27420.1	protease m1 zinc metalloprotease	215.56	8.23	6	899	102.7	5.59
	EDS27170.1	truncated ER mannose-binding lectin	213.76	13.59	6	471	53.4	6.05
	EDS36419.1	cytochrome P450 26B1	211.90	12.83	6	499	57.1	8.37
	EDS26147.1	sodium/potassium-transporting ATPase alpha chain	209.18	9.52	6	735	80.3	5.67
	EDS35286.1	conserved hypothetical protein	200.25	12.86	2	521	58.1	7.97
	EDS38952.1	alpha-glucosidase	195.21	11.95	6	611	70.6	5.31
	EDS41433.1	conserved hypothetical protein	188.63	30.43	3	115	13.3	9.25
	EDS28872.1	disulfide-isomerase A6	187.22	19.95	7	436	47.5	5.49
	EDS29320.1	alkaline phosphatase	186.96	15.91	5	264	28.9	9.32
	EDS38275.1	conserved hypothetical protein	185.09	20.86	6	302	33.0	9.72
	EDS38950.1	maltase 1	183.05	11.26	6	604	69.4	4.94
	EDS38022.1	chitotriosidase-1	178.22	17.27	7	440	48.6	6.81
	EDS34537.1	cytochrome P450 12b1. mitochondrial	177.44	8.19	4	525	60.0	7.74
	EDS45921.1	Vanin-like protein 1	166.86	7.21	4	555	61.6	5.14
	BAK26813.1	cytochrome P450	164.41	13.41	7	537	61.4	7.55
	EDS28166.1	elongation factor 2	163.42	5.43	5	1031	114.4	6.71
	EDS28386.1	transferrin	158.64	15.15	5	462	51.4	6.67
	EDS32421.1	calnexin	158.29	13.41	7	589	66.6	4.65
	EDS34510.1	cytochrome P450 9b2	157.50	11.42	5	534	61.3	7.90

Seção	Acesso n°	Descrição	Score	Cobertura (%)	N° Peptídeos únicos	continuação		
						N° Aminoácidos	PM predito [kDa]	pI
	EDS40900.1	saccharopine dehydrogenase domain-containing protein	156.83	11.63	5	430	47.7	8.47
	EDS32097.1	prolylcarboxypeptidase	150.43	9.38	3	501	57.5	4.83
	EDS38838.1	glutactin	150.03	10.70	5	570	63.2	5.94
	EDS44930.1	l(2) long form	148.82	4.95	5	1294	148.8	4.58
	EDS32098.1	prolylcarboxypeptidase	144.01	15.29	6	726	84.5	4.61
	EDS25721.1	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	141.98	6.75	4	607	66.1	6.54
	EDS27857.1	UDP-glucuronosyltransferase 2B4	141.38	10.56	4	521	59.0	7.62
	AEN19673.1	cytochrome P405 CYP9J40	136.89	15.46	5	524	59.8	8.50
	EDS28616.1	catalase	134.43	12.04	5	490	55.0	7.43
	EDS37300.1	oligosaccharyltransferase alpha subunit	128.00	10.46	5	459	51.8	8.22
	B0WYY2.1	RecName: Full=Moesin/ezrin/radixin homolog 1	123.67	9.62	6	572	67.7	5.68
	EDS26512.1	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit. mitochondrial	122.42	6.05	3	661	72.1	6.46
	EDS45144.1	dolichyl-diphosphooligosaccharide protein glycotransferase	118.05	5.08	2	453	49.5	5.71
	BAI77921.1	cytochrome P450	116.88	13.41	6	507	57.4	8.46
	EDS44961.1	myosin-Id	113.40	3.18	2	692	77.9	9.14
	BAI77925.1	cytochrome P450	112.08	7.30	4	493	57.3	8.12
	EDS26138.1	cytochrome P450	109.67	6.79	2	501	57.3	7.53
	EDS43476.1	glycogen phosphorylase	106.39	2.73	2	842	96.6	6.37
	EDS30018.1	apolipoporphins	105.93	0.72	2	3324	366.8	7.36
	EDS27182.1	prolylcarboxypeptidase	104.81	8.79	4	512	58.3	4.56
	EDS41432.1	conserved hypothetical protein	100.23	7.54	2	305	34.6	7.14
	EDS42579.1	glucosyl transferase	98.98	6.01	3	516	58.2	7.69
	EDS34040.1	fatty acid oxidation complex subunit alpha	97.04	6.45	4	744	79.7	9.06
	EDS35048.1	conserved hypothetical protein	90.01	8.99	5	645	71.4	6.86
	EDS31797.1	synaptotagmin	85.68	3.64	3	825	89.9	6.35

Seção	Acesso nº	Descrição	Score	Cobertura (%)	Nº Peptídeos únicos	Nº Aminoácidos	continuação	
							PM predito [kDa]	pI
	EDS30010.1	conserved hypothetical protein	77.74	2.04	2	931	103.5	5.02
	EDS41303.1	24-dehydrocholesterol reductase	72.17	3.57	2	504	58.4	8.38
	EDS34513.1	cytochrome P450 9b2	71.72	3.33	2	540	61.8	6.49
	EDS43339.1	brain chitinase and chia	70.89	9.48	5	485	53.5	5.34
	EDS31007.1	aminopeptidase N	68.48	4.43	4	926	105.4	6.19
6	EDS31006.1	aminopeptidase N	984.52	13.66	23	1852	210.0	5.08
	EDS35272.1	conserved hypothetical protein - ATP synthase subunit alpha	613.20	32.30	16	551	59.3	8.94
	EDS27254.1	ATP synthase beta subunit	546.45	33.07	13	511	54.6	5.12
	EDS26297.1	calcium-transporting atpase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type	380.57	13.67	2	995	109.1	5.59
	EDS38798.1	mitochondrial processing peptidase beta subunit	352.77	20.25	10	474	52.2	6.13
	EDS27170.1	truncated ER mannose-binding lectin	279.17	18.26	8	471	53.4	6.05
	EDS35706.1	vacuolar ATP synthase subunit H	243.87	15.19	6	474	54.5	6.14
	EDS34125.1	conserved hypothetical protein	211.62	31.65	3	376	41.8	5.48
	EDS37675.1	conserved hypothetical protein	210.59	11.50	7	887	98.8	5.76
	EDS36615.1	adipocyte plasma membrane-associated protein	182.45	8.56	6	841	92.2	8.06
	EDS28872.1	disulfide-isomerase A6	178.50	15.14	6	436	47.5	5.49
	EDS26631.1	juvenile hormone epoxide hydrolase 1	126.90	9.52	5	462	53.0	6.92
	EDS38951.1	alpha-glucosidase	121.02	7.77	4	605	69.4	5.20
	EDS45881.1	gamma glutamyl transpeptidase	118.93	4.49	2	579	62.2	5.20
	EDS26147.1	sodium/potassium-transporting ATPase alpha chain	117.12	5.44	3	735	80.3	5.67
	EDS32421.1	calnexin	92.60	7.98	4	589	66.6	4.65
	EDS26585.1	enolase	92.12	5.08	2	433	46.6	6.76
	EDS29972.1	ATP synthase alpha subunit vacuolar	91.18	4.40	2	614	68.1	5.39
	EDS42147.1	gram-negative bacteria binding protein	88.09	8.74	3	412	46.7	5.08
	EDS44961.1	myosin-Id	86.80	3.18	2	692	77.9	9.14
	EDS30648.1	arginine kinase	77.89	7.80	3	410	45.1	5.80

Seção	Acesso nº	Descrição	Score	Cobertura (%)	Nº Peptídeos únicos	Nº Aminoácidos	continuação	
							PM predito [kDa]	pI
	ABC59609.1	maltase 1	76.87	4.14	2	580	66.2	5.95
	EDS28502.1	carboxylesterase-6	75.82	3.96	2	632	71.1	6.19
7	EDS26629.1	juvenile hormone epoxide hydrolase 1	206.65	25.16	7	457	51.7	8.41
	EDS42147.1	gram-negative bacteria binding protein	163.44	12.86	5	412	46.7	5.08
	EDS27093.1	trifunctional enzyme beta subunit	159.37	16.49	7	467	50.3	9.01
	EDS30648.1	arginine kinase	142.07	15.61	6	410	45.1	5.80
	EDS30010.1	conserved hypothetical protein	116.28	4.19	3	931	103.5	5.02
	EDS27170.1	truncated ER mannose-binding lectin	110.70	6.58	3	471	53.4	6.05
	EDS26190.1	adenosine diphosphatase	110.41	12.45	4	466	51.6	7.77
	EDS26631.1	juvenile hormone epoxide hydrolase 1	107.01	7.79	3	462	53.0	6.92
	EDS31071.1	polyadenylate-binding protein 1	85.94	4.62	2	628	69.7	9.47
	EDS26147.1	sodium/potassium-transporting ATPase alpha chain	82.21	4.76	3	735	80.3	5.67
	EDS44431.1	fasciclin	71.84	7.08	2	452	48.4	5.17
	EDS27419.1	protease m1 zinc metalloprotease	67.48	2.57	2	1011	113.2	5.12
8	EDS35272.1	conserved hypothetical protein - ATP synthase alpha subunit	2921.97	55.90	35	551	59.3	8.94
	EDS26297.1	calcium-transporting atpase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type	2335.41	32.46	4	995	109.1	5.59
	EDS34125.1	conserved hypothetical protein	2191.72	56.65	6	376	41.8	5.48
	EDS27254.1	ATP synthase beta subunit	2118.71	46.97	19	511	54.6	5.12
	EDS44094.1	actin 1	1699.07	48.94	3	376	41.7	5.39
	EDS25844.1	actin-2	1689.34	47.61	6	376	41.6	5.48
	EDS30322.1	ATP synthase gamma chain. mitochondrial	1211.21	54.21	17	297	32.8	8.88
	EDS29972.1	ATP synthase alpha subunit vacuolar	765.00	31.76	17	614	68.1	5.39
	EDS34040.1	fatty acid oxidation complex subunit alpha	760.17	26.34	18	744	79.7	9.06
	EDS38275.1	conserved hypothetical protein	755.20	34.77	10	302	33.0	9.72
	EDS26604.1	voltage-dependent anion-selective channel	652.29	45.39	11	282	30.7	8.56
	EDS28370.1	sodium/potassium-dependent ATPase beta-2 subunit	602.81	34.05	10	326	37.9	6.79

