

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

HEVERLY SUZANY GOUVEIA DE MENEZES

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE COMPETIÇÃO DE DOIS ALELOS DE *Culex quinquefasciatus* QUE CONFEREM RESISTÊNCIA AO BIOLARVICIDA *Lysinibacillus sphaericus*

RECIFE

2019

**HEVERLY SUZANY GOUVEIA DE MENEZES**

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE COMPETIÇÃO DE DOIS ALELOS DE *Culex quinquefasciatus* QUE CONFEREM RESISTÊNCIA AO BIOLARVICIDA *Lysinibacillus sphaericus*

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de mestre 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

2019

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

- M543a Menezes, Heverly Suzany Gouveia.  
Avaliação da capacidade de competição de dois alelos de *Culex quinquefasciatus* que conferem resistência ao biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus* / Heverly Suzany Gouveia Menezes. - Recife: [s.n.], 2019.  
145 p. : ilus., graf., tab.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.  
Orientadora: Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha; coorientadora: Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo.
1. Controle de vetores. 2. Frequência do Gene. 3. Transcriptoma. 4. Resistência a inseticidas. 5. Mutação. 6. Proteínas de insetos. 7. Toxinas bacterianas. I. Silva Filha, Maria Helena Neves Lobo. II. Melo, Tatiany Patrícia Romão Pompílio de. III. Título.

**HEVERLY SUZANY GOUVEIA DE MENEZES**

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE COMPETIÇÃO DE DOIS ALELOS DE *Culex quinquefasciatus* QUE CONFEREM RESISTÊNCIA AO BIOLARVICIDA *Lysinibacillus sphaericus*

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de mestre em ciências.

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

**Banca Examinadora**

---

Dra. Flávia Figueira Aburjaile

Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

(Membro externo)

---

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

(Membro interno)

---

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha

Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

A minha orientadora, Chica, por todo conhecimento, paciência e parceria ao longo da iniciação, do período em que estive como técnica e agora no mestrado. Chica sempre foi mais que uma orientadora e sou muito grata por todas as oportunidades, além de ter sido a primeira que acreditou no meu potencial.

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

Aos meus colegas do ornitolab, em especial à Bruna (parceira rio branquete), Dani (companheira de booooooas risadas), Iolanda, Jhon, Lilia, Yuri, Thaís, Jonathas, Vitor, Hevana, Lays (a doidinha que amo) e seu Mário, que partiu deste mundo, mas que foi um grande homem em vida. Mesmo não estando mais lá, ainda sou tratada como se ainda fosse integrante do Lab.

Às minhas pupinhas que tanto amo, Nathaly, Suzane, Emanuel, Fernando, Pri, Tati, Darleide, Lari K., Lari Maciel, Alex, Laís, Jade, Karine, Derciliano, Luisa e Filipe (me ajudou com algumas análises do RNASeq também) que sempre me divertem, seja no laboratório, ou nas vezes em que saímos para comer de se acabar. E a todo o departamento de Entomologia, principalmente Elô, Taty Rezende, Fabi e Dani Varjal. E em especial, Elisama, que foi minha dupla nesse mestrado me ajudando sempre que necessário, me esperando até tarde para me dar carona e compartilhando conhecimento.

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

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

Às minhas amigas do grupo de noivas, que me ajudaram a não enlouquecer neste processo que é fazer mestrado e organizar um casamento. Foram grandes presentes que ganhei.

A Maria Ribeiro, pelo auxílio na execução do RNASeq, e também por doar seu tempo. Sempre disposta a colaborar e explicar todo o procedimento.

A Antônio Mauro Rezende, que me socorreu quando precisei de ajuda nas análises do RNASeq. Com toda paciência, passou o conhecimento e explicou cada análise realizada.

Ao Dr. Gabriel Wallau pelo suporte dado nas análises de RNASeq e também ao seu aluno Elverson Melo pelas análises de elementos transponíveis.

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

A FACEPE pela bolsa que me foi concedida.

Ao IAM pela infraestrutura que possibilitou a realização deste trabalho.

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

MENEZES, Heverly Suzany Gouveia. **Avaliação da capacidade de competição de dois alelos de *Culex quinquefasciatus* que conferem resistência ao biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus***. 2019. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

## RESUMO

A ação do *Lysinibacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus* depende da ligação da protoxina binária (Bin) ao seu receptor Cqml que é uma  $\alpha$ -glicosidase localizada no epitélio intestinal. Dois alelos deste gene, *cqm1*<sub>REC</sub> e *cqm1*<sub>REC-2</sub>, conferem resistência na ao *L. sphaericus*. O principal objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de competição e, por conseguinte, o risco de seleção e evolução de cada alelo. Inicialmente foi demonstrado que o nível de resistência conferido por cada alelo em homozigose, avaliado através de bioensaios, foi similar (CL<sub>50</sub> 14 mg/L). Em seguida a evolução da frequência destes alelos em indivíduos descendentes de uma geração parental heterozigota foi avaliada ao longo de 20 gerações sendo tratado com a toxina Bin a cada geração. O genótipo de larvas mostrou que a partir da geração F<sub>6</sub> o alelo *cqm1*<sub>REC</sub> assumiu a maior frequência 0,57 que aumentou e atingiu 0,68 na F<sub>12</sub>. Nesta geração parental foi provocado um efeito *bottleneck* e, mesmo após esta forte redução populacional, a frequência do *cqm1*<sub>REC</sub> manteve-se mais elevada em relação ao *cqm1*<sub>REC-2</sub> (0,62 na F<sub>20</sub>). Por outro lado, ensaios de competição para avaliar a taxa de produção de adultos a partir de grupos mistos de larvas homozigotas para cada alelo submetidos à alta densidade ou baixa disponibilidade de alimento, mostraram que indivíduos homozigotos para o alelo *cqm1*<sub>REC-2</sub> tiveram melhor desempenho. A comparação de indivíduos portadores destes alelos também foi feita através de uma análise transcriptômica do intestino pelo método de RNASeq. Larvas das colônias REC e REC-2 compartilham muitos DEGS de destaque ( $(\text{Log}^2)\text{FC} > 2$ ), incluindo o gene *cqm1* que apresentou um significativo nível de subexpressão em ambas ( $> 4$ ). A análise comparativa entre as colônias resistentes REC X REC-2 mostrou um perfil diferencial, porém, este foi mais discreto, envolveu um número menor de genes, com menor amplitude de expressão diferencial ( $(\text{Log}^2)\text{FC} + 2$  e  $-4$ ). Não foi possível identificar genes ou vias específicas que pudessem elucidar a capacidade adaptativa diferencial dos indivíduos destas colônias. O conjunto dos resultados obtidos mostra que os alelos conferem o mesmo nível de resistência, porém, cada alelo possui uma capacidade adaptativa específica que pode favorecer o aumento de sua frequência pelo menos sob as condições testadas neste estudo.

Palavras-chave: Controle de vetores, Frequência do gene, Mosquitos vetores, Mutação, Resistência a inseticidas, Transcriptoma, Toxinas bacterianas;

MENEZES, Heverly Suzany Gouveia. **Evaluation of the competition capacity of two *Culex quinquefasciatus* alleles that confer resistance to the biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus*.** 2019. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

## ABSTRACT

The action of *Lysinibacillus sphaericus* on *Culex quinquefasciatus* larvae depends on the binding of the binary protoxin (Bin) to the Cqm1 receptor, which is an  $\alpha$ -glycosidase located in the intestinal epithelium. Two alleles of this gene, *cqm1*<sub>REC</sub> and *cqm1*<sub>REC-2</sub>, can confer resistance to *L. sphaericus* under laboratory conditions. The main objective of this study was to evaluate the competition of those alleles and, therefore, the risk of selection and evolution of each allele. Initially, the level of resistance conferred by each allele on homozygotes, evaluated by bioassays, was similar (LC<sub>50</sub> 14 mg/L). Then, the evolution of the alleles frequency in the progenies from a parental heterozygous generation, treated with the Bin toxin at every generation, was evaluated over 20 generations. Larvae genotype, which was evaluated by an allele-specific PCR, showed that from the F<sub>6</sub> generation *cqm1*<sub>REC</sub> allele assumed the highest frequency of 0.57 which increased and reached 0.68 at F<sub>12</sub>. In this parental generation a bottleneck effect was induced and, although the strong population reduction observed, the *cqm1*<sub>REC</sub> frequency remained higher than *cqm1*<sub>REC-2</sub> (0.62 in F<sub>20</sub>). On the other hand, competition assays to evaluate the rate of adult production from mixed groups of homozygous larvae for each allele submitted to high density or low food availability, showed that homozygous for the *cqm1*<sub>REC-2</sub> allele had better performance. The comparison of the homozygous individuals for each allele was also performed by a transcriptomic analysis of the midgut using a RNaseq approach. Resistant larvae share many prominent DEGs ((Log<sup>2</sup>)FC > 2) including the *cqm1* gene which displayed a significant level of subexpression in both (>4). The comparison between the resistant REC X REC-2 colonies showed a differential profile, but this was more discrete, since it comprised a smaller set of DEGs (226), a narrower range of differential expression (Log<sup>2</sup>)FC +2 and -4). The analysis did not point out specific DEGs or pathways that could elucidate the differential adaptive capacity of individuals from these colonies. Dataset show that the alleles confer the same level of resistance, however, each one has a specific adaptive capacity that can favor the increase of its frequency, at least under the conditions tested in this study.

Key-words: Bacterial toxins, Insecticide resistance, Insect protein, Genes frequency, Mutation, Mosquito vectors, Transcriptome, Vector control.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	20
Figura 2 – Aspecto do <i>Lysinibacillus sphaericus</i> cepa 2362. ....	24
Figura 3 - Estrutura das subunidades BinA e BinB da toxina Binária de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> .....	25
Figura 4 - Modo de ação da toxina Binária presente nos cristais de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	27
Figura 5 – Estrutura do receptor Cqm1. ....	28
Figura 6 - Representação do gene <i>cqm1</i> que codifica o receptor da toxina Bin em <i>Culex quinquefasciatus</i> (número de acesso no GenBank DQ333335) e localização dos polimorfismos dos alelos <i>cqm1<sub>REC</sub></i> , <i>cqm1<sub>REC-D16</sub></i> , <i>cqm1<sub>REC-D25</sub></i> e <i>cqm1<sub>REC-2</sub></i> que estão associados à resistência.....	33
Figura 7 - Frequência dos alelos <i>cqm1<sub>REC</sub></i> e <i>cqm1<sub>REC-2</sub></i> em larvas <i>Culex quinquefasciatus</i> da colônia R2362 selecionada para resistência a <i>Lysinibacillus sphaericus</i> 2362 e mantido em condições de laboratório.....	35
Figura 8 – A. Expressão relativa dos alelos de resistência <i>cqm1<sub>REC</sub></i> e <i>cqm1<sub>REC-2</sub></i> em relação ao gene de referência suscetível, <i>cqm1</i> . B. Expressão relativa dos alelos de resistência <i>cqm1<sub>REC</sub></i> e <i>cqm1<sub>REC-2</sub></i> .....	36
Figura 9 - Frequência dos alelos <i>cqm1<sub>REC</sub></i> (REC) e <i>cqm1<sub>REC-2</sub></i> (REC-2) ao longo de gerações da colônia R2362/A1-A2.....	37
Figura 10 – Representação esquemática do estabelecimento da subcolônia REC/REC-2 de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistente a <i>Lysinibacillus sphaericus</i> 2362. ....	49
Figura 11 – Representação esquemática das etapas da análise do transcriptoma do intestino das larvas das colônias de <i>Culex quinquefasciatus</i> . ....	52
Figura 12 - Separação eletroforética de fragmentos amplificados a partir do gene <i>cqm1</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i> da subcolônia REC/REC-2 por PCR.....	59
Figura 13 - Evolução dos alelos <i>cqm1<sub>REC</sub></i> e <i>cqm1<sub>REC-2</sub></i> em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> (n=100 larvas/geração) da subcolônia REC/REC-2, mantida sob condição de laboratório e tratamento com o biolarvicida <i>Lysinibacillus sphaericus</i> durante vinte gerações. ....	59
Figura 14 - Separação eletroforética de fragmentos amplificados a partir do gene <i>cqm1</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i> da subcolônia REC/REC-2 por PCR de indivíduos sobreviventes após o segundo efeito <i>bottleneck</i> da geração F <sub>12</sub> . ....	60
Figura 15 - Avaliação dos efeitos da densidade em <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	62
Figura 16 - Avaliação dos efeitos da densidade em <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	63
Figura 17 – Qualidade das sequencias para análise da colônia REC (A) com a Suscetível (B) obtida no FastQC. ....	67
Figura 18 - Qualidade das sequencias para análise da colônia REC-2 (A) com a Suscetível (B) obtida no FastQC.....	68
Figura 19 – Análise dos componentes principais (PCA) das replicatas biológicas das colônias REC, REC-2 e S de <i>Culex quinquefasciatus</i> . ....	73
Figura 20 – Normalização das bibliotecas das colônias REC, REC-2 e S de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	73
Figura 21 – <i>Heatmap</i> do perfil de expressão gênica das colônias REC, REC-2 e S de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	75

Figura 22 – “MA plot” de genes diferencialmente expressos (DEGs) das colônias REC, REC-2 e S de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	77
Figura 23 – Diagrama de Venn com os transcritos das colônias REC, REC-2 e S de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	78
Figura 24 - 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> da colônia REC.....	86
Figura 25 - Clusters do STRING que mostram a interação funcional proteína-proteína em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> da colônia REC em relação à colônia Susceptível.....	94
Figura 26 - Clusters do STRING que mostram a interação funcional proteína-proteína em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> da colônia REC-2 em relação à colônia Susceptível. ....	95
Figura 27 - Clusters do STRING que mostram a interação funcional proteína-proteína em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> da análise da colônia REC X REC-2. ....	96

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alelos <i>cqml</i> , <i>cqml<sub>REC</sub></i> e <i>cqml<sub>REC-2</sub></i> detectados em populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> de bairros do Recife.....	38
Tabela 2 – Toxicidade do <i>Lysinibacillus sphaericus</i> cepa 2362 (biomassa úmida amostra 0448/09) para larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> do 4º instar das colônias S, REC e REC-2 após 48h de exposição.....	55
Tabela 3 – Mortalidade de larvas do 4º instar de <i>Culex quinquefasciatus</i> das colônias REC e REC-2 a partir das maiores concentrações de <i>L. sphaericus</i> 2362 testadas e desvio padrão (DP). .....	56
Tabela 4 – Mortalidade de larvas do 4º instar da subcolônia REC/REC-2 após tratamento com <i>L. sphaericus</i> por 48h e o nº de adultos sobreviventes que formaram a próxima geração parental. ....	57
Tabela 5 – Perfil transcriptômico diferencial de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> da colônia resistente REC em relação à colônia Suscetível, considerando as enzimas detoxificadoras das classes monooxidases de função mista (MFO) e glutational-S-transferase (GST). .....	65
Tabela 6 – Perfil transcriptômico diferencial de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> da colônia resistente REC-2 em relação a colônia Suscetível, considerando as enzimas detoxificadoras das classes monooxidases de função mista (MFO) e glutational-S-transferase (GST). .....	66
Tabela 7 – Estatísticas do alinhamento no STAR aligner das bibliotecas de sequenciamento para as colônias analisadas: REC x Suscetível e REC-2 x Suscetível.....	69
Tabela 8 – Lista de transcritos diferencialmente expressos em comum para as análises REC x S, REC-2 x S e REC x REC-2.....	72
Tabela 9 – Seleção de genes induzidos e reprimidos na colônia REC de <i>Culex quinquefasciatus</i> . .....	81
Tabela 10 – Seleção de genes induzidos e reprimidos na colônia REC-2 de <i>Culex quinquefasciatus</i> . .....	83
Tabela 11– Seleção de genes induzidos e reprimidos nas colônias REC e REC-2 de <i>Culex quinquefasciatus</i> . .....	85

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Colônias de <i>Culex</i> sp. selecionadas sob condições de laboratório (Lab) ou populações de campo expostas ao tratamento com o <i>Lysinibacillus sphaericus</i> que apresentaram alterações na susceptibilidade a este agente, e respectivos alelos de resistência já caracterizados em algumas amostras.....	31
Quadro 2– Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a detecção dos alelos <i>cqm1</i> (S), <i>cqm1</i> <sub>REC</sub> (REC) e <i>cqm1</i> <sub>REC-2</sub> (REC-2) de <i>Culex quinquefasciatus</i> a partir de reações em cadeia da polimerase.....	47
Quadro 3– Combinações de <i>primers</i> descritos no quadro 2 e respectivos <i>amplicons</i> esperados para a detecção dos alelos <i>cqm1</i> (S), <i>cqm1</i> <sub>REC</sub> (REC) e <i>cqm1</i> <sub>REC-2</sub> (REC-2) de <i>Culex quinquefasciatus</i> a partir de reações em cadeia da polimerase.....	48
Quadro 4 – Termos KEGG enriquecidas da colônia REC em relação a colônia susceptível...	87
Quadro 5 – Termos KEGG enriquecidos da colônia REC-2 em relação à colônia suscetível.	89
Quadro 6 – Termos KEGG enriquecidos da colônia REC em relação a colônia REC-2. ....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Agm3	<i>Anopheles gambiae</i> maltase 3
Aam1	<i>Aedes aegypti</i> maltase 1
Bin	Toxina binária
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovariedade <i>israelensis</i>
cDNA	DNA complementar
CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub>	Concentrações letais para 50 e 90% dos indivíduos expostos
Cp	<i>Culex pipiens</i>
Cpm1	<i>Culex pipiens</i> maltase 1
Cqm1	<i>Culex quinquefasciatus</i> maltase 1
CqSF	Colônia de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetível a <i>L. sphaericus</i>
DEGs	<i>Differentially expressed genes</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EST	Esterase
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FL	Filariose Linfática
g/L	Gramas/litro
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
GST	Glutathione- s- transferase
IGR	<i>Insect Growth Regulator</i>
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
kDa	Kilo Dalton
KABS	<i>German Mosquito Control Association</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LB	Luria Bertani
<i>L. sphaericus</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
L1, L2, L3, L4	Estádios larvais 1, 2, 3 e 4
LLINS	<i>Long Lasting Insecticidal Nets</i>
MFO	Monooxidase de Função Mista
Mtx	<i>Mosquitocidal toxins</i>
NPT	Núcleo de plataformas tecnológicas
OMS	Organização Mundial da Saúde
OP	Organofosforado
ORF	<i>Open reading frame</i> (matriz aberta de leitura)
Pb	Pares de bases
PM	Peso molecular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
<i>r</i>	Alelo de resistência
RMR	Região metropolitana do Recife
SNP'S	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
SlpC	<i>Inglês-</i> Proteínas do envelope S-layer

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>19</b>
2.1 Importância de <i>Culex quinquefasciatus</i> na saúde pública .....	20
2.2 Controle de vetores .....	21
2.3 <i>Lysinibacillus sphaericus</i> .....	22
2.4 Protoxina Bin .....	24
2.5 Modo de ação da protoxina Bin .....	25
2.6 Receptores da toxina Bin .....	27
2.7 Utilização de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> em campo.....	29
2.8 Resistência a toxina Bin .....	30
2.9 Alelos <i>cqm1<sub>REC</sub></i> e <i>cqm1<sub>REC-2</sub></i> .....	33
2.10 Competição entre alelos de resistência .....	38
2.11 Análises transcriptômicas em mosquitos vetores .....	40
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>42</b>
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b> .....	<b>43</b>
<b>5 HIPÓTESE</b> .....	<b>44</b>
<b>6 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>45</b>
6.1 Objetivos específicos.....	45
<b>7 METODOLOGIA</b> .....	<b>46</b>
7.1 Bioensaios dose-resposta .....	46
7.2 PCR multiplex para detecção dos alelos <i>cqm1<sub>REC</sub></i> e <i>cqm1<sub>REC-2</sub></i> .....	47
7.4 Estabelecimento e manutenção da subcolônia REC/REC-2.....	48
7.5 Ensaios de competição entre larvas homozigotas <i>cqm1<sub>REC</sub></i> e <i>cqm1<sub>REC-2</sub></i> .....	50
7.6 Avaliação de enzimas detoxificadoras .....	51
7.7 Ensaio de RNASeq para avaliação de transcriptoma .....	51
7.7.1 Análise de dados .....	53
<b>8 RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
8.1 Resistência das colônias REC e REC-2 à toxina Bin.....	55
8.2 Evolução da frequência dos alelos da subcolônia REC/REC-2.....	56
8.3 Competição de larvas homozigotas ( <i>cqm1<sub>REC</sub></i> e <i>cqm1<sub>REC-2</sub></i> ) sob estresse.....	61
8.3.1 Alta densidade .....	61
8.3.2 Baixa disponibilidade de alimento .....	63
8.4 Perfil de expressão de enzimas detoxificadoras .....	64

8.5 Perfil de expressão gênica diferencial de larvas das colônias REC e REC-2.....	66
8.5.1 Alinhamento e contagem das sequências.....	68
8.5.2 Análise do padrão de expressão diferencial global.....	69
8.5.3 Análise do perfil de genes com maior expressão diferencial .....	79
8.5.4 Enriquecimento funcional de vias metabólicas KEGGs .....	85
8.5.5 Enriquecimento funcional de interações proteína-proteína .....	92
9 DISCUSSÃO .....	97
9.1 Análise de fenótipo de resistência conferido pelos alelos .....	97
9.2 Desempenho dos indivíduos portadores dos alelos.....	99
9.3 Perfil transcriptômico diferencial das colônias resistentes e suscetível.....	101
9.4 Perfil diferencial entre colônias resistentes .....	104
10 CONCLUSÕES.....	106
REFERÊNCIAS .....	107
APÊNDICE A - POLIMORFISMOS DO GENE <i>CQMI</i> EM POPULAÇÕES DE <i>C. PIPPIENS</i> RESISTENTES A <i>L. SPHAERICUS</i> (EUA) .....	123
APÊNDICE B - PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DIFERENCIAL DE LARVAS DE <i>CULEX QUINQUEFASCIATUS</i> CONSIDERANDO AS ENZIMAS DETOXIFICADORAS <sup>A</sup> DAS COLÔNIAS RESISTENTES REC E REC-2 <sup>B</sup> EM RELAÇÃO À COLÔNIA S.....	128
APÊNDICE C – DESCRIÇÃO DE <i>CLUSTERS</i> STRING DE GENES DE <i>CULEX QUINQUEFASCIATUS</i> SUPER E REPRIMIDOS NA COLÔNIA RESISTENTE REC EM RELAÇÃO À SUSCEPTÍVEL. ....	131
APÊNDICE D – DESCRIÇÃO DE <i>CLUSTERS</i> STRING DE GENES DE <i>CULEX QUINQUEFASCIATUS</i> SUPER E REPRIMIDOS NA COLÔNIA RESISTENTE REC-2 EM RELAÇÃO À SUSCEPTÍVEL. ....	138
APÊNDICE E – DESCRIÇÃO DE <i>CLUSTERS</i> STRING DE GENES DE <i>CULEX QUINQUEFASCIATUS</i> SUPER E REPRIMIDOS NA COLÔNIA RESISTENTE REC EM RELAÇÃO À REC-2.....	143

## 1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Culex quinquefasciatus* é o vetor do nematoide *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose linfática na Região Metropolitana de Recife (RMR) (ALBUQUERQUE, 1993), além de ser responsável pela transmissão de arbovírus que estão em expansão nas Américas, como o vírus do Oeste do Nilo (VIEIRA et al., 2015). Recentemente, esta espécie tem sido investigada como um potencial vetor para o vírus da Zika em Recife (GUEDES et al., 2017). *C. quinquefasciatus* é alvo de programas de controle por ser um culicídeo de importância médica e biolarvicidas a base de *Lysinibacillus sphaericus* vêm sendo utilizados nestes programas, devido ao seu alto poder inseticida e persistência prolongada em criadouros desta espécie (LACEY, 2007). Na RMR, os municípios de Recife, Olinda, e Jaboatão dos Guararapes mantêm um programa de controle de *C. quinquefasciatus* desde 2003 pelas respectivas Secretarias de Saúde, que está inserido no plano global de eliminação desta doença promovida pela OMS, que teve sua meta redimensionada, visando eliminar a filariose até 2022 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Uma das ações adotadas neste plano é a utilização de larvicidas a base de *L. sphaericus* nos criadouros de *C. quinquefasciatus* a fim de reduzir a densidade populacional desta espécie (SILVA-FILHA et al., 2008).

A ação de *L. sphaericus* em culicídeos é devido a uma protoxina inseticida denominada binária (Bin) produzida em cristais (CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELÉCLUSE, 1996). A protoxina Bin tem ação oral e uma vez ingerida, ela é processada para a forma de toxina no intestino das larvas (CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELÉCLUSE, 1996). Para que a ação larvicida *L. sphaericus* possa ser eficiente, é necessário que a toxina Bin ligue-se especificamente aos receptores presentes no epitélio intestinal das larvas (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). Em *C. quinquefasciatus*, o receptor da toxina Bin, denominado *Culex quinquefasciatus* maltase 1 (Cqm1), é uma  $\alpha$ -glicosidase de 66 kDa, ligada ao epitélio intestinal das larvas por meio de uma âncora glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (DARBOUX et al., 2001; OPOTA et al., 2008; SILVA-FILHA et al., 1999). A ligação específica entre a toxina Bin e o receptor Cqm1 é essencial e falhas nesta interação estão associadas a altos níveis de resistência (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992,1995; OLIVEIRA et al., 2004; PEI et al., 2002).

A investigação de colônias ou populações de *C. quinquefasciatus* resistentes à toxina Bin revelou que determinadas mutações no gene *cqm1*, impossibilitam a expressão de

proteínas Cqm1 ancoradas no epitélio intestinal das larvas e são responsáveis pelo principal mecanismo de resistência, que é a ausência de receptores no epitélio. Oito alelos de resistência ligados ao gene *cqm1* já foram identificados, em colônias selecionadas de laboratório, ou em populações de campo expostas a *L. sphaericus* em diferentes países (CHALEGRE et al., 2012; DARBOUX et al., 2002, 2007; GUO et al., 2013; MULLA et al., 2003; RAO et al., 1995; ROMÃO et al., 2006; WIRTH et al., 2000; YUAN, 2000).

Dentre os alelos já descritos, destacam-se os alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>*, que foram identificados na colônia R2362 selecionada em laboratório com *L. sphaericus* 2362 e que apresenta um alto nível de resistência à toxina Bin (OLIVEIRA et al., 2004; PEI et al., 2002). A princípio, a resistência de larvas desta colônia foi atribuída à presença de indivíduos homocigotos para o alelo *cqm1<sub>REC</sub>*, caracterizado por uma deleção de 19 nucleotídeos (posição 1225-1243). Esta mutação gera um códon de parada prematuro (posição 443), codificando uma proteína truncada sem âncora GPI, o que impede a sua localização no microvilli intestinal e posterior ligação com a toxina Bin (ROMÃO et al., 2006). Uma avaliação posterior de larvas da colônia R2362 mostrou que outro alelo, denominado *cqm1<sub>REC-2</sub>* também confere resistência observada nestes indivíduos. Este alelo possui uma mutação pontual G1292A que gera um códon de parada prematuro (posição 431) e, a exemplo do alelo *cqm1<sub>REC</sub>*, também codifica uma proteína truncada que, se produzida, seria solúvel e ausente no epitélio (CHALEGRE et al., 2015). Os alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* são caracterizados por mutações diferentes, porém ambas geram uma proteína solúvel truncada sem a âncora GPI, e o epitélio intestinal destes insetos são desprovidos da  $\alpha$ -glicosidase Cqm1, impedindo a assimilação da toxina Bin.

A colônia R2362 vem sendo mantida sob condições de laboratório por mais de 250 gerações e uma análise retrospectiva da frequência destes alelos em amostras de larvas da colônia mostrou que na geração F<sub>35</sub> o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* era o mais abundante (75% *cqm1<sub>REC</sub>*, 25% *cqm1<sub>REC-2</sub>*), enquanto que na geração F<sub>169</sub> o alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* passou a ser predominante (31% *cqm1<sub>REC</sub>*, 69% *cqm1<sub>REC-2</sub>*) até a última avaliação, realizada na F<sub>255</sub>. Estes dados mostram que ocorreu um processo de co-seleção desses alelos na colônia R2362, mantida sob condições de laboratório e sem fluxo gênico, consistindo em um modelo de evolução de alelos de resistência (CHALEGRE et al., 2015). A dinâmica da frequência destes alelos na colônia e a substituição de indivíduos portando o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* pelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* ainda não foi elucidada e sugere que os alelos podem conferir diferentes condições para a sobrevivência dos insetos. Um *screening* da presença destes alelos em populações de campo de *C. quinquefasciatus*,

mostrou uma frequência significativamente maior do alelo *cqm1<sub>REC</sub>* em relação ao alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* (MENEZES et al., 2016).

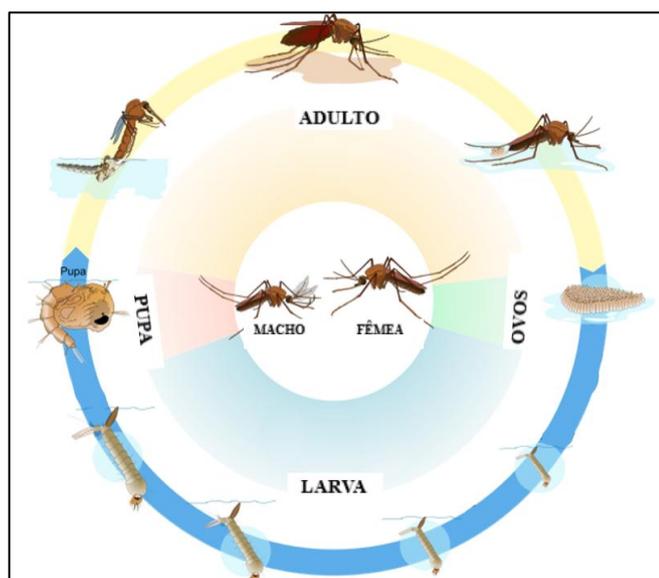
A partir da colônia resistente R2362, duas subcolônias homozigotas para cada alelo (REC e REC-2) foram estabelecidas e estão sendo mantidas para a realização de estudos visando expandir o conhecimento em relação à resistência a *L. sphaericus* conferidas por estes alelos (CHALEGRE et al., 2015). Um dos estudos realizados com estas colônias (MELO, 2013) mostrou que indivíduos homozigotos para o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* possuem um maior custo biológico relativo à capacidade hematofágica, fecundidade e fertilidade, em relação aos homozigotos para o *cqm1<sub>REC-2</sub>*. Este projeto parte da hipótese que indivíduos homozigotos para cada alelo possuem capacidades adaptativas distintas e que, certas condições, ainda não determinadas, possam favorecer a seleção de indivíduos homozigotos para o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* ou *cqm1<sub>REC-2</sub>*. O principal objetivo deste projeto é avaliar a capacidade de competição entre esses alelos a fim de determinar qual deles representa o maior risco de seleção. O estudo foi realizado a partir de diferentes abordagens que incluíram a determinação do nível de resistência conferido por cada alelo, a avaliação da evolução da frequência destes alelos a partir de uma colônia parental inicialmente heterozigota e mantida por 20 gerações; a avaliação da capacidade de desenvolvimento pré-imaginal de indivíduos homozigotos para cada alelo sob condições de estresse; a avaliação do padrão de atividade de enzimas detoxificadoras relacionadas a resistência a inseticidas; realizar uma análise de transcriptoma do intestino de larvas a homozigotas para cada alelo, para identificar a expressão diferencial de moléculas e vias metabólicas que possam desempenhar um papel na capacidade de sobrevivência. Este conjunto de análises visa gerar conhecimentos sobre estes alelos que ocorrem em populações de *C. quinquefasciatus* em Recife e assim contribuir para gerar conhecimentos para subsidiar estratégias de prevenção de seleção de resistência.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

*Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) é um inseto com distribuição cosmopolita nas regiões tropicais e subtropicais e encontrados em abundância em áreas urbanas e sua proliferação é favorecida, dentre outros fatores, por saneamento precário e pelo clima quente e úmido (ANDRADE; NASCIMENTO, 2010; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATINI, 2002). Estes ambientes fornecem condições ideais para o aumento de sua população, visto que seus principais criadouros são locais ricos em matéria orgânica em decomposição (ex: fossas sépticas), propiciados pela falta de saneamento básico em áreas urbanas.

O ciclo biológico de *C. quinquefasciatus* dura em média 10 dias (27°C, 70% umidade relativa, fotoperíodo 12h claro: 12h escuro) e consiste nas fases de ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto (Figura 1). Os adultos desta espécie são altamente antropofílicos e as fêmeas fazem o repasto sanguíneo preferencialmente no período crepuscular e a noite (ANDRADE; NASCIMENTO, 2010; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI et al., 2002). Após a cópula, as fêmeas precisam da alimentação sanguínea para maturação de seus ovos, cuja postura ocorre cerca de 48h após o repasto. A oviposição é realizada a superfície da água e os ovos são depositados de forma agrupada (~150-250 ovos), em estruturas denominadas de “jangadas”. A eclosão das larvas do 1º estádio (L<sub>1</sub>) ocorre após 48h e estas sofrem sucessivas mudas (L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> e L<sub>4</sub>), até atingir a fase de pupa, que tem duração média de 48h e, em seguida passa pela muda para a fase adulta (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). As características biológicas destes culicídeos, tais como curto ciclo de vida, alta capacidade de reprodução e adaptação ao ambiente em áreas urbanas, tornam seu controle populacional um desafio (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

**Figura 1** – Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus*



Fonte: Wikimedia (CULEX, 2018, tradução nossa).