Seção	Acesso nº	Descrição	Score	Cobertura (%)	Nº Peptídeos únicos	continuação		
						Nº Aminoácidos	PM predito [kDa]	pI
	EDS38514.1	sarcalumenin	579.44	13.57	12	958	107.6	3.93
	EDS28367.1	sodium/potassium-dependent ATPase beta-2 subunit	521.83	35.65	10	317	36.2	7.64
	EDS39731.1	78 kDa glucose-regulated protein	520.06	21.46	11	657	72.3	5.20
	EDS30029.1	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	494.92	30.07	9	306	34.5	6.93
	EDS36550.1	ubiquinol-cytochrome c reductase complex core protein	493.72	21.41	10	439	45.3	8.84
	EDS40274.1	40S ribosomal protein S3	484.58	34.80	9	250	27.5	9.61
	EDS30648.1	arginine kinase	458.40	26.83	13	410	45.1	5.80
	EDS26147.1	sodium/potassium-transporting ATPase alpha chain	449.65	17.41	11	735	80.3	5.67
	EDS36304.1	sodium/potassium-dependent ATPase beta-2 subunit	447.15	24.66	7	292	33.4	6.24
	EDS26512.1	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit. mitochondrial	436.97	13.77	7	661	72.1	6.46
	EDS37338.1	short-chain dehydrogenase	416.40	21.52	7	316	34.6	8.13
	EDS29666.1	vacuolar ATP synthase subunit e	389.43	27.88	7	226	25.8	6.81
	EDS27419.1	protease m1 zinc metalloprotease	377.47	11.28	10	1011	113.2	5.12
	EDS34105.1	vacuolar ATP synthase subunit ac39	367.69	33.05	8	348	39.6	4.94
	EDS28166.1	elongation factor 2	349.85	6.40	6	1031	114.4	6.71
	EDS44958.1	myosin heavy chain	341.20	1.61	2	1927	219.3	5.97
	EDS34461.1	60S ribosomal protein L5	314.24	16.50	6	297	34.0	9.73
	EDS32198.1	vacuolar ATP synthase subunit C	303.68	17.99	10	528	60.0	6.13
	EDS41621.1	40S ribosomal protein SA	303.08	14.54	3	282	30.8	4.91
	EDS38023.1	bacteria responsive protein 1; AgBR1	300.66	14.03	5	449	49.2	8.43
	EDS33081.1	60S acidic ribosomal protein P0	296.73	25.08	6	315	33.9	5.81
	EDS35981.1	endoplasmin	291.51	15.11	10	794	91.0	4.98
	EDS41216.1	anionic trypsin-2	281.48	12.12	3	297	31.8	7.88
	EDS42199.1	proliferation-associated 2g4	280.01	13.82	5	434	46.8	8.22
	AEN19673.1	cytochrome P405 CYP9J40	275.46	15.84	6	524	59.8	8.50
	EDS44784.1	lysosomal aspartic protease	275.27	19.90	6	387	41.7	5.31

Seção	Acesso nº	Descrição	Score	Cobertura (%)	Nº Peptídeos únicos	Nº Aminoácidos	continuação	
							PM predito [kDa]	pI
	EDS36212.1	tubulin alpha-2 chain	268.68	9.35	3	449	49.8	5.14
	BAI77924.1	cytochrome P450	257.61	19.76	9	496	56.3	7.69
	EDS30010.1	conserved hypothetical protein	257.32	6.12	5	931	103.5	5.02
	EDS27170.1	truncated ER mannose-binding lectin	253.46	12.31	6	471	53.4	6.05
	EDS42768.1	steroid dehydrogenase	243.73	16.30	4	319	34.7	9.50
	EDS34510.1	cytochrome P450 9b2	242.12	8.24	4	534	61.3	7.90
	EDS42147.1	gram-negative bacteria binding protein	235.12	13.59	5	412	46.7	5.08
	EDS45475.1	conserved hypothetical protein	225.43	20.78	6	332	35.4	8.25
	EDS32263.1	serine-type endopeptidase	224.32	19.59	3	296	32.0	5.02
	EDS32138.1	heat shock 70 kDa protein cognate 4	218.49	10.53	4	655	71.4	5.52
	EDS30841.1	conserved hypothetical protein	216.54	9.31	6	462	52.9	5.24
	EDS33630.1	zinc carboxypeptidase A 1	193.62	14.65	4	430	48.9	5.19
	EDS38373.1	activated protein kinase C receptor	189.62	28.30	9	311	34.9	7.88
	EDS38397.1	soluble NSF attachment protein	177.44	17.75	5	293	33.0	5.85
	EDS28502.1	carboxylesterase-6	177.38	5.06	3	632	71.1	6.19
	EDS44930.1	l(2) long form	165.06	3.79	4	1294	148.8	4.58
	EDS26618.1	prohibitin-2	164.97	15.38	5	299	33.1	9.67
	EDS39442.1	V-type ATP synthase beta chain	162.82	9.15	4	492	54.7	5.49
	EDS35346.1	membrane associated progesterone receptor	153.54	23.25	4	228	24.3	4.83
	EDS31006.1	aminopeptidase N	152.31	2.21	4	1852	210.0	5.08
	EDS37258.1	cytochrome P450 9b1	152.07	6.55	2	534	61.0	7.78
	EDS33477.1	phosphatidylinositol transfer protein/retinal degeneration b protein	151.83	24.07	5	270	31.1	6.44
	EDS34661.1	zinc carboxypeptidase	151.47	6.78	2	428	48.8	5.10
	B0WN96.2	RecName: Full=40S ribosomal protein S3a	150.45	15.56	3	270	30.0	9.42
	EDS35048.1	conserved hypothetical protein	147.19	12.25	6	645	71.4	6.86
	EDS40443.1	mitochondrial cytochrome c1	146.62	18.30	4	306	33.2	8.94

Seção	Acesso nº	Descrição	Score	Cobertura (%)	Nº Peptídeos únicos	Nº Aminoácidos	continuação	
							PM predito [kDa]	pI
	EDS39919.1	disulfide isomerase	145.56	6.29	3	493	55.4	4.91
	EDS31640.1	conserved hypothetical protein	145.27	20.90	5	244	26.7	6.65
	EDS37912.1	UDP-glucuronosyltransferase 2C1	131.65	9.63	4	509	56.9	8.79
	EDS35706.1	vacuolar ATP synthase subunit H	126.53	8.44	3	474	54.5	6.14
	EDS27414.1	palmitoyl-protein thioesterase 1	126.32	8.70	2	299	34.0	6.39
	EDS38951.1	alpha-glucosidase	121.69	8.93	5	605	69.4	5.20
	EDS33030.1	cytochrome P450 4g15	120.09	4.42	4	566	64.6	8.53
	EDS33238.1	fructose-bisphosphate aldolase	118.87	7.99	3	363	39.2	7.62
	EDS44707.1	cytochrome P450 93A3	118.01	10.02	5	499	57.6	8.50
	EDS34505.1	cytochrome P450 52A5	117.92	8.52	3	540	62.0	7.44
	EDS34537.1	cytochrome P450 12b1, mitochondrial	112.63	7.43	4	525	60.0	7.74
	EDS37463.1	polyserase-2	111.44	8.14	3	381	40.2	8.10
	EDS43476.1	glycogen phosphorylase	103.80	5.46	5	842	96.6	6.37
	EDS25938.1	succinate dehydrogenase	101.44	10.56	3	303	34.1	7.50
	EDS28607.1	lipase	98.30	10.72	2	345	37.4	6.76
	EDS34662.1	carboxypeptidase A1	96.08	9.18	3	425	48.4	5.19
	EDS36767.1	CD98hc amino acid transporter protein	95.47	3.29	2	639	70.2	5.08
	EDS44578.1	motor-protein	94.33	3.51	3	769	85.2	8.85
	B0WYY2.1	RecName: Full=Moesin/ezrin/radixin homolog 1	93.26	3.32	2	572	67.7	5.68
	EDS35443.1	60S ribosomal protein L14	90.05	13.41	2	179	20.7	11.15
	EDS44962.1	myosin heavy chain	89.24	1.21	2	2068	237.3	5.85
	EDS37025.1	disulfide-isomerase tigA	88.59	7.32	3	396	44.0	5.07
	EDS38798.1	mitochondrial processing peptidase beta subunit	87.83	5.27	3	474	52.2	6.13
	EDS28847.1	long-chain fatty acid transport protein 4	86.09	4.78	3	627	69.7	8.18
	BAK26813.1	cytochrome P450	85.07	3.17	2	537	61.4	7.55
	EDS38696.1	40S ribosomal protein S4	84.10	10.27	3	263	29.7	10.33

Seção	Acesso nº	Descrição	Score	Cobertura (%)	Nº Peptídeos únicos	Nº Aminoácidos	conclusão	
							PM predito [kDa]	pI
	EDS33797.1	retinol dehydrogenase 14	82.53	7.01	2	328	36.1	8.81
	EDS36124.1	NADH-cytochrome b5 reductase	81.51	7.84	3	319	35.1	8.43
	EDS36469.1	multidrug resistance-associated protein 14	78.19	5.23	2	440	48.9	6.67
	EDS29539.1	guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1	76.74	10.59	2	340	37.2	6.58
	EDS45227.1	DNA-J/hsp40	75.82	8.66	3	358	40.8	5.58
	EDS39751.1	conserved hypothetical protein	74.80	7.04	3	412	47.9	8.07
	EDS45747.1	plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	71.69	3.18	3	1195	131.7	6.80
	EDS35011.1	conserved hypothetical protein	70.43	5.05	2	436	50.1	5.39

**APÊNDICE B - PROTEÍNAS DO INTESTINO DE *Aedes aegypti* (21)
IDENTIFICADAS COMO LIGANTES DA TOXINA Cry48Aa /Cry49Aa.**

Quadro 2- Proteínas do intestino de *Aedes aegypti* (21) identificadas como ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa.