## 2.1 Importância de *Culex quinquefasciatus* na saúde pública

A proximidade desta espécie com o homem no ambiente urbano aumenta a importância epidemiológica deste mosquito que é vetor do nemátodo *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose linfática (ALBUQUERQUE, 1993). A filariose linfática (FL) atinge milhões de pessoas no mundo, principalmente em regiões endêmicas das Américas, África e Ásia (FONTES et al., 2012). A FL está entre as doenças tropicais negligenciadas e é mais recorrente em áreas com carência de saneamento (FONTES et al., 2012). No Brasil, a filariose linfática continua tendo grande relevância no estado de Pernambuco, sendo encontradas, em áreas ainda endêmicas na Região Metropolitana do Recife (RMR) (FONTES et al., 2012, PERNAMBUCO, 2011; ROCHA et al., 2010). Nesta região foi implementado um programa de controle de *C. quinquefasciatus* pela Secretaria de Saúde Municipal, desde 2003, o qual está inserido no plano global de erradicação da filariose promovida pela OMS, que visa a eliminação desta doença até 2020 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1997). Além disso, a Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde de Pernambuco vem desenvolvendo também o programa “SANAR”, desde 2011, o qual reforça estas ações pois tem como objetivo diminuir ou eliminar doenças negligenciadas no estado, incluindo a filariose (PERNAMBUCO, 2011). *C. quinquefasciatus* pode ainda estar envolvido na transmissão de arboviroses, como a febre do vírus do Oeste do Nilo, que está em expansão nas Américas (VIEIRA et al., 2015), encefalite de St. Louis (DIAZ et al., 2013), Oropouche

(FIGUEIREDO, 2007), Mayaro, Rocio, dentre outros. Atualmente, esta espécie vem sendo investigada como potencial vetor do vírus zika (ELIZONDO-QUIROGA et al., 2018; FU et al., 2017; GUEDES et al., 2017).

## 2.2 Controle de vetores

Devido à importância de algumas espécies de insetos na transmissão de patógenos, agentes e métodos de controle têm sido desenvolvidos e aperfeiçoados visando o controle populacional de vetores. Uma das principais estratégias de controle é a eliminação direta de criadouros ou o seu tratamento com a utilização de larvicidas para a eliminação das formas jovens nestes habitats. Dentre os inseticidas químicos, os mais utilizados são os das classes dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (BECKER, 2003). Além destes, compostos que regulam o crescimento de insetos (IGR), tais como análogos do hormônio juvenil e inibidores de síntese de quitina, que afetam o desenvolvimento do inseto e inibem a muda para a fase adulta, vêm sendo empregados (BALDACCHINO et al., 2015). Outros métodos empregados são o controle por telas-mosquiteiros impregnadas com inseticidas de grande duração (LLINS) e pulverização residual interna de inseticidas (IRS) que podem ser eficientes para reduzir a transmissão de algumas doenças, e seu emprego tem sido estratégico em campanhas de controle de anofelinos na África (KILLEEN et al., 2017). Apesar de serem muito utilizados, há limitações no emprego de agentes de controle químico. Uma delas é seu modo de ação não seletivo, podendo ser prejudicial para organismos não alvo e sua acumulação no meio ambiente e na cadeia trófica. Outro problema que pode ser destacado é a resistência dos mosquitos aos inseticidas, que vem sendo selecionada a partir da utilização em larga escala desses inseticidas desde 1950 (BECKER, 2003).

Para minimizar o uso de inseticidas químicos, a busca de outras estratégias de controle é necessária para buscar através de ações na busca de alternativas de controle, sobretudo através de ações integradas, dentre elas, com a escolha de compostos mais seletivos tais como agentes biológicos (ACHEE et al., 2015; KILLEEN et al., 2017). Estes agentes podem ser como predadores, patógenos, parasitas e competidores, ou toxinas/metabólitos produzidos por organismos que têm a capacidade de reduzir as populações desses insetos (LACEY et al., 2015). As bactérias entomopatogênicas são os agentes biológicos mais empregados para o controle de vários grupos de insetos (BRAVO et al., 2011). Para insetos da ordem Diptera, as bactérias mais utilizadas são *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* (Bti) e *Lysinibacillus*

*sphaericus* que possuem alto potencial larvicida, devido a produção de cristais que contém proteínas com ação específica para alguns gêneros de importância médica, tais como *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* e *Simulium* (LACEY, 2007).

Outro agente bacteriano de destaque são os metabólitos espinosinas A e D derivado da bactéria, *Saccharopolyspora spinosa*, que tem ação em vários grupos de insetos praga e vetores (HERTLEIN et al., 2010). Este agente é denominado Spinosad, e o seu modo de ação, bem como seus análogos (spinosóides) é baseado na ativação de moduladores alostéricos de receptores GABA presentes no sistema nervoso de insetos, que leva o inseto à morte por rápida excitação do sistema nervoso (SPARKS et al., 2012). Os produtos à base de spinosad têm se mostrado eficazes para uma ampla gama de insetos, porém já há registros de resistência incluindo em espécies de mosquitos e seu uso deve ser monitorado e feito de forma integrada com outros agentes de controle (SPARKS et al., 2012; SU; CHENG; 2014).

### **2.3 *Lysinibacillus sphaericus***

*Lysinibacillus sphaericus* (*L. sphaericus*) é uma bactéria Gram-positiva, saprófita, esporulante, com distribuição cosmopolita, podendo ser encontrada em solos, ambientes aquáticos e cadáveres de insetos entre outros. Durante a fase de esporulação a bactéria pode produzir esporos arredondados, localizados na região terminal em um esporângio, além de cristais proteicos (Figura 2). Estes têm atividade larvicida para alguns gêneros de insetos da ordem Diptera, sendo o *L. sphaericus*, portanto, caracterizada como uma bactéria entomopatogênica. As suas toxinas têm propriedades larvicidas para alguns gêneros de mosquitos, dentre eles *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia*, *Aedes* e *Psorophora* (BERRY, 2012; CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELÉCUSE, 1996). Uma vantagem do *L. sphaericus* é a sua persistência e capacidade de se reciclar no ambiente, apresentando uma eficácia prolongada após a aplicação (LACEY, 2007). Várias cepas de *L. sphaericus* com alta atividade larvicida para mosquitos já foram isoladas, tais como as cepas 2362, 1593, IAB881, IAB59, 2297, IAB872 e C3-41, e algumas delas são utilizadas para a produção industrial de biolarvicidas e utilizadas em programas de controle (SILVA-FILHA; BERRY; REGIS, 2014).

Cinco classes de toxinas inseticidas já foram identificadas em cepas de *L. sphaericus* (Binária, Mtx, Cry48Aa/Cry49Aa, sphaericolisina, S-layer) e estão descritas a seguir (BERRY, 2012). A protoxina binária (Bin) é o principal componente presente nas

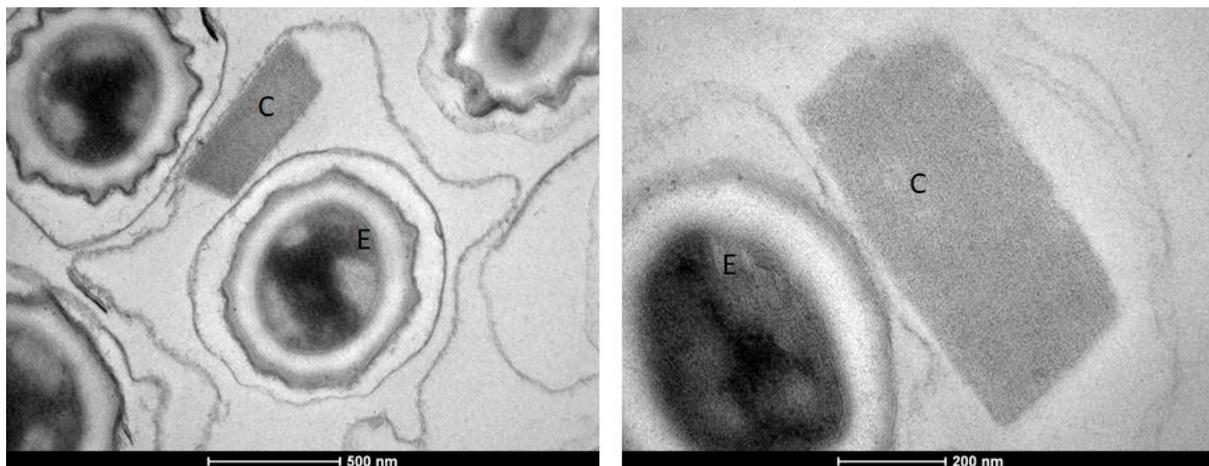
formulações comerciais e a única usada no controle de insetos, até o presente, e suas propriedades serão apresentadas na seção 2.5. As demais toxinas identificadas estão em fase de caracterização, mas ainda não foram usadas como princípio ativo para a formulação de biolarvicidas. Três toxinas Mtx (*mosquitocidal toxins* Mtx1, Mtx2 e Mtx3) já foram identificadas, e por serem produzidas na fase vegetativa, são sujeitas a degradação por proteases (CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELÉCLUSE, 1996). Porém, sabe-se que a Mtx1, produzida sob a forma de recombinante, mostrou excelente ação sobre larvas de culicídeos, demonstrando seu potencial inseticida (WIRTH et al., 2007).

A toxina binária formada pelos componentes Cry48Aa e Cry49Aa é produzida como inclusões cristalinas durante a esporulação de algumas cepas de *L. sphaericus* e é considerada também uma toxina binária, pois o seu maior nível de toxicidade só é atingido quando os dois componentes estão presentes em concentração equimolar (JONES et al., 2007; REZENDE et al., 2017). A sua atividade nas cepas nativas não é muito elevada, pois a subunidade Cry48Aa é expressa em pequena quantidade, em relação à Cry49Aa (JONES et al., 2007). A avaliação destas toxinas quando produzidas sob a forma recombinante e administradas de forma equimolar apresenta uma excelente toxicidade para *C. quinquefasciatus* (JONES et al., 2008).

As sphaericolisinas são citolisinas dependentes de colesterol e tem alta toxicidade para o ortóptero (*Blattella germânica*) e o lepidóptero *Spodoptera litura*, porém não tem ação em dípteros. São proteínas da superfamília de toxinas Thiol, que também engloba a perfringolisina O e alveolisina produzidos pelo *Bacillus thuringiensis* (BERRY, 2012; NISHIWAKI et al., 2007).

A proteína do envelope do esporo denominada S-layer (SlpC), pode ser produzida durante o estágio vegetativo de algumas cepas (ex. OT4b25, OT4b26 e 2362) pode ter atividade inseticida contra *C. quinquefasciatus* (LOZANO; AYALA; DUSSÀN, 2011). Um estudo realizado por Allievi et al. (2014) mostrou a associação das proteínas S-layer e Bin em cepas C7 e 2362 de *L. sphaericus*. Ao contrário das toxinas Mtx, as proteínas S-layer não são degradadas pela atividade proteolítica (ALLIEVI et al., 2014).

**Figura 2** – Aspecto do *Lysinibacillus sphaericus* cepa 2362.



Fonte: Neves (2018).

Legenda: cristal (C) e esporo (E).

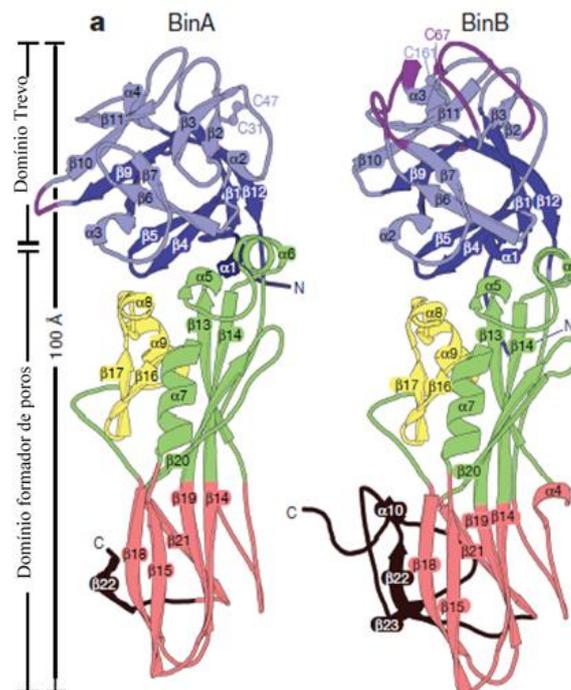
## 2.4 Protoxina Bin

A protoxina Bin é o fator inseticida que apresenta a maior toxicidade, além de ser produzida de forma estável e abundante em algumas cepas, como a 2362, 1593 e C3-41. Por esta razão cepas produtoras destes cristais são empregadas para produção industrial e os cristais são utilizados como princípio ativo das formulações comerciais de biolarvicidas. Esta protoxina é um heterodímero formado por duas proteínas, denominadas de BinA e BinB (Figura 3) que são produzidas de forma abundante e em quantidades equimolares nos cristais. Estas subunidades atuam em sinergia e apresentam uma elevada toxicidade para larvas de algumas espécies de culicídeos (NICOLAS et al., 1993; PRIEST et al., 1997).

Estudos para determinar a função de cada subunidade evidenciaram que, o componente BinB reconhece e se liga a receptores específicos na membrana celular do epitélio intestinal, enquanto a subunidade BinA é responsável pela atividade tóxica (CHARLES et al., 1997; NICOLAS et al., 1993). Para que a ação larvicida *L. sphaericus* seja eficiente, é necessário que a toxina Bin, através de sua subunidade BinB, ligue-se especificamente aos receptores presentes no epitélio intestinal das larvas (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). A avaliação das sequências dos genes da toxina Bin em cepas de *L. sphaericus* mostrou que estas podem ser classificadas em quatro tipos (Bin1, Bin2, Bin3 e Bin4), a partir de diferenças detectadas nas sequências de aminoácidos (PRIEST et al., 1997). As mais estudadas são as toxinas Bin1 e Bin2, que são consideradas as mais tóxicas para larvas de *Anopheles* e *Culex* e são produzidas pelas cepas IAB59 (Bin1), 2352, 1593 e C3-41 (Bin2) (PRIEST et al., 1997).

As sequências das subunidades BinA (370 aminoácidos) e BinB (448 aminoácidos) apresentam 28% de identidade e 46% de similaridade (BERRY, 2012). Estudos dos domínios funcionais da subunidade da BinA mostram que a sua região C-terminal é importante para a atividade tóxica da Bin e que ambas as regiões N- e C-terminal da proteína são requeridas para interação com a subunidade BinB (LIMPANAWAT; PROMDONKOY; BOONSERM, 2009). Na subunidade BinB a região N-terminal é importante para a ligação ao receptor nas células intestinais de larvas de *Culex* e a sua porção C-terminal é requerida na interação com a subunidade BinA (OEI; HINDLEY; BERRY, 1992). Na região N-terminal subunidade BinB, um segmento entre os resíduos 33-158 foi caracterizado como importante na interação com o receptor e os resíduos específicos como 147-149-150 parecem ser críticos para esta ligação (ROMÃO et al., 2011, SINGKHAMANAN et al., 2010).

**Figura 3** - Estrutura das subunidades BinA e BinB da toxina Binária de *Lysinibacillus sphaericus*.



Fonte: Colletier et al. (2016)

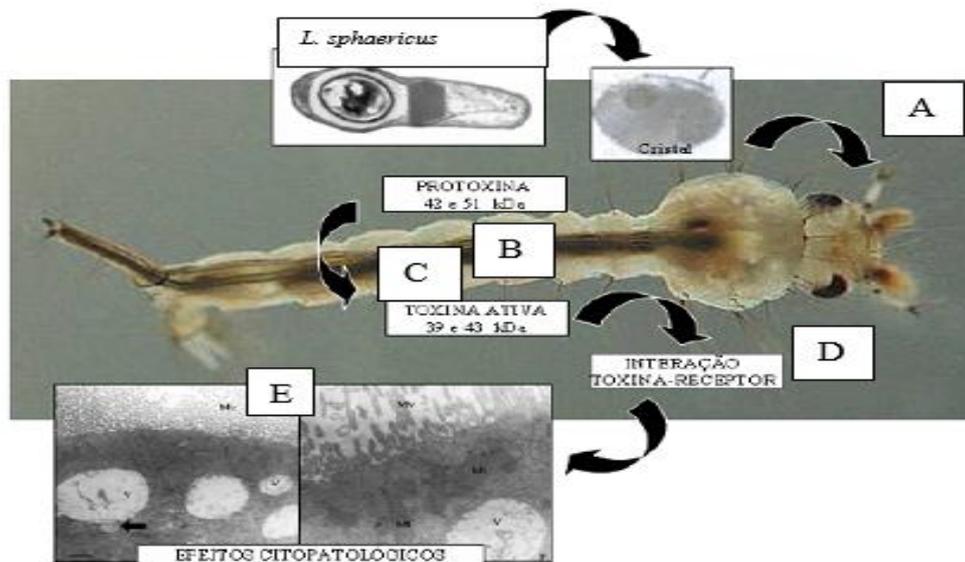
## 2.5 Modo de ação da protoxina Bin

A protoxina Bin do *L. sphaericus* tem ação larvicida por ingestão, por isso os produtos contendo seus cristais como princípio ativo são aplicados na superfície aquática dos

criadouros e ingeridos pelas larvas de culicídeos que se alimentam das partículas em suspensão através de filtração. Quando ingeridos, os cristais são solubilizados no pH alcalino (~10) do intestino das larvas, liberando as subunidades da protoxina Bin que são clivadas por serina-proteases nos fragmentos menores (BinA de 42 para 39 kDa, BinB de 51 para 43 kDa) para se tornar uma toxina ativa (BAUMANN et al., 1985; BROADWELL; BAUMANN, 1987). Após a solubilização e ativação no intestino, a toxina se liga às células epiteliais de forma regionalizada no ceco gástrico e no intestino posterior (DAVIDSON, 1989) sendo esta etapa decisiva para a ação da toxina nas larvas (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). As interações de toxinas com receptores específicos das células do epitélio do intestino causam alterações citopatológicas como destruição das microvilosidades, vacuolização citoplasmática, intumescimento das mitocôndrias e alterações do retículo endoplasmático rugoso (CHARLES, 1987; MELO, 2008; SINGH; GILL, 1988) que resultam na morte das larvas.

Outros efeitos que a toxina Bin induz são os processos de apoptose e de autofagia nos mosquitos (TANGSONGCHAROEN et al., 2017). Estudos anteriores revelaram que a toxina Bin induz a vacuolização dos autolisossomas da via de autofagia resultante da fusão entre autofagossoma com um lisossoma. Isso demonstra que a Bin induz autofagia no intestino das larvas, formando vacúolos citoplasmáticos e formação de células apoptóticas como uma resposta da célula à intoxicação, enquanto se protege da degradação (OPOTA et al., 2011; TANGSONGCHAROEN et al., 2015). As principais etapas do modo de ação da toxina Bin em *C. quinquefasciatus* pode ser visualizado na figura 4.

**Figura 4** - Modo de ação da toxina Binária presente nos cristais de *Lysinibacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus*.



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

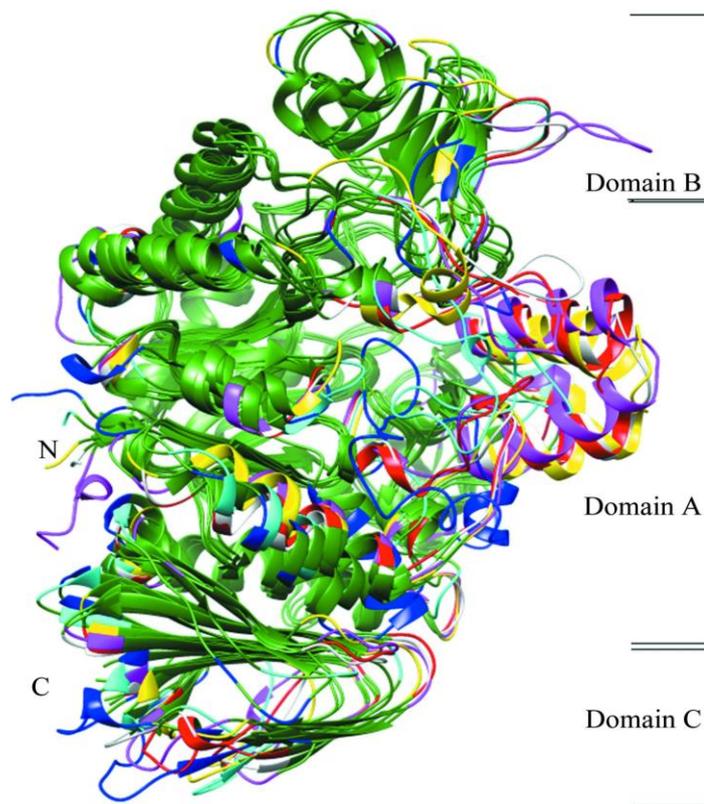
Nota: Após a ingestão (A), o cristal é solubilizado no pH alcalino intestinal da larva, a protoxina Bin é liberada no lúmen (B) e processada até a forma de toxina ativa (C). Esta interage com receptores específicos (D) presentes na membrana apical do epitélio intestinal e desencadeia os efeitos citopatológicos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

## 2.6 Receptores da toxina Bin

O receptor da toxina Bin em *C. quinquefasciatus*, denominado *Culex quinquefasciatus* maltase 1 (Cqm1; Figura 5), é uma  $\alpha$ -glicosidase (EC 3.2.1.20) de 66 kDa, ligada ao epitélio intestinal das larvas por meio de uma âncora glicosil-fosfatidilinositol (GPI). A existência de receptores para a toxina Bin também já foi evidenciada também em larvas de *Culex pipiens*, *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensi* (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA et al., 1995, 1997, 1999, 2008). Aqueles receptores já caracterizados foram chamados de ‘*Culex pipiens*, maltase 1’ (Cpm1) e ‘*An. gambiae* maltase 3’ (Agm3) (ROMÃO et al., 2006). Como descrito em larvas de *C. pipiens*, a toxina Bin mostra a ligação regionalizada no intestino posterior e ceco gástrico, à medida que em *An. gambiae* essa ligação é mais fraca e pouco definida ao longo do intestino médio (FERREIRA; SILVA-FILHA, 2013; SILVA-FILHA, 2017). *Aedes aegypti* é uma espécie naturalmente refratária a *L. sphaericus*, embora as larvas consigam processar a protoxina em toxina e possuam a  $\alpha$ -glicosidase Aam1 que é ortóloga a Cpm1/Cqm1. No caso, a proteína Aam1, diferente da Cqm1, não tem a capacidade

de se ligar a toxina Bin (FERREIRA et al., 2010; 2014; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA, 2017). O primeiro receptor da toxina Bin identificado foi o Cpm1, em *C. pipiens*, e este compartilha uma identidade de 97% com Cqm1 e 66% com Agm3 e 74% com Aam1 (OPOTA et al., 2008; ROMÃO et al. 2006; SILVA-FILHA; BERRY; REGIS, 2014). A expressão de Cpm1/Cqm1 como proteínas ligadas à membrana celular é necessária para a atividade da toxina Bin nas larvas (DARBOUX et al., 2002; FERREIRA et al., 2010; SILVA-FILHA et al., 1999). Falhas na ligação entre a toxina Bin e o receptor podem ocorrer devido a mutações que impedem a expressão de proteínas ligadas ao epitélio via a âncora GPI. Assim, a ausência de receptores localizados no epitélio provoca altos níveis resistência como será descrito na seção 2.9 (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992,1995; OLIVEIRA et al., 2004; PEI et al., 2002, SILVA-FILHA; BERRY; REGIS, 2014).

**Figura 5** – Estrutura do receptor Cqm1.



Fonte: Sharma et al. (2017)

Legenda: Em verde, regiões conservadas. Nas demais cores, regiões variáveis.

## 2.7 Utilização de *Lysinibacillus sphaericus* em campo

Biolarvicidas a base desta bactéria vêm sendo empregados desde 1990 em programas de controle. A eficácia do uso de *L. sphaericus* já foi comprovada em vários países, tais como França, Índia, Malásia, Tailândia, Austrália, Tanzânia e outros países da África e nas Américas como EUA, Brasil, Cuba e Peru (LACEY et al., 2007, SILVA-FILHA; BERRY; REGIS, 2014). Estes testes foram importantes para o estabelecimento de formulações, doses, métodos apropriados para aplicação de produtos e para medir o impacto de tratamentos em populações de mosquitos (SILVA-FILHA; BERRY; REGIS, 2014). Devido a este desenvolvimento na área de produção e avaliação produtos à base de *L. sphaericus* vem sendo preconizados para o controle de vetores, principalmente, mosquitos dos gêneros *Culex* e *Anopheles*, responsáveis pela transmissão da filariose linfática e malária, respectivamente (BARBAZAN et al., 1997; 1998; BERTI MOSER et al., 2012; HOUGARD et al., 1990; 1993; REGIS et al., 1995, 1996; SKOVMAND; SANOGO, 1999).

No Brasil, a utilização de *L. sphaericus* em campo para o controle de *C. quinquefasciatus* se deu inicialmente no Distrito Federal, seguido de outros programas em Belo Horizonte e Recife, onde reduções significativas da densidade de *C. quinquefasciatus* foram alcançadas. Em Recife, particularmente, a utilização de *L. sphaericus* no controle de *C. quinquefasciatus*, vetor da filariose linfática no Brasil, já vem sendo empregada em diferentes testes piloto desde 1990 no intuito de mostrar sua efetividade no controle destas espécies. As avaliações do emprego do *L. sphaericus* para o controle de *C. quinquefasciatus* em áreas urbanas do Recife mostraram uma significativa redução da densidade populacional deste vetor e conseqüentemente a exposição da população às larvas filariais infectivas (REGIS et al., 1995; 2000; 2001; SILVA-FILHA et al., 2001). Recentemente, o uso de *L. sphaericus* em associação com o *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* (Bti) em sistemas de rotação vêm sendo recomendados como forma de controle integrado de vetores, inclusive como estratégia de manejo da resistência a este agente (SILVA-FILHA; BERRY; REGIS, 2014). A Organização de Controle de Mosquitos da Alemanha (KABS) também foi pioneira no uso de *L. sphaericus* como uma complementação ao uso do Bti nos programas de controle e não houve registro de resistência a essas bactérias, ou impactos ambientais e na fauna (SILVA-FILHA; BERRY; REGIS, 2014). Um produto comercial, VectoMax<sup>®</sup> WSP, com cristais destas duas bactérias (*L. sphaericus* 2.7% e Bti 4.5%) é utilizado na RMR como estratégia de

controle. Sua eficácia foi comprovada para algumas espécies de *Culex* e *Aedes* (ANDERSON et al., 2011; CETIN et al., 2015; DRIZ et al., 2011), tornando esse produto eficiente no controle de várias espécies devido a mistura de toxinas.

## 2.8 Resistência a toxina Bin

A resistência de *C. quinquefasciatus* a *L. sphaericus* já foi detectada devido à ausência de ligação da toxina Bin ao epitélio intestinal das larvas, e este mecanismo é classificado como uma alteração no sítio-alvo (NIELSEN-LEROUX et al., 1995;1992). A investigação da base molecular da resistência mostrou que, na maioria dos casos estudados, mutações no gene *cqm1* que impedem a expressão de proteínas Cqm1 ancoradas no epitélio intestinal das larvas pela resistência à toxina Bin (Quadro 1). A resistência a *L. sphaericus* já foi registrada tanto a partir da seleção artificial de colônias de laboratório, como também foi observado em populações de campo que foram tratadas intensivamente com *L. sphaericus*. Diversos níveis de resistência a *L. sphaericus* já foram identificados em populações da Índia, China, Tailândia, Tunísia e França (MULLA et al., 2003; NIELSEN-LEROUX et al., 2002; RAO et al., 1995; SINÈGRE et al., 1994; YUAN et al., 2000) e em laboratório (CHALEGRE et al., 2012; 2015; DARBOUX et al., 2002; 2007; GUO et al., 2013; NIELSEN-LEROUX; CHARLES; GEORGHIOU, 1995; PEI et al., 2002; ROMÃO et al., 2006; WIRTH et al., 2000). Há ainda, duas populações de *Culex pipiens* (SPHAE e TUNIS) resistentes a *L. sphaericus*, mas que apresentam receptores Cqm1 funcionais, indicando que há outros mecanismos de resistência que ainda não foram elucidados (NIELSEN-LEROUX et al., 1997; 2002).

A primeira colônia resistente descrita, GEO na Califórnia (EUA), foi obtida através de seleção em laboratório com *L. sphaericus* cepa 2362, e atingiu uma alta razão de resistência (RR) cerca de 7.000 vezes comparada a colônia suscetível (WIRTH et al., 2000). A base molecular da resistência desta e de outras colônias e de populações resistentes a *L. sphaericus* foi elucidada, a partir do estudo do gene *cpm1* que codifica o receptor. Até o momento foram identificados oito alelos contendo mutações que levam a este fenótipo (Quadro 1). A sequência do gene de *C. pipiens* da colônia GEO, o alelo *cpm1<sub>GEO</sub>*, exibe uma mutação pontual (T1706A) que gera um códon prematuro de terminação da tradução, e leva à expressão de uma proteína de 568 aminoácidos desprovida de âncora GPI (DARBOUX et al.,

2002). No caso da população de *C. pipiens* da França denominada BP, dois alelos de resistência denominados *cpm1<sub>BP</sub>* e *cpm1<sub>BP-del</sub>* (DARBOUX et al., 2007) foram detectados. O alelo *cpm1<sub>BP</sub>* possui uma mutação “nonsense” (Gln396Stop) que leva à formação de um códon de parada prematuro e síntese de uma proteína truncada com 395 aminoácidos, igualmente, sem a âncora GPI. O alelo *cpm1<sub>BP-del</sub>*, foi caracterizado pela inserção de um transposon no éxon 2, que leva à uma deleção de 198 pb. Após o processamento do RNA mensageiro, este codifica uma proteína de 514 aminoácidos com âncora GPI, porém, a perda de 66 aminoácidos, impede a interação desta proteína mutante com a toxina Bin (DARBOUX et al., 2007). A resistência da colônia CqRL/C3-41, oriunda da China, está associada ao alelo *cqm1R*, caracterizado pela deleção de uma citosina na posição 445, que gera um códon de parada na posição 582, e produz uma proteína truncada composta de 194 resíduos (GUO et al., 2013).

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

Colônia/ população	País	Origem	Alelo <i>r</i>	Referência
GEO <sup>1</sup>	EUA	Lab	<i>cpm1<sub>GEO</sub></i>	DARBOUX et al., 2002; WIRTH et al., 2000
R2362 <sup>2</sup>	Brasil	Lab	<i>cqm1<sub>REC</sub></i>	ROMÃO et al., 2006; PEI et al., 2002
R2362 <sup>2</sup>	Brasil	Lab	<i>cqm1<sub>REC-2</sub></i>	CHALEGRE et al., 2015
R2362 <sup>2</sup>	Brasil	Campo	<i>cqm1<sub>REC-D25</sub></i>	CHALEGRE et al., 2012
R2362 <sup>2</sup>	Brasil	Campo	<i>cqm1<sub>REC-D16</sub></i>	CHALEGRE et al., 2012
RIAB59 <sup>2</sup>	Brasil	Lab	<i>cqm1<sub>REC</sub></i>	AMORIM et al., 2007
RLCq1/C3-41 <sup>2</sup>	China	Lab	<i>cqm1R</i>	GUO et al., 2013
Kochi <sup>2</sup>	Índia	Campo	ND	RAO et al., 1995
Coque <sup>2</sup>	Brasil	Campo	ND	SILVA-FILHA et al., 1995
SPHAE <sup>1</sup>	França	Campo	ND	NIELSEN-LEROUX et al., 1997
RFCq1 <sup>2</sup>	China	Campo	ND	YUAN et al., 2000
TUNIS <sup>1</sup>	Tunísia	Campo	ND	NIELSEN-LEROUX et al., 2002
BP <sup>1</sup>	França	Campo	<i>cpm1<sub>BP</sub></i> <i>cpm1<sub>BP-del</sub></i>	NIELSEN-LEROUX et al., 2002; DARBOUX et al., 2007
Wat Pikul <sup>1</sup>	Tailândia	Campo	ND	MULLA et al., 2003

Fonte: a autora

Nota:

<sup>1</sup>*C. pipiens*.

<sup>2</sup>*C. quinquefasciatus*.

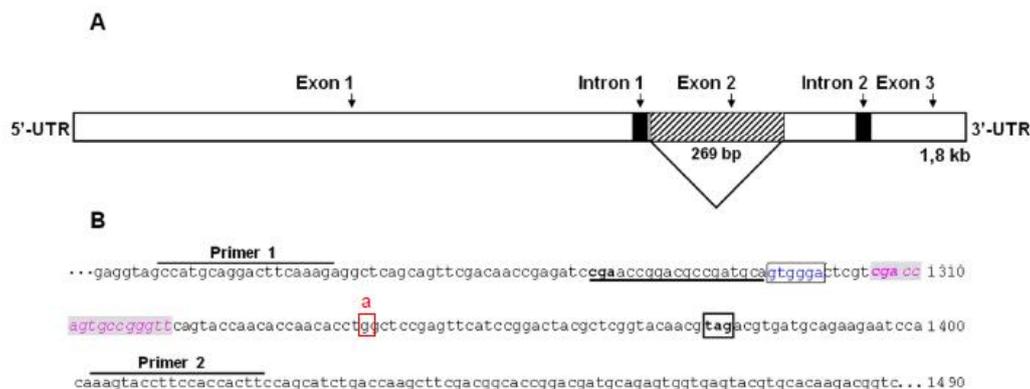
Quatro alelos de resistência foram identificados em populações/colônias de *C. quinquefasciatus* em Recife. Dentre eles, estão os alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>*, que foram caracterizados na colônia R2362, que possui um alto nível de resistência à toxina Bin e foi selecionada com a cepa *L. sphaericus* 2362 em laboratório (OLIVEIRA et al., 2004; PEI et al., 2002). As mutações descritas a seguir estão representadas na Figura 6. O alelo *cqm1<sub>REC</sub>* é caracterizado por uma deleção de 19 nucleotídeos (posição 1225-1243), que causa um stop códon prematuro (posição 443), codificando uma proteína truncada sem âncora GPI (CHALEGRE et al., 2009; ROMÃO et al., 2006). O alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* também confere resistência em larvas desta colônia, e possui uma mutação pontual G1292A que gera um códon de parada de tradução prematuro (posição 431) e, a exemplo do alelo *cqm1<sub>REC</sub>*, também codifica uma proteína truncada (Figura 5) (CHALEGRE et al., 2015). Já os alelos *cqm1<sub>REC-D16</sub>* e *cqm1<sub>REC-D25</sub>*, foram identificados em populações de campo e sabe-se que eles estão associados à resistência, pois, eles contêm deleções de 16 e 25 nucleotídeos que provocam a formação de um códon de parada prematuro e, portanto, também irão gerar proteínas desprovidas de âncora GPI. Nos casos de resistência associados a alelos do gene *cqm1* foi demonstrado que a herança é recessiva, ou seja, apenas larvas homocigotas para um determinado alelo exibem o fenótipo resistente.