Seção	Acesso nº	Descrição	Score	Nº peptideos únicos	PM predito (kDa)	Outras seções
1 (110-180 kDa)	EAT35028.1	AAEL012778-RA protease m1 zinc metalloprotease	111	4	111.9	2,5,7
2 (90-110 kDa)	EAT35028.1	AAEL012778-RA protease m1 zinc metalloprotease	108	3	111.9	1,5,7
	EAT40060.1	AAEL008155-RA protease m1 zinc metalloprotease	70	3	211.1	6,8
3 (70-90 kDa)						
4 (62-70 kDa)						
5 (50-62 kDa)	EAT38121.1	AAEL009955-RA	87	4	367.2	8
	EAT35028.1	AAEL012778-RA protease m1 zinc metalloprotease	70	3	111.9	1,2,7
6 (48-50 kDa)	EAT35030.1	AAEL012783-RA protease m1 zinc metalloprotease	208	5	107.5	7
	EAT43098.1	AAEL005435-PA	116	6	52.2	
	EAT40060.1	AAEL008155-RA protease m1 zinc metalloprotease	103	3	211.1	2,8
7 (45-48 kDa)	EAT36615.1	AAEL011313-PA	148	8	53.1	
	EAT35028.1	AAEL012778-RA protease m1 zinc metalloprotease	138	5	111.9	1,2,5
	EAT43291.1	AAEL005269-PA ubiquinol-cytochrome c reductase	99	4	45.5	
	EAT36616.1	AAEL011314-PA	85	4	51.9	
	EAT35030.1	AAEL012783-RA protease m1 zinc metalloprotease	75	3	107.5	6
	EAT42846.1	AAEL005662-PA	67	3	50.3	
8 (30-45 kDa)	EAT40060.1	AAEL008155-RA protease m1 zinc metalloprotease	120	3	211.1	2,6
	EAT38121.1	AAEL009955-RA	84	3	367.2	5
	EAT42771.1	AAEL005740-PA	72	3	69.1	
	EAT32491.1	AAEL015100-PA calnexin	72	2	68.5	

FONTE: AUTORA

APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO

Insect Biochemistry and Molecular Biology 88 (2017) 63–70



Contents lists available at ScienceDirect

Insect Biochemistry and Molecular Biology

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

Identification of Cry48Aa/Cry49Aa toxin ligands in the midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae



Tatiana Maria Teodoro Rezende ^a, Tatiany Patrícia Romão ^a, Michel Batista ^b, Colin Berry ^c, Michael J. Adang ^d, Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha ^{a,*}

^a Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Recife, PE, 50740-465, Brazil

^b Instituto Carlos Chagas-FIOCRUZ, Curitiba, PR 81350-010, Brazil

^c Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, Cardiff, CF10 3AT, United Kingdom

^d University of Georgia, Athens, GA 30602, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 May 2017

Received in revised form

15 July 2017

Accepted 1 August 2017

Available online 3 August 2017

Keywords:

Lysinibacillus sphaericus

Binary toxin

Cry

Bioinsecticides

Receptors

Mosquito

ABSTRACT

A binary mosquitocidal toxin composed of a three-domain Cry-like toxin (Cry48Aa) and a binary-like toxin (Cry49Aa) was identified in *Lysinibacillus sphaericus*. Cry48Aa/Cry49Aa has action on *Culex quinquefasciatus* larvae, in particular, to those that are resistant to the Bin Binary toxin, which is the major insecticidal factor from *L. sphaericus*-based bioinsecticides, indicating that Cry48Aa/Cry49Aa interacts with distinct target sites in the midgut and can overcome Bin toxin resistance. This study aimed to identify Cry48Aa/Cry49Aa ligands in *C. quinquefasciatus* midgut through binding assays and mass spectrometry. Several proteins, mostly from 50 to 120 kDa, bound to the Cry48Aa/Cry49Aa toxin were revealed by toxin overlay and pull-down assays. These proteins were identified against the *C. quinquefasciatus* genome and after analysis a set of 49 proteins were selected which includes midgut bound proteins such as aminopeptidases, amylases, alkaline phosphatases in addition to molecules from other classes that can be potentially involved in this toxin's mode of action. Among these, some proteins are orthologs of Cry receptors previously identified in mosquito larvae, as candidate receptors for Cry48Aa/Cry49Aa toxin. Further investigation is needed to evaluate the specificity of their interactions and their possible role as receptors.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lysinibacillus sphaericus is an entomopathogen bacterium that can produce crystals containing protoxins with high and selective activity against mosquito larvae, in particular those from the *Culex pipiens* complex. Some insecticidal proteins have been identified in *L. sphaericus* strains (Allievi et al., 2014; Berry, 2012) and the Binary crystal protoxin (Bin), which was the first mosquitocidal factor characterized, remains the active principle of the commercial larvicides based on this bacterium (Silva-Filha et al., 2014). Bin is a heterodimer composed of BinA (42 kDa) and BinB (51 kDa) polypeptides which are produced at high levels in equimolar concentrations by some strains (Charles et al., 1996). Bin achieves the optimal activity only when both components are present, which

characterizes its binary nature (Nicolas et al., 1993). Its mode of action has been mostly studied in species from the *Culex pipiens* complex and, after ingestion and proteolytic processing of protoxins, the active BinB subunit is responsible for specifically binding to the Cpm1/Cqm1 α -glucosidases that act as midgut receptors (Darboux et al., 2001; Romão et al., 2006; Silva-Filha et al., 1999), while the BinA component is associated with cell toxicity (Nicolas et al., 1993). Resistance of *C. pipiens* and *C. quinquefasciatus* larvae to Bin toxin has been recorded (Mulla et al., 2003; Nielsen-Leroux et al., 2002; Rao et al., 1995; Wirth et al., 2000; Yuan et al., 2000) due to mutations in genes encoding the receptors, which lead to the production of truncated or non-functional proteins and cause the failure of Bin toxin binding on the midgut epithelium. This has been the major resistance mechanism documented and *cpm1/cqm1* alleles causing such failures have been reported (Chalegre et al., 2012, 2015; Darboux et al., 2002, 2007; Darboux et al., 2002; Guo et al., 2013; Romão et al., 2006).

Resistance to *L. sphaericus* based on loss of Bin toxin binding

* Corresponding author. Department of Entomology, Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, 50740-465, Brazil. E-mail address: mhneves@cpqam.fiocruz.br (M.H.N.L. Silva-Filha).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.08.001>

0965-1748/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

highlights the need to characterize molecules with distinct modes of action. Investigation of *L. sphaericus* strain IAB59 began soon after the first reports of Bin-based resistance since this strain is toxic to Bin-resistant larvae, suggesting the production of a novel insecticidal factor that can overcome resistance to Bin toxin (Nielsen-LeRoux et al., 2001; Pei et al., 2002; Yuan et al., 2003). Jones et al. (2007) identified the insecticidal factor as Cry48Aa (135 kDa) and Cry49Aa (53 kDa), which are also produced as protoxins in small crystalline inclusions during sporulation. Cry48Aa/Cry49Aa is considered a new binary toxin produced by *L. sphaericus* since neither the Cry48Aa nor Cry49Aa component shows toxicity to larvae alone (Jones et al., 2007). They can act in synergy forming the complex Cry48Aa/Cry49Aa through the N-terminal portion of the Cry49Aa subunit (Guo et al., 2016). These toxins have comparable toxicity to Bin against *C. quinquefasciatus*, and remain active to Bin-resistant larvae, when both Cry toxins are produced as recombinant proteins and are administered in equimolar ratios (Jones et al., 2008). Unfortunately, native strains are deficient in expression of Cry48Aa and do not attain the optimal 1:1 Cry48Aa:Cry49Aa ratio required for high toxicity, which accounts for why strains such as IAB59 can produce both binary toxins, but are not more toxic than strains producing only Bin toxin.

The Cry48Aa component of the toxin belongs to the three-domain (3D) structural family of Cry proteins with 33% amino acid identity with the Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* (Bti) (Boonserm et al., 2006; Jones et al., 2007). Cry49Aa is part of the group Bin-toxin-like proteins (Toxin-10 family) with about 30% identity to both subunits of the Bin toxin from *L. sphaericus*, in addition to comparable identity to Cry36 (34%) and Cry35 (20%) produced by *B. thuringiensis* strains (Berry, 2012; Jones et al., 2007). The initial steps of the mode of action of Cry48Aa and Cry49Aa are similar to that of the Bin toxin comprising ingestion of crystals, solubilization under alkaline pH and proteolytic activation of protoxins into toxins (Jones et al., 2008), interaction with midgut (de Melo et al., 2009; Guo et al., 2016) followed by cytopathological effects which appear similar to those produced by a synergistic mixture of Cry-like and Bin-like toxins (de Melo et al., 2009). However, the identity of ligands and receptors in the larval midgut that underlie toxic action and larval mortality is still unknown. The investigation of this specific step of the mode of action is strategic since Cry48Aa/Cry49Aa is toxic to Bin-resistant *C. quinquefasciatus* lacking the midgut receptors (Cqm1) for Bin toxin (de Melo et al., 2009; Pei et al., 2002) which indicates that the Cry48Aa/Cry49Aa toxin complex interacts with distinct molecules mediating toxicity to larvae. Recently it was shown that both subunits display the ability to bind to the *C. quinquefasciatus* larval midgut (Guo et al., 2016). In this context, the major goal of the present study was to identify potential ligands for Cry48Aa/Cry49Aa in the midgut of *C. quinquefasciatus* larvae and contribute to the understanding of the mode of action of this mosquitoicidal toxin.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of cry toxins

Cry48Aa and Cry49Aa were produced individually in the acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* strain 4Q7 transformed with plasmids pSTAB135 and pHTP49, which carry genes encoding the respective toxins (Jones et al., 2007). Cultures were grown in sporulation medium (de Barjac and Lecadet, 1976) supplemented with 1% glucose and erythromycin (25 µg/ml), under agitation (200 rpm) at 30 °C, for 72 h until reaching sporulation (≥80%). Spore-crystal biomass was centrifuged, sequentially

washed with 1M NaCl/10 mM EDTA pH 8.0 and 10 mM EDTA pH 8.0, and stored at –80 °C. Crystal/spores from both recombinant Bt strains were also processed together. For this purpose biomass containing spore-crystals of each protein were combined (1:1 wt/wt), solubilized (50 mM NaOH, 30 °C, 1 h, at 150 rpm), the supernatant containing both solubilized proteins was separated by centrifugation (21,000g, 4 °C, 30 min) and the pH was adjusted to ≈8.5 using 0.1 M HCl. Combined protoxins were activated with pancreatic bovine trypsin (1:100 wt/wt, 30 °C, 1 h). Supernatant, containing the activated proteins, was centrifuged as described above and then dialyzed (0.02 M sodium phosphate, pH 8, 4 °C, 16 h). Protein concentration was determined according to Bradford (1976) using the Biorad reagent (Biorad, Hercules, CA, USA) and a bovine serum albumin standard curve. Size and the integrity of proteins were analyzed in 10% SDS-PAGE. Activated proteins were stored at –80 °C. Moreover, in this study Cry49Aa protein fused to a C-terminal poly-histidine tag (Cry49Aa-His) was individually produced in *Escherichia coli* T7 express cells (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). For this purpose, the *cry49Aa* gene was amplified from pHTP49 (described above) using specific primers containing *Bam*HI (bold) and *Not*I (underlined) restriction sites (Fwd 5'-CGAGGATCCATGAAAATCAAATAAAAGAGAATTAAAC-3', Rev 5'-CGAGCGGCCGCATTATAATATGGCTTTGAATTTTCATG-3') and subsequently cloned into the expression vector pET21a⁺ (Novagen, USA). Antibodies against the His-tag were used to track binding of the Cry48Aa/Cry49Aa mix through the Cry49-His. Attempts to produce Cry48Aa in *E. coli* in order to have a suitable expression to evaluate this toxin were not successful. Cry49Aa cultures of transformed T7 express cells were grown using Luria-Bertani (LB) medium supplemented with ampicillin (100 µg/ml) (under agitation, 200 rpm, 37 °C until reaching an OD₆₀₀ of 0.5), and induced with IPTG (0.1 mM, 30 °C, 4 h). Cultures were centrifuged (21,500g, 4 °C, 10 min), the cell pellets were re-suspended in phosphate-buffered saline pH 7.4 (PBS), sonicated, and Triton X-100 was added to a final 1% vol/vol. The samples were centrifuged (1700g, 30 min, 4 °C) and proteins from the supernatants were purified using the Ni-NTA resin (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Proteins were eluted with 1M imidazole in wash buffer (50 mM sodium phosphate-buffer, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 6, 4 °C, 1 h) and dialyzed (50 mM dibasic sodium phosphate, 5 mM monobasic sodium phosphate, 50 mM NaCl, 0.1% Triton x-100, 5% glycerol, pH 7.8, 4 °C, overnight). Protein integrity and concentration were verified, as previously described. The purified Cry49Aa-His from *E. coli* was combined with solubilized Cry48Aa from Bt in 1:2 ratio (µg protein: µg protein) and the mixed sample was subjected to *in vitro* processing, as previously described. The concentration and integrity of the activated mix of proteins was verified by 10% SDS-PAGE and then it was stored at –80 °C. Cry49Aa fused to glutathione S-transferase (Cry49Aa-GST) was also individually produced in *E. coli* BL21 Star[™] (DE3) cells (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA). *cry49Aa* gene was amplified from pHTP49 using the following primers containing *Bam*HI and *Not*I sites as described (Fwd 5'-CGAGGATCCATG-GAAAATCAAATAAAAGAGAATTAAAC-3', Rev 5'-CGAGCGGCCGCT-TAATTATAATATGGCTTTGAATTTTCATG-3'). The BinB subunit of the binary toxin fused to glutathione S-transferase (BinB-GST) was also produced according to Romão et al. (2006). Further steps to produce purified GST proteins are also described in that study.

2.2. Mosquito strain

Fourth instar larvae of the CqSLab *Culex quinquefasciatus* strain were used in this study. This colony has been maintained in the

insectarium of the Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ for more than five years under controlled conditions of 26 ± 1 °C, 70% relative humidity, and a 12 h:12 h (light/dark) photoperiod. CqSLab is a laboratory reference colony susceptible to insecticidal compounds. Larvae were reared in dechlorinated water and fed on cat food. Adults were maintained on a 10% sugar solution, and females were also artificially fed with rabbit blood.

2.3. Midgut brush border membrane fractions

Midgut apical membrane enriched preparations, called brush border membrane fractions (BBMFs), were prepared with batches of whole frozen (-80 °C) 4th instar larvae (5 g) as described by (Silva-Filha et al., 1997). BBMFs were solubilized with 1% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate) according to Silva-Filha et al. (1999). BBMF and CHAPS-solubilized proteins (CHAPS-extract) were stored at -80 °C. Protein concentration was determined as described in section 2.1 and the enrichment of proteins from apical cell membranes was evaluated through the detection of α -glucosidase activity (EC 3.2.1.20), according to Ferreira et al. (2014).

2.4. Homologous competition binding assays

Competition assays were performed to evaluate the capacity of radiolabeled (125 I) individual Cry48Aa, Cry49Aa and a mixture of these toxins to bind to BBMF, according to Silva-Filha et al. (1997). Labeled individual toxins or a mixture of Cry48Aa/Cry49Aa (1:1) (10 nM) were incubated with BBMF proteins (25 μ g) in the absence, or in the presence of increasing concentrations (3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 nM), of each homologous unlabeled toxin used as competitor, for 16 h at room temperature (RT). After incubation, 125 I-toxins bound to BBMF were separated through centrifugation (21,000g, 15 min, 4 °C), sediments were rinsed twice with PBS, added to a scintillation cocktail and analyzed using a scintillation beta counter. Each experimental point was repeated at least four times and the inhibitory concentration of the competitor that reduces the binding response by half (IC_{50}) was determined using GraphPad Prism™ software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

2.5. Toxin overlay assays

As an initial approach to identify the *C. quinquefasciatus* midgut proteins that bind to Cry48Aa/Cry49Aa-His toxin, proteins (30–40 μ g) from BBMF and CHAPS-extracts were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose Protran® membranes (GE Healthcare, Germany). Membranes were first incubated in TBS-T buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20), containing 5% nonfat dry milk at RT for 1 h and then with a mix (100 μ g) of Cry48Aa/Cry49Aa-His activated toxins (16 h at 4 °C). Unbound toxins were removed by washing with TBS-T buffer (4 \times 15 min at RT). Membranes were then incubated with a primary monoclonal serum raised against poly-histidine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (1:5,000, 1 h at RT) followed by washings and incubation with the secondary serum raised against mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (1:10,000, 1 h at RT). After washing, membranes were subjected to chemiluminescence detection using Luminata Forte® (Millipore, Billerica, MA, USA) to detect binding of the Cry48Aa/Cry49Aa mix through the Cry49Aa-His bound to midgut proteins. Similar membranes with midgut proteins, but without incubation with the Cry48Aa/Cry49Aa-His mix, were subjected to immunodetection and were used as negative controls. Assays were conducted in triplicate.

2.6. Pull-down assays

Protein–protein binding assays were also performed using a mix of Cry48Aa/Cry49Aa activated toxins immobilized on CNBr activated sepharose 4B® (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) beads adapted from the protocol described by Zhou et al. (2016). Briefly, activated Cry48Aa/Cry49Aa mix (1 mg) was immobilized on beads (500 μ L), for 16 h at 4 °C. After washings (0.2 M NaHCO₃ pH 8.3) potential remaining active groups on the resin were blocked (glycine 0.1 M pH 8, 6 h at RT) and the coupled Cry48Aa/Cry49Aa beads were re-suspended in a final volume of 500 μ L of PBS (pH 7.4) and stored at 4 °C. Pull-down assays were then conducted using Cry48Aa/Cry49Aa beads (50 μ L) and CHAPS-extracts (50 μ g) incubated for 2 h at 4 °C. After incubation, unbound proteins were removed by centrifugation (400g, 30 s, 4 °C) and beads were washed five times with 500 μ L of PBS pH 7.4/1 M NaCl, followed by five washes with 500 μ L of PBS pH 7.4. Proteins that remained bound to the Cry48Aa/Cry49Aa beads were solubilized in Laemmli buffer boiled for 10 min and visualized in 10% SDS-PAGE. Samples of CNBr sepharose beads coupled with 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.5) were submitted to pull-down assays with CHAPS-extracts and used as negative controls. Gels were stained with Coomassie blue or PlusOne Silver Staining kit® (GE Healthcare). At least three gels for each staining were analyzed.

A second set of pull-down assays was conducted using recombinant Cry49Aa and BinB toxins produced by *E. coli* fused to glutathione S-transferase (GST) and immobilized on glutathione-sepharose 4B™ beads (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), according to Romão et al. (2006). For the assays the Cry49Aa-GST beads were pre-incubated with activated recombinant Cry48Aa toxin from Bt for 1 h at RT. After this, Cry49Aa-GST beads were recovered by centrifugation (1,500 g, 2 min, 4 °C) and washed three times with BB3 buffer (100 mM KCl/1 mM MgCl₂/50 mM HEPES/0.2% Nonidet P-40®/5% glycerol). Sf9 cell culture medium samples enriched with Cqm1 recombinant protein were obtained as described in Ferreira et al. (2014) and Cqm1 content in samples was estimated based on a standard curve of purified Cqm1 protein immunodetected with an antibody raised against Cqm1 (Romão et al., 2006). Medium samples containing Cqm1 protein (0.015–1.5 μ g) were incubated with equivalent amounts (\sim 10 μ g) of BinB beads, or Cry49Aa beads, or GST beads (negative control) for 2 h, at RT in BB3 buffer. After incubation beads samples, washed and recovered as described above, were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and subjected to immunoblotting with the anti Cqm1 antibody.