É importante destacar que dentre os possíveis mecanismos de resistência, a resistência metabólica para inseticidas químicos é um fenômeno bastante documentado para insetos de diferentes ordens (HEMINGWAY, 2000; HEMINGWAY; RANSON 2000; LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007). Este mecanismo ocorre mediado pela ação de enzimas que são capazes de metabolizar os xenobióticos e são responsáveis pelo processo de detoxificação nos insetos através de reações de biotransformação. Estas reações possuem três fases, nas quais as enzimas detoxificadoras fazem parte: fase I de modificação química, fase II de conjugação e fase III de excreção (FROVA, 2006). Estas enzimas atuam na fase I, tais como monooxidasas de função mista (MFOs) e Esterases (EST) e Fase II, tais como glutathione *S*-transferase (GSTs). A superfamília das MFOs, incluem as enzimas da família de citocromos P450 e citocromos em geral, são conhecidas pela sua capacidade de metabolizar vários compostos tais como, hormônios juvenil e ecdisona, ácidos graxos, esteroides e contribuem em várias funções: crescimento, desenvolvimento, nutrição e detoxificação de xenobióticos (FEYEREISEN, 2005; SCOTT, 1999). As esterases ( $\alpha$  e  $\beta$ ) são responsáveis pela hidrólise de ésteres de ácidos carboxílicos, podendo funcionar também sobre outros substratos que contenham ligações amidas (OAKESHOTT et al., 1993). Essas enzimas agem sequestrando o

inseticida e liberando lentamente os metabólitos formados para a sua excreção (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998). As GSTs estão envolvidas na metabolização de compostos hidrofóbicos que são tóxicos para a célula, tais como drogas, inseticidas e substratos endógenos. Além disso, elas podem atuar na biossíntese de hormônios esteroides e a degradação de aminoácidos aromáticos (HAYES et al., 2005).

Estas enzimas estão geralmente associadas à detoxificação de compostos químicos utilizados no controle de mosquitos como piretróides, organoclorados e organofosforados. Devido à relevância deste mecanismo na resistência a inseticidas químicos, uma das indagações deste estudo foi qual seria a potencial importância destas enzimas em relação à ação larvicida da toxina Bin.

**Figura 6** - Representação do gene *cqml* que codifica o receptor da toxina Bin em *Culex quinquefasciatus* (número de acesso no GenBank DQ333335) e localização dos polimorfismos dos alelos *cqml*<sub>REC</sub>, *cqml*<sub>REC-D16</sub>, *cqml*<sub>REC-D25</sub> e *cqml*<sub>REC-2</sub> que estão associados à resistência.



Fonte: Adaptado de Chalegre et al. (2012).

Nota: **A.** sequência de 1848 nucleotídeos (nt) contendo dois íntrons de 50- (1169-1218) e 55-nt (1655-1709). **B.** Região de 269 nt (1221-1490) que engloba os polimorfismos dos alelos encontrados nas populações de Recife: deleção de 19 nt correspondendo ao alelo *cqml*<sub>REC</sub> (sublinhada); as seis bases adicionais correspondentes ao *cqml*<sub>REC-D25</sub> (azul e enquadradas); a deleção de 16 nt do alelo *cqml*<sub>REC-D16</sub> (itálico, rosa e sombreado); a mutação pontual na posição 1342 do alelo *cqml*<sub>REC-2</sub> (marcada em vermelho).

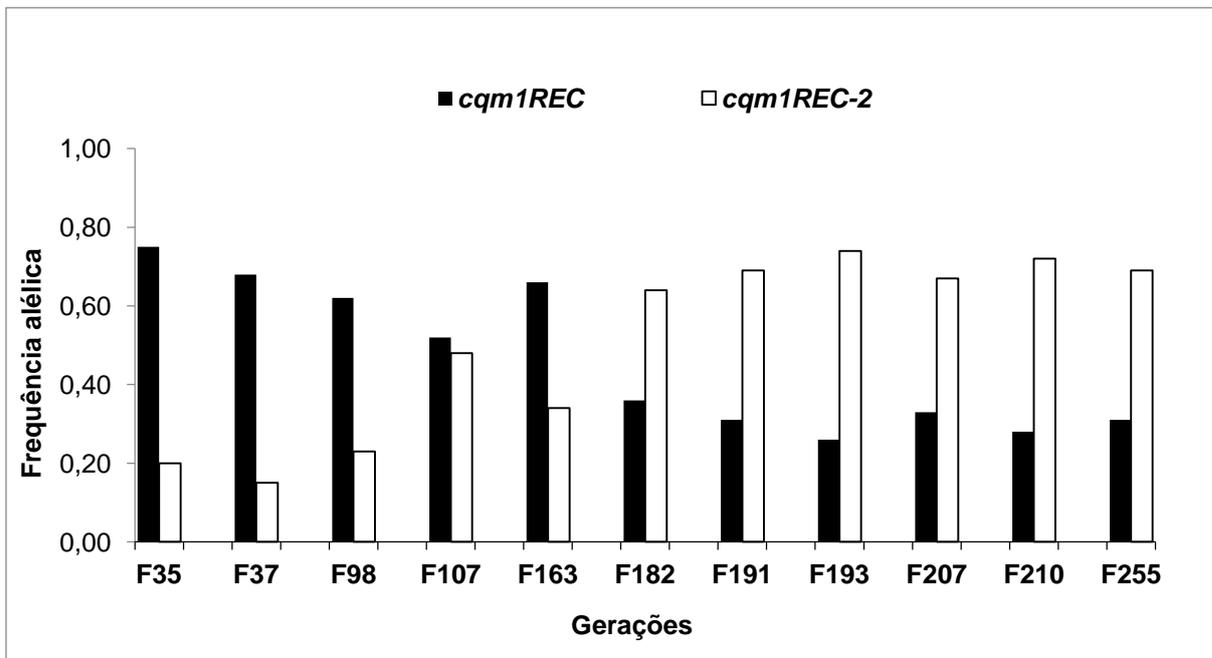
## 2.9 Alelos *cqml*<sub>REC</sub> e *cqml*<sub>REC-2</sub>

A colônia R2362 de *C. quinquefasciatus* foi fundada a partir de larvas da colônia suscetível oriundas de um grande número de ovos coletados em diversos bairros do Recife (PE). Esta colônia foi, em seguida, submetida à contínua exposição a *L. sphaericus* 2362 até atingir um alto nível de resistência, superior a 100.000 vezes comparada à colônia suscetível

(PEI et al., 2002). O mecanismo de resistência nesta colônia está associado à ausência da expressão do receptor Cqml no epitélio intestinal, que é o sítio-alvo da toxina Bin (OLIVEIRA et al., 2004). No período de caracterização molecular da resistência da colônia R2362, o grupo de indivíduos analisados mostrou o genótipo homozigoto para o alelo *cqml<sub>REC</sub>* (ROMÃO et al., 2006). A partir da caracterização deste alelo, foi possível desenvolver um método de PCR alelo-específica para a sua detecção, que validou o genótipo homozigoto para o alelo *cqml<sub>REC</sub>* em larvas desta colônia. Uma avaliação posterior do genótipo das larvas da colônia R2362 demonstrou a presença de outro alelo de resistência na colônia, denominado *cqml<sub>REC-2</sub>* (CHALEGRE et al., 2015). Esses dados sugerem que ocorreu um processo de co-seleção e sucessão desses alelos na colônia R2362. Os estudos de sucessão de alelos de resistência em mosquitos são, de uma forma geral, escassos e alguns deles vêm sendo realizados com populações de campo, os quais estão sujeitos a variáveis não controladas (LABBÉ et al., 2009).

Uma análise retrospectiva da frequência destes alelos nas larvas desta colônia vem sendo mantida sob condições de laboratório por mais de 255 gerações mostrou que na geração F<sub>35</sub> o alelo *cqml<sub>REC</sub>* era o mais abundante (75% *cqml<sub>REC</sub>*; 25% *cqml<sub>REC-2</sub>*), enquanto que na geração F<sub>169</sub> o alelo *cqml<sub>REC-2</sub>* passou a ser predominante (31% *cqml<sub>REC</sub>*; 69% *cqml<sub>REC-2</sub>*) até a última avaliação realizada, na F<sub>255</sub> (Figura 7) (CHALEGRE et al., 2015). Após a descoberta do alelo *cqml<sub>REC-2</sub>* na colônia, foi desenvolvido um novo método de PCR-multiplex para sua detecção, que foi utilizado para comparar a frequências de ambos os alelos na colônia. Esta ferramenta de diagnóstico direto do genótipo das larvas possibilitou a fundação de duas subcolônias homozigotas para cada um dos alelos responsáveis pela resistência, o *cqml<sub>REC</sub>* e o *cqml<sub>REC-2</sub>*.

**Figura 7** - Frequência dos alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* em larvas *Culex quinquefasciatus* da colônia R2362 selecionada para resistência a *Lysinibacillus sphaericus* 2362 e mantido em condições de laboratório.

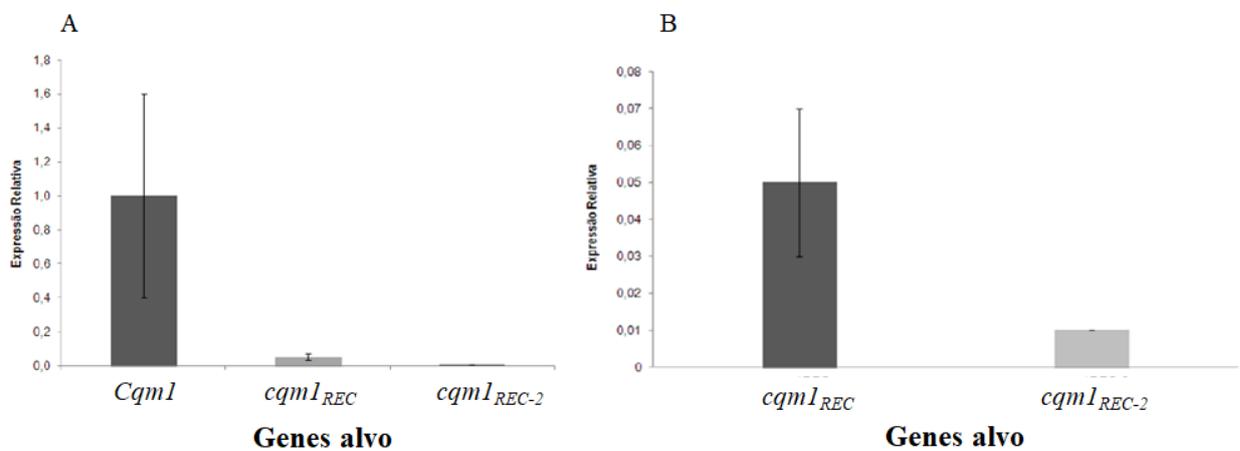


Fonte: Adaptado de Chalegre et al. (2015).

As subcolônias fundadas, denominadas R2362/REC e R2362/REC-2, estão sendo, portanto usadas para estudar cada um dos alelos incluindo a análise de expressão relativa dos alelos, o padrão de herança destes alelos e ensaios de competição para elucidar as possíveis características específicas que podem estar associados a cada alelo (CHALEGRE et al., 2015). A quantificação relativa de expressão gênica mostrou que os alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* possuíam níveis baixos de transcritos, que foram em média 20 e 100 vezes menores do que o gene suscetível *cqm1*, respectivamente, (Figura 8). A avaliação da herança de resistência desses alelos mostrou que ambos são recessivos (CHALEGRE et al., 2015). Foram realizados ensaios de competição destes alelos em uma subcolônia heterozigota (R2362/A1-A2) com uma frequência inicial similar dos alelos, (0,52 para o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* e 0,48 para o *cqm1<sub>REC-2</sub>*), fundadas a partir das larvas das subcolônias homozigotas para estes alelos. No decorrer de 10 gerações, sem exposição ao *L. sphaericus*, o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* assumiu a maior frequência sendo de 0,78 ao final do experimento (Figura 9 A; CHALEGRE et al., 2015). Foi também realizado outro experimento com esta subcolônia durante as gerações subsequentes até a 21ª geração. Neste experimento, a partir da F10, os indivíduos foram mantidos com pressão de seleção e o

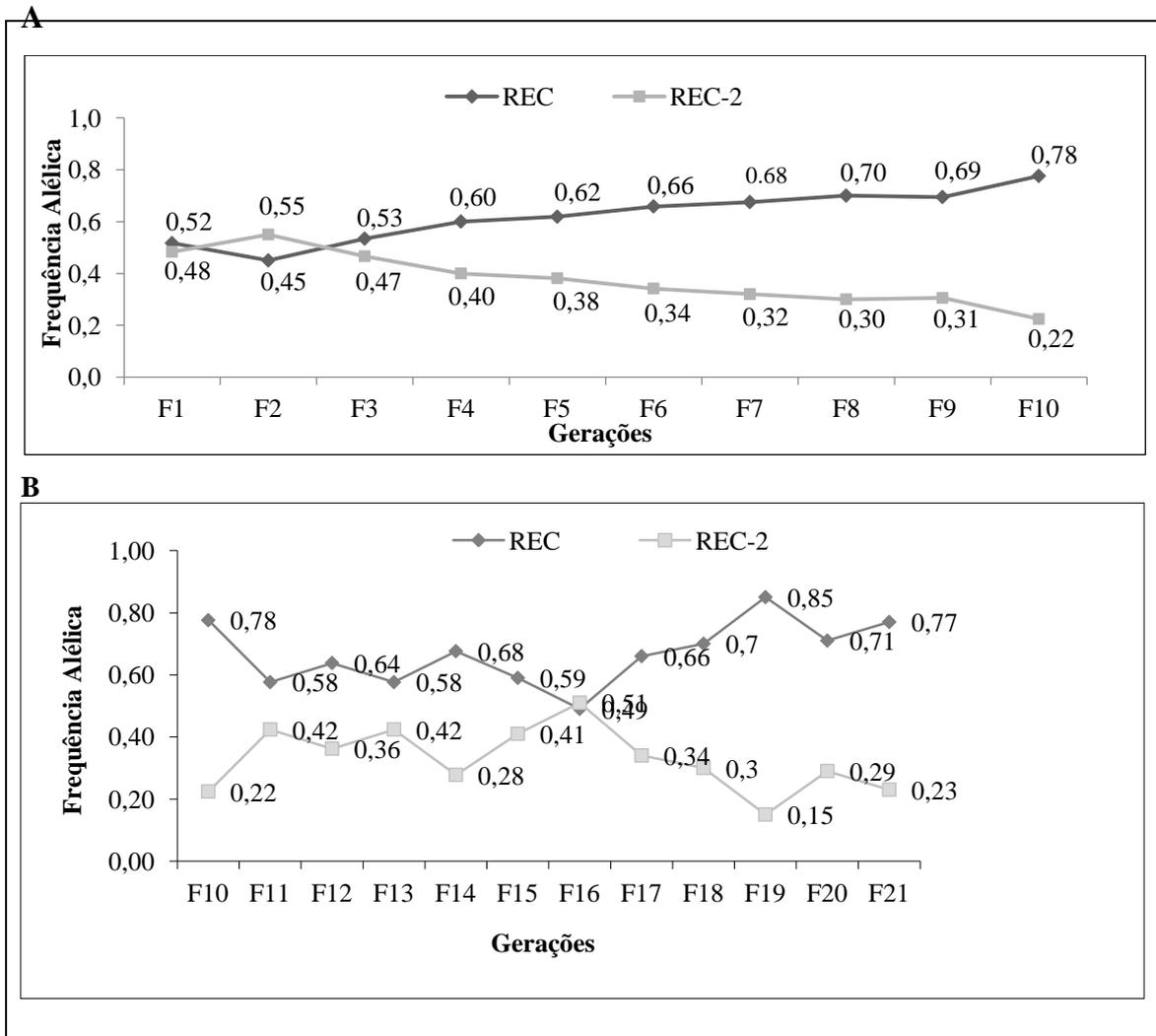
que foi observado foi uma grande flutuação na frequência destes alelos (Figura 9 B). O alelo  $cqm1_{REC}$  foi novamente o mais frequente nesta análise, porém em determinados momentos, como na  $F_{16}$ , a frequência dos alelos  $cqm1_{REC}$  e  $cqm1_{REC-2}$  foi similar (0,51 e 0,49, respectivamente). A partir da  $F_{19}$ , o alelo  $cqm1_{REC}$  teve frequência superior a 0,7 e na última geração ( $F_{21}$ ), a frequência destes alelos foi de 0,77 e 0,23, para os alelos  $cqm1_{REC}$  e  $cqm1_{REC-2}$ , respectivamente (dados não publicados).

**Figura 8** – A. Expressão relativa dos alelos de resistência  $cqm1_{REC}$  e  $cqm1_{REC-2}$  em relação ao gene de referência suscetível,  $cqm1$ . B. Expressão relativa dos alelos de resistência  $cqm1_{REC}$  e  $cqm1_{REC-2}$ .



Fonte: Chalegre et al. (2015)

**Figura 9** - Frequência dos alelos  $cqmI_{REC}$  (REC) e  $cqmI_{REC-2}$  (REC-2) ao longo de gerações da colônia R2362/A1-A2.



Fonte: A. Chalegre et al. (2015) e B. a autora

Legenda: . A. Indivíduos mantidos da F1-F10 sem exposição ao *Lysinibacillus sphaericus*. B. Indivíduos mantidos da F11-F20 expostos ao *L. sphaericus*.

Apesar dos alelos  $cqmI_{REC}$  e  $cqmI_{REC-2}$  terem sido identificados inicialmente em uma colônia de laboratório, foram feitos *screenings* por PCR alelo-específica de sua presença em populações de campo em Recife que mostraram sua presença com frequências na ordem de  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , respectivamente (CHALEGRE et al., 2009; 2012; MENEZES et al., 2016). Os alelos foram identificados em amostras de quatro populações não expostas a *L. sphaericus* de *Culex quinquefasciatus* da RMR, além de uma população exposta a *L. sphaericus* (Tabela 1). A frequência destes alelos nas populações estudadas, bem como o seu genótipo pode ser observado na tabela 1. Análises das sequências do alelo  $cqmI_{REC-2}$  encontradas nas populações de campo foram comparadas com a sequência obtida das larvas da colônia do

laboratório, e os dados sugerem que os alelos detectados em laboratório possuem origem a partir das populações de campo (MENEZES et al., 2016).

**Tabela 1** – Alelos *cqm1*, *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* detectados em populações de *Culex quinquefasciatus* de bairros do Recife.

Amostras	N	Genótipos		Frequência	
		<i>cqm1/cqm1<sub>REC</sub></i>	<i>cqm1/cqm1<sub>REC-2</sub></i>	<i>cqm1<sub>REC</sub></i>	<i>cqm1<sub>REC-2</sub></i>
Azeitona	223	2	0	0,004	0
Ipojuca	500	2	0	0,002	0
Jaboatão	500	3	2	0,003	0,002
R. de Fogo	226	2	0	0,004	0
Água Fria	600	7	0	0,006	0
Total	2049	16	2	0,004	0,0005

Fonte: Menezes et al. (2016)

## 2.10 Competição entre alelos de resistência

A resistência a inseticidas é um modelo estratégico para estudos de processos evolutivos em populações naturais por dois principais motivos: a evolução pode ser rápida sob forte pressão de seleção intensa e o respectivo fenótipo é detectável. Sendo assim, o estudo e compreensão de mecanismos de resistência são importantes para o desenvolvimento de ferramentas para detectar e monitorar alelos associados a este fenômeno (GUILLEMAUD et al., 1998), além de definir estratégias de manejo de acordo com sua dinâmica. Sabe-se que um dos principais fatores para a evolução do processo de seleção de resistência é a frequência inicial de alelos que conferem este fenótipo nas populações naturais e seu modo de herança.

Um dos modelos mais estudados de sucessão de alelos são os genes de resistência à organofosforados (OP), cuja dinâmica em populações de *Culex pipiens* vem sendo investigada ao decorrer dos anos em algumas regiões da França (CHEVILLON et al. 1995; PASTEUR et al., 1981; PASTEUR; SINÈGRE, 1975; RAYMOND et al., 1986; 2001). No caso, alelos do gene da acetilcolinesterase (*Ace*) que é o sítio-alvo dos OPs, e genes que codificam esterases (*Ester*) relacionadas ao mecanismo de resistência metabólica vêm sendo investigados (LABBÉ et al., 2007a).

No locus *Ester*, diferentes alelos de resistência vêm sendo detectados e o estudo mostra que eles vão se sucedendo nas populações (GUILLEMAUD et al., 1998; LABBÉ; LENORMAND; RAYMOND, 2005). Estes genes de esterases que conferem resistência a OP no Sul da França foram detectados quatro anos após o início do controle com o composto

clorpirifós. Foi observada uma substituição sucessiva de alelos de resistência neste locus (*Ester<sup>1</sup>*, *Ester<sup>2</sup>* e *Ester<sup>4</sup>*) na área de Montpellier, França (LABBÈ et al., 2009), que tem permitido analisar um processo de melhoria adaptativa sob condições de campo. No decorrer do tempo houve dois processos de substituição, primeiro o alelo *Ester<sup>4</sup>* substituiu o *Ester<sup>1</sup>*, e foi detectado que *Ester<sup>4</sup>* pode conferir o fenótipo de resistência com um menor custo biológico. Em seguida, o alelo *Ester<sup>2</sup>* substituiu o alelo *Ester<sup>4</sup>*, que embora tenha um maior custo de biológico, confere um melhor fenótipo de resistência e assim, uma maior vantagem seletiva na área tratada. Na primeira substituição, os alelos que conferem resistência possuem efeitos pleiotrópicos fracos, sendo então generalistas, como o alelo *Ester<sup>4</sup>* que substituiu o *Ester<sup>1</sup>*. No segundo momento, um alelo mais especialista para áreas tratadas e com fortes efeitos pleiotrópicos (*Ester<sup>2</sup>*) foi selecionado. Sendo assim, se os tratamentos com inseticidas forem mantidos, sem manejo, há duas formas que a evolução desses alelos pode ocorrer. Primeiro pode favorecer alelos especialistas que possuem polimorfismos estáveis, ou então, favorecer alelos mais generalistas que não tenham alto custo biológico (LABBÈ et al., 2009). Assim, a evolução nesse locus provavelmente ocorreu devido ao tratamento, e é possível que, se diminuir a intensidade do tratamento com inseticidas, o alelo generalista *Ester<sup>4</sup>* pode ser favorecido novamente devido ao menor custo. Isso enfatiza as práticas de tratamento local, são importantes e devem considerar a capacidade adaptativa de cada alelo (LABBÈ; LENORMAND; RAYMOND, 2005).

Semelhante ao que ocorre no locus *Ester*, no locus *Ace.1*, o alelo *Ace.1<sup>R</sup>* foi substituído pelo alelo *Ace.1<sup>RS</sup>*, que foi formado por uma duplicação de genes, há mais de uma década (LENORMAND et al., 1998). A duplicação combinando cópias resistentes e suscetíveis, como *Ace.1<sup>RS</sup>* provavelmente aconteceu recentemente, isto é, desde o início dos tratamentos com inseticidas organofosforados. Na ausência de inseticidas OPs, nenhum alelo de resistência *Ace.1* é encontrado, provavelmente devido ao alto custo (LABBÈ et al., 2007b). Para o alelo *Ace.1<sup>RS</sup>*, a cópia S adicional não altera a resistência produzida pela cópia R, logo, sua vantagem é provavelmente ter um menor custo biológico. Portanto, a cópia S pode ser considerada como um transformador para o custo gerado pela cópia R (RAYMOND et al., 2001).

A utilização de cultivares transgênicos que contém genes que codificam toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt), ou plantas-Bt, também levou a estudos de avaliação da frequência de alelos de resistência nas populações de insetos que são pragas destes cultivares no campo (HUANG et al., 2012; TABASHNIK et al., 2000; 2013; ZHAO et al., 2002). Deve

ser ressaltado que as plantas Bt, sobretudo cultivares de algodão, representam uma área significativa do emprego desta tecnologia, e o monitoramento da resistência é essencial para sua sustentabilidade. O monitoramento pode fornecer informações sob a evolução destes alelos de resistência e testar a efetividade do Bt em cultivares transgênicos como efetivo controle de pragas. Os estudos de resistência de insetos às toxinas Cry1Ac já revelaram 14 alelos de caderinas com polimorfismos diversos no mesmo gene que estão associados à resistência à toxina Cry1A em três principais espécies praga *Pectinophora gossypiella*, *Heliothis virescens* e *Helicoverpa armigera* (GAHAN et al., 2001; MORIN et al., 2003; XU et al., 2005; ZHAO et al., 2010). Entretanto estudos de dinâmica ou sucessão destes alelos ainda não foram relatados, mas sugerem que os diferentes alelos podem ter capacidades adaptativas distintas. O modelo investigado neste estudo também mostrou a competição de dois alelos de resistência a *L. sphaericus* *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* em uma colônia R2362 mantida no insetário do IAM e oferece condições ideais para investigar as capacidades adaptativas diferenciais para o entendimento deste fenômeno.

## 2.11 Análises transcriptômicas em mosquitos vetores

O perfil transcriptômico pode revelar genes que estão sendo expressos sob determinadas condições e tratamentos e tecidos, e também mostrar variações de sequências nas regiões transcritas (WANG; GERSTEIN; SNYDER; 2009). Além de demonstrar os níveis de expressão, é possível também detectar eventos de *splicing* alternativo (TRAPNELL et al., 2009). Portanto análises comparativas de insetos submetidos a tratamentos com agentes inseticidas, infecção com patógenos e sob outras condições experimentais têm sido feitas para avaliar o padrão de expressão gênica diferencial e assim identificar vias e genes envolvidos nestes processos.

Um estudo prévio de *Anopheles gambiae* resistentes ao inseticida piretróide deltametrina, mostrou um grupo de cinco genes candidatos a resistência que estavam alterados sob tratamento com este piretróide, além de identificar mutações associadas ao fenótipo de resistência através da análise de SNP's (*Single nucleotide polymorphisms*) (BONIZZONI et al., 2015). Já uma linhagem de *Culex pipiens pallens* resistente a deltametrina, mostrou que entre os genes diferencialmente expressos que estavam sendo induzidos, estavam as serina proteases, enzimas detoxificadoras, lipases e proteínas *heat-shock*. Dentre os genes

reprimidos, foram encontrados genes prolylcarboxypeptidase, apolipoproteína D e algumas proteases (LV et al., 2015). A análise do transcriptoma de *Aedes aegypti* submetidos à exposição com a toxina Cry11Aa do larvicida microbiano *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* revelou alterações transcricionais importantes. A exposição com esta toxina induziu a expressão de genes relacionados a tráfico vesicular, metabolismo de lipídeos e metabolismo da membrana celular e reprimiu genes relacionados a enzimas detoxificadoras (CANTON et al., 2015).

A análise de interação de mosquitos com patógenos também tem sido explorada através de análises de transcriptômica. O perfil de expressão diferencial de duas populações de *Culex quinquefasciatus* competentes para o vírus do Oeste do Nilo revelou que alguns genes induzidos estavam relacionados à atividade catalítica, enquanto que genes envolvidos na resposta imune e de atividade transportadora estavam reprimidos (SHIN et al., 2014). Além disso, foi possível identificar três transcritos com formas de *splicing* diferentes entre essas duas populações quando analisados para esta característica (SHIN et al., 2014). Assim a análise do perfil diferencial por RNA-Seq possibilita a compreensão de transcritos e suas isoformas, proporcionando um perfil global dos genes que estão sendo expressos, modificações pós-transcricionais, sequências rearranjadas e outras informações que possibilitam a compreensão da base molecular dos processos investigados (CARDOSO-SILVA et al., 2014).

### 3 JUSTIFICATIVA

*Lysinibacillus sphaericus* é um importante larvicida empregado em programas de controle populacional de *C. quinquefasciatus*, vetor de parasitas e arboviroses no Brasil, em especial, nos programas de controle desta espécie em Recife, onde é utilizado desde 2003. Entretanto, a sua utilização por longos períodos pode favorecer a seleção de populações resistentes, tornando-se um fator que limita a eficácia desse agente para o controle destas populações. Segundo estudos prévios da equipe, os alelos de resistência *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* ocorrem em populações de *C. quinquefasciatus* da RMR. Este projeto busca avaliar a capacidade adaptativa desses alelos sob condições de laboratório e gerar o conhecimento que podem subsidiar a elaboração de estratégias de manejo para evitar a seleção destes alelos e da resistência de *C. quinquefasciatus* a *L. sphaericus* em campo.

#### 4 PERGUNTA CONDUTORA

Qual dos alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* de *Culex quinquefasciatus* representa o maior risco de seleção de resistência ao *Lysinibacillus sphaericus*?

## 5 HIPÓTESE

Indivíduos homozigotos para os alelos  $cqm1_{REC}$  e  $cqm1_{REC-2}$  de *Culex quinquefasciatus* possuem características diferenciais que podem conferir uma melhor capacidade adaptativa. A substituição do alelo  $cqm1_{REC}$  pelo  $cqm1_{REC-2}$  na colônia de laboratório sugere que o último teria uma vantagem adaptativa.

## 6 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de competição dos alelos de resistência *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* de *C. quinquefasciatus* a fim de gerar conhecimentos para subsidiar estratégias de manejo de resistência ao *Lysinibacillus sphaericus*.

### 6.1 Objetivos específicos

- a) Determinar e quantificar o fenótipo de resistência conferido por cada alelo em larvas homozigotas;
- b) Avaliar a competição dos alelos a partir de uma colônia inicialmente heterozigota, mantida por 20 gerações sob pressão de seleção e redução populacional;
- c) Comparar o desenvolvimento de larvas até a fase adulta de indivíduos homozigotos para cada alelo, submetidas a condição de estresse;
- d) Determinar o perfil de expressão diferencial de indivíduos de cada colônia resistente em relação à suscetível e o perfil das colônias resistentes entre si.

## 7 METODOLOGIA

Neste trabalho foram utilizadas três colônias mantidas em laboratório, denominadas S, REC e REC-2. A colônia S é composta por indivíduos suscetíveis a *L. sphaericus*, estabelecida a partir de ovos coletados em criadouros de áreas urbanas de Recife e mantidas no insetário por mais de 10 anos. As colônias REC e REC-2 são formadas por indivíduos homozigotos para os alelos *cqmI<sub>REC</sub>* e *cqmI<sub>REC-2</sub>*, respectivamente, que possuem um alto nível de resistência (CHALEGRE et al., 2015) a cepa 2362 de *L. sphaericus*. Estas subcolônias foram estabelecidas, segundo Chalegre et al. (2015), a partir de indivíduos homozigotos para cada alelo coletados a partir da colônia resistente R2362, que foi previamente selecionada em laboratório com o *L. sphaericus* 2362 (PEI et al., 2002). Todas as colônias foram mantidas no insetário sob as seguintes condições: temperatura de  $26 \pm 1$  °C, umidade relativa (UR) de 70% e fotoperíodo 14:10 h (dia/noite). Os adultos foram alimentados em solução de sacarose (10%) *ad libidum* e uma vez por semana foi oferecido um repasto de sangue de coelho desfibrinado para as fêmeas. As larvas foram mantidas em água de torneira e alimentadas com ração para gatos (Friskies®).

### 7.1 Bioensaios dose-resposta

As larvas da colônia REC e REC-2 apresentam um nível de alta resistência à toxina Bin o qual foi avaliado através bioensaios de doses diagnósticas (CHALEGRE et al., 2015). Neste estudo a análise da resistência foi baseada a partir da determinação da concentração letal (CL) de *L. sphaericus* 2362 para 50% e 90% das larvas para avaliar, de forma precisa, o fenótipo de resistência conferido por cada alelo a partir do padrão de dose-resposta. O protocolo foi adaptado a partir do método padrão da ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (1985) e consistiu em submeter grupos de larvas a seis concentrações obtidas a partir da diluição de uma suspensão aquosa estoque (5 g/L) preparada com uma biomassa úmida contendo cristais e esporos de *L. sphaericus* 2362 (lote 0448-09). Amostras de 20 larvas do 4º instar jovens foram colocadas em recipientes contendo 50 mL de água e submetidas a uma concentração testada, além de um grupo controle não tratado. Cada grupo (tratado e não tratado) foi testado em triplicata e a mortalidade foi registrada após 48h de exposição. Cada bioensaio foi repetido no mínimo três vezes. Os valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> de *L. sphaericus* para

as larvas foram estabelecidos através da análise de Próbites utilizando o programa SPSS v.16.0 para Windows.