2.7. Mass spectrometry analysis

Protein samples from a silver stained gel were sectioned into eight parts according to the molecular weight range and sent for LC-MS/MS analysis in the Proteomics and Mass Spectrometry Facility (PAMS) from the University of Georgia. In-gel digestions of these bands were performed. The tryptic peptides were analyzed by an Orbitrap Elite mass spectrometer coupling with a Proxeon nanoLC system (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The data-dependent acquisition (DDA) Top 8 method was used to acquire MS data. Protein identification and characterization of modifications were performed using Thermo Proteome Discoverer (version 1.4) with Mascot (Matrix Science, London, UK). The NCBI proteome reference database for *C. quinquefasciatus* was downloaded on October 10, 2016. The searched protein database was complete, but redundant; the 39,875 entry database was composed of 18,883 entries from the NCBI reference protein database for *C. quinquefasciatus* and Refseq, UniProt and EMBL *C. quinquefasciatus* protein entries.

66

T.M.T. Rezende et al. / Insect Biochemistry and Molecular Biology 88 (2017) 63–70

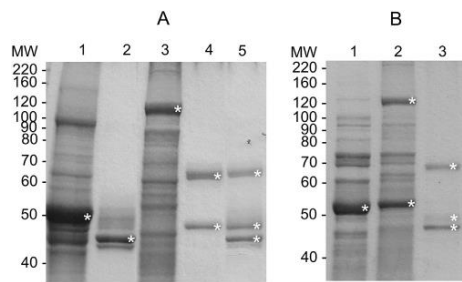


Fig. 1. Cry48Aa and Cry49Aa recombinant proteins separated in 10% SDS-PAGE and visualized with Coomassie blue. **A.** Proteins expressed in *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* 4Q7 strain, Cry49Aa solubilized (1) and activated (2), Cry48Aa solubilized (3) and activated (4), mixture of Cry48Aa/Cry49Aa activated together (5). **B.** Cry49Aa-His produced in *Escherichia coli* (1), mix of protoxins Cry48Aa/Cry49Aa-His (2), mix Cry48Aa/Cry49Aa-His activated together (3). MW molecular weight in kDa. * protoxins and their activated forms.

3. Results

3.1. Production of cry toxins

Crystal/spore samples individually produced in the recombinant Bt strains were the sources of Cry49Aa (≈ 53 kDa) and Cry48Aa (≈ 135 kDa), yielding protoxins with their expected molecular weights (Fig. 1A, lanes 1 and 3). *In vitro* processing of Cry49Aa protoxin produced a major polypeptide of ≈ 44 kDa while Cry48Aa processing resulted in fragments of ≈ 68 and 46 kDa (Fig. 1A, lanes 2 and 4). Crystal/spores from both recombinant Bt strains were also processed together, as described in section 2.1, and the mix of activated proteins showed a similar activation pattern to that of the individually processed toxins (Fig. 1A, lane 5). The mix of activated Cry48Aa/Cry49Aa toxins was employed for pull-down assays, based on the results of competition binding assays described below in section 3.2. Cry49Aa protoxin containing a poly-histidine tag (Cry49Aa-His) was also produced in *E. coli* as a recombinant protein of ≈ 53 kDa (Fig. 1B, lane 1). A mix of protoxins produced in Bt and *E. coli* (Cry48Aa/Cry49Aa-His) respectively (Fig. 1B lane 2), processed *in vitro* exhibited the pattern (Fig. 1B, lane 3) (Cry48Aa, ≈ 68 and 46 kDa; Cry49Aa ≈ 44 kDa) as observed before (Fig. 1A, lane 5). Similarly, this Cry48Aa/Cry49Aa-His mixture of activated toxins was employed to perform overlay assays. Cry49Aa-GST and BinB-GST were successfully produced and showed a expected molecular of around 80 kDa (data not shown).

3.2. Cry toxins binding to midgut proteins

Midgut brush border membrane fractions (BBMF) used in assays showed a protein concentration of $5.1 \pm 0.8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ and the enrichment of α -glucosidase activity in the BBMF, compared to the initial whole larvae extract used, was 3.3 ± 0.9 fold. First, homologous competition assays were performed to evaluate the binding capacity of Cry48Aa and Cry49Aa toxins to *C. quinquefasciatus* BBMF. Individual labelled toxins and the mixture of labeled Cry48Aa/Cry49Aa bound specifically to BBMF and were displaced in presence of the respective unlabeled homologous competitors (Fig. S1). Labeled Cry48Aa/Cry49Aa showed a lower IC_{50} (41 nM), compared to those observed for Cry48Aa (83 nM) and Cry49Aa (95 nM) individual labeled toxins (Fig. S1), indicating that the binding affinity of the Cry48Aa/Cry49Aa mix to *C. quinquefasciatus* BBMF is higher

than the individual toxins.

The binding ability of the activated Cry48Aa/Cry49Aa-His mixture to the *C. quinquefasciatus* BBMF proteins was investigated through overlay assays. Cry48Aa/Cry49Aa-His mix recognized midgut proteins of about 52, 58, 65, 73, 80, 90, 100–125 kDa, based on the immunodetection of bound Cry49Aa-His toxin (Fig. 2A, lanes 1, 3). Most of the proteins observed in these BBMF samples were also detected in solubilized midgut proteins (CHAPS-extract) (Fig. 2A, lanes 2, 4). Cry49Aa-His, included among the SDS-PAGE samples as positive control, was recognized by the monoclonal antibody raised against the poly-histidine tail of this protein (Fig. 2A, lane 5). In parallel the immunodetection of midgut proteins without incubation with the Cry48Aa/Cry49Aa-His mix, was used as a negative control. In this assay two major proteins (≈ 44 and 48 kDa) from BBMF and CHAPS-extract (Fig. 2B, lanes 1–4) were recognized by the anti-His antibody and they were discarded from further analysis as potential binding proteins as well as proteins whose molecular weights were lower than 40–50 kDa since they seemed to be a result of non-specific binding, as observed on negative control blot overlays.

3.3. Identification of Cry48Aa/Cry49Aa binding proteins

A proteomic approach was performed to identify Cry48Aa/Cry49Aa binding proteins from *C. quinquefasciatus* solubilized BBMF proteins. Pull-down assays were performed between midgut CHAPS-solubilized proteins (Fig. 3, lane 1) and activated Cry48Aa/Cry49Aa toxins immobilized on CNBr-beads (Fig. 3, lane 2). Pull-down, i.e. extracted proteins were separated by 10% SDS-PAGE and then visualized by silver staining. Separation of proteins from the Cry48Aa/Cry49Aa beads alone (not incubated with gut extracts) showed major bands of ≈ 68 , 46 and 44 kDa, a profile similar to the activated Cry48Aa/Cry49Aa toxins (Fig. 1A, lane 5). A band of ≈ 90 kDa is possibly a Cry49Aa dimer that is stable under the conditions of this assay. Midgut proteins that bound to the immobilized toxins (Fig. 3, lane C) showed apparent molecular weights consistent with those immunodetected as potential ligands in the overlay assays (Fig. 2A, lanes 1–4). When midgut solubilized proteins were incubated with CNBr beads that had been prepared by incubation with Tris buffer only (without Cry48Aa/Cry49Aa), used as a negative control, no proteins bound to the beads were visualized by silver staining (data not shown). Lane C from the pull-down assay (Fig. 3) was cut into eight sections that were subjected to LC-MS/MS analysis. A list of 266 *C. quinquefasciatus* proteins from gel sections (1–8) with a significant score higher than 67

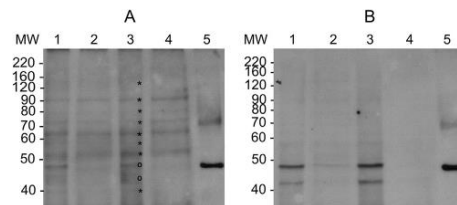


Fig. 2. Overlay assays performed between *Culex quinquefasciatus* midgut proteins and Cry48Aa/Cry49Aa-His. Midgut proteins from BBMF (30–40 μg , lanes 1, 3) and after solubilization with CHAPS (30–40 μg , lanes 2, 4) were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, incubated with activated Cry48Aa/Cry49Aa-His (100 μg) (A) or without toxin (B) and subjected to immunodetection with a monoclonal anti-poly-histidine antibody to detect bound Cry49Aa-His. Sample of Cry49Aa-His protein (lane 5, 2 μg). MW molecular weight in kDa. Major proteins detected (*) and those (*) observed in negative control (B).

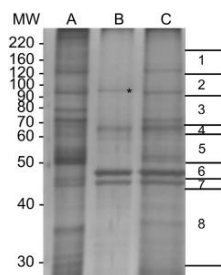


Fig. 3. Proteins identified by pull-down assay. Pull-down assays were performed between solubilized *Culex quinquefasciatus* midgut proteins (A) and a mix of activated Cry48Aa/Cry49Aa toxins immobilized on CNBr-beads (B) and resulting bound proteins to toxin beads (C). Samples were separated in 10% SDS-PAGE and silver stained. MW molecular weight in kDa. The eight sections from lane 3 were subjected to mass spectrometry. Cry49Aa putative dimer (*).

and the number of unique peptides greater than 2 as threshold, is presented in the [Supplementary Table 1 \(Table S1\)](#). From this dataset a group of 49 proteins was selected ([Table 1](#)), in most cases, because they belong to a class previously reported as Cry receptors/ligands, or they were already cited as molecules potentially involved in the mode of action of those toxins. Proteins that were detected in more than one gel section were cited in that section corresponding to its expected molecular weight ([Table 1](#)). When a protein occurred in sections where the molecular weight range differs from the predicted weight, they were cited in the section where they displayed the best scores. Gel section 8 (30–45 kDa) displayed the highest number of identified proteins and this is likely to be related to the presence of polypeptides resulting from the degradation of higher molecular weight proteins. Several selected proteins from [Table 1](#) belong to protein classes that have been described as functional receptors to 3-domain Cry toxins, including aminopeptidases (APN), maltases and alkaline phosphatases (ALPs). Eight of these proteins are orthologs of functional receptors for Cry toxins from *B. thuringiensis* svar. *israelensis* or *B. thuringiensis* svar. *jegathesan* previously identified in *Aedes aegypti* or *Anopheles* larvae ([Table 2](#)). These proteins have molecular weights that were consistent with those of the bands detected in the binding assays. APN molecules were detected in all sections analyzed regardless of the fact that their predicted molecular weights are greater than 100 kDa. Maltases including α -glucosidases also were found in almost all sections and the *C. quinquefasciatus* maltase 1 (Cqm1), the receptor of the Bin toxin, was detected in sections 5 and 6. ALPs, on the other hand, were exclusively detected in section 5. Proteins already described as ligands to Cry toxins as apolipoprotein, actin, dipeptidyl-peptidase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, glucosyl transferase, myosin-Id, prohibitin, ATP synthase (alpha or beta subunit), and V-ATP synthase (subunit E or H) were found with high scores in one or more sections analyzed. In addition, proteins not previously characterized as Cry binding proteins were identified such as aldehyde dehydrogenase, calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type, carboxylesterase-6, carboxypeptidase A1, fasciclin, maltose phosphorylase, panthetheinase, sodium-potassium-transporting ATPase alpha chain, sodium-potassium-dependent ATPase beta-2 subunit, transferrin, truncated ER mannose-binding lectin, and vanin-like protein 1.

The identification of Cqm1 among the ligands led to the investigation of its role in the mode of action of Cry48Aa/Cry49Aa since

this toxin is active against *L. sphaericus* resistant larvae due to the loss of Cqm1 ([de Melo et al., 2009](#)). Pull-down assays between recombinant Cqm1 protein and Cry49Aa-GST immobilized on sepharose beads previously pre-incubated with Cry48Aa, was compared with the respective assay between Cqm1 and the BinB subunit. Cqm1 bound to BinB-GST, as expected, while Cqm1 bound to Cry49Aa-GST but binding was only detected using Cqm1 amounts about 30-fold higher, compared to that used to detect binding to BinB-GST ([Fig. S2](#)).

4. Discussion

Three-domain Cry toxins might require midgut processing for their insecticidal activity and Bin protoxins are also converted in this way ([Berry, 2012; Tabashnik et al., 2015](#)). In this study a mixture of Cry48Aa and Cry49Aa protoxins processed *in vitro* yielded a pattern of activated toxins similar to that observed for individually processed toxins ([Jones et al., 2008](#)). These activated individual subunits showed the capacity to bind to *C. quinquefasciatus* midgut, in agreement with [Guo et al. \(2016\)](#). The IC_{50} values determined in our work were higher but it is likely that differences in the methodology, biotinylated Cry toxins and fresh BBMF employed by [Guo et al. \(2016\)](#), might have improved the resolution of these binding assays. On the other hand our study showed that the Cry48Aa/Cry49Aa mixture bound with higher affinity than the individual subunits and this indicated that both Cry48Aa and Cry49Aa toxins are required to attain maximal binding affinity to *C. quinquefasciatus* midgut, in contrast to Bin binary toxin whose binding ability relies exclusively on the BinB subunit ([Charles et al., 1997](#)). Cry48Aa/Cry49Aa interacts with larval midgut and our study shows a set of *C. quinquefasciatus* proteins that bound to Cry48Aa/Cry49Aa toxin using overlay and pull-down assays. Although our study showed midgut ligands when both Cry48Aa/Cry49Aa toxins were employed in the assays, the role of each toxin for this interaction requires further investigation.

Cry48Aa/Cry49Aa ligands identified in *C. quinquefasciatus* larvae in this study include molecules belonging to protein classes previously characterized as receptors of other Cry toxins, plus other proteins that may be potentially involved in the mode of action. Several forms of APNs/metalloproteases were detected as ligands, which is consistent with previous studies that have demonstrated that APNs act as Cry toxin receptors. In mosquito larvae, for instance, APNs were identified as Cry11Ba, Cry11Aa and Cry4Ba receptors in *Anopheles quadrimaculatus* ([Abdullah et al., 2006](#)), *An. gambiae* ([Zhang et al., 2008](#)) and *Aedes aegypti* ([Aroonkesorn et al., 2015; Chen et al., 2009, 2013](#)). The apparent sizes of several identified APNs suggested proteolytic degradation and/or formation of dimers with high-molecular weight. Some of these *C. quinquefasciatus* APNs are orthologs, with more than 60% identity, to known Cry receptors cited above, which reinforces their possible role as Cry48Aa/Cry49Aa receptors. Maltases, including α -glucosidases and α -amylases, although less numerous than APNs, were also identified and proteins from this class have been reported as receptors for Cry11Aa and Cry4Ba toxins in *An. albimanus* ([Fernandez-Luna et al., 2010](#)) and Cry11Ba toxin in *An. gambiae* ([Zhang et al., 2013](#)). Ortholog α -glucosidases Cpm1 and Cqm1 are proven, and Agm3 is a putative receptor of Bin toxin in *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus* and *An. gambiae*, respectively ([Darboux et al., 2001; Opota et al., 2008; Romão et al., 2006](#)). Agm3 was also reported as a receptor to Cry11Ba toxin in *An. gambiae* ([Zhang et al., 2013](#)) and Cqm1, the Bin receptor in *C. quinquefasciatus*, was identified among the Cry48Aa/Cry49Aa ligands in this study. Cry48Aa/Cry49Aa is active against Bin-resistant larvae deprived of the Cqm1 α -glucosidase and this finding might indicate that Cry48Aa/Cry49Aa binding to Cqm1 is not specific or that the toxin

Table 1
Selected *Culex quinquefasciatus* midgut proteins detected as ligands of Cry48Aa/Cry49Aa toxin through pull-down assays and identification by LC-MS/MS.

Section	Accession no.	Description	Score	Coverage (%)	No. unique peptides	Predicted MW (kDa)	Detection in other sections	
1 (110–180 kDa)	EDS27419.1 ^a	protease m1 zinc metalloprotease	365.96	18.00	9	113.2	2,3,4,5,7,8	
	EDS27892.1	calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/ER type	146.88	7.74	4	88.8	2,4	
2 (90–110 kDa)	EDS27418.1 ^a	protease m1 zinc metalloprotease	93.25	11.25	6	101.2		
	EDS40798.1	CHP ^c	78.46	2.96	2	100.1		
3 (70–90 kDa)	EDS36841.1 ^a	aminopeptidase N	74.67	8.38	3	105.0		
	EDS38951.1 ^a	alpha-glucosidase	619.19	40.83	25	69.4	4,5,6,8	
	EDS30018.1	apolipoporphins	374.88	6.41	18	366.8	4,5	
	EDS38952.1	alpha-glucosidase	374.85	25.37	12	70.6	4,5	
	EDS32575.1	maltose phosphorylase	277.49	18.29	10	85.4		
	EDS45210.1	dipeptidyl peptidase 4	250.82	19.19	12	84.1		
	EDS32578.1	maltose phosphorylase	206.18	15.58	11	85.1		
	EDS32127.1	alpha-glucosidase	199.35	20.66	10	70.7		
	EDS32576.1	maltose phosphorylase	172.15	7.89	5	84.8		
	EDS26147.1	sodium/potassium-transporting ATPase alpha chain	97.64	5.44	3	80.3	5,6,7,8	
4 (62–70 kDa)	EDS35643.1	glutamyl aminopeptidase	93.53	6.02	5	116.5		
	EDS37148.1	dipeptidyl-peptidase	88.24	6.05	5	88.2	2	
	EDS38950.1 ^a	maltase 1	183.05	11.26	6	69.4	5	
	EDS45922.1	pantheinase	113.26	16.47	9	57.1		
	EDS35272.1	CHP ^c ; ATP synthase subunit alpha	191.486	59.17	40	59.3	6,8	
5 (50–62 kDa)	EDS27254.1	ATP synthase beta subunit	1100.18	56.16	21	54.6	2,6,8	
	EDS29323.1	alkaline phosphatase	563.81	27.30	14	62.9		
	ABC59603.1 ^b	maltase 1 (Cqm1)	528.27	29.31	18	66.2	6	
	EDS39449.1	V-type ATP synthase beta chain	515.83	38.82	15	54.7	8	
	EDS29322.1 ^a	alkaline phosphatase	485.67	17.04	13	100.6		
	EDS29972.1	ATP synthase alpha subunit vacuolar	474.63	31.76	15	68.1	3,4,5,6,8	
	EDS27420.1 ^a	protease m1 zinc metalloprotease	215.56	8.23	6	102.7	4	
	EDS35286.1	CHP ^c ; Aldehyde dehydrogenase	200.25	12.86	2	58.1		
	EDS29320.1	alkaline phosphatase	186.96	15.91	5	28.9		
	EDS45921.1	Vanin-like protein 1	166.86	7.21	4	61.6		
	EDS28386.1	transferrin	158.64	15.15	5	51.4	4	
	EDS42579.1	glucosyl transferase	98.98	6.01	3	58.2		
	EDS44961.1	myosin-Id	113.40	3.18	2	77.9	6	
	6 (48–50 kDa)	EDS31007.1	aminopeptidase N	68.48	4.43	4	105.4	
		EDS31006.1	aminopeptidase N	984.52	13.66	23	210.0	2,3,5,8
7 (45–48 kDa)	EDS27170.1	truncated ER mannose-binding lectin	279.17	18.26	8	53.4	5,7,8	
	EDS35706.1	vacuolar ATP synthase subunit H	243.87	15.19	6	54.5	8	
8 (30–45 kDa)	EDS44431.1	fasciclin	71.84	7.08	2	48.4		
	EDS26297.1	Ca-transporting ATPase sarcoplasmic/ER type	2335.41	32.46	4	109.1	3,5,6	
	EDS44094.1	actin 1	1699.07	48.94	3	41.7		
	EDS25844.1	actin-2	1689.34	47.61	6	41.6	3,5	
	EDS38275.1	CHP ^c	755.20	34.77	10	33.0	3,5	
	EDS28370.1	Na/K-dependent ATPase beta-2 subunit	602.81	34.05	10	37.9		
	EDS28367.1	Na/K-dependent ATPase beta-2 subunit	521.83	35.65	10	36.2		
	EDS36304.1	Na/K-dependent ATPase beta-2 subunit	447.15	24.66	7	33.4		
	EDS29666.1	vacuolar ATP synthase subunit e	389.43	27.88	7	25.8		
	EDS45475.1	CHP ^c ; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	225.43	20.78	6	35.4		
	EDS28502.1	carboxylesterase-6	177.38	5.06	3	71.1	6	
	EDS26618.1	prohibitin-2	164.97	15.38	5	33.1		
EDS34662.1	carboxypeptidase A1	96.08	9.18	3	48.4			

^a Orthologs identified in *Aedes aegypti* or *Anopheles* species known as functional receptors to Cry toxins, details are shown in Table 2.