## 7.2 PCR multiplex para detecção dos alelos *cqm1*<sub>REC</sub> e *cqm1*<sub>REC-2</sub>.

A identificação dos genótipos das larvas em relação aos alelos, *cqm1*<sub>REC</sub> e *cqm1*<sub>REC-2</sub>, foi feita a partir de um método de PCR multiplex, desenvolvido por Chalegre et al. (2015). Neste, são utilizados quatro primers (Quadro 2), que permitem à amplificação de fragmentos controle e diagnóstico, que são produtos gênicos específicos a partir dos alelos em questão (Quadro 3). Para a extração do DNA genômico, amostras de larvas individuais do 4º instar foram homogeneizadas em DNAzol® (Invitrogen), e processadas de acordo com instruções do fabricante. Em seguida as amostras de DNA foram precipitadas com etanol e ressuspendidas em tampão Tris-EDTA, segundo Chalegre et al. (2009). Após a extração, o DNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000c® (Thermoscientific).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 mM de cada *primer* específico (Quadro 2), 2U da enzima Platinum® Taq DNA Polymerase® (Invitrogen) em tampão fornecido pelo fabricante, além do DNA molde (12,5 ng) extraído individualmente das larvas. Cada amostra foi amplificada em um termociclador MASTERCYCLER® NEXUS X2 SERIES (Eppendorf) programado para uma etapa de desnaturação a 94 °C por 3 min, seguido de 36 ciclos a 94 °C por 60 seg, 65°C por 50 seg e 72 °C por 60 seg, e uma etapa final de 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram separados em eletroforese em gel de agarose (2,5%), corados com brometo de etídeo e visualizados em um transluminador de luz ultravioleta (UV).

**Quadro 2**– Sequência dos *primers* utilizados para a detecção dos alelos *cqm1*(S), *cqm1*<sub>REC</sub> (REC) e *cqm1*<sub>REC-2</sub> (REC-2) de *Culex quinquefasciatus* a partir de reações em cadeia da polimerase.

Primer	Sequência (5' - 3')
1. FwREC-2	AGCATAGTCCGGATGAACTCGGATCC
2. RvCqm1	CCGGGTTTCAGTACCAACACCAACTCATA
3. FconREC-2	ACCGTCTTGTGCACGTACTCACCCTCT
4. RconREC-2	GTTGATCAGGTCATGACGTTGCTGCATA

Fonte: Adaptado de Chalegre et al. (2015)

**Quadro 3**– Combinações de *primers* descritos no quadro 2 e respectivos *amplicons* esperados para a detecção dos alelos *cqm1* (S), *cqm1<sub>REC</sub>* (REC) e *cqm1<sub>REC-2</sub>* (REC-2) de *Culex quinquefasciatus* a partir de reações em cadeia da polimerase.

Primer	Associação	Amplicon (pb)		
		<i>cqm1</i>	<i>cqm1<sub>REC</sub></i>	<i>cqm1<sub>REC-2</sub></i>
1. FwREC-2	1+4	—	—	173
2. RvCqm1	1+2	—	—	—
3. FconREC-2	3+2	273	254	—
4. RconREC-2	3+4	327	308	327

Fonte: Adaptado de Chalegre et al. (2015)

#### 7.4 Estabelecimento e manutenção da subcolônia REC/REC-2

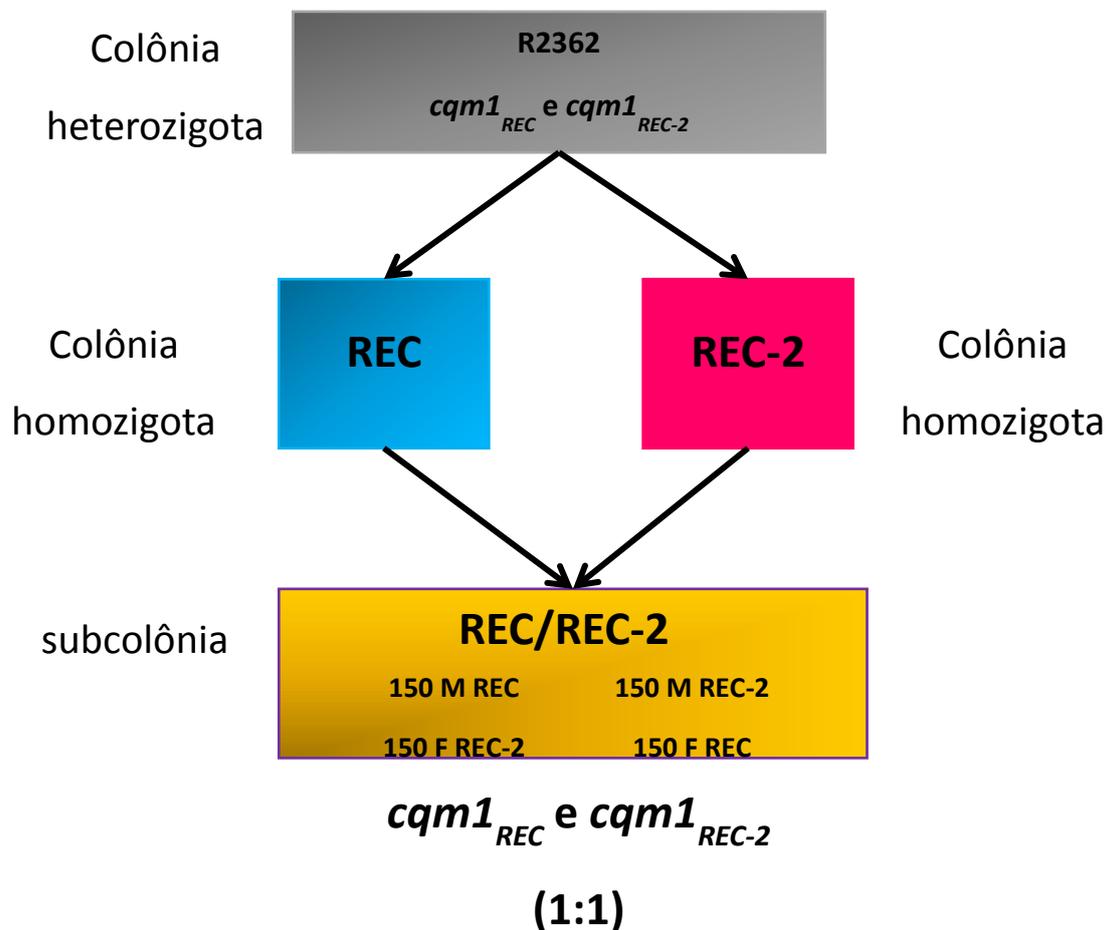
Para avaliar a competição entre indivíduos portadores de alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* foi obtida uma subcolônia parental heterozigota (REC/REC-2), composta inicialmente por indivíduos heterozigotos, com uma cópia de cada alelo. Os genótipos e frequências dos alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* foram analisadas em amostras de 100 larvas, ao longo de vinte gerações subsequentes através do método de PCR multiplex, descrito no item 7.5.

Para estabelecer a subcolônia REC/REC-2 com uma composição dos alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* em igual frequência (1:1), foi realizado um acasalamento entre dois grupos separados: o primeiro foi composto por 150 fêmeas da colônia REC e 150 machos da REC-2; o segundo por 150 fêmeas da colônia REC-2 e 150 machos da REC, totalizando 600 adultos. Este cruzamento visou obter uma geração filial F<sub>1</sub> composta por 100% de indivíduos heterozigotos (Figura 10). As larvas das gerações filiais da colônia REC/REC-2 foram mantidas sob condições controladas, conforme descrito abaixo.

A manutenção da colônia seguiu um protocolo específico a fim de padronizar o tamanho/densidade populacional da colônia, disponibilidade de alimento e tratamento com *L. sphaericus* 2362. Cada geração foi composta por indivíduos oriundos de 32 jangadas obtidas a partir da primeira e única oviposição das fêmeas de cada geração obtida. Estas foram distribuídas em oito recipientes de criação (4 jangadas/ recipiente) contendo 2 L de água da torneira e 1600 mg de ração para gatos Friskies®. A alimentação foi administrada da seguinte

forma: 0.2, 0.6 e 0.8 g nos dias 0, 4 e 8, respectivamente. A cada geração todas as larvas do 4º instar foram expostas a *L. sphaericus* cepa 2362 (Vectolex® WG ABTS 1743, Lote: 267-871-PG) com uma concentração (0,05 g/L), determinada previamente, para causar cerca de 30-40% de mortalidade após 48h de exposição. Após este período, as larvas sobreviventes foram mantidas sob condições padrão, até atingir a fase adulta para constituir a nova geração. Cada geração proveniente desta subcolônia foi composta por, pelo menos, 2000 adultos que foram alimentados com sacarose (10%) *ad libidum*. A cada geração também foi oferecido um único repasto sanguíneo para as fêmeas, cerca de 15 dias após a emergência dos adultos. Cinco dias após o repasto foi posto um recipiente para a oviposição na gaiola de contenção dos adultos para coleta de ovos e dar origem à próxima geração.

**Figura 10** – Representação esquemática do estabelecimento da subcolônia REC/REC-2 de *Culex quinquefasciatus* resistente a *Lysinibacillus sphaericus* 2362.



Fonte: Dados da autora

Durante a manutenção da colônia foi induzido um efeito de “*bottleneck*”, provocado intencionalmente para causar uma redução populacional significativa na geração F<sub>11</sub> e avaliar seu efeito na frequência dos alelos nos indivíduos das gerações subsequentes. Para tal, larvas do 4º instar desta geração foram submetidas a uma exposição com *L. sphaericus* com uma dose de Vectolex® WG ABTS (0,1 g/L) a fim de provocar uma mortalidade de cerca de 80%. A partir dos sobreviventes obtidos foi empregado um número reduzido de apenas 240 adultos, composto por 160 fêmeas e 80 machos para compor a geração parental F<sub>11</sub>. Esta redução foi equivalente a cerca de 10% do número médio de adultos empregados para formar as gerações parentais precedentes. A partir da geração F<sub>12</sub> a colônia voltou a ser mantida sob tratamento com *L. sphaericus* com a concentração padrão (0,05g/L de Vectolex® WG ABTS), até o final da avaliação na F<sub>20</sub>.

### **7.5 Ensaios de competição entre larvas homozigotas *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>***

Este experimento teve como objetivo avaliar a taxa de obtenção de adultos a partir de grupos de indivíduos homozigotos para cada alelo das colônias REC e REC-2 em igual proporção que foram submetidos a efeito de estresse (alta densidade e baixa disponibilidade de alimento), sob condições de insetário. Ao contrário do ensaio anterior, que foi uma avaliação de longa duração, estes ensaios visaram comparar a taxa de sobrevivência de indivíduos homozigotos para cada alelo durante um período de desenvolvimento pré-imaginal, ou seja, de larvas do 1º instar até a fase adulta. As condições do ensaio padrão, bem como àqueles referentes aos ensaios sob estresse estão descritas a seguir. Para realizar os ensaios foram utilizadas quatro jangadas (1 jangada/recipiente de criação) e deste grupo foram selecionadas as larvas do 1º instar com idade de até 20h após a eclosão para compor o experimento. O grupo controle consistiu de 50 larvas do 1º instar, em um recipiente de 200 ml contendo 100 ml de água e 100 mg de alimento padrão (ração para gatos Friskies®) administrada em duas doses de 50 mg nos dias 0 e 5. O registro de adultos obtidos foi realizado em até 20 dias após o início dos ensaios. Cada grupo experimental foi executado em triplicata e cada ensaio foi repetido no mínimo três vezes. Diariamente os adultos obtidos foram removidos, registrados e armazenados a -80°C. Os adultos foram submetidos à determinação de genótipo para os alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* pela PCR multiplex, descrita previamente no item 7.5. Foram realizados os experimentos para avaliar o efeito de dois

parâmetros sobre a taxa de sobreviventes homozigotos para os alelos *cqml*<sub>REC</sub> e *cqml*<sub>REC-2</sub>, descritos abaixo.

**a) Densidade.** Foram avaliados dois grupos experimentais com densidades de 100 e 200 larvas de 1º instar/recipiente comparados com o grupo padrão com 50 larvas. As demais condições de manutenção padrão descritas acima foram mantidas;

**b) Disponibilidade de alimento.** Foram formados grupos experimentais, cujas quantidades de alimento foram reduzidas a 50 e 75 mg comparados com o grupo padrão de 100 mg de ração para gatos/recipiente, administradas de acordo com as condições padrões do ensaio. Foram mantidas as condições padrão.

## 7.6 Avaliação de enzimas detoxificadoras

O envolvimento de algumas famílias de enzimas detoxificadoras de xenobióticos na resistência de insetos a inseticidas químicos é bem documentada na literatura, ao passo que, estudos similares relativos às toxinas bacterianas com ação no intestino são escassos. Por esta razão, o envolvimento destas enzimas foi conduzido neste modelo utilizando indivíduos de duas colônias que possuem um alto nível de resistência a uma toxina inseticida de bactérias com ação oral, cujos genes e mecanismos de resistência já foram bem caracterizados. Foram investigadas três classes de enzimas: esterases ( $\alpha$ -esterase,  $\beta$ -esterase), glutathione-S-transferases (GST) e monooxidases de função mista (MFO) através de uma análise do perfil diferencial destas classes de enzimas, realizadas a partir dos dados do transcriptoma do intestino das larvas das colônias resistentes REC e REC 2. A metodologia do ensaio de RNASeq para avaliação do transcriptoma está descrita no próximo item.

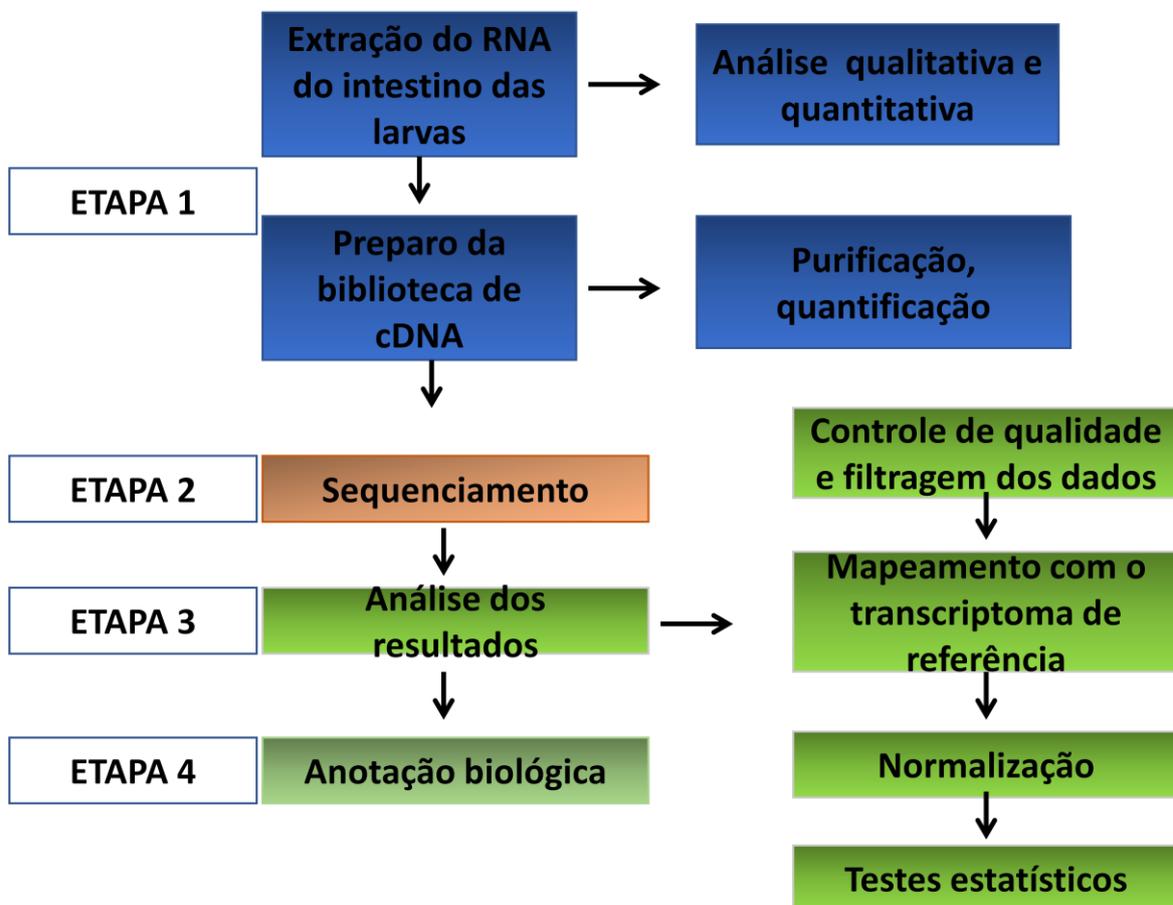
## 7.7 Ensaio de RNASeq para avaliação de transcriptoma

Esta abordagem visou obter e comparar dados do transcriptoma do intestino de larvas das diferentes colônias, utilizando o sequenciador MiSeq da plataforma Illumina ([www.illumina.com/systems/sequencing](http://www.illumina.com/systems/sequencing)). As análises foram feitas a partir de *pools* de 20 intestinos dissecados de larvas do 4º instar das colônias (S, REC e REC-2) mantidas segundo

descrito na seção 7.1. O RNA total foi extraído (1- 4 µg de RNA por replicata biológica), em triplicata, com kit RNeasy® (Qiagen).

As principais etapas do sequenciamento foram: obtenção de amostras de RNA total e quantificação da concentração das amostras no Qubit (Thermo fisher Scientific); avaliação da integridade dos fragmentos por eletroforese; construção, purificação e quantificação de bibliotecas de cDNA, sequenciamento propriamente dito; e análise bioinformática com anotação funcional baseado em bancos de dados disponíveis (Figura 11). As bibliotecas *paired-end* foram preparadas com o kit TruSeq RNAm™ (Illumina), e as etapas de purificação foram realizadas com o kit AMPURE XP™ (Beckman Coulter). O sequenciamento foi realizado com o kit MiSeq Reagent Kit v3® com 150 ciclos (Illumina) no equipamento MiSeq Sequencer® (Illumina) disponível no NPT/IAM. As análises dos perfis de expressão gênica diferencial e o mapeamento de *reads* de interesse foram conduzidos em colaboração com Dr. Antônio Mauro Rezende e Dr. Gabriel da Luz Wallau.

**Figura 11** – Representação esquemática das etapas da análise do transcriptoma do intestino das larvas das colônias de *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Adaptado de JAIN (2011).

### 7.7.1 Análise de dados

As análises das bibliotecas de cDNA das colônias foram feitas a partir das seguintes comparações REC x S, REC-2 x S e REC x REC-2. O primeiro passo das análises de bioinformática, foi avaliar a qualidade das sequências obtidas com a ferramenta FastQC versão 0.11.5 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Esse programa oferece um conjunto de análises para avaliar os parâmetros em cada biblioteca, tais como: qualidade das bases, quantidade de bases não identificadas, comprimento médio das sequências, identificação de sequências duplicadas, conteúdo GC.

Em seguida foi usada a ferramenta Trimmomatic versão 0.36 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) para filtrar e retirar as bases de baixa qualidade (Phred < 30) e com tamanho menor que 50 pb, além de filtrar os adaptadores utilizados no sequenciamento. Em seguida, as leituras filtradas para cada amostra foram mapeadas através da ferramenta STAR aligner versão 2.5.3 (DOBIN et al., 2013) no genoma de *Culex quinquefasciatus*, (cepa de Johannesburg CpipJ2) disponível do banco de dados VectorBase (<https://www.vectorbase.org/>).

O programa STAR foi executado com os parâmetros padrão com exceção do “quantMode”, gerando um arquivo de contagem de leituras por gene. Apenas os genes com uma contagem mínima de cinco *hits* (presenças) em cada replicata biológica foram utilizados.

O pacote R DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) foi utilizado para realizar a análise da expressão diferencial dos genes. Os genes com valor absoluto de  $(\text{Log}^2)$  FC igual ou maior que um (quantificação da expressão de um gene entre duas situações diferentes utilizando o logaritmo de base 2 para fornecer uma simetria entre os dados), e com *p*-valor corrigido menor que 0.05 foram selecionados para a análise funcional de enriquecimento usando os pacotes de análise STRINGdb (FRANCESCHINI et al., 2013) e o Pathviews implementados no ambiente de programação R (LUO; BROUWER, 2013). O STRINGdb foi utilizado para atribuir a Ontologia do gene (GO) (<http://www.geneontology.org/>), e os termos das vias da base de dados da “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”–KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). O Pathview foi utilizado para mapear os genes diferencialmente expressos (DEGs) e suas medidas de expressão diferencial para as vias KEGG enriquecidas. Foram construídas redes de interação de proteínas a partir da lista de DEGs e foram analisadas através do programa Cytoscape versão 3.5.1 ([www.cytoscape.org](http://www.cytoscape.org))

juntamente com o plug-in AutoAnnotate, versão 1.2 ([www.baderlab.org/Software/AutoAnotate](http://www.baderlab.org/Software/AutoAnotate)). Aqui, as redes foram agrupadas em *clusters* usando o algoritmo Community Cluster (GLay). A denominação de cada *cluster* foi atribuída com base nas três palavras mais frequentes obtidas a partir da anotação obtida no Vectorbase dos membros de proteínas de cada cluster.

## 8 RESULTADOS

Os resultados referentes ao fenótipo de resistência e evolução da frequência dos alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* estão descritos nos tópicos 8.1 e 8.2. A competição entre esses alelos nas colônias resistentes está descrita no tópico 8.3 e o perfil de expressão gênica das colônias susceptível, REC e REC-2 estão descritos nos tópicos 8.4 e 8.5.

### 8.1 Resistência das colônias REC e REC-2 à toxina Bin

Para quantificar a resistência dos indivíduos homozigotos para cada alelo de resistência a *L. sphaericus* 2362 foram realizados bioensaios dose-resposta, a partir de uma curva dose-mortalidade obtida a partir de concentrações de *L. sphaericus*, para as colônias resistentes e a colônia susceptível (S), que foi utilizada como referência. Os resultados mostram que o *L. sphaericus* 2362 apresentou valores de concentrações letais (CL) para larvas da colônia susceptível (controle) de CL<sub>50</sub> de 0,004 mg/L e CL<sub>90</sub> de 0,036 mg/L, com alta atividade para estas larvas (Tabela 2). Por outro lado, a avaliação das colônias REC e REC-2 confirmam a resistência ao *L. sphaericus* 2362, visto que a CL<sub>50</sub> foi cerca de 13,8 mg/L. Os resultados obtidos a partir da CL<sub>50</sub> indicam que a razão de resistência (RR) das colônias para *L. sphaericus*, é de cerca de 3.500 vezes, e o nível de resistência conferido pelos dois alelos em homozigose é similar. O valor de CL<sub>90</sub> não pode ser determinado, pois não foi encontrada uma concentração, dentre as testadas, que atingisse 90% de mortalidade. A maior mortalidade foi de 62%, obtida com a concentração de 30 mg/L, e nas maiores concentrações testadas, a mortalidade foi inferior (Tabela 3). Portanto, não foi observado um padrão de mortalidade dose crescente esperado e, ao contrário, a mortalidade apresentou um padrão inversamente proporcional à dose, o que será discutido posteriormente.

**Tabela 2** – Toxicidade do *Lysinibacillus sphaericus* cepa 2362 (biomassa úmida amostra 0448/09) para larvas de *Culex quinquefasciatus* do 4º instar das colônias S, REC e REC-2 após 48h de exposição.

Colônia	Nº larvas	CL <sub>50</sub> <sup>a</sup> (IC 95)	RR	CL <sub>90</sub> <sup>a</sup> (IC 95%)	RR
S	1800	0,004 (0,003-0,005)	1	0,036 (0,024-0,065)	1
REC	1800	13,7 (7,9-44,9)	> 3475	> 30 <sup>b</sup>	b
REC-2	1440	13,9 (8,4-33, 8)	> 3475	> 30 <sup>b</sup>	b

Fonte: a autora.

<sup>a</sup> Concentração Letal para 50% a 90% das larvas em mg/L, <sup>b</sup> Não foi possível determinar.

**Tabela 3** – Mortalidade de larvas do 4º instar de *Culex quinquefasciatus* das colônias REC e REC-2 a partir das maiores concentrações de *L. sphaericus* 2362 testadas e desvio padrão (DP).

Concentração (mg/L)	Mortalidade (%) <sup>a</sup>			
	REC		REC-2	
	Média	DP	Média	DP
30	61,7	4,04	61,6	6,80
35	16,6	9,07	35,0	3,00
40	17,6	11,7	16,6	9,07
45	7,7	10,8	15,0	8,00
50	6,0	5,30	11,7	12,6

Fonte: a autora

<sup>a</sup> média e desvio padrão (dp) obtidos a partir de três replicatas.

## 8.2 Evolução da frequência dos alelos da subcolônia REC/REC-2

A subcolônia REC/REC-2, originada do cruzamento entre indivíduos homocigotos para os alelos *cqmI<sub>REC</sub>* e *cqmI<sub>REC-2</sub>* em igual proporção foi mantida em condições de insetário e sob pressão de seleção com *L. sphaericus* cepa 2362. A evolução da frequência destes alelos foi avaliada no decorrer de 20 gerações como será apresentado a seguir. Em relação à condição de exposição desta colônia ao *L. sphaericus* 2362, pode observar que nas gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> a exposição ao *L. sphaericus* provocou uma mortalidade abaixo do esperado (<40%), pois as concentrações do produto estavam em fase de ajuste. Em seguida, todas as gerações da colônia foram expostas ao *L. sphaericus* 2362 sendo obtida uma mortalidade média de 44% a cada geração (Tabela 4).

Em relação ao tamanho populacional, outra condição testada, observa-se que cada geração parental foi formada por um número médio de 2.400 adultos, exceto as larvas da geração F<sub>11</sub>, pois, foram submetidas a uma dose maior de *L. sphaericus* 2362 a fim de gerar um efeito “*bottleneck*” (redução populacional). As larvas desta geração sofreram uma mortalidade de 75% e apenas 240 pupas sobreviventes desta exposição foram selecionadas para dar origem a F<sub>12</sub>. Esta amostra (n=240) representou cerca de 10% da média de adultos obtidos para as demais gerações. Observou-se que os adultos da geração F<sub>12</sub> tinham menor tamanho do que o observado nas gerações anteriores, embora esta diferença tenha sido feita apenas por inspeção visual e não foi quantificada.

Estes adultos da F<sub>12</sub> sofreram um segundo efeito de “*bottleneck*”, mas este ocorreu de forma espontânea. Três semanas após a muda imaginal foi feito o 1º repasto sanguíneo e nos dias subsequentes houve uma mortalidade drástica na colônia, sendo o número inicial de 2600 adultos reduzido para apenas 21 indivíduos (20 fêmeas e um macho), uma perda de 98% de indivíduos. Não foi possível detectar nenhum fator abiótico (temperatura, umidade, fotoperíodo) ou biótico (falta de alimento, predação, infecção aparente), que possa ter sido responsável pelo segundo “*bottleneck*” observado na geração parental F<sub>12</sub>. Com o objetivo de manter a subcolônia e garantir a produção da progênie F<sub>13</sub> foram oferecidos múltiplos repastos sanguíneos às 20 fêmeas sobreviventes da geração parental F<sub>12</sub>. Foram então obtidas 23 jangadas, a partir das sucessivas tentativas de alimentação, e estas foram mantidas sob as condições de criação padrão descritas no item 7.4. As larvas do 4º instar da geração F<sub>13</sub> não foram submetidas à exposição com *L. sphaericus*, devido a situação vulnerável da subcolônia e a partir destas foram obtidos 1439 adultos que formaram a geração parental F<sub>13</sub>.

**Tabela 4** – Mortalidade de larvas do 4º instar da subcolônia REC/REC-2 após tratamento com *L. sphaericus* por 48h e o nº de adultos sobreviventes que formaram a próxima geração parental.

Geração	Mortalidade (%) <sup>a</sup>	Nº de Adultos
<b>F1</b>	10	3000
<b>F2</b>	25	2500
<b>F3</b>	40	2300
<b>F4</b>	45	2100
<b>F5</b>	50	1900
<b>F6</b>	50	2100
<b>F7</b>	55	2300
<b>F8</b>	40	2700
<b>F9</b>	45	2500
<b>F10</b>	40	2800
<b>F11<sup>b</sup></b>	75	240
<b>F12<sup>c</sup></b>	45	2600 (21) <sup>c</sup>
<b>F13<sup>d</sup></b>	-	1439
<b>F14</b>	40	2800
<b>F15</b>	55	2500
<b>F16</b>	50	2650
<b>F17</b>	45	2950
<b>F18</b>	55	2400
<b>F19</b>	40	2700
<b>F20</b>	35	2900
<b>Média</b>	<b>44</b>	<b>2240</b>

Fonte: a autora

<sup>a</sup> Mortalidade de larvas do 4º instar após 48h de exposição a *L. sphaericus* 2362.

<sup>b</sup> Efeito *bottleneck* realizado nesta geração composta por apenas 240 adultos.

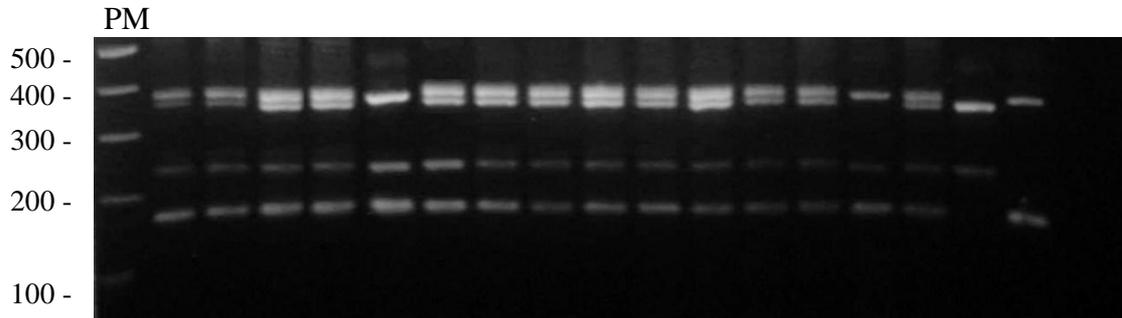
<sup>c</sup> Alta mortalidade espontânea de adultos antes do repasto sanguíneo, 21 remanescentes foram os progenitores.

<sup>d</sup> Esta geração não foi exposta a *L. sphaericus* devido ao efeito gerado na F<sub>12</sub>.

A partir do estabelecimento e manutenção da subcolônia segundo as condições descritas acima, a evolução da frequência dos alelos e dos genótipos dos indivíduos foi avaliada ao longo das 20 gerações. Na primeira geração todos os indivíduos apresentaram genótipo heterozigoto REC/REC-2, o que foi esperado em razão do desenho experimental do cruzamento da geração parental o qual visou produzir uma prole 100% heterozigota para que a frequência inicial dos alelos fosse equivalente (Figura 12). A partir da F<sub>6</sub>, o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* começou a exibir uma maior frequência (0.55) em relação ao alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* (0.45) que manteve-se superior a 0.6 até a F<sub>20</sub> (Figura 13 A). Neste gráfico também pode-se observar o número médio de adultos de cada geração > 2000, exceto em dois momentos: F<sub>11</sub> (n= 240) e F<sub>12</sub> (n=21), conforme descrito anteriormente.

No decorrer das gerações, os genótipos das larvas desta subcolônia também foram avaliados (Figura 13 B). Até a geração F<sub>6</sub> o genótipo heterozigoto *cqm1<sub>REC</sub>/cqm1<sub>REC-2</sub>* foi predominante com frequências relativamente baixas de homozigotos de cada alelo, mas progressivas do genótipo *cqm1<sub>REC</sub>/cqm1<sub>REC</sub>*. A partir da geração F<sub>8</sub> este genótipo passou a ser mais frequente, sendo igual ou superior a 0.5 nas demais gerações analisadas, o que ocorreu em paralelo à redução do genótipo heterozigoto. Já o genótipo *cqm1<sub>REC-2</sub>/cqm1<sub>REC-2</sub>* não mostrou evolução e manteve uma frequência média de 0.16. Após dois eventos de *bottleneck* que ocorreram na subcolônia, nota-se uma discreta redução no genótipo *cqm1<sub>REC-2</sub>/cqm1<sub>REC-2</sub>* em gerações subsequentes e um consequente aumento do *cqm1<sub>REC</sub>/cqm1<sub>REC</sub>*. Em seguida nas gerações F<sub>18</sub> a F<sub>20</sub> houve uma redução do genótipo predominante *cqm1<sub>REC</sub>/cqm1<sub>REC</sub>* e aumento dos demais genótipos *cqm1<sub>REC</sub>/cqm1<sub>REC-2</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>/cqm1<sub>REC-2</sub>*. Uma análise geral das frequências alélicas e genotípicas ao longo do desenvolvimento da colônia, que começou com igual frequência dos alelos, demonstrou que testadas o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* se estabeleceu com mais sucesso nos indivíduos em comparação com o alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* sob as condições testadas. Nesta análise é importante ressaltar que o genótipo de 14 dos 21 indivíduos sobreviventes ao 2º efeito *bottleneck* foram analisados (Figura 13) e sete deles não foram determinados. Dentre aqueles analisados, oito apresentaram o genótipo homozigoto *cqm1<sub>REC</sub>/cqm1<sub>REC</sub>* e seis o genótipo heterozigoto *cqm1<sub>REC</sub>/cqm1<sub>REC-2</sub>* confirmando a manutenção e sobrevivência de indivíduos, portanto o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* sob esta condição.

**Figura 12** - Separação eletroforética de fragmentos amplificados a partir do gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus* da subcolônia REC/REC-2 por PCR.