^b *Culex quinquefasciatus* maltase 1 (Cqm1) receptor of the Binary toxin.

^c CHP: Conserved hypothetical protein.

Table 2
Culex quinquefasciatus midgut proteins identified as potential ligands of Cry48Aa/Cry49Aa toxins and their orthologs in *Aedes aegypti* or *Anopheles* species that were described as receptors of other Diptera-active Cry toxins.

Accession no.	Description	Ortholog id	Identity (%)	Specie	Toxin	Reference
EDS31006.1	aminopeptidase N	AAEL008155	31.4	<i>Ae. aegypti</i>	Cry11Aa	(Chen et al., 2013)
EDS36841.1	aminopeptidase N	AAEL005808	63.6	<i>Ae. aegypti</i>	Cry4Ba	(Saengwiman et al., 2011)
EDS27418.1	protease m1 zinc metalloprotease	AAEL012783	70.9	<i>Ae. aegypti</i>	Cry4Ba	
EDS27419.1	protease m1 zinc metalloprotease	AAEL012778	65.1	<i>Ae. aegypti</i>	Cry11Aa Cry4Ba	(Chen et al., 2009)
EDS27420.1	protease m1 zinc metalloprotease	AAEL012776	63.4	<i>Ae. aegypti</i>	Cry4Ba	(Saengwiman et al., 2011)
EDS38951.1	alpha-glucosidase	AALB015771	64.3	<i>An. albimanus</i>	Cry11Aa	(Bayyareddy et al., 2009)
		AGAP008963	64.9	<i>An. gambiae</i>	Cry11Ba	(Fernandez-Luna et al., 2010)
EDS38950.1	maltase 1	AALB015771	61.3	<i>An. albimanus</i>	Cry11Aa	(Zhang et al., 2013)
		AGAP008963	62.8	<i>An. gambiae</i>	Cry11Ba	(Fernandez-Luna et al., 2010)
EDS29322.1	alkaline phosphatase	AAEL003313	67.1	<i>Ae. aegypti</i>	Cry4Ba	(Zhang et al., 2013)
						(Bayyareddy et al., 2009)

can bind alternative receptors without dependence on Cqm1. Comparative binding assays performed in this study confirmed that Cqm1 binding to Cry48Aa/Cry49Aa is much more limited than that observed to the BinB subunit from the Bin toxin. In contrast to APNs and maltases, only three alkaline phosphatases (ALPs) were detected exclusively in gel section 5 (50–62 kDa) and one of them is an ortholog of an *Ae. aegypti* ALP which is a binding protein for Cry4Ba (Bayyareddy et al., 2009). ALPs have been identified as receptors for Cry11Aa and Cry4Ba in *Ae. aegypti* (Dechklar et al., 2011; Fernández et al., 2006) and Cry11Ba in *An. gambiae* (Hua et al., 2009). Cadherins play a major role for the binding and oligomerization of some 3-domain Cry toxins (Bravo et al., 2004) but they were not identified in this study. This could be due to the low abundance of cadherins in mosquito midgut and their relative instability in brush border preparations. Whether or not cadherins have a role in Cry48Aa/49Aa action merits more attention.

Some proteins identified in our study were shown to be associated with lipid rafts that are enriched in glycosphingolipids, cholesterol and GPI-anchored proteins; functionally they are proposed to be involved in signal transduction, sorting and trafficking of proteins and pathogens (Bayyareddy et al., 2012). Among them apolipoprotein, identified in this study, was previously found as a ligand for the Cry8Ea toxin (Shu et al., 2015), glucosyl transferase was identified as binding protein for Cry1Aa (Zhou et al., 2016), prohibitin was detected as ligand for Cry4Ba and Cry3Aa (Kwadkitkan et al., 2012; Ochoa-Campuzano et al., 2013). Other proteins associated with lipid rafts of *Ae. aegypti* were identified in our study including calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type, carboxylesterase-6, fasciclin, maltose phosphorylase and transferrin, however, their functional relevance to the Cry toxin mode of action is unknown (Bayyareddy et al., 2012). Vanin-like protein 1 and pantetheinase are members of the Vanin family that can be expressed as membrane-associated proteins (Pitari et al., 2000). Vanin-1 proteins, as well as aldehyde dehydrogenases, are associated with lipid rafts in *Ae. aegypti* and although their function has been scarcely studied, it could be related to the regulation of responses to oxidative stress, detoxification processes and recycling (Bayyareddy et al., 2012; Pitari et al., 2000; Popova-Butler and Dean, 2009).

Several proteins identified as integral membrane components according to their Gene Ontology (GO) classifications were extracted by Cry48Aa/49Aa beads including sodium-potassium-transporting ATPase alpha chain, sodium-potassium-dependent ATPase beta-2 subunit, and truncated ER mannose-binding lectin. Dipetidyl-peptidase, a membrane component found in our study, was identified as a Cry1Aa ligand (Zhou et al., 2016). Consistent with other studies that detected intracellular proteins forming part of the cell cytoskeleton as Cry toxin ligands, some, such as actin, myosin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Bayyareddy et al., 2009; Chen et al., 2010; Krishnamoorthy et al., 2007; Shu et al., 2015; Zhou et al., 2016), were also found in this investigation. However, further studies remain to be performed to understand the function of these proteins in Cry48Aa/Cry49Aa mode of action. Among the mitochondrial proteins detected in our study the most relevant were V-ATPases, as they have been identified as Cry toxin binding proteins in different insects, although their localization on the cytoplasmic side of the plasma membrane seems inconsistent with a direct receptor function (Bayyareddy et al., 2009; Chen et al., 2010; Krishnamoorthy et al., 2007). Detection of the α - and β -ATP synthases is also consistent with the literature as they are reported as Cry4Ba and Cry1Ac toxin ligands (Bayyareddy et al., 2009; Zhou et al., 2016). However, the ATP synthase complex is related with ATP generation in mitochondrial membrane and their presence has been considered as evidence of contamination in midgut preparations.

This study reveals a set of ligands of the Cry48Aa/Cry49Aa toxin in *C. quinquefasciatus* that are described as molecules involved in the mode of action of Cry toxins in different target insects. Some of them were identified as toxin ligands in binding assays and it is possible that they could be involved in the intracellular mode of action of Cry toxins rather than being membrane receptors. Molecules such as APNs, ALPS and maltases have been characterized as toxin receptors based on their localization as membrane-bound proteins and their capacity to bind specifically to the toxins with high affinity, as monomers or oligomers, in order to display toxicity in insect midguts. This study provides evidence of binding ligands for Cry48Aa/Cry49Aa toxin in *C. quinquefasciatus* midgut and further work is necessary to elucidate their role on its mode of action since the unique composition of Cry48Aa/Cry49Aa, consisting of a 3D-Cry like and Bin-like subunits, could display distinct features compared to models already described for toxins from these groups.

Funding

This work was supported by FACEPE/Brazil (APQ-0660-2.01/12, APQ-1616-2.13/15, APQ-1659-2.01/15 and IBPG-1364-2.13/13).

Acknowledgements

The authors thank Drs. Chau-Wen Chou and Dennis Phillips of the Proteomics and Mass Spectrometry Facility at the University of Georgia for their expert proteomics analyses, the insectarium from CPqAM-FIOCRUZ for the technical support, Dr. Danielle Moura (IAM-FIOCRUZ) for helpful discussion of the experimental procedures, Dr. Antonio Mauro Rezende (IAM-FIOCRUZ) for the technical support with the figures, the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.08.001>.

References

- Abdullah, M.A., Valaitis, A.P., Dean, D.H., 2006. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochem.* 7, 16.
- Allievi, M.C., Palomino, M.M., Prado Acosta, M., Lanati, L., Ruzal, S.M., Sanchez-Rivas, C., 2014. Contribution of S-layer proteins to the mosquitocidal activity of *Lysinibacillus sphaericus*. *PLoS One* 9, e111114.
- Aroonkesorn, A., Pootanakit, K., Katzenmeier, G., Angsuthanasombat, C., 2015. Two specific membrane-bound aminopeptidase N isoforms from *Aedes aegypti* larvae serve as functional receptors for the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin implicating counterpart specificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 461, 300–306.
- Bayyareddy, K., Andacht, T.M., Abdullah, M.A., Adang, M.J., 2009. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 279–286.
- Bayyareddy, K., Zhu, X., Orlando, R., Adang, M.J., 2012. Proteome analysis of Cry4Ba toxin-interacting *Aedes aegypti* lipid rafts using gelC-MS/MS. *J. Proteome Res.* 11, 5843–5855.
- Berry, C., 2012. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. *J. Invertebr. Pathol.* 109, 1–10.
- Boonserm, P., Moonsom, S., Boonchoy, C., Promdonkoy, B., Parthasarathy, K., Torres, J., 2006. Association of the components of the binary toxin from *Bacillus sphaericus* in solution and with model lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 1273–1278.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S., Soberón, M., 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* 1667, 38–46.