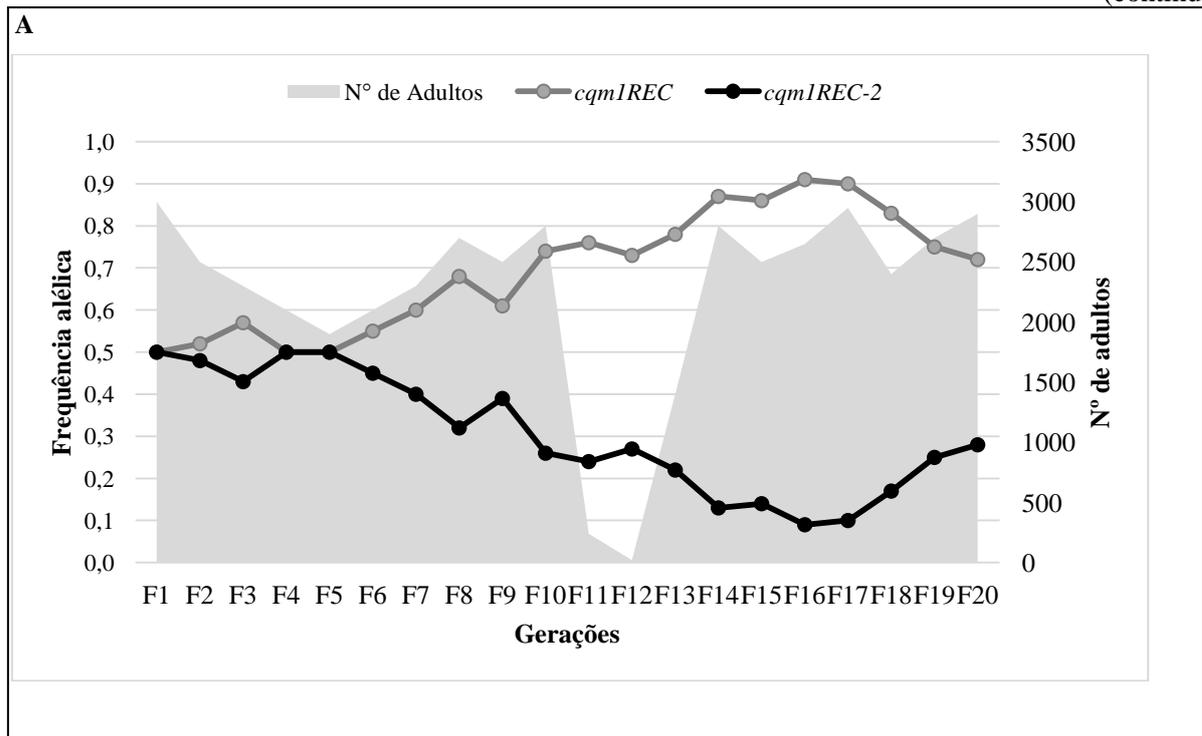


Fonte: a autora

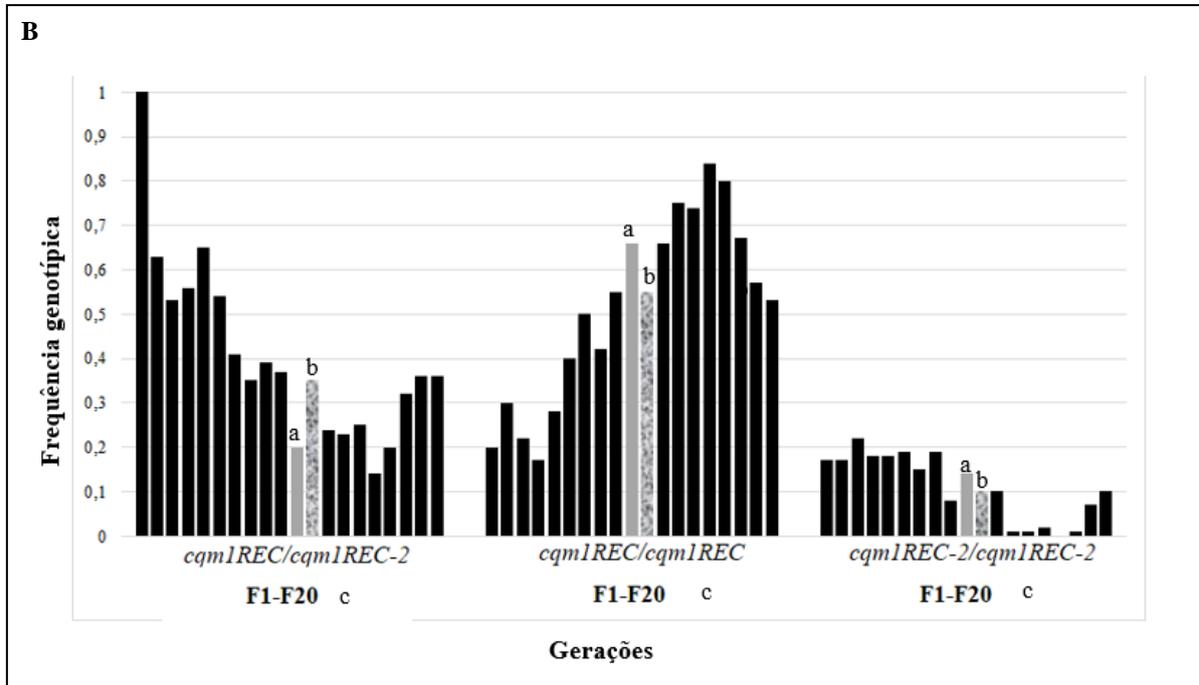
Legenda: Indivíduos heterozigotos *cqm1*<sub>REC</sub>/*cqm1*<sub>REC-2</sub> da geração F<sub>1</sub>, controle para o alelo *cqm1*<sub>REC</sub> (C1), controle para o alelo *cqm1*<sub>REC-2</sub> (C2), controle negativo da reação (C-). Peso molecular em pares de base à esquerda (PM).

**Figura 13** - Evolução dos alelos *cqm1*<sub>REC</sub> e *cqm1*<sub>REC-2</sub> em larvas de *Culex quinquefasciatus* (n=100 larvas/geração) da subcolônia REC/REC-2, mantida sob condição de laboratório e tratamento com o biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus* durante vinte gerações.

(continua)



**Figura 13** - Evolução dos alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* em larvas de *Culex quinquefasciatus* (n=100 larvas/geração) da subcolônia REC/REC-2 inicialmente heterozigota para cópia, mantida sob condição de laboratório e tratamento com o biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus* durante vinte gerações. (conclusão)



Fonte: a autora

Nota:

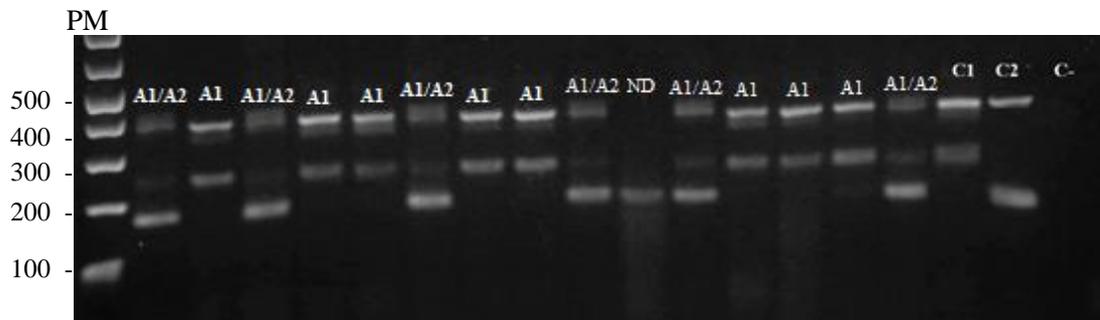
A. Frequência alélica e número de adultos por geração. B. Frequência genotípica.

<sup>a</sup> efeito de redução populacional intencional na F<sub>11</sub> (2400 adultos-240)

<sup>b</sup> efeito de redução populacional espontâneo na F<sub>12</sub> (2600 adultos-21)

<sup>c</sup> Cada coluna representa a frequência genotípica de uma geração (F1-F20)

**Figura 14** - Separação eletroforética de fragmentos amplificados a partir do gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus* da subcolônia REC/REC-2 por PCR de indivíduos sobreviventes após o segundo efeito *bottleneck* da geração F<sub>12</sub>.



Fonte: a autora

Legenda: Indivíduos homozigotos para o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* (A1), indivíduos heterozigotos *cqm1<sub>REC</sub>/cqm1<sub>REC-2</sub>* (A1/A2), não determinados (ND), controle para o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* (C1), controle para o alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* (C2), controle negativo da reação (C-). Peso molecular em pares de base à esquerda (PM).

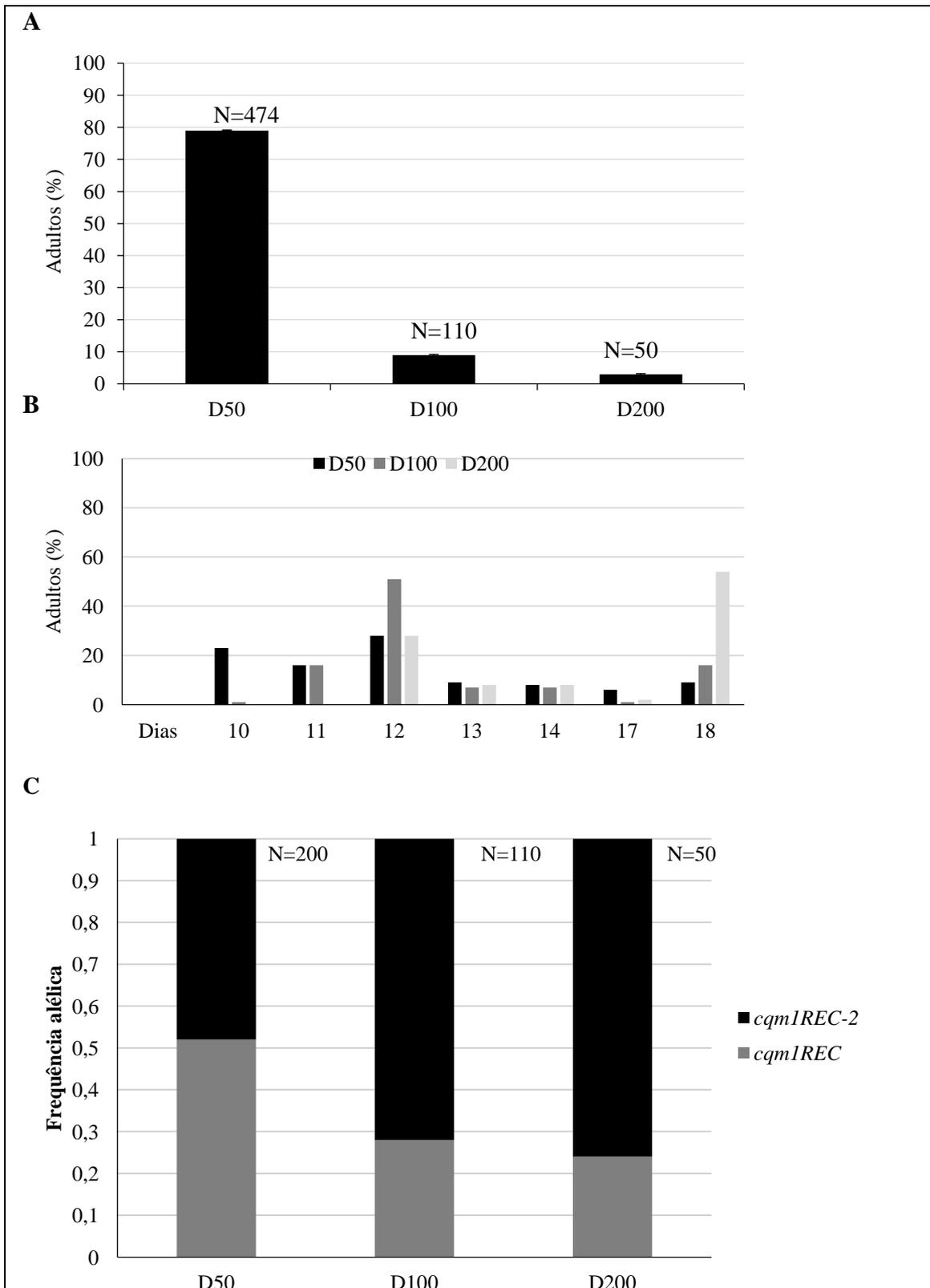
### 8.3 Competição de larvas homozigotas (*cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>*) sob estresse

O objetivo destes ensaios foi observar a capacidade de desenvolvimento pré-imaginal de indivíduos homozigotos para cada alelo quando submetidos a condições de estresse de alta densidade e baixa disponibilidade de alimento, em ensaios de curta duração. Para tal, grupos de larvas homozigotas para cada alelo foram mantidas em igual proporção em grupos experimentais, sob diferentes condições, para avaliar a taxa de sobrevivência até a fase adulta.

#### 8.3.1 Alta densidade

Neste ensaio o genótipo de adultos obtidos a partir de grupos de larvas do 1º instar homozigotas para cada alelo em igual proporção, mantidas nas densidades de 50 (D50), 100 (D100) e 200 (D200) por recipiente foi determinado. Foram realizadas quatro repetições dos ensaios. No grupo D50, estabelecido como controle, foi obtido um percentual de 79% de adultos (n=474/600) e a frequência de genótipos avaliados foi similar no grupo de adultos analisados (n=200), sendo 0.52 e 0.48 de homozigotos para os alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>*, respectivamente. Nos grupos sob estresse de alta densidade D100 e D200 foram obtidos apenas 9% (n= 110/1200) e 2 % (n= 50/2400) de adultos respectivamente (Figura 15 A) demonstrando o efeito negativo desta condição sobre o desenvolvimento das larvas até a atingir a fase adulta. Observou-se ainda que a cinética de obtenção de adultos ao longo dos ensaios foi distinta nos grupos (Figura 15 B). No grupo controle D50 e D100 a maior parte dos indivíduos (70%) foram obtidos até 12 dias, enquanto que no grupo D200 apenas 28% dos adultos foram obtidos neste período. A maior parte foi obtida após 18 dias. Os resultados obtidos mostram que a alta densidade exerceu um efeito significativo nos genótipos dos adultos sob esta condição. Observou-se que cerca de 72 e 76% dos adultos eram homozigotos para o alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* e apenas 24 e 28% eram homozigotos para o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* (Figura 15 C). Os resultados mostram que o desenvolvimento pré-imaginal de indivíduos homozigotos para alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* foi superior sob a alta densidade.

**Figura 15** - Avaliação dos efeitos da densidade em *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: a autora

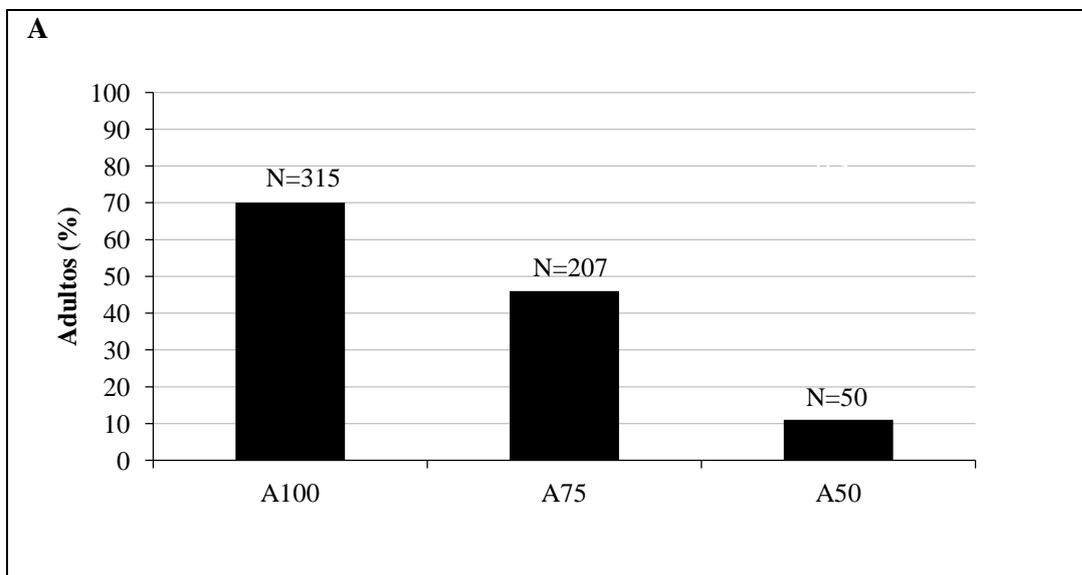
Legenda: A. adultos obtidos no ensaio de desenvolvimento pré-imaginal sob condições de densidade padrão (D50) e alta densidade (D100 e D200). B. Cinética de obtenção de adultos submetidos ao efeito de estresse de alta densidade ao longo de 18 dias. C. Frequência alélica obtida na avaliação da densidade de indivíduos homocigotos para os alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>*.

### 8.3.2 Baixa disponibilidade de alimento

A sobrevivência de indivíduos homozigotos para cada alelo até a fase adulta, também foi avaliada frente à diminuição da disponibilidade de alimento. Foram realizadas três repetições dos ensaios. No grupo alimentado com 100 mg (A100), estabelecido como controle do experimento, o percentual de adultos obtidos foi de 70% (n=315/450), enquanto que os alimentados com 75 mg (A75) e 50 mg (A50) foi de 46% (n=207/450) e 11% (50/450), respectivamente (Figura 16 A). Foram utilizados 150 indivíduos/grupo para avaliar o genótipo nos grupos A100 e A75 e todos os adultos obtidos do grupo A50 (n=50). Neste ensaio a cinética de obtenção de adultos ao longo dos 16 dias de experimento ocorreu de forma semelhante para os três grupos e a maior a porcentagem de adultos foi observada após 10 dias (Figura 16 B). Em relação ao genótipo dos adultos, no grupo A100 as frequências dos genótipos encontrados foram de 0.51 e 0.49 para os alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>*, respectivamente, conforme esperado. A redução do alimento também afetou significativamente os genótipos dos indivíduos que atingiram a fase adulta. Observa-se que cerca de 61 e 76% dos adultos eram homozigotos para o alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* e apenas 24 e 39% eram homozigotos para o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* (Figura 16 C). Estes resultados demonstram que os indivíduos homozigotos para o alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* também possuem maior vantagem sob efeito de redução de alimento, em relação aqueles homozigotos para o *cqm1<sub>REC</sub>*.

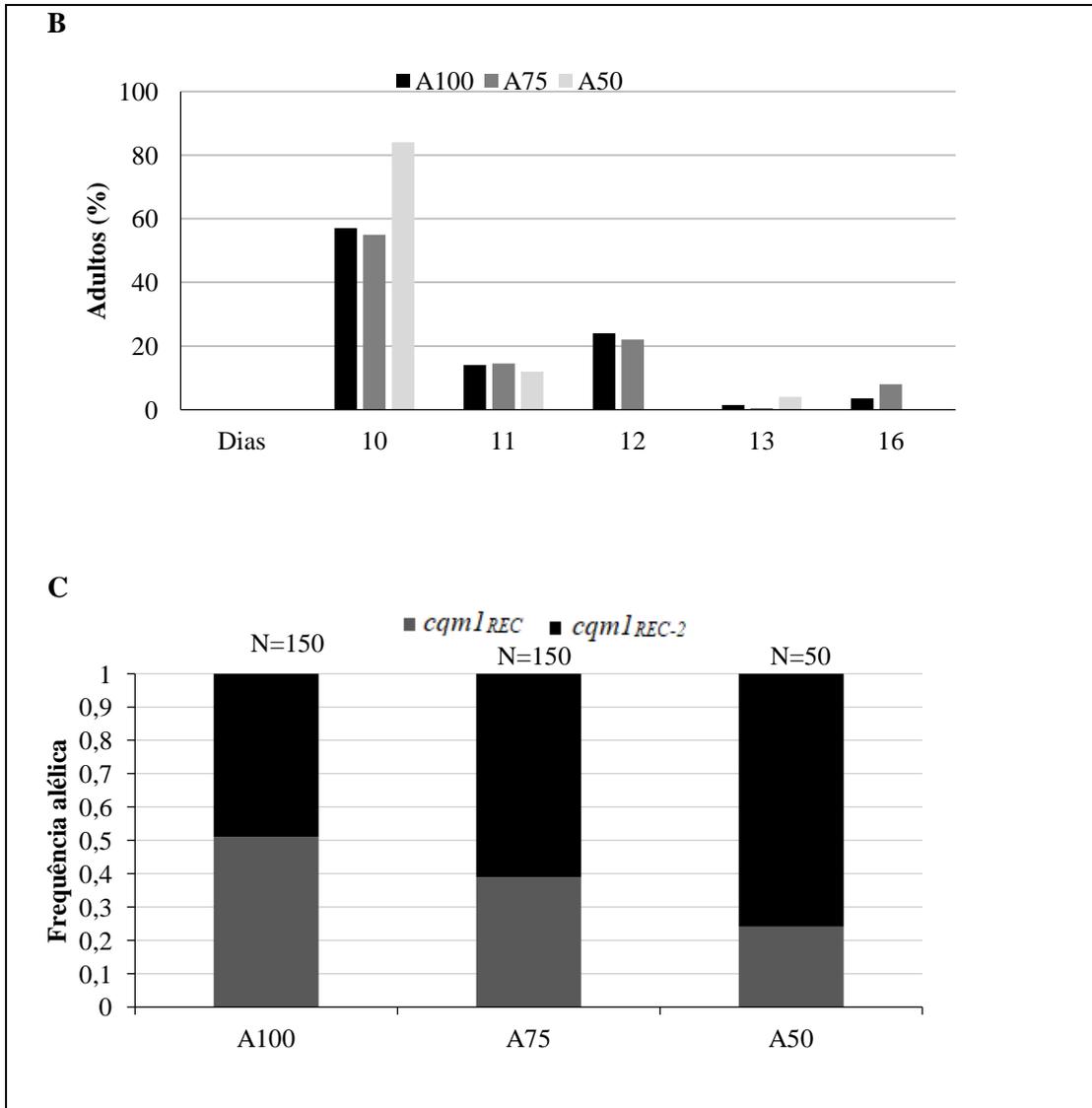
**Figura 16** - Avaliação dos efeitos da densidade em *Culex quinquefasciatus*.

(continua)



**Figura 16** - Avaliação dos efeitos da densidade em *Culex quinquefasciatus*.

(conclui)



Fonte: a autora

Legenda: A. Adultos obtidos no ensaio de desenvolvimento pré-imaginal, sob condições de disponibilidade de alimento padrão (A100) e baixa disponibilidade (A75 e A50). B. Cinética de obtenção de adultos sob efeito de estresse de baixa disponibilidade de alimento ao longo de 18 dias. C. Frequência alélica obtida na avaliação de baixa disponibilidade de alimento de indivíduos homocigotos para os alelos *cqml*<sub>REC</sub> e *cqml*<sub>REC-2</sub>.

#### 8.4 Perfil de expressão de enzimas detoxificadoras

Esta análise foi inicialmente prevista para avaliar a atividade catalítica de três famílias de enzimas detoxificadoras resistentes e susceptíveis. Entretanto a abordagem foi modificada e foi feita uma análise do perfil diferencial destas classes de enzimas através dos dados de RNAseq do intestino das larvas das colônias analisadas. Este perfil mostrou que um grande

número de enzimas detoxificadoras em ambas as colônias, tanto superexpressas como subexpressas. Os genes com maior nível de expressão diferencial ( $(\text{Log}^2)\text{FC} > 1,5$ ) nas colônias REC e REC-2 estão apresentadas nas tabelas 5 e 6 e a totalidade dos genes está apresentada no apêndice B. Considerando uma seleção de enzimas cuja expressão diferencial foi  $(\text{Log}^2)\text{FC} > 2$  observa-se que nas colônias REC e REC-2 em relação à susceptível, há uma grande superexpressão de enzimas da classe de MFO's, da família "cytochrome P450". Em subexpressão, além da grande quantidade de enzimas da classe das MFO's, há uma maior subexpressão de enzima da classe das GST's. As enzimas da classe das Esterases não foram muito representadas nesta análise em ambas às colônias resistentes em relação à susceptível. Os resultados mostram um perfil semelhante de enzimas detoxificadoras em ambas as colônias, e considerando os critérios utilizados, a colônia REC mostra tanto induzido como reprimido estes genes e o perfil diferencial de subexpressão mais evidente que a colônia REC-2, não sendo possível associar a presença destas enzimas à resistência metabólica.

**Tabela 5** – Perfil transcriptômico diferencial de larvas de *Culex quinquefasciatus* da colônia resistente REC em relação à colônia Susceptível.

<b>Colônia REC</b>			
<b>ID</b>	<b>Anotação Vectorbase</b>	<b>(Log<sup>2</sup>)FC padj</b>	
<b>INDUZIDOS</b>			
<b>MFO</b>			
CPIJ040083	COX3: cytochrome c oxidase subunit III	3.71	1.2560e-08
CPIJ010175	CYP9J48: cytochrome P450 9J48	2.96	4.8866e-17
CPIJ010546	CYP9J34: cytochrome P450 9J34	2.91	1.2311e-20
CPIJ002535	CYP6AG9: cytochrome P450 6AG9	2.73	3.8192e-12
CPIJ010230	CYP12F10: cytochrome P450 12F10	2.06	2.9830e-06
CPIJ010541	CYP9J37: cytochrome P450 9J37	2.01	2.2421e-12
CPIJ001757	CYP4H39: cytochrome P450 4H39	2.01	5.2723e-13
<b>REPRIMIDOS</b>			
<b>MFO</b>			
CPIJ016853	CYP6N21P: cytochrome P450 6N21P	-2.47	8.0883e-08
CPIJ016849	CYP6M12: cytochrome P450 6M12	-2.41	4.2932e-09
CPIJ016855	CYP6N20: cytochrome P450 6N20	-2.04	2.2421e-12
<b>GST</b>			
CPIJ018626	Glutathione-s-transferase theta, gst	-3.03	3.7896e-16
CPIJ018624	Glutathione-s-transferase theta, gst	-2.55	5.9875e-11

Fonte: a autora

Legenda: Em verde: Enzimas superexpressas encontradas em ambas as colônias.

Em vermelho: Enzimas subexpressas encontradas em ambas as colônias.

Monooxidases de função mista (MFO) e glutathione-S-transferase (GST).

**Tabela 6** – Perfil transcriptômico diferencial de larvas de *Culex quinquefasciatus* da colônia resistente REC-2 em relação a colônia Susceptível.

<b>Colônia REC-2</b>			
<b>ID</b>	<b>Anotação Vectorbase</b>	<b>(Log<sup>2</sup>)FC Padj</b>	
<b>INDUZIDOS</b>			
<b>MFO</b>			
CPIJ010175	CYP9J48: cytochrome P450 9J48	2.32	0.00017853
CPIJ010546	CYP9J34: cytochrome P450 9J34	2.19	9.3978e-12
CPIJ020229	CYP4D42: cytochrome P450 4D42	2.14	4.3423e-11
<b>REPRIMIDOS</b>			
<b>MFO</b>			
CPIJ016846	CYP6M13: cytochrome P450 6M13	-2.66	7.7962e-06
CPIJ016852	CYP6N19: cytochrome P450 6N19	-2.07	4.0134e-14
CPIJ019704	CYP6N24: cytochrome P450 6N24	-1.81	0.00100968
CPIJ016848	CYP6M14: cytochrome P450 6M14	-1.75	5.2852e-09
CPIJ019673	CYP6AG15: cytochrome P450 6AG15	-1.66	4.1147e-05
CPIJ010538	CYP9J46: cytochrome P450 9J46	-1.65	1.2014e-05
CPIJ016855	CYP6N20: cytochrome P450 6N20	-1.61	8.2221e-08
CPIJ020199	CYP6N20: cytochrome P450 6N20	-1.52	0.00091517
<b>GST</b>			
CPIJ018624	Glutathione-s-transferase theta, gst	-2.84	1.5863e-14
CPIJ018626	Glutathione-s-transferase theta, gst	-2.67	3.2924e-18
CPIJ002676	Glutathione S-transferase D7	-2.17	1.3381e-10

Fonte: a autora

Legenda: Em verde: Enzimas superexpressas encontradas em ambas as colônias.

Em vermelho: Enzimas subexpressas encontradas em ambas as colônias.

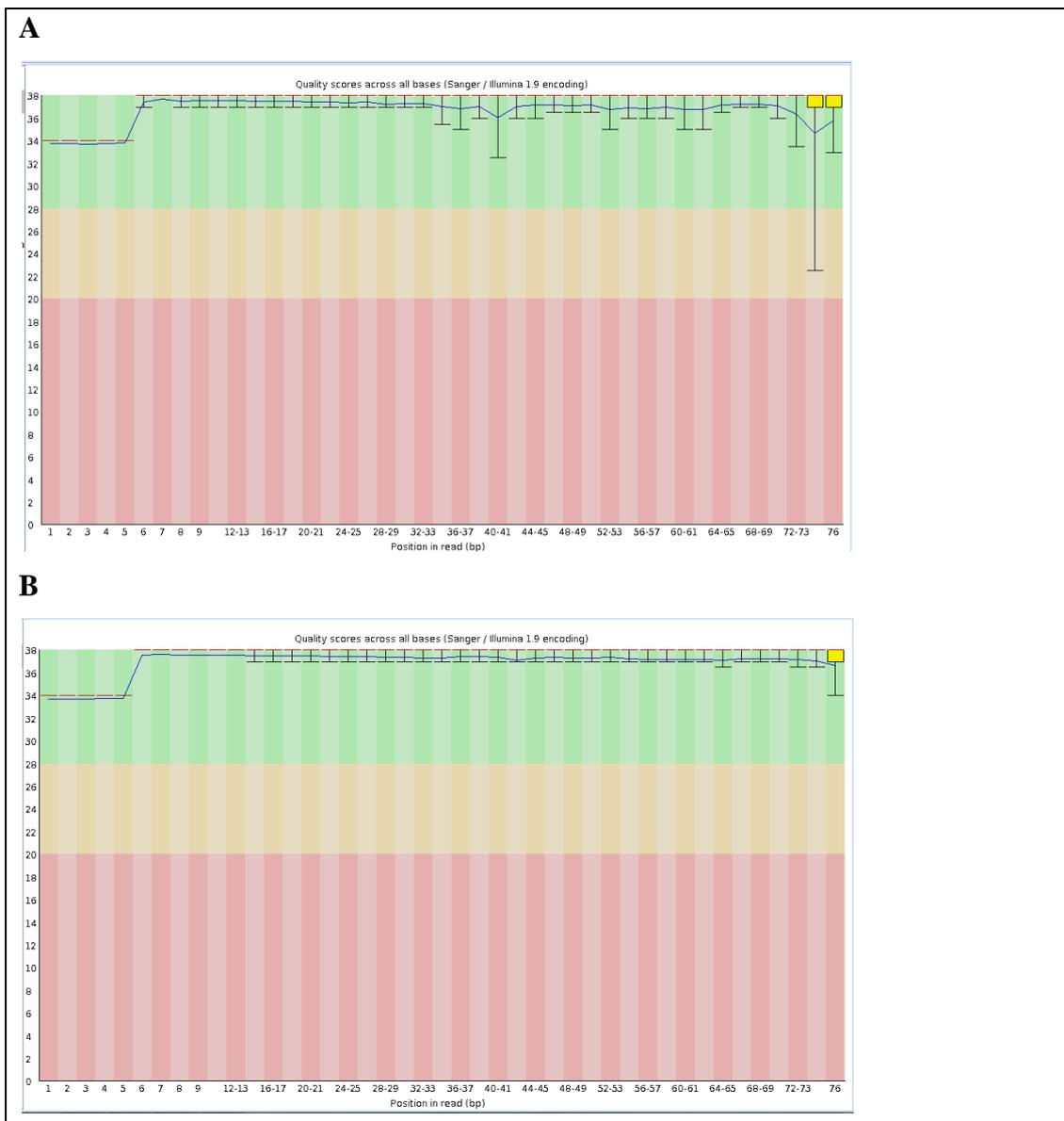
Monooxidases de função mista (MFO) e glutathione-S-transferase (GST).

### 8.5 Perfil de expressão gênica diferencial de larvas das colônias REC e REC-2

Esta análise foi realizada em duas etapas, inicialmente as bibliotecas de transcritos para cada colônia resistente foram comparadas com aquelas da colônia susceptível. Em seguida, foi feita uma normalização das bibliotecas, o que permitiu a comparação entre as colônias resistentes REC e REC-2. O padrão de expressão gênica diferencial de amostras de intestino de larvas de *C. quinquefasciatus* de cada colônia resistente (REC e REC-2) em relação à colônia susceptível (S) foi obtido a partir do sequenciamento de nove bibliotecas, correspondentes a três replicatas biológicas por colônia (20 intestinos/replicata), no equipamento MiSeq (Illumina). Como descrito, foi realizado também o perfil diferencial direto entre as colônias resistentes REC x REC-2. Para a comparação REC e S foi obtida uma média de leituras de ~ 2.085.632 e ~2.758.552, respectivamente, e conteúdo GC médio das

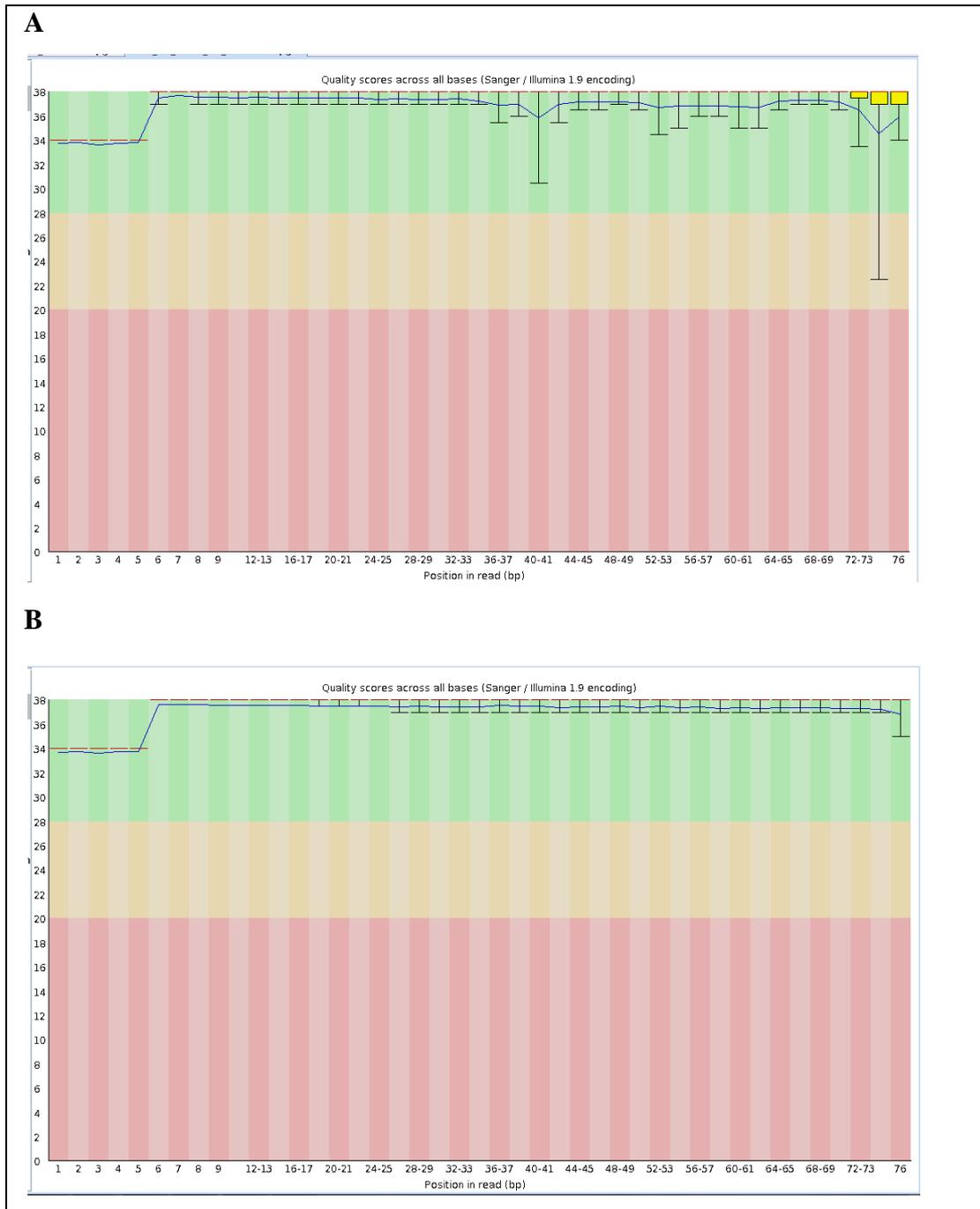
sequências foi de aproximadamente 39% e 43% para as colônias REC e S, respectivamente. Quando comparadas as colônias REC-2 e S, a média de leituras foi de ~4.045.938 e ~4.587.723, respectivamente e o conteúdo GC médio 42% e 44,5% para as colônias REC-2 e S, respectivamente. De modo geral, as sequências apresentaram bases com “phred” superior a 30 (Figura 17 e 18), com exceção de uma das bibliotecas da colônia REC-2 que obteve o valor de 24.

**Figura 17** – Qualidade das sequencias para análise da colônia REC (A) com a Susceptível (B) obtida no FastQC.



Fonte: a autora

**Figura 18** - Qualidade das sequências para análise da colônia REC-2 (A) com a Susceptível (B) obtida no FastQC.



Fonte: a autora

### 8.5.1 Alinhamento e contagem das sequências

As leituras de cada biblioteca foram alinhadas, separadamente, utilizando o genoma de *C. quinquefasciatus* obtida no VectorBase (cepa de Johannesburg CpipJ2) como referência.

Foram obtidas taxas de mapeamento único médio de 51,6% e 66,1% para as colônias para a colônia REC e S, respectivamente (Tabela 7). Comparando as colônias REC-2 e S, os valores de mapeamento único são 53,1% e 69,6%, respectivamente (Tabela 7). A taxa de leituras não mapeadas foi baixa (entre 7,9 e 13%) para a maioria das bibliotecas, com exceção de uma das bibliotecas da colônia REC-2, que elevou este percentual para 18,7% (Tabela 7). A análise da presença de elementos transponíveis em cada biblioteca realizada de acordo com Lerat et al. (2017), mostrou que parte dessas sequências de mapeamento múltiplo, cerca de 3-6,6%, eram transposons (Tabela 10). As estatísticas do alinhamento das colônias resistentes com respectiva amostra suscetível estão apresentadas na tabela 7. Em uma das bibliotecas da colônia REC-2, o mapeamento único das sequências foi considerado baixo (44,5%), e isto pode ser associado a baixa qualidade desta sequência específica.

**Tabela 7** – Estatísticas do alinhamento no STAR aligner das bibliotecas de sequenciamento para as colônias analisadas: REC x Suscetível e REC-2 x Suscetível.

Amostra	REC		Suscetível		REC-2		Suscetível	
Total leituras	6.256.898		8.275.658		6,230,726		9,220,190	
	N° Reads (10 <sup>6</sup> )	%						
<b>Resultados</b>								
Total Mapeado	6.13	98.1	8.12	98.9	6.17	99.1	9.12	99
Map. Únicos	3.23	51.6	5.56	66.1	3.39	53.1	6.44	69.6
Map. Múltiplos	1.68	26.7	1.92	24.4	1.13	17.3	1.96	21.5
Não mapeados	1.21	13.0	0.69	8.30	1.64	18.7	0.72	7.9
Transposons	0.30	3.22	0.41	4.93	0.54	6.15	0.58	6.6

Fonte: a autora

### 8.5.2 Análise do padrão de expressão diferencial global

Neste ensaio, um total de 19.859 leituras foram sequenciadas e mais de 98% foram mapeadas contra o genoma de *C. quinquefasciatus*. A partir do mapeamento das análises que atenderam aos parâmetros de ter pelo menos cinco leituras em cada replicata e estar presente em pelo menos uma condição experimental, foram observados os seguintes resultados: 5634 genes (correspondente à  $\cong 28\%$  do repertório total de *C. quinquefasciatus*) para a comparação REC x S, 6435 ( $\cong 32\%$ ) para a comparação REC-2 x S e 4878 ( $\cong 24\%$ ) para a comparação

REC x REC2. Com base nos resultados do mapeamento, foi realizada a análise de expressão diferencial pelo pacote DESeq2, baseada na seleção de genes com valor de *cutoff* de  $(\text{Log}^2)\text{FC} \geq 1$  e com p-valor corrigido abaixo de 0.05.

A análise dos componentes principais (PCA) permite avaliar visualmente as semelhanças e diferenças entre as amostras e determinar se elas podem ser agrupadas. Nos gráficos de PCA das colônias REC e REC-2 é possível observar a formação de grupos distintos entre as replicatas de cada colônia resistente, em comparação com a suscetível, bem como a diferença entre as replicatas da colônia REC x REC-2 (Figura 19). Para realizar as análises, as bibliotecas foram normalizadas no pacote DESeq2 e o resultado da normalização pode ser observado na figura 20.

Para complementar os resultados e comparar os perfis de expressão de cada replicata de uma dada amostra foi construído um *HeatMap*, onde foi possível agrupá-las de acordo com a semelhança. A maior similaridade da expressão é representada pela cor vermelha, e a menor a similaridade foi exibida em cor verde. Esta análise mostra que as maiores similaridades acontecem dentro das mesmas colônias e que o padrão de cada colônia comparada naquela análise (Figura 21).

Após a normalização, foi gerado um gráfico de “*MA plot*”, que apresenta genes que possuam níveis de expressão semelhantes entre as colônias analisadas em torno da linha horizontal ( $y = 0$ ), a superexpressão dos genes na colônia resistente pode ser observada na cor verde, e a subexpressão na cor vermelha (Figura 22). O conjunto de análises aponta a existência de um padrão de expressão diferencial entre cada colônia resistente e a colônia suscetível e bem como entre as colônias resistentes. Em relação à suscetível a colônia REC teve 306 genes induzido e 278 reprimidos e a colônia REC-2 teve 236 genes induzidos e 210 reprimidos. Quando comparados à colônia REC x REC-2, foi encontrado um conjunto mais reduzido de 107 genes induzidos e 119 genes reprimidos. É importante destacar que, em ambas as colônias resistentes, o gene *cqm1* (identidade CPIJ013173) foi diferencialmente reprimido e com score de cinco e quatro na escala de  $(\text{Log}^2)\text{FC}$  para as colônias REC e REC-2, respectivamente, e um valor de *p* altamente significativo. Este achado é consistente com o fenótipo de alta resistência de larvas destas colônias, e indica assim a robustez da análise destas colônias. Deve ser observado que a anotação deste gene *cqm1* é “neutral and basic amino acid transport protein rBAT”, um dos grupos de enzimas da família de  $\alpha$ -glicosidases (EC 3.2.1.20). As diferenças de expressão entre as colônias resistentes REC e REC-2 com a

suscetível foram mais evidentes (584 e 446 genes, com valor de  $(\text{Log}^2)\text{FC} \geq 1$  do que aqueles entre as colônias REC e REC-2 (226 genes diferencialmente expressos,  $(\text{Log}^2)\text{FC} \geq 1$ ).

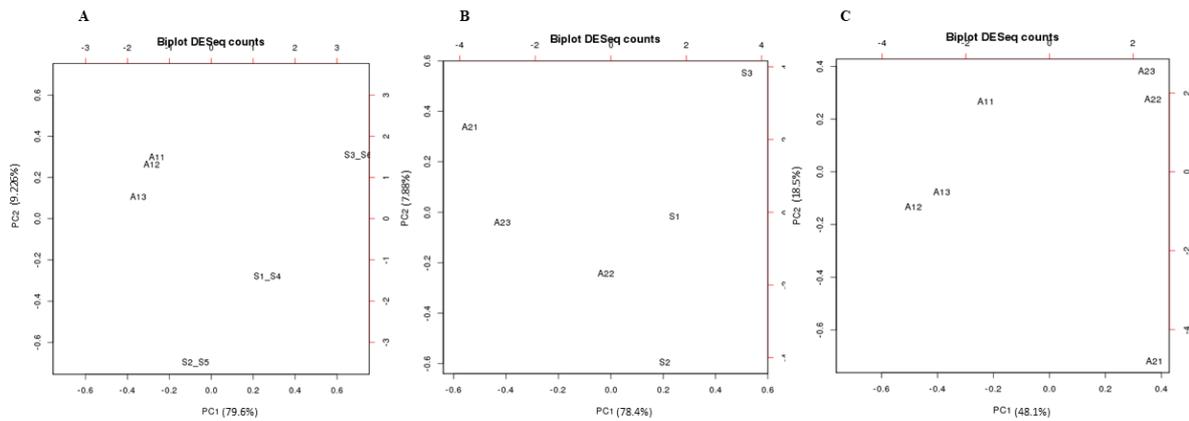
Para visualizar a correlação entre os conjuntos de dados foi realizado um diagrama de Venn. A figura 23 mostra o número genes em comum que foram encontrados nas análises das colônias REC x S, REC-2 x S e REC x REC-2. Em cada círculo são mostrados a quantidade de transcritos únicos para cada grupo analisado. O grupo REC x S, REC-2 x S e REC x REC-2 apresentam 291, 175 e 105 transcritos únicos, respectivamente. Para os transcritos em comum, o número de genes são 208, 38 e 60, para os grupos REC x S e REC-2 x S, grupos REC-2 x S e REC x REC-2 e os grupos REC x S e REC x REC-2, respectivamente. No meio do diagrama, podemos observar que foram detectados 23 transcritos em comum nas três análises (Tabela 8).

**Tabela 8** – Lista de transcritos diferencialmente expressos em comum para as análises REC x S, REC-2 x S e REC x REC-2.

<b>ID</b>	<b>Anotação</b>	<b>REC X S (Log<sup>2</sup>)FC</b>	<b>REC2 X S (Log<sup>2</sup>)FC</b>	<b>REC X REC2 (Log<sup>2</sup>)FC</b>
CPIJ010801	carboxypeptidase B precursor	5.37	3.93	1.84
CPIJ006306	Ion channel nompc	4.33	3.46	1.30
CPIJ011190	deoxyribonuclease I, putative	3.10	1.53	1.50
CPIJ008490	Ankyrin repeat domain-containing protein 44	2.64	1.23	1.19
CPIJ000500	Putative uncharacterized protein	2.54	3.53	-1.05
CPIJ000496	Putative uncharacterized protein	2.50	2.95	-1.17
CPIJ010307	Putative uncharacterized protein	2.46	1.82	1.02
CPIJ010456	Cysteine dioxygenase	2.38	1.26	1.11
CPIJ006267	LRIM16: leucine-rich immune protein (TM)	1.78	1.17	1.06
CPIJ000039	glucosyl/glucuronosyl transferases	1.74	1.01	1.22
CPIJ017122	SOD1A_XENLASuperoxide dismutase	1.46	2.36	-1.06
CPIJ004223	pancreatic triacylglycerol lipase precursor	1.14	1.91	-1.33
CPIJ012752	cysteine synthase	1.13	3.28	-1.36
CPIJ004224	Pancreatic triacylglycerol lipase	1.06	1.74	-1.25
CPIJ013173	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT	-5.49	-3.99	-1.88
CPIJ018693	Hyp37.3 putative secreted salivary gland protein	-3.87	-1.44	-1.86
CPIJ012180	NPC2 homolog	-3.60	-2.06	-1.18
CPIJ002103	Putative uncharacterized protein	-3.48	-1.54	-2.40
CPIJ007385	serine-type endopeptidase, putative	-3.24	-1.34	-1.91
CPIJ016853	CYP6N21P: cytochrome P450 6N21P	-2.47	-1.18	-1.69
CPIJ008877	prolylcarboxypeptidase, putative	-2.84	-1.36	-1.21
CPIJ007384	azurocidin precursor	-2.25	-1.32	-1.25
CPIJ018694	Ion channel nompc	-2.35	-1.21	-1.32

Fonte: a autora.

**Figura 19** – Análise dos componentes principais (PCA) das replicatas biológicas das colônias REC, REC-2 e S de *Culex quinquefasciatus*.

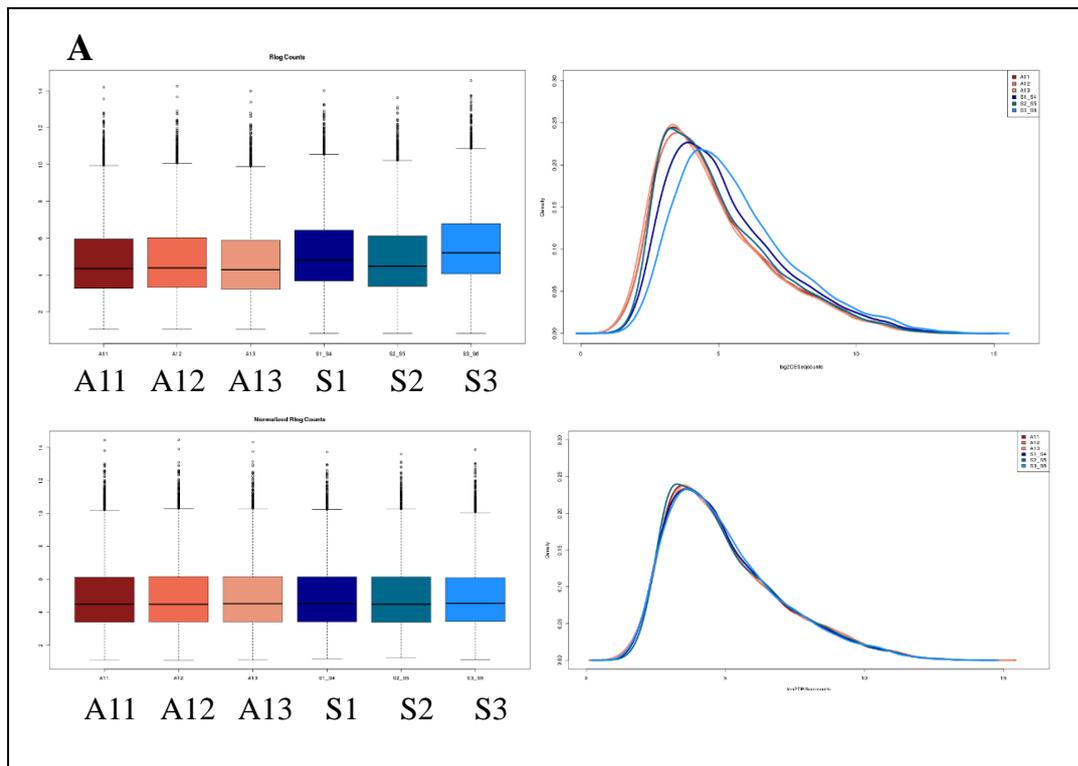


Fonte: a autora

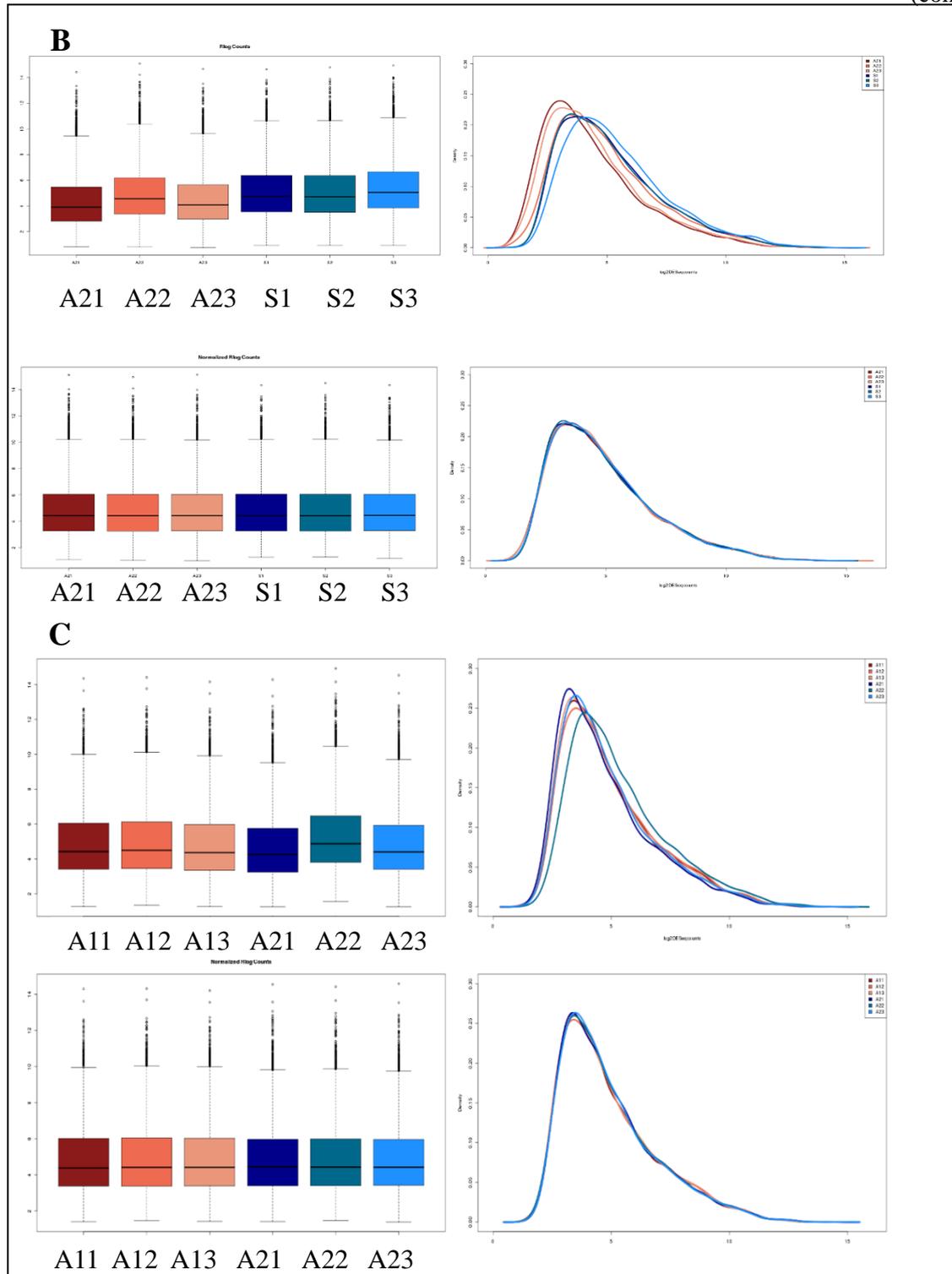
Legenda: A. colônias REC (A11, A12 e A13) e susceptível (S1, S2 e S3). B. colônia REC-2 (A21, A22 e A23) e susceptível (S1, S2, S3). C. colônias REC (A11, A12 e A13) e REC-2 (A21, A22 e A23).

**Figura 20** – Normalização das bibliotecas das colônias REC, REC-2 e S de *Culex quinquefasciatus*.

(continua)



**Figura 20** – Normalização das bibliotecas das colônias REC, REC-2 e S de *Culex quinquefasciatus*.  
(conclusão)

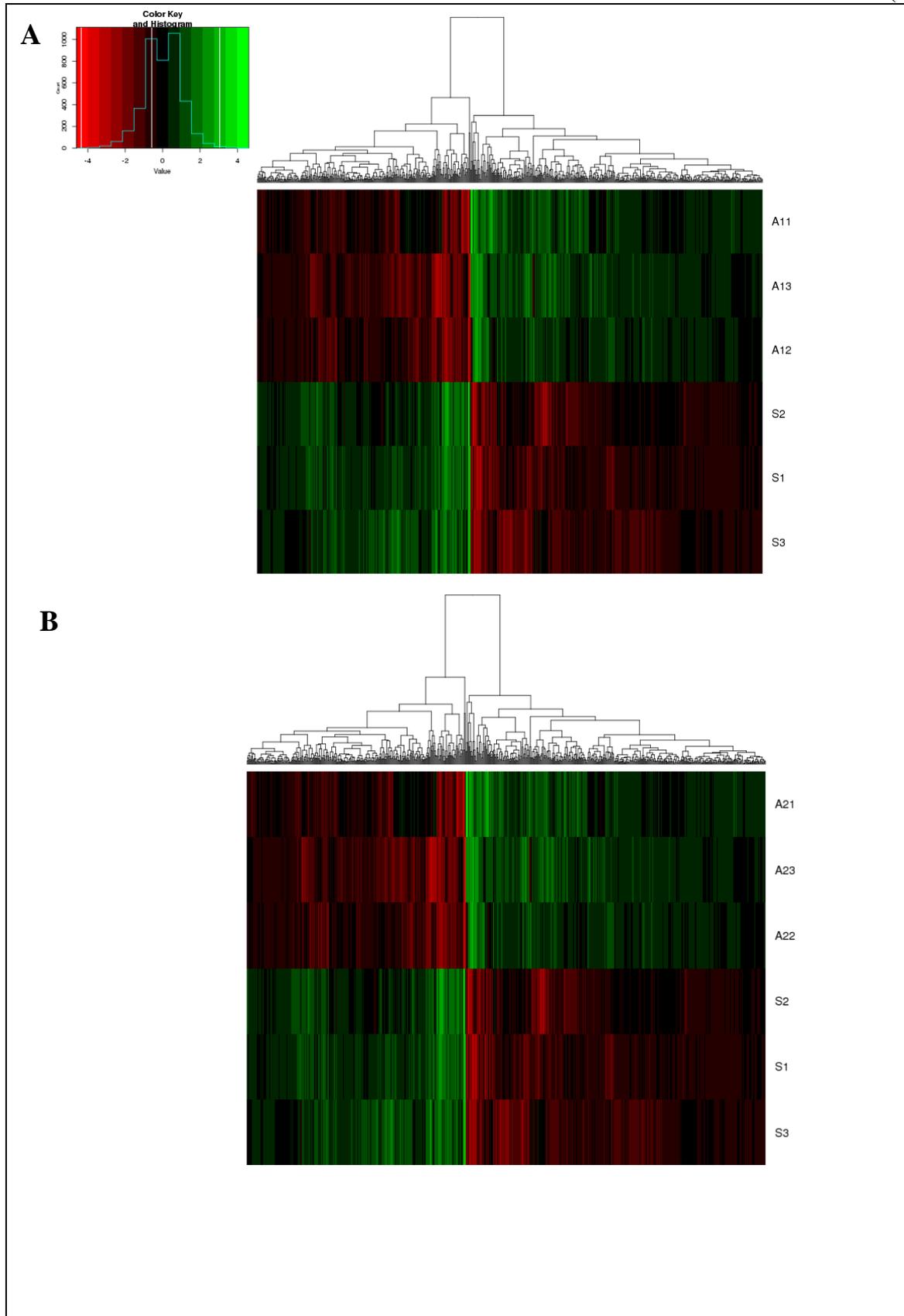


Fonte: a autora

Legenda: A. colônias REC (A11, A12 e A13) e susceptível (S1, S2 e S3). B. colônia REC-2 (A21, A22 e A23) e susceptível (S1, S2, S3). C. colônias REC (A11, A12 e A13) e REC-2 (A21, A22 e A23). As partes superiores e inferiores representam as bibliotecas antes e após a normalização, respectivamente.

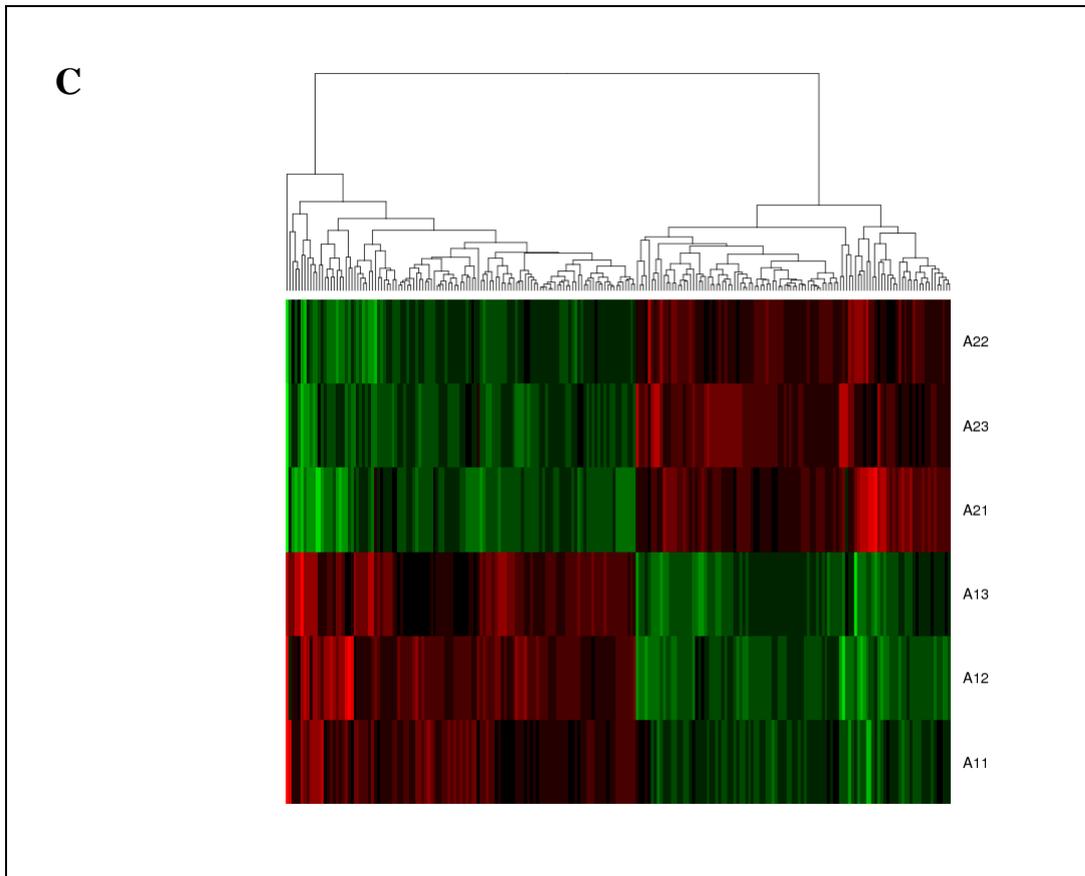
**Figura 21** – Heatmap do perfil de expressão gênica das colônias REC, REC-2 e S de *Culex quinquefasciatus*.

(continua)



**Figura 21** – Heatmap do perfil de expressão gênica das colônias REC, REC-2 e S de *Culex quinquefasciatus*.

(conclusão)

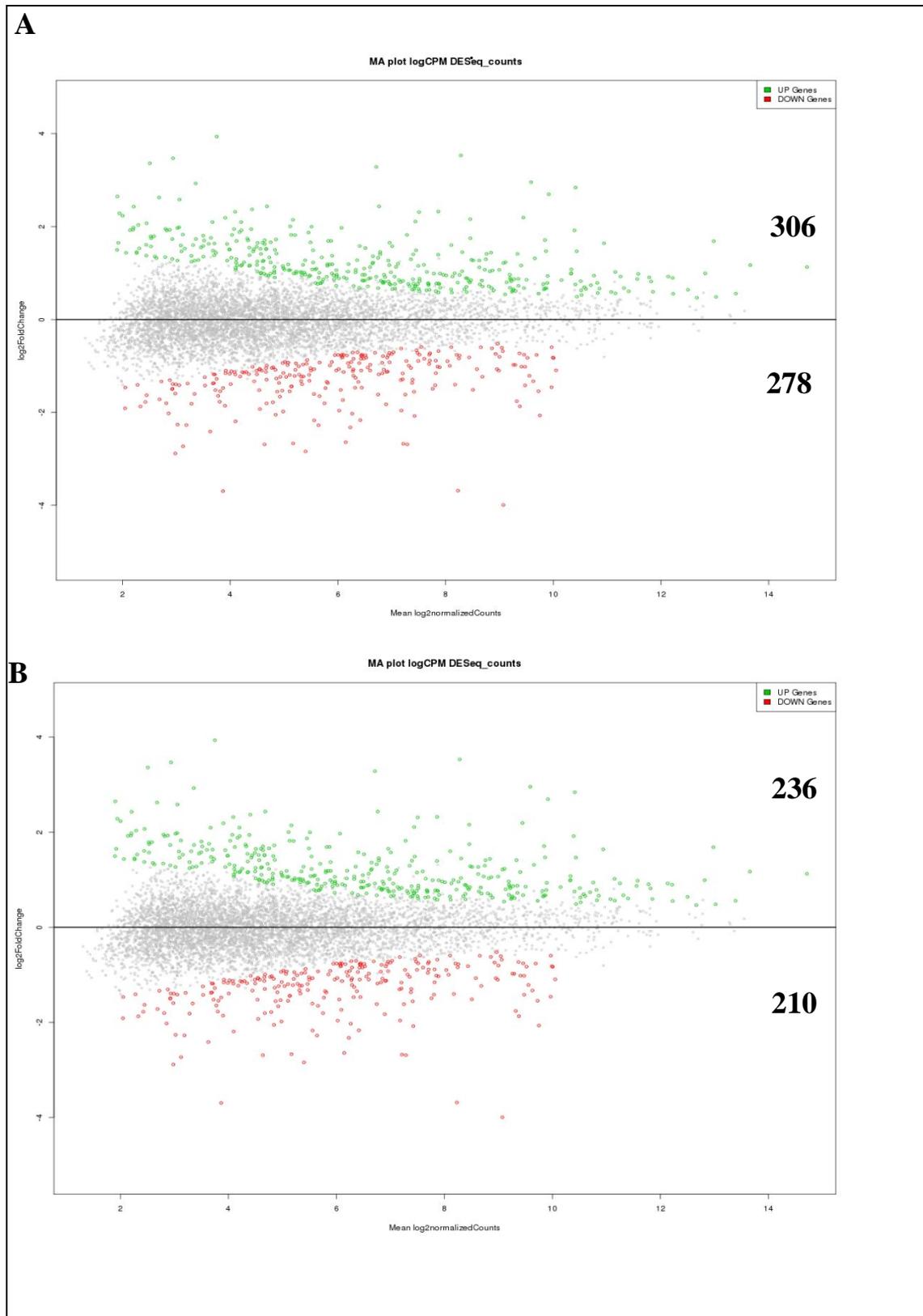


Fonte: a autora

Legenda: A. Padrão da colônia REC (A11, A12 e A13) e susceptível (S1, S2 e S3). B. REC-2 (A21, A22 e A23) e susceptível (S1, S2 e S3). C. REC (A11, A12 e A13) e REC-2 (A21, A22 e A23). Em vermelho genes reprimidos e em verde genes induzidos.

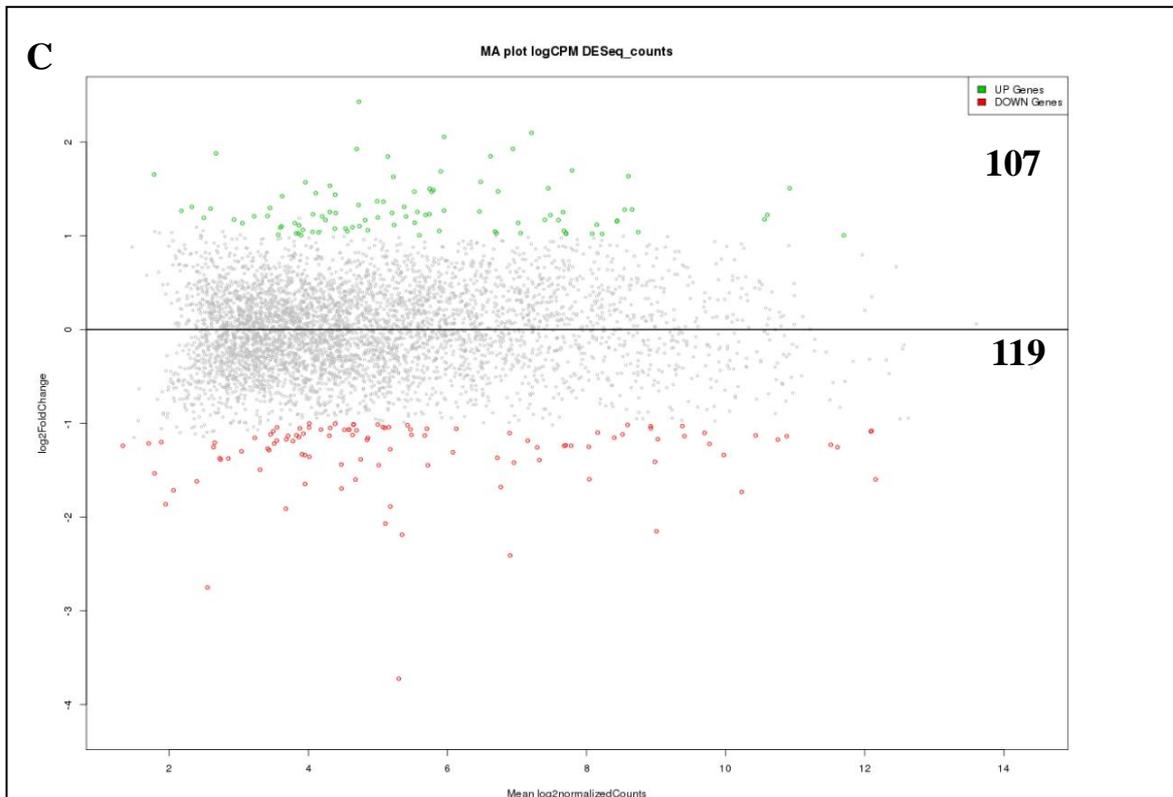
**Figura 22** – “MA plot” de genes diferencialmente expressos (DEGs) das colônias REC, REC-2 e S de *Culex quinquefasciatus*.

(continua)



**Figura 22** – “MA plot” de genes diferencialmente expressos (DEGs) das colônias REC, REC-2 e S de *Culex quinquefasciatus*.

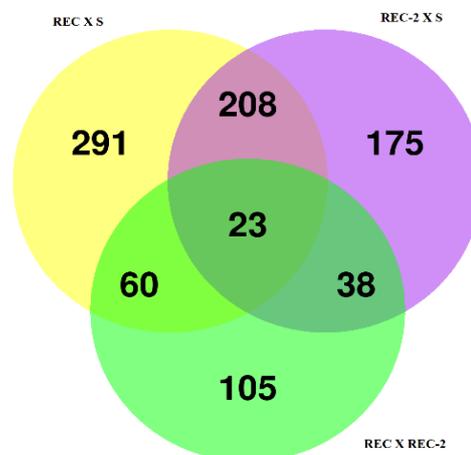
(conclusão)



Fonte: a autora

Nota: A. Colônia REC e suscetível. B. Colônia REC-2 e suscetível. C. Colônia REC e REC-2. Genes induzidos (verde), genes em comum (cinza) e genes reprimidos (vermelho).

**Figura 23** – Diagrama de Venn com os transcritos das colônias REC, REC-2 e S de *Culex quinquefasciatus*



Fonte: a autora

Legenda: Análises REC x S (amarelo), REC-2xS (roxo) e REC x REC-2 (verde).

### 8.5.3 Análise do perfil de genes com maior expressão diferencial

Outro nível de análise realizada foi uma seleção de genes que apresentaram uma expressão diferencial de genes com um valor mais elevado de  $(\text{Log}^2)\text{FC} > 2$ . Na análise REC x S, 89 genes, de um total de 583 genes da análise foram selecionados (Tabela 9). Para a análise REC-2 x S, foram selecionados 57 genes de um total de 445 (Tabela 10). Enquanto que a análise comparativa entre as colônias resistentes REC e REC-2 foram selecionados 47 genes de um total de 227 DEGs (Tabela 11).

Alguns genes comuns se destacaram na análise entre as colônias resistentes REC e REC-2 com a colônia susceptível. Dentre os genes induzidos encontrados nas colônias resistentes em relação a susceptível, destaca-se o gene CPIJ10801 (*Carboxypeptidase B precursor*; Tabela 9; nº1; Tabela 10; nº 4), envolvido no metabolismo de proteínas que coordenam mecanismos de defesa (MANTHEY et al, 2009). Este gene teve a maior super expressão encontrado na colônia REC (5,37) e com altos valores de expressão na colônia REC-2 também (3,93). Os genes das lipases CPIJ004228 e CPIJ004230, enzimas responsáveis pelo metabolismo de lipídeos, também foram destaques no perfil de super expressão com altos valores de  $(\text{Log}^2)\text{FC}$  (Tabela 9; nº16, 33; Tabela 10; nº 8, 13). Na colônia REC foram observados os genes CPIJ016362 (*alpha-glucosidase precursor*), CPIJ002066 (*alpha-galactosidase A precursor*) e CPIJ008079 (*alpha-amylase 1 precursor*), que são maltases envolvidas na digestão e metabolismo de carboidratos (Tabela 9; nº 8,15 e 10). Alguns genes que codificam a “Ankyrin” foram encontrados induzidos e reprimidos, dentre os induzidos CPIJ008490 (*Ankyrin repeat domain-containing protein 44*) e CPIJ017156 (*Ankyrin repeat and SOCS box protein 13*; Tabela 9; nº 13; Tabela 10; nº 17). Estas proteínas são conhecidas por serem proteínas transmembrana envolvidas no reconhecimento de patógenos e imunoreceptores. Na colônia REC-2, foram observados muitos dos genes descritos na REC, mas um gene específico com destacada superexpressão, o CPIJ013538 (*ficolin-1 precursor*), gene que codifica proteínas como lectinas, que estão relacionadas a resposta imune (FUJITA, 2002; FUJITA, MATSUSHITA; ENDO; 2004; Tabela 10; nº 1). Como descrito anteriormente na seção 8.4, foram encontrados também genes envolvidos na atividade de enzimas detoxificadoras, como os genes de citocromo C, da família P450, *glucosyl/glucuronosyl transferases* e *glutathione-S-transferase*. É importante destacar que estes genes apareceram tanto induzidos em ambas as colônias resistentes como também reprimidos.

Dentre os genes encontrados em repressão nas colônias resistentes em relação a susceptível, destaca-se primeiramente o gene (CPIJ0013173) que codifica a  $\alpha$ -glicosidase Cqm1 (Tabela 9; n°1; Tabela 10; n° 3) que é o receptor de toxina Bin. Este gene teve o maior valor de repressão na colônia REC e o terceiro maior na colônia REC-2, sendo um marcador robusto da alta resistência desta colônia à toxina Bin. Outros genes com os maiores valores de sub-expressão foram as da família de *vanin-like proteins*, CPIJ017593 (*pantheteinase precursor*) e CPIJ017592 (*vanin-like protein 1 precursor, putative*), porém a função destas proteínas não foi bem estudada em insetos, principalmente em mosquitos (Tabela 9; n°2 e 6; Tabela 10; n° 1 e 2). Os genes de que codificam a “*Ankyrin*” também foram encontrados em repressão. O gene CPIJ018744 (*Ankyrin 2,3/unc44*) encontrado nas colônias REC e REC-2 (Tabela 12 e 13; n°4) e CPIJ013539 (*Ankyrin repeat and SOCS box protein 10*; Tabela 9; n°34; Tabela 10; 30).

Observando os genes diferencialmente expressos na análise entre as colônias resistentes (Tabela 11), na qual os valores positivos (induzidos) são referentes aos genes mais expressos na colônia REC e os valores negativos (reprimidos) possui genes mais expressos na colônia REC-2, constata-se um padrão diferencial discreto, com número de repertório limitado e DEG's reduzido. Nota-se também que a amplitude dos valores de  $(\text{Log}^2)\text{FC}$  foi menor do que a observada nas demais análises entre estas colônias resistentes e a susceptível. No perfil mais expresso na colônia REC, destacam-se genes, CPIJ002535 (*CYP6AG9: cytochrome P450 6AG9*) e CPIJ040083 (*COX3: cytochrome c oxidase subunit III*, referentes a enzimas detoxificadoras (Tabela 11; induzidos n° 1, 3). Na colônia REC também foram encontrados os genes CPIJ010067 (*ATP-binding cassette sub-family A member 3*), responsável pelo transporte transmembrana, CPIJ002066 (*alpha-galactosidase A precursor*), relacionado a metabolismo de carboidratos e CPIJ010412 (*Fucosyltransferase 11*), que é relativo a glicosilação de proteínas (Tabela 11; induzidos n° 2, 4 e 5). Com esta análise, foi confirmado que o gene CPIJ013538 (*ficolin-1 precursor*) é um diferencial da colônia REC-2 (Tabela 11; reprimidos n° 3). Também na colônia REC-2, os genes CPIJ003695 (*glucosyl/glucuronosyl transferases*), que também pode atuar na detoxificação metabólica e pertence à classe das Esterases, o gene CPIJ006124 (*prolylcarboxypeptidase, putative*), que é uma serino protease, gene *Heat shock* CPIJ013538 e o gene CPIJ001464 (*alpha amylase A precursor*), envolvido no metabolismo de carboidratos (Tabela 11, reprimidos n° 1, 2, 4 e 5) foram encontrados.

**Tabela 9** – Seleção de genes induzidos e reprimidos na colônia REC de *Culex quinquefasciatus*.

		(continua)		
Nº	ID <sup>a</sup>	Anotação	(Log <sup>2</sup> )FC <sup>b</sup>	p <sub>adj</sub>
<b>Induzidos</b>				
1	CPIJ010801	carboxypeptidase B precursor	5.37	2.664e-47
2	CPIJ006306	Ion channel nompc	4.33	1.844e-22
3	CPIJ002522	Serine 3-dehydrogenase	4.21	9.386e-12
4	CPIJ000344	39S ribosomal protein L24, mitochondrial precursor	3.96	4.876e-10
5	CPIJ040083	COX3: cytochrome c oxidase subunit III	3.71	1.256e-08
6	CPIJ011190	deoxyribonuclease I, putative	3.10	3.131e-30
7	CPIJ010175	CYP9J48: cytochrome P450 9J48	2.96	4.886e-17
8	CPIJ016362	alpha-glucosidase precursor	2.95	3.348e-05
9	CPIJ010546	CYP9J34: cytochrome P450 9J34	2.91	1.231e-20
10	CPIJ004489	potassium-dependent sodium-calcium exchanger	2.74	5.580e-05
11	CPIJ002535	CYP6AG9: cytochrome P450 6AG9	2.73	3.819e-12
12	CPIJ017065	NMDA-type glutamate receptor subunit 1	2.66	6.909e-08
13	CPIJ008490	Ankyrin repeat domain-containing protein 44	2.64	2.698e-11
14	CPIJ005640	Heat shock protein 26	2.63	3.085e-05
15	CPIJ002066	alpha-galactosidase A precursor	2.55	7.089e-14
16	CPIJ004228	Lipase	2.53	6.822e-19
17	CPIJ008079	alpha-amylase 1 precursor	2.48	2.231e-27
18	CPIJ001812	Sugar transporter	2.38	6.504e-05
19	CPIJ016697	Leukocyte elastase inhibitor	2.38	0.0001521
20	CPIJ010456	Cysteine dioxygenase	2.38	4.876e-10
21	CPIJ005229	N-acetylgalactosaminyltransferase 6	2.35	0.0004831
22	CPIJ000699	Vago: salivary Cys-rich secreted protein Vago	2.31	0.0007789
23	CPIJ013793	Cuticle protein 8	2.23	1.445e-09
24	CPIJ010067	ATP-binding cassette sub-family A member 3	2.22	3.028e-10
25	CPIJ010412	Fucosyltransferase 11	2.21	0.0002843
26	CPIJ019874	salivary cysteine-rich peptide	2.14	4.173e-05
27	CPIJ001747	tep3	2.12	2.200e-06
28	CPIJ001777	ataxia telangiectasia mutated, putative	2.10	0.0004831
29	CPIJ012831	Fibrinogen and fibronectin	2.08	1.974e-06
30	CPIJ010230	CYP12F10: cytochrome P450 12F10	2.06	2.983e-06
31	CPIJ006081	trypsin alpha precursor	2.06	0.0001658
32	CPIJ002073	juvenile hormone esterase	2.05	6.972e-06
33	CPIJ004230	Lipase	2.03	1.561e-08
34	CPIJ017792	Serine protease	2.02	0.0027628
35	CPIJ016301	Serine protease inhibitor A3G	2.01	0.0003009
36	CPIJ010541	CYP9J37: cytochrome P450 9J37	2.01	2.242e-12
37	CPIJ001757	CYP4H39: cytochrome P450 4H39	2.01	5.272e-13

**Tabela 9** – Seleção de genes induzidos e reprimidos na colônia REC de *Culex quinquefasciatus*.

(continua)				
Nº	ID <sup>a</sup>	Anotação	(Log <sup>2</sup> )FC <sup>b</sup>	p <sub>adj</sub>
<b>Reprimidos</b>				
1	CPIJ013173	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT	-5.49	8.758e-81
2	CPIJ017593	pantetheinase precursor	-5.27	1.137e-21
3	CPIJ003695	glucosyl/glucuronosyl transferases	-5.00	1.231e-20
4	CPIJ018744	ankyrin 2,3/unc44	-4.94	4.040e-18
5	CPIJ012700	CHKov1, putative	-4.59	3.142e-15
6	CPIJ017592	Vanin-like protein 1 precursor, putative	-4.56	5.566e-15
7	CPIJ018693	Hyp37.3 putative secreted salivary gland protein	-3.87	6.093e-13
8	CPIJ005154	Nuclear transport factor 2	-3.64	1.256e-08
9	CPIJ014889	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	-3.58	3.207e-08
10	CPIJ012840	39S ribosomal protein L24, mitochondrial precursor	-3.50	7.486e-08
11	CPIJ006124	prolylcarboxypeptidase, putative	-3.35	6.921e-09
12	CPIJ007385	serine-type endopeptidase, putative	-3.24	5.966e-13
13	CPIJ018626	Glutathione-s-transferase theta, gst	-3.03	3.789e-16
14	CPIJ012061	hyp37.3 putative secreted salivary gland protein	-3.01	5.350e-07
15	CPIJ012066	sodium/shloride dependent amino acid transporter	-2.89	2.107e-06
16	CPIJ007736	Steroid dehydrogenase	-2.87	2.961e-06
17	CPIJ008877	prolylcarboxypeptidase, putative	-2.84	2.540e-12
18	CPIJ006734	DNA-directed RNA polymerase II 16 kDa polypeptide	-2.77	4.982e-05
19	CPIJ007230	Regucalcin	-2.75	0.000122
20	CPIJ008878	prolylcarboxypeptidase, putative	-2.66	0.000124
21	CPIJ019851	Myosin i	-2.57	0.000420
22	CPIJ018624	Glutathione-s-transferase theta, gst	-2.55	5.987e-11
23	CPIJ019567	vegetatible incompatibility protein HET-E-1, putative	-2.53	0.0001770
24	CPIJ016041	Putative uncharacterized protein	-2.51	0.0006305
25	CPIJ009793	Glioma tumor suppressor candidate region gene 2	-2.51	8.348e-05
26	CPIJ016341	alpha-esterase	-2.50	1.215e-05
27	CPIJ016853	CYP6N21P: cytochrome P450 6N21P	-2.47	8.088e-08
28	CPIJ002989	Oseg1	-2.42	0.0006946
29	CPIJ016849	CYP6M12: cytochrome P450 6M12	-2.41	4.293e-09
30	CPIJ004709	Bifunctional protein fold	-2.40	3.645e-07
31	CPIJ012829	Fibrinogen and fibronectin	-2.40	2.042e-13
32	CPIJ018694	Ion channel nompc	-2.35	0.0009470
33	CPIJ004872	protein phosphatase 2C isoform beta	-2.34	0.0001183
34	CPIJ013539	ankyrin repeat and SOCS box protein 10	-2.31	0.0022809
35	CPIJ008422	Serine esterase	-2.29	5.275e-10
36	CPIJ007384	azurocidin precursor	-2.25	0.0015171
37	CPIJ001035	Lipase member H	-2.25	9.338e-10
38	CPIJ017634	Disulfide oxidoreductase	-2.23	0.0024706
39	CPIJ014142	nucleotide-binding protein 1	-2.21	9.790e-05
40	CPIJ014772	techylectin-5B precursor	-2.20	0.0015515
41	CPIJ003007	elongase, putative	-2.20	0.0001074
42	CPIJ014557	Nitrilase and fragile histidine triad fusion protein	-2.09	0.0006073
43	CPIJ013919	Xanthine dehydrogenase/oxidase	-2.05	2.042e-13
44	CPIJ005214	Ceramide glucosyltransferase	-2.05	0.0001253

**Tabela 9**– Seleção de genes induzidos e reprimidos na colônia REC de *Culex quinquefasciatus*.

(conclusão)				
Nº	ID <sup>a</sup>	Anotação	(Log <sup>2</sup> )FC <sup>b</sup>	padj
<b>Reprimidos</b>				
45	CPIJ005656	Oxidoreductase	-2.05	0.0001543
46	CPIJ008807	ficolin-1 precursor	-2.04	0.0096032
47	CPIJ016855	CYP6N20: cytochrome P450 6N20	-2.04	2.242e-12
48	CPIJ015947	purine nucleoside phosphorylase	-2.04	0.0097905
49	CPIJ015241	Alkaline phosphatase	-2.04	0.0023775
50	CPIJ011728	Serine/threonine protein kinase	-2.03	0.0055666
51	CPIJ012888	rRNA processing protein Ebp2	-2.03	0.0066152
52	CPIJ008485	calponin/transgelin	-2.00	0.0068368

<sup>a</sup> Identidade do gene obtida no vectorbase<sup>b</sup> valor de expressão de Log2FoldChange

Fonte: a autora

**Tabela 10** – Seleção de genes induzidos e reprimidos na colônia REC-2 de *Culex quinquefasciatus*.

(continua)				
Nº	ID <sup>a</sup>	Anotação	(Log <sup>2</sup> )FC <sup>b</sup>	padj
<b>Induzidos</b>				
1	CPIJ013538	ficolin-1 precursor	4.57	3.672e-19
2	CPIJ002522	Serine 3-dehydrogenase	4.36	4.441e-17
3	CPIJ000344	39S ribosomal protein L24, mitochondrial precursor	4.03	4.940e-13
4	CPIJ010801	carboxypeptidase B precursor	3.93	3.766e-22
5	CPIJ006306	Ion channel nompc	3.46	1.890e-13
6	CPIJ012752	cysteine synthase	3.28	5.323e-22
7	CPIJ001812	Sugar transporter	2.92	7.349e-10
8	CPIJ004228	Lipase	2.84	2.628e-49
9	CPIJ005640	Heat shock protein 26	2.62	4.534e-07
10	CPIJ001747	tep3	2.43	7.289e-11
11	CPIJ010175	CYP9J48: cytochrome P450 9J48	2.32	0.0001785
12	CPIJ019874	salivary cysteine-rich peptide	2.31	1.558e-08
13	CPIJ004230	Lipase	2.31	3.809e-17
14	CPIJ010546	CYP9J34: cytochrome P450 9J34	2.19	9.397e-12
15	CPIJ020229	CYP4D42: cytochrome P450 4D42	2.14	4.342e-11
16	CPIJ007082	TIM: timeless circadian protein	2.09	2.191e-07
17	CPIJ017156	Ankyrin repeat and SOCS box protein 13	2.09	1.041e-05
18	CPIJ016697	Leukocyte elastase inhibitor	2.07	0.0003571
19	CPIJ040816	NA	2.03	0.0005858
20	CPIJ002609	protein serine/threonine kinase, putative	2.00	4.146e-08

**Tabela 10**– Seleção de genes induzidos e reprimidos na colônia REC-2 de *Culex quinquefasciatus*.  
(conclusão)

Nº	ID <sup>a</sup>	Anotação	(Log <sup>2</sup> )FC <sup>b</sup>	padj
<b>Reprimidos</b>				
1	CPIJ017593	pantetheinase precursor	-5.21	4.899e-28
2	CPIJ017592	Vanin-like protein 1 precursor, putative	-4.69	4.701e-20
3	CPIJ013173	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT	-3.99	7.265e-84
4	CPIJ018744	ankyrin 2,3/unc44	-3.69	4.729e-16
5	CPIJ012066	sodium/shloride dependent amino acid transporter	-3.68	7.563e-44
6	CPIJ005154	Nuclear transport factor 2	-3.47	1.871e-09
7	CPIJ012840	39S ribosomal protein L24, mitochondrial precursor	-3.42	3.784e-09
8	CPIJ014889	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	-3.29	2.193e-08
9	CPIJ012061	hyp37.3 putativesecreted salivary gland protein	-2.88	9.814e-08
10	CPIJ018624	Glutathione-s-transferase theta, gst	-2.84	1.586e-14
11	CPIJ012700	CHKov1, putative	-2.68	5.760e-11
12	CPIJ018326	Niemann-Pick Type C-2	-2.68	6.982e-18
13	CPIJ018626	Glutathione-s-transferase theta, gst	-2.67	3.292e-18
14	CPIJ016846	CYP6M13: cytochrome P450 6M13	-2.66	7.796e-06
15	CPIJ012829	Fibrinogen and fibronectin	-2.64	4.220e-19
16	CPIJ009924	ion channel nompc	-2.62	4.159e-05
17	CPIJ017634	Disulfide oxidoreductase	-2.43	0.0002261
18	CPIJ008729	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial	-2.40	8.923e-06
19	CPIJ019567	vegetatible incompatibility protein HET-E-1	-2.35	0.0001462
20	CPIJ000225	UDP-glucuronosyltransferase R-21	-2.32	7.588e-16
21	CPIJ011602	NADH-cytochrome b5 reductase	-2.30	0.0001313
22	CPIJ016639	acetyl-coa synthetase	-2.27	4.342e-11
23	CPIJ005656	Oxidoreductase	-2.27	2.144e-05
24	CPIJ002989	Oseg1	-2.27	0.0004924
25	CPIJ017473	Organic cation transporter	-2.26	3.656e-05
26	CPIJ007230	Regucalcin	-2.25	0.0005861
27	CPIJ017291	DNA damage-binding 1-like	-2.20	0.0011545
28	CPIJ016453	Acyl-coa dehydrogenase	-2.19	1.787e-06
29	CPIJ002676	Glutathione S-transferase D7	-2.17	1.338e-10
30	CPIJ013539	ankyrin repeat and SOCS box protein 10	-2.15	0.0016335
31	CPIJ010699	CecA1: Cecropin A	-2.10	0.0006551
32	CPIJ016852	CYP6N19: cytochrome P450 6N19	-2.07	4.013e-14
33	CPIJ012180	NPC2 homolog	-2.06	7.723e-28
34	CPIJ012065	tryptophan transporter	-2.04	7.395e-07
35	CPIJ003266	CCAAT/enhancer-binding protein	-2.03	0.0005037
36	CPIJ002911	retinoid-inducible serine carboxypeptidase	-2.02	3.028e-13
37	CPIJ004873	RING finger and SPRY domain-containing 1	-2.02	0.0004072

<sup>a</sup> Identidade do gene obtida no vectorbase

<sup>b</sup> valor de expressão de Log2FoldChange

Fonte: a autora

**Tabela 11**– Seleção de genes induzidos e reprimidos nas colônias REC e REC-2 de *Culex quinquefasciatus*.

Nº	ID <sup>a</sup>	Anotação	(Log <sup>2</sup> )FC <sup>b</sup>	padj
<b>Induzidos</b>				
1	CPIJ002535	CYP6AG9: cytochrome P450 6AG9	2.43	6.368e-13
2	CPIJ010067	ATP-binding cassette sub-family A member 3	2.09	1.347e-17
3	CPIJ040083	COX3: cytochrome c oxidase subunit III	2.06	0.0001128
4	CPIJ002066	alpha-galactosidase A precursor	2.05	1.475e-14
5	CPIJ010412	Fucosyltransferase 11	2.01	0.0001531
<b>Reprimidos</b>				
1	CPIJ003695	glucosyl/glucuronosyl transferases	-4.21	1.613e-23
2	CPIJ006124	prolylcarboxypeptidase, putative	-3.72	1.540e-36
3	CPIJ013538	ficolin-1 precursor	-2.75	2.305e-09
4	CPIJ013880	Heat shock protein 67B2	-2.18	1.302e-12
5	CPIJ001464	alpha-amylase A precursor	-2.15	5.268e-37

<sup>a</sup> Identidade do gene obtida no vectorbase

<sup>b</sup> valor de expressão de Log2FoldChange

Fonte: a autora

#### 8.5.4 Enriquecimento funcional de vias metabólicas KEGGs

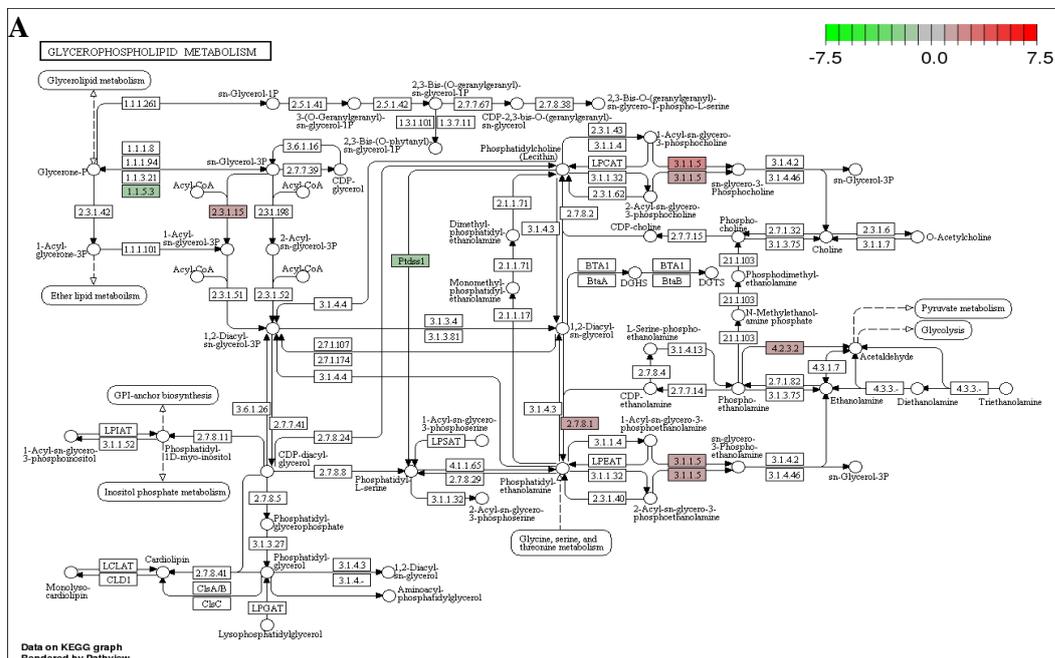
Os transcritos foram anotados contra o banco de dados do VectorBase através da linguagem de programação R, utilizando o pacote *pathview* do Bioconductor sendo assim possível fazer uma análise de enriquecimento funcional para identificar vias metabólicas disponíveis no banco de dados KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) que estão significativamente super- ou sub-representadas entre os genes diferencialmente expressos (DEGs) nas colônias analisadas e entre as colônias resistentes. Nesta análise é possível determinar vias metabólicas que possuem genes com expressão diferencial, fornecendo uma visão do perfil a partir de processos fisiológicos. A análise da colônia REC x S mostrou que os DEGs foram mapeados em 97 vias metabólicas, das quais 52 foram consideradas significativas. Destas, 19 apresentaram termos enriquecidos no perfil de sub expressão e 33 associados ao perfil de super expressão (Quadro 4). Na colônia REC, destacam-se as vias envolvidas no metabolismo de lipídeos, tais como *Glycerophospholipid metabolism* (0564), *Glycosphingolipid metabolism* (0603), *Sphingolipid metabolism* (0600), *Glycerolipid metabolism* (0561), *Biosynthesis of unsaturated fatty acids* (1040) e *Ether lipid metabolism* (0565). Além destas, outras vias foram evidenciadas, como *FoxO* (4068), envolvido em processos fisiológicos como apoptose, controle do ciclo celular e metabolismo de glicose, *Metabolism of Xenobiotics by cytochrome P450* (00980) e *Drug metabolism – P450* (00982),

que compreendem a detoxificação metabólica. Uma representação de vias KEGG induzido (Figura 24 A) e reprimida na colônia REC (Figura 24 B) podem ser observados como exemplo.

Para a REC-2 x S, 70 vias foram mapeadas no total, dessas, 62 foram significativas, e 28 vias apresentaram termos enriquecidos no perfil reprimido e 34 associadas ao perfil induzido (Quadro 5). Dentre as vias que destacaram-se na colônia REC-2 também encontram-se algumas vias de metabolismo de lipídeos observados na colônia REC, porém em menor quantidade. Há também a via *Cysteine and methionine metabolismo*, que participam da metilação do DNA para regulação da expressão gênica. Na análise das colônias REC x REC-2 de um total de 71 vias mapeadas, 55 vias foram significativas, das quais 34 vias apresentaram termos enriquecidos para a colônia REC (super-representadas) e 21 para a colônia REC-2 (sub-representadas; Quadro 6). Nesta análise, as vias mais importantes da colônia REC, além das supracitadas relativas ao metabolismo de lipídeos, foram algumas vias envolvidas na replicação e reparo do DNA, tais como *DNA replication* (03030), *Mismatch repair* (03430), *Homologous recombination* (3440), *fanconi anemia pathway* (03460) e *Nucleotide excision repair*. Também foram encontradas vias envolvidas na transcrição e tradução, *Ribosome biogenesis in eukaryotes* (03008), *Aminoacyl-tRNA biosynthesis* (0970) e *Spliceosome* (03040).

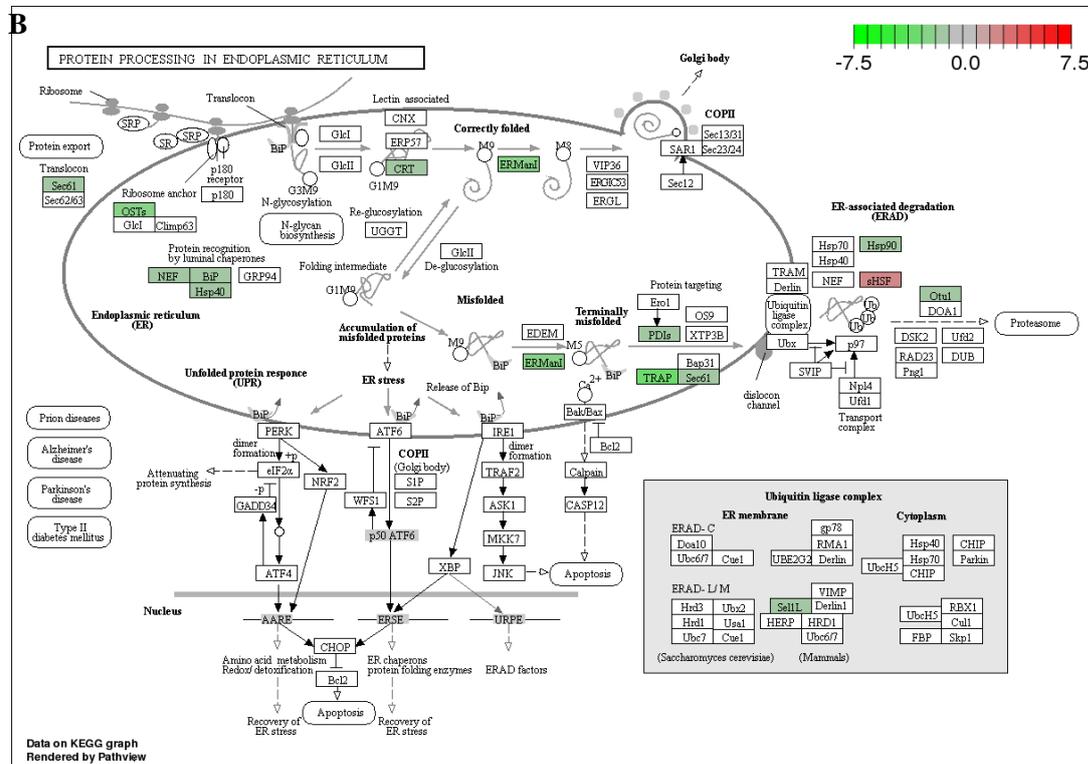
**Figura 24** - Exemplos de vias metabólicas geradas pelo KEGG que exibem um conjunto de genes com expressão diferencial em larvas de *Culex quinquefasciatus* resistentes ao *Lysinibacillus sphaericus* da colônia REC.

(continua)



**Figura 24** - Exemplos de vias metabólicas geradas pelo KEGG que exibem um conjunto de genes com expressão diferencial em larvas de *Culex quinquefasciatus* resistentes ao *Lysinibacillus sphaericus* da colônia REC.

(conclusão)



Fonte: a autora

Legenda: A. Via Glycerophospholip metabolism n°. 00564. B. via Protein Processing in endoplasmic reticulum n°. 04141.

**Quadro 4** – Termos KEGG enriquecidas da colônia REC em relação a colônia susceptível.

(continua)

Termo KEGG	Hits	ID	P-adj	Classificação KEGG
<b>Super-representadas</b>				
<b>METABOLISMO</b>				
Carbon metabolism	2	1200	0,0190	Global
Microbial metabolism in diverse environments	4	1120	0,0005	
Biosynthesis of amino acids	2	1230	0,0131	
2-Oxocarboxylic acid metabolism	1	1210	0,0376	
Pentose phosphate pathway	1	0030	0,0478	Carboidrato
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	1	0630	0,0478	
Galactose metabolism	1	0052	0,0498	

**Quadro 4** – Termos KEGG enriquecidas da colônia REC em relação a colônia susceptível.

(continua)

<b>Termo KEGG</b>	<b>Hits</b>	<b>ID</b>	<b>P-adj</b>	<b>Classificação KEGG</b>
Glycerophospholipid metabolism	5	0564	0,0005	Lipídeo
Glycosphingolipid biosynthesis - globo series	2	0603	0,0015	
Sphingolipid metabolism	2	0600	0,0049	
Glycerolipid metabolism	2	0561	0,0051	
alpha-Linolenic acid metabolism	1	0592	0,0355	
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	1	1040	0,0413	
Ether lipid metabolism	1	0565	0,0478	
Cysteine and methionine metabolism	2	0270	0,0039	Aminoácido
Glycine, serine and threonine metabolism	2	0260	0,0057	
Tryptophan metabolism	1	0380	0,0498	
Glutathione metabolism	3	0480	0,0006	Outros Aminoácidos
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	1	0471	0,0156	
Taurine and hypotaurine metabolism	1	0430	0,0355	
Mucin type O-Glycan biosynthesis	1	0512	0,0376	Biosíntese de Glicanos
Folate biosynthesis	2	0790	0,0015	Co-fatores e vitaminas
Lipoic acid metabolism	1	0785	0,0156	
Nicotinate and nicotinamide metabolism	1	0760	0,0376	
Insect hormone biosynthesis	1	0981	0,0413	Terpenoides e poliquetóides
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	1	0980	0,0478	Biodregação de Xenobióticos
Drug metabolism - cytochrome P450	1	0982	0,0478	
<b>PROCESSAMENTO DA INFORMAÇÃO GENÉTICA</b>				
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	7	0970	0,00004	Tradução
Ribosome biogenesis in eukaryotes	7	3008	0,00007	
Sulfur relay system	1	4122	0,03557	Dobramento, classificação e degradação
<b>PROCESSAMENTO DA INFORMAÇÃO AMBIENTAL</b>				
ABC transporters	2	2010	0,00153	Transporte transmembrana
FoxO signaling pathway	2	4068	0,01311	Transdução de sinais
<b>PROCESSOS CELULARES</b>				
Peroxisome	2	4146	0,01564	Transporte e catabolismo
Lysosome	2	4142	0,01611	
<b>Termo KEGG</b>	<b>Hits</b>	<b>ID</b>	<b>P-adj</b>	<b>Classificação KEGG</b>
<b>Sub-representadas</b>				
<b>METABOLISMO</b>				
Microbial metabolism in diverse environments	7	1120	0,00005	Global
Carbon metabolism	5	1200	0,00008	
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	3	0520	0,00371	Carboidrato
Butanoate metabolism	2	0650	0,00597	
Fatty acid metabolism	3	1212	0,00255	Lipídeo
Purine metabolism	7	0230	0,00004	Nucleotídeos
Pyrimidine metabolism	5	0240	0,00084	
Valine, leucine and isoleucine degradation	3	0280	0,00158	Aminoácido
Glutathione metabolism	3	0480	0,00272	Outros Aminoácidos

**Quadro 4** – Termos KEGG enriquecidas da colônia REC em relação a colônia susceptível.  
(conclusão)

<b>Termo KEGG</b>	<b>Hits</b>	<b>ID</b>	<b>P-adj</b>	<b>Classificação KEGG</b>
N-Glycan biosynthesis	4	0510	0,00008	Biosíntese de Glicanos
<b>PROCESSAMENTO DA INFORMAÇÃO GENÉTICA</b>				
Protein processing in endoplasmic reticulum	13	4141	0,00005	Dobramento, classificação e degradação
Proteasome	4	3050	0,00084	
<b>PROCESSOS CELULARES</b>				
Peroxisome	4	4146	0,00054	Transporte e catabolismo

Fonte: a autora

**Quadro 5** – Termos KEGG enriquecidos da colônia REC-2 em relação à colônia suscetível.  
(continua)

<b>Termo KEGG</b>	<b>Hits</b>	<b>ID</b>	<b>P-adj</b>	<b>Classificação KEGG</b>
<b>Super-representadas</b>				
<b>METABOLISMO</b>				
Microbial metabolism in diverse environments	4	1120	0,0020	Global
Biosynthesis of amino acids	1	1230	0,0415	
Ascorbate and aldarate metabolism	1	0053	0,0300	Carboidrato
Pentose phosphate pathway	1	0030	0,0300	
Pentose and glucuronate interconversions	1	0040	0,0300	
Propanoate metabolism	1	0640	0,0300	
Glycolysis / Gluconeogenesis	1	0010	0,0341	
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	1	0520	0,0415	
Pyruvate metabolism	1	0620	0,0341	
Glycerolipid metabolism	1	0561	0,0340	Lipídeo
Fatty acid degradation	1	0071	0,0340	
Glycerophospholipid metabolism	1	0564	0,0415	
Histidine metabolism	1	0340	0,0300	Aminoácido
Phenylalanine metabolism	1	0360	0,0300	
Tyrosine metabolism	1	0350	0,0300	
Cysteine and methionine metabolism	2	0270	0,0016	
Tryptophan metabolism	1	0380	0,0300	
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	1	0250	0,0340	
Lysine degradation	1	0310	0,0340	
Glycine, serine and threonine metabolism	1	0260	0,0341	
Valine, leucine and isoleucine degradation	1	0280	0,0341	
Arginine and proline metabolism	1	0330	0,0377	
Taurine and hypotaurine metabolism	1	0430	0,0300	Outros Aminoácidos
Glutathione metabolism	2	0480	0,0046	
beta-Alanine metabolism	1	0410	0,0300	Co-fatores e vitaminas
Folate biosynthesis	1	0790	0,0300	
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	1	0130	0,0300	Biodregadação de Xenobióticos
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	1	0980	0,0300	
Drug metabolism - cytochrome P450	1	0982	0,0300	

**Quadro 5** – Termos KEGG enriquecidos da colônia REC-2 em relação à colônia suscetível.  
(conclusão)

Termo KEGG	Hits	ID	P-adj	Classificação KEGG
<b>PROCESSAMENTO DA INFORMAÇÃO AMBIENTAL</b>				
ABC transporters	1	2010	0,0300	Transporte transmembrana
Hippo signaling pathway - fly	1	4391	0,0415	Transdução de sinais
FoxO signaling pathway	1	4068	0,0415	
Neuroactive ligand-receptor interaction	1	4080	0,0340	Moléculas sinalizadoras e interação
<b>Sub-representadas</b>				
<b>METABOLISMO</b>				
Carbon metabolism	4	1200	0,0003	Global
Microbial metabolism in diverse environments	4	1120	0,0001	
2-Oxocarboxylic acid metabolism	2	1210	0,0006	
Biosynthesis of amino acids	2	1230	0,0075	
Propanoate metabolism	2	0640	0,0016	Carboidrato
Pyruvate metabolism	2	0620	0,0040	
Pentose phosphate pathway	1	0030	0,0400	
Butanoate metabolism	1	0650	0,0400	
Citrate cycle (TCA cycle)	1	0020	0,0521	
Glycolysis / Gluconeogenesis	1	0010	0,0553	
Fatty acid biosynthesis	1	0061	0,0262	Lipídeo
Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series	1	0604	0,0262	
Sphingolipid metabolism	1	0600	0,0521	
Pyrimidine metabolism	2	0240	0,0150	Nucleotídeo
Purine metabolism	2	0230	0,0262	
Valine, leucine and isoleucine degradation	2	0280	0,0040	Aminoácido
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	1	0290	0,0098	
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	1	0250	0,0521	
Glutathione metabolism	3	0480	0,0002	Outros Aminoácidos
beta-Alanine metabolism	1	0410	0,0400	
Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	1	0563	0,0487	Biosíntese de Glicano
Pantothenate and CoA biosynthesis	1	0770	0,0306	Co-fatores e vitaminas
Folate biosynthesis	1	0790	0,0374	
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	1	0980	0,0400	Biodregadação de Xenobióticos
Drug metabolism - cytochrome P450	1	0982	0,0400	
<b>PROCESSAMENTO DA INFORMAÇÃO GENÉTICA</b>				
RNA polymerase	1	3020	0,0521	Transcrição
Protein processing in endoplasmic reticulum	2	4141	0,0262	Dobramento, classificação e degradação

Fonte: a autora

**Quadro 6** – Termos KEGG enriquecidos da colônia REC em relação a colônia REC-2.

(continua)

Termo KEGG	Hits	ID	P-adj	Classificação KEGG
<b>Super-representadas</b>				
<b>METABOLISMO</b>				
Butanoate metabolism	1	0650	0,0307	Carboidrato
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	1	0630	0,0307	
Propanoate metabolism	1	0640	0,0307	
Galactose metabolism	1	0052	0,0307	
Pyruvate metabolism	1	0620	0,0420	
Glycerolipid metabolism	2	0561	0,0030	Lipídeo
Fatty acid degradation	2	0071	0,0030	
Fatty acid metabolism	2	1212	0,0038	
Glycerophospholipid metabolism	2	0564	0,0047	
Synthesis and degradation of ketone bodies	1	0072	0,0190	
Glycosphingolipid biosynthesis - globo series	1	0603	0,0307	
Fatty acid elongation	1	0062	0,0307	
Sphingolipid metabolism	1	0600	0,0380	
Tryptophan metabolism	1	0380	0,0307	Aminoácidos
Lysine degradation	1	0310	0,0380	
Valine, leucine and isoleucine degradation	1	0280	0,0420	
N-Glycan biosynthesis	1	0510	0,0420	Biosíntese de Glicanos
Insect hormone biosynthesis	1	0981	0,0307	Terpenoides e poliquetídeos
Terpenoid backbone biosynthesis	1	0900	0,0307	
<b>PROCESSAMENTO DA INFORMAÇÃO GENÉTICA</b>				
Homologous recombination	2	3440	0,0030	Replicação e reparo
Fanconi anemia pathway	2	3460	0,0035	
Mismatch repair	1	3430	0,0307	
DNA replication	1	3030	0,0420	
Nucleotide excision repair	1	3420	0,0425	
<b>PROCESSAMENTO DA INFORMAÇÃO AMBIENTAL</b>				
ABC transporters	1	2010	0,0307	Transporte transmembrana
MAPK signaling pathway - fly	1	4013	0,0307	Trandução de sinais
FoxO signaling pathway	1	4068	0,0531	
Wnt signaling pathway	1	4310	0,0545	
<b>PROCESSOS CELULARES</b>				
Lysosome	2	4142	0,0072	Transporte e catabolismo
Regulation of autophagy	1	4140	0,0307	
Proteasome	1	3050	0,0425	
Phagosome	1	4145	0,0531	
Peroxisome	1	4146	0,0596	
<b>Sub-representadas</b>				
<b>METABOLISMO</b>				
Microbial metabolism in diverse environments	2	1120	0,0202	Global
Galactose metabolism	1	0052	0,0337	Carboidrato

**Quadro 6**– Termos KEGG enriquecidos da colônia REC em relação a colônia REC-2.

(conclusão)

Termo KEGG	Hits	ID	P-adj	Classificação KEGG
Cysteine and methionine metabolism	2	0270	0,0024	Aminoácidos
Phenylalanine metabolism	1	0360	0,0240	
Lysine degradation	1	0310	0,0429	
Glycine, serine and threonine metabolism	1	0260	0,0465	
Valine, leucine and isoleucine degradation	1	0280	0,0484	
Arginine and proline metabolism	1	0330	0,0527	
Glutathione metabolism	2	0480	0,0047	Outros aminoácidos
beta-Alanine metabolism	1	0410	0,0323	
Glycosaminoglycan biosynthesis	1	0532	0,0202	Biosíntese de Glicanos
Terpenoid backbone biosynthesis	1	0900	0,0323	Terpenoides e poliquetídios
Caffeine metabolism	1	0232	0,0082	Biosíntese de metabólitos secundários
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	1	0980	0,0323	Biodegradação de Xenobióticos
Drug metabolism - cytochrome P450	1	0982	0,0323	
<b>PROCESSAMENTO DA INFORMAÇÃO GENÉTICA</b>				
Spliceosome	2	3040	0,0202	Transcrição
Ribosome	3	3010	0,0024	Tradução
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	2	0970	0,0047	
Sulfur relay system	1	4122	0,0236	Dobramento, classificação e degradação
Ribosome biogenesis in eukaryotes	3	3008	0,0015	

Fonte: a autora

### 8.5.5 Enriquecimento funcional de interações proteína-proteína

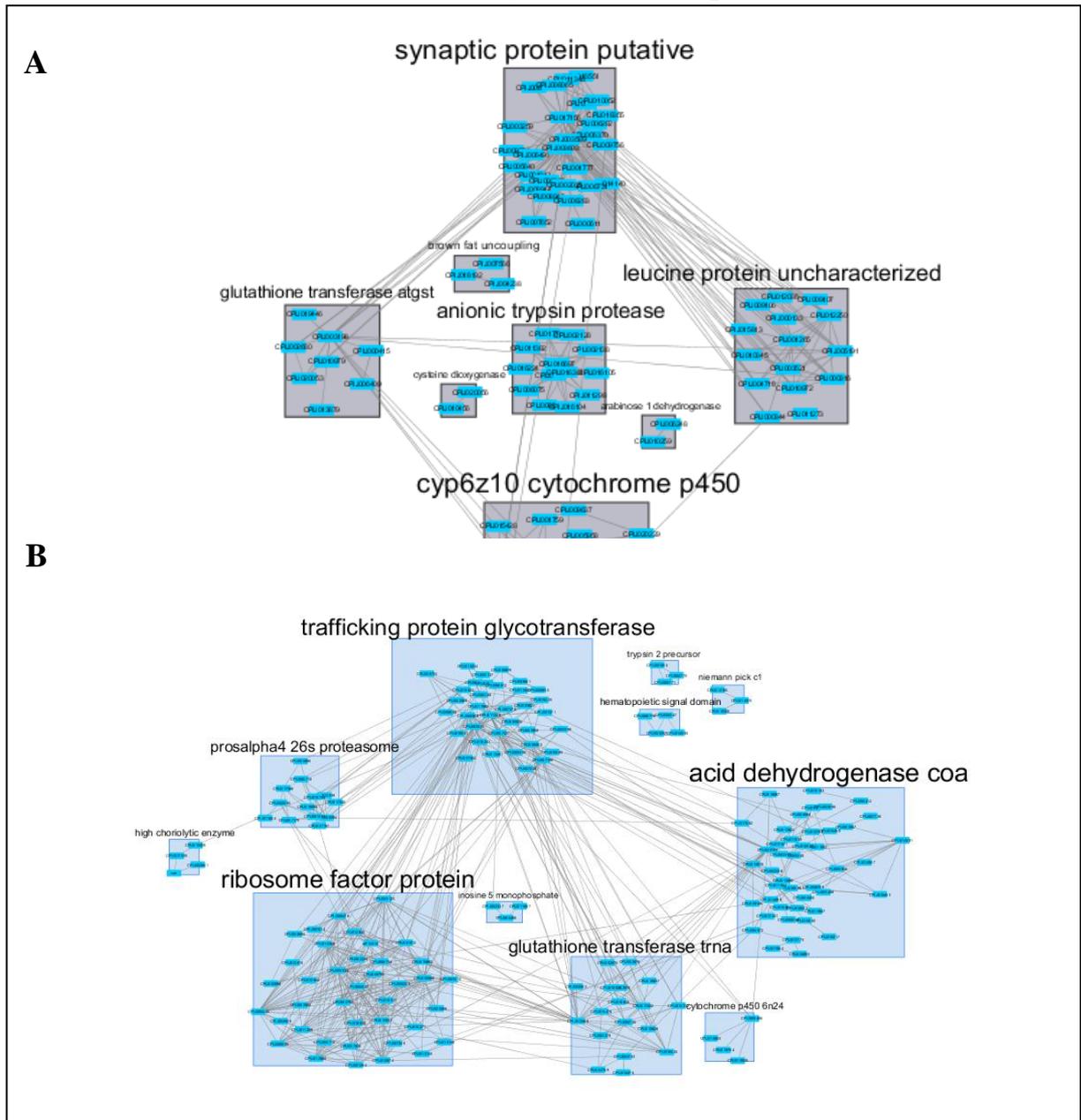
A interação funcional dos DEGs proteína-proteína foi avaliada pelo STRINGdb. Os clusters e suas interações foram formados a partir dos dados obtidos de super e sub-expressão (Figura 25, 26 e 27), nomeados de acordo com a metodologia descrita no item 7.9. Os genes induzidos da colônia REC x S agruparam-se em oito clusters (Figura 25 A) e o que teve um maior número de genes foi o “Synaptic protein putative” (n= 28). Este cluster possui diversos genes relacionados ao transporte de açúcares, proteases e proteínas envolvidas no reconhecimento de substratos fosfoprotéicos e observa-se que ele possui uma extensa rede de interações com outros clusters. O segundo cluster super-expresso que teve um grande número de proteínas foi o “cyp6z10 cytochrome p450” (n=25), que contém várias proteínas envolvidas na detoxificação metabólica, proteínas de transporte de substâncias através da membrana e proteínas do metabolismo de lipídeos, corroborando dados anteriores. No grupo

reprimido, o painel foi distinto e os genes se agruparam em 11 clusters (Figura 25 B). O cluster que obteve um maior número de genes foi “acid dehydrogenase coa” (n=44), que inclui o receptor *cqm1* *Neutral basic amino acid transport protein rBat* e proteínas de síntese de ácidos graxos. Outro cluster de destaque foi o “ribosome fator protein” (n=38), no qual possui vários genes referente a síntese proteica.

Os genes induzidos da colônia REC-2 x S foram agrupados em cinco *clusters* (Figura 26 A), com destaque para o “synaptic vesicle protein” (n=21), que contem genes associados ao transporte de açúcar, metabolismo de lipídeos e genes de sinalização celular. Outro cluster que teve mais genes super-expresso foi “alkaline phosphatase putative” (n=16), com genes de proteínas motoras e proteases. Em sub-expressão, agruparam-se em nove clusters (Figura 26 B), e o que possui um maior número de genes é “glutathione transferase d7” (n=21), que tem um grande número de genes associados a enzimas detoxificadoras.

Na análise comparativa entre as colônias REC e REC-2, o padrão de cluster é menos complexo em termo de número de clusters, genes componentes e redes de interação entre estes clusters. No grupo super-expresso não há interação entre os clusters encontrados e foram agrupados em oito clusters (Figura 27 A), onde o grupo com maior quantidade de genes foi “toll9 protein tyrosine” (n=8), que contém genes envolvidos na sinalização transmembrana. No grupo reprimido, os genes agruparam-se em nove clusters (Figura 27 B), no qual “arginine splicing fator” (n=8) possui o maior número de genes, destacando genes envolvidos na estabilidade genômica e regulação da expressão gênica. Nos anexos C, D e E é possível observar a lista de genes e seus respectivos clusters.

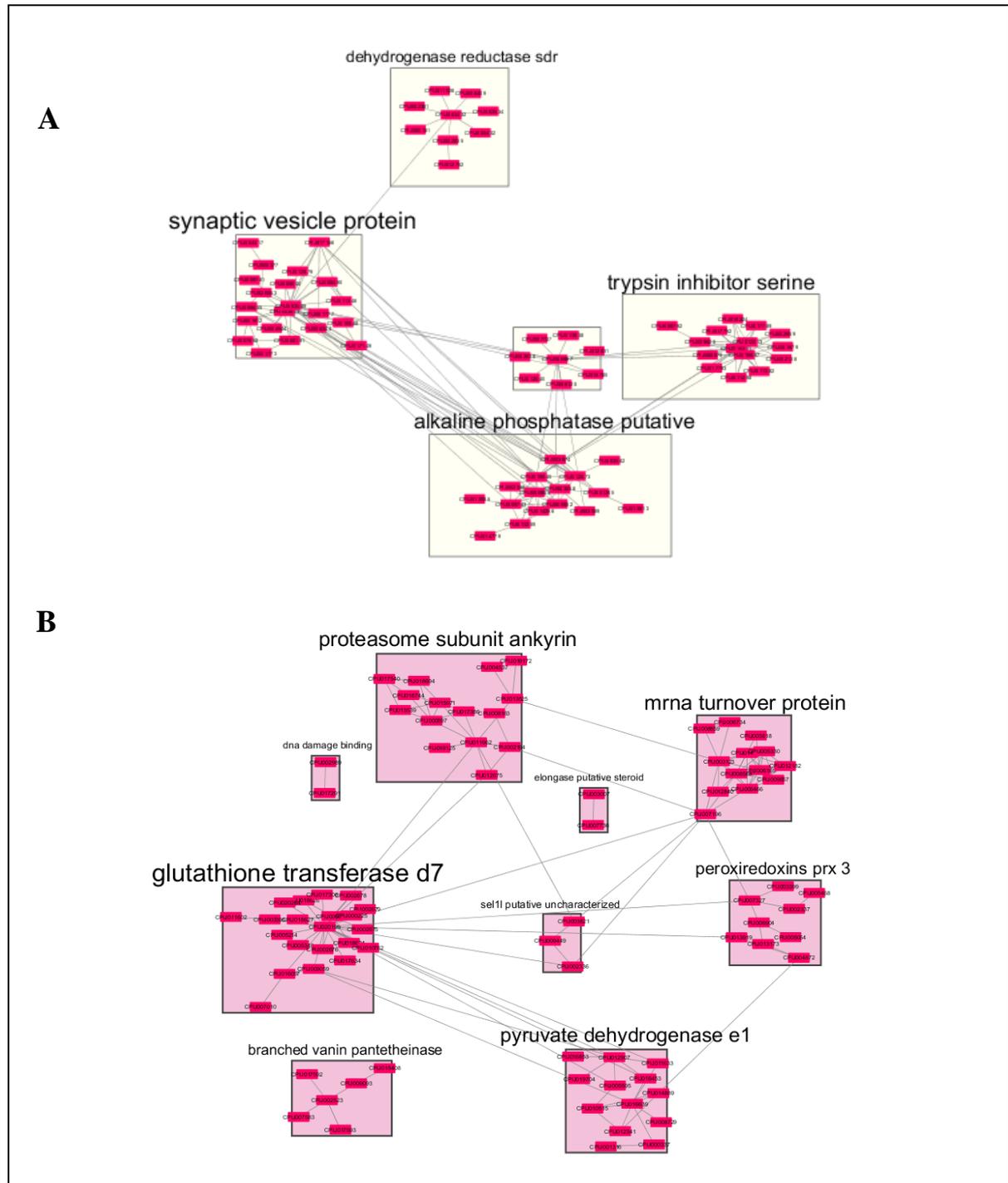
**Figura 25** - Clusters do STRING que mostram a interação funcional proteína-proteína em larvas de *Culex quinquefasciatus* da colônia REC em relação à colônia Susceptível.



Fonte: a autora

Legenda: A. Induzidos. B. Reprimidos.

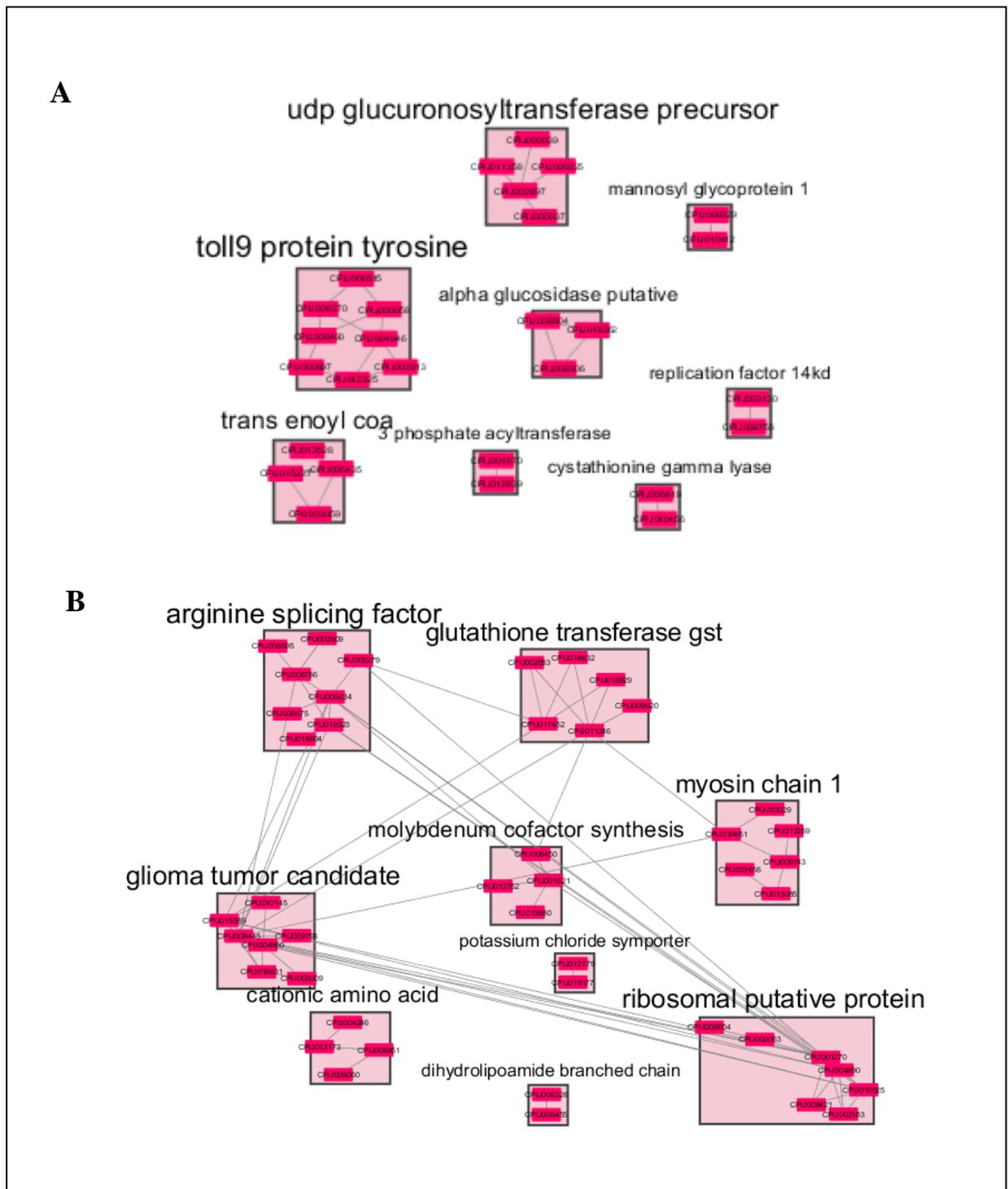
**Figura 26** - Clusters do STRING que mostram a interação funcional proteína-proteína em larvas de *Culex quinquefasciatus* da colônia REC-2 em relação à colônia Susceptível.



Fonte: a autora

Legenda: A. Induzidos. B. Reprimidos.

**Figura 27** - Clusters do STRING que mostram a interação funcional proteína-proteína em larvas de *Culex quinquefasciatus* da análise da colônia REC X REC-2.



Fonte: a autora

Legenda: A. Induzidos. B. Reprimidos.

## 9 DISCUSSÃO

No contexto de alelos de resistência de *Culex quinquefasciatus* à toxina Bin, principal composto ativo de *Lysinibacillus sphaericus*, a compreensão das características e capacidade adaptativa desses alelos é importante para a definição de estratégias que visem evitar a seleção destes alelos em campo, sobretudo naquelas áreas onde inseticidas a base de *L. sphaericus* vem sendo utilizados, a exemplo da RMR.

### 9.1 Análise de fenótipo de resistência conferido pelos alelos

A primeira parte deste estudo visou determinar e quantificar o fenótipo de resistência para o *L. sphaericus* 2362 conferido pelos alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>*. Nossos resultados demonstraram que o nível de resistência à toxina Bin exibido pelas larvas homozigotas para cada alelo é equivalente, portanto, não há uma vantagem para quaisquer destes alelos em relação ao fenótipo conferido por eles. Este resultado corrobora o fato dos alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* apresentarem o mesmo mecanismo de resistência à esta toxina pois as mutações impedem a expressão do receptor Cqm1 ancorado ao epitélio, provocando um nível de refratoriedade elevado e similar, apesar de terem mutações diferentes (CHALEGRE et al., 2015). Este aspecto foi investigado devido a dados na literatura apontarem que a substituição de alelos em uma população pode ocorrer quando um dos alelos pode conferir uma melhoria no fenótipo de resistência em relação a outro. Isto foi observado em estudos de alelos de resistência do gene de esterases de *C. quinquefasciatus* para organofosforados. Em uma população da França, no decorrer de anos de tratamento, houve dois eventos de sucessão de alelos, o alelo *Ester<sup>4</sup>* substituiu o *Ester<sup>1</sup>* por conferir um melhor fenótipo e em seguida o alelo *Ester<sup>4</sup>* foi substituído pelo alelo *Ester<sup>2</sup>* (GUILLEMAUD et al., 1998; LABBÈ et al., 2009). Em populações de *C. quinquefasciatus* na China, esse efeito também foi observado pois uma análise revelou quatro alelos de resistência do locus *Ester* e alguns anos depois do tratamento, apenas dois destes alelos (*Ester<sup>b1</sup>* e *Ester<sup>2</sup>*) foram encontrados (LIU et al., 2011), sugerindo que houve uma competição e seleção daqueles alelos que conferem mais vantagem naquela dada situação. Entretanto no nosso modelo a sucessão de alelos não está relacionada a uma melhoria do fenótipo de resistência, e é possível que a sucessão tenha ocorrido em função de outros aspectos avaliados e discutidos adiante.

A mortalidade encontrada na maior concentração de *Lysinibacillus sphaericus* 2362 testada nesse trabalho (50 mg/L), cerca de 10% foi similar àquela encontrada por Chalegre et al. (2015), usando uma concentração de 100 mg/L. Estes resultados levaram a estimativas de valores de razões de resistência (RR) ao *L. sphaericus* da ordem de 100.000 vezes (PEI et al., 2002; WIRTH et al., 2000), pois empregaram altas doses do *L. sphaericus* e não alcançam uma alta mortalidade. No entanto os resultados de nosso estudo mostrou um possível artefato nestas avaliações prévias, pois, doses excessivamente altas eram inversamente proporcionais à mortalidade, contrariamente ao esperado. Uma hipótese seria que a alta concentração de cristais e esporos em suspensão, poderia causar sua agregação formando partículas de grande tamanho dificultando a ingestão pelas larvas, que se alimentam por filtração. Portanto os resultados deste estudo demonstram que a estimativa da razão de resistência para estas colônias deve ser feita a partir da CL<sub>50</sub>, que podem representar melhor a razão e resistência destas larvas visto que os valores são obtidos dentro de padrão de resposta de mortalidade que foi dose dependente.

O valor de RR estimado a partir da CL<sub>50</sub> neste estudo (RR=3.500) foi menor do que alguns registros prévios em que os valores de RR estimados a partir da CL<sub>90</sub> foram de 100.000 e 40.000 (AMORIM et al., 2007; PEI et al., 2002; WIRTH et al., 2000). Entretanto o nível de resistência de larvas homozigotas para qualquer dos alelos de qualquer das estimativas (ex. RR=3.500, 100.000) é, de qualquer forma, muito elevado e causa refratariedade total, visto que o mecanismo de resistência é a ausência de ligação da toxina com o seu sítio alvo, o receptor Cqm1. O mecanismo de alteração de sítio-alvo, causado por mutações em genes que codificam a proteína-alvo dos inseticidas, impedindo ou dificultando essa ligação é um dos mecanismos de resistência a inseticidas químicos mais amplamente descritos na literatura, (BRAGA; VALLE, 2007; HEMINGWAY; RANSON, 2000). Neste contexto é importante destacar que o mecanismo de alteração de sítio alvo que causa resistência à toxina Bin descrito neste estudo tem consequências drásticas, pois leva à refratariedade dos insetos à toxina. No caso de mecanismos de sítio alvo relacionado à resistência à químicos, são detectadas perdas de suscetibilidade bem mais discretas da ordem de dezenas ou centenas de vezes (ARAÚJO et al., 2013; DINIZ et al., 2015; MELO-SANTOS et al., 2010). Isso ocorre, pois, as mutações encontradas não causam uma perda do receptor, a exemplo de nosso modelo, mas as mutações no receptor reduzem ou dificultam a sua ligação aos inseticidas, provocando uma perda apenas parcial. Inclusive são escassos os trabalhos que demonstram o efeito da mutação na própria capacidade de ligação com o receptor. Um estudo

realizado com *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, demonstrou que a ligação de piretróides com dois sítios receptores em um canal de sódio de quatro domínios é essencial para bloquear estes canais e agir na ação inseticida ( DU et al., 2013), evidenciando este mecanismo ao nível molecular. Como não há muitos estudos que comprovem esta ligação, na maioria dos casos, é feita apenas uma associação entre a mutação no sítio alvo e a perda de susceptibilidade e subentende-se que a mutação reduziu a ligação do inseticida ao alvo (RINKEVITCH; DU; DONG; 2013).

## 9.2 Desempenho dos indivíduos portadores dos alelos

Uma vez que os alelos conferem o mesmo fenótipo, e essa não foi a razão para que o alelo *cqmI<sub>REC-2</sub>* sucedesse o alelo *cqmI<sub>REC</sub>* na colônia R2362, foram realizados ensaios de desempenho biológico dos indivíduos portadores destes alelos, sob diferentes condições, na tentativa de identificar a sua capacidade adaptativa.

Na primeira avaliação a evolução dos alelos, sua frequência e genótipos, foi registrada em indivíduos de uma subcolônia heterozigota REC-REC-2 mantida por 20 gerações e submetida ao tratamento com o *L. sphaericus