- Chalegre, K.D., Romão, T.P., Tavares, D.A., Santos, E.M., Ferreira, L.M., Oliveira, C.M.F., de-Melo-Neto, O.P., Silva-Filha, M.H.N.L., 2012. Novel mutations associated to *Bacillus sphaericus* resistance are identified in a polymorphic region of the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6321–6326.
- Chalegre, K.D., Tavares, D.A., Romão, T.P., Menezes, H.S.G., Nascimento, A.L., Oliveira, C.M.F., de-Melo-Neto, O.P., Silva-Filha, M.H.N.L., 2015. Co-selection and replacement of resistance alleles to *Lysinibacillus sphaericus* in a *Culex quinquefasciatus* colony. *FEBS J.* 282, 3592–3602.
- Charles, J.F., Nielsen-LeRoux, C., Delecluse, A., 1996. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annu. Rev. Entomology* 41, 451–472.
- Charles, J.F., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Humphreys, M.J., Berry, C., 1997. 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 Microbiol. Lett.* 156, 153–159.
- Chen, J., Aimanova, K.G., Fernandez, L.E., Bravo, A., Soberon, M., Gill, S.S., 2009. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochem. J.* 424, 191–200.
- Chen, J., Likitvatanavong, S., Aimanova, K.G., Gill, S.S., 2013. A 104 kDa *Aedes aegypti* aminopeptidase N is a putative receptor for the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 1201–1208.
- Chen, L.Z., Liang, G.M., Zhang, J., Wu, K.M., Guo, Y.Y., Rector, B.G., 2010. Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 73, 61–73.
- Darboux, I., Charles, J.F., Pauchet, Y., Warot, S., Pauron, D., 2007. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cell Microbiol.* 9, 2022–2029.
- Darboux, I., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Pauron, D., 2001. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 981–990.
- Darboux, I., Pauchet, Y., Castella, C., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Pauron, D., 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5830–5835.
- de Barjac, H., Lecadet, M.M., 1976. Dosage biochimique de l'exotoxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* d'après l'inhibition de ARN-polymérase bactériennes. *C. R. Acad. Sci. Paris* 282D, 2119–2122.
- de Melo, J.V., Jones, G.W., Berry, C., Vasconcelos, R.H., de Oliveira, C.M., Furtado, A.F., Peixoto, C.A., Silva-Filha, M.H., 2009. Cytopathological effects of *Bacillus sphaericus* Cry48Aa/Cry49Aa toxin on binary toxin-susceptible and -resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4782–4789.
- Dechkar, M., Tiewsiiri, K., Angsuthanasombat, C., Pootanakit, K., 2011. Functional expression in insect cells of glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: a *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 159–166.
- Fernandez-Luna, M.T., Lanz-Mendoza, H., Gill, S.S., Bravo, A., Soberon, M., Miranda-Rios, J., 2010. An alpha-amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Environ. Microbiol.* 12, 746–757.
- Fernández, L.E., Aimanova, K.G., Gill, S.S., Bravo, A., Soberon, M., 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. J.* 394, 77–84.
- Ferreira, L.M., Romão, T.P., Nascimento, N.A., Costa, M.D., Rezende, A.M., de-Melo-Neto, O.P., Silva-Filha, M.H., 2014. Non conserved residues between *Cqm1* and *Aam1* mosquito alpha-glucosidases are critical for the capacity of *Cqm1* to bind the Binary (Bin) toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 50, 34–42.
- Guo, Q.Y., Cai, Q.X., Yan, J.P., Hu, X.M., Zheng, D.S., Yuan, Z.M., 2013. Single nucleotide deletion of *qm1* gene results in the development of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus*. *J. Insect Physiol.* 59, 967–973.
- Guo, Q.Y., Hu, X.M., Cai, Q.X., Yan, J.P., Yuan, Z.M., 2016. Interaction of *Lysinibacillus sphaericus* Cry48Aa/Cry49Aa toxin with midgut brush-border membrane fractions from *Culex quinquefasciatus* larvae. *Insect Mol. Biol.* 25, 163–170.
- Hua, G., Zhang, R., Bayyareddy, K., Adang, M.J., 2009. *Anopheles gambiae* alkaline phosphatase is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis jgathesan* Cry11Ba toxin. *Biochem. J.* 418, 9785–9793.
- Jones, G.W., Nielsen-Leroux, C., Yang, Y., Yuan, Z., Dumas, V.F., Monnerat, R.G., Berry, C., 2007. A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. *FASEB J.* 21, 4112–4120.
- Jones, G.W., Wirth, M.C., Monnerat, R.G., Berry, C., 2008. The Cry48Aa-Cry49Aa binary toxin from *Bacillus sphaericus* exhibits highly restricted target specificity. *Environ. Microbiol.* 10, 2418–2424.
- Krishnamoorthy, M., Jurat-Fuentes, J.L., McNall, R.J., Andacht, T., Adang, M.J., 2007. Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 189–201.
- Kuadkitkan, A., Smith, D.R., Berry, C., 2012. Investigation of the Cry4B-prohibitin interaction in *Aedes aegypti* cells. *Curr. Microbiol.* 65, 446–454.
- Mulla, M.S., Thavara, U., Tawatsin, A., Chomposri, J., Su, T., 2003. Emergence of resistance and resistance management in field populations of tropical *Culex quinquefasciatus* to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 19, 39–46.
- Nicolas, L., Nielsen-Leroux, C., Charles, J.F., Delécluse, A., 1993. Respective role of the 42- and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 106, 275–280.
- Nielsen-Leroux, C., Pasteur, N., Pretre, J., Charles, J.F., Sheikh, H.B., Chevillon, C., 2002. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of West Mediterranean countries. *J. Med. Entomol.* 39, 729–735.
- Nielsen-LeRoux, C., Rao, D.R., Murphy, J.R., Carron, A., Mani, T.R., Hamon, S., Mulla, M.S., 2001. Various levels of cross-resistance to *Bacillus sphaericus* strains in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) colonies resistant to *B. sphaericus* strain 2362. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5049–5054.
- Ochoa-Campuzano, C., Martínez-Ramírez, A.C., Contreras, E., Rausell, C., Real, M.D., 2013. Prohibitin, an essential protein for Colorado potato beetle larval viability, is relevant to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxicity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 107, 299–308.
- Opota, O., Charles, J.F., Warot, S., Pauron, D., Darboux, I., 2008. Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Comp. Biochem. Physiol. -Part B Biochem. Mol. Biol.* 149, 419–427.
- Pei, G., Oliveira, C.M., Yuan, Z., Nielsen-LeRoux, C., Silva-Filha, M.H., Yan, J., Regis, L., 2002. A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3003–3009.
- Pitari, G., Malergue, F., Martin, F., Philippe, J.M., Massucci, M.T., Chabret, C., Maras, B., Dupre, S., Naquet, P., Galland, F., 2000. Pantetheinase activity of membrane-bound Vanin-1: lack of free cysteamine in tissues of Vanin-1 deficient mice. *FEBS Lett.* 483, 149–154.
- Popova-Butler, A., Dean, D.H., 2009. Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles. *J. Insect Physiol.* 55, 264–272.
- Rao, D.R., Mani, T.R., Rajendran, R., Joseph, A.S., Gajana, A., Reuben, R., 1995. Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11, 1–5.
- Romão, T.P., de Melo Chalegre, K.D., Key, S., Ayres, C.F., Fontes de Oliveira, C.M., de-Melo-Neto, O.P., Silva-Filha, M.H., 2006. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its alpha-glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS J.* 273, 1556–1568.
- Saengwimam, S., Aroonkesorn, A., Dedvisitsakul, P., Sakdee, S., Leetchawea, S., Angsuthanasombat, C., Pootanakit, K., 2011. In vivo identification of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptors by RNA interference knockdown of glycosylphosphatidylinositol-linked aminopeptidase N transcripts in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407, 708–713.
- Shu, C., Tan, S., Yin, J., Soberon, M., Bravo, A., Liu, C., Geng, L., Song, F., Li, K., Zhang, J., 2015. Assembling of *Holotrichia parallela* (dark black chafer) midgut tissue transcriptome and identification of midgut proteins that bind to Cry8Ea toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 7209–7218.
- Silva-Filha, M.H., Nielsen-Leroux, C., Charles, J.F., 1997. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. mosquito larvae. *Eur. J. Biochem./FEBS* 247, 754–761.
- Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 1999. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 711–721.
- Silva-Filha, M.H.N.L., Berry, C., Regis, L.N., 2014. *Lysinibacillus sphaericus*: toxins and mode of action, applications for mosquito control and resistance management. In: Dhadialla, T.S., Gill, S.S. (Eds.), *Insect Midgut and Insecticidal Proteins*. Academic Press, Oxford, pp. 89–176.
- Tabashnik, B.E., Zhang, M., Fabrick, J.A., Wu, Y., Gao, M., Huang, F., Wei, J., Zhang, J., Yelich, A., Unnithan, G.C., Bravo, A., Soberon, M., Carriere, Y., Li, X., 2015. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Sci. Rep.* 5, 15107.
- Wirth, M.C., Georghiou, G.P., Malik, J.I., Abro, G.H., 2000. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. *J. Med. Entomol.* 37, 534–540.
- Yuan, Z.M., Pei, G.F., Regis, L., Nielsen-Leroux, C., Cai, Q.X., 2003. Cross-resistance between strains of *Bacillus sphaericus* but not *B. thuringiensis israelensis* in colonies of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Med. Vet. Entomol.* 17, 251–256.
- Yuan, Z.M., Zhang, Y.M., Liu, E.Y., 2000. High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. *Biocontrol Sci. Technol.* 10, 43–51.
- Zhang, Q., Hua, G., Bayyareddy, K., Adang, M.J., 2013. Analyses of alpha-amylase and alpha-glucosidase in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*, as receptors of Cry11Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jgathesan*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 907–915.
- Zhang, R., Hua, G., Andacht, T.M., Adang, M.J., 2008. A 106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* 412, 11263–11272.
- Zhou, Z., Wang, Z., Liu, Y., Liang, G., Shu, C., Song, F., Zhou, X., Bravo, A., Soberon, M., Zhang, J., 2016. Identification of ABC2 as a binding protein of Cry1Ac on brush border membrane vesicles from *Helicoverpa armigera* by an improved pull-down assay. *Microbiol. Open* 5, 659–669.

ANEXO D – MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO

Differential transcriptional profile of a *Culex quinquefasciatus* colony highly resistant to *Lysinibacillus sphaericus* for a long term period

BMC Genomics 2018

Tatiana Maria Teodoro Rezende^a, Antonio Mauro Rezende^a, Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha^a, Gabriel da Luz Wallau^a, Crhisllane Rafele dos Santos Vasconcelos^a, Osvaldo Pompílio de Melo Neto^a, Tatiany Patrícia Romão^{a*}

^a Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Recife-PE, 50740-465, Brazil

* Corresponding author. Department of Entomology, Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n Cidade Universitária, Recife-PE, 50740-465, Brazil. E-mail address: taty@cpqam.fiocruz.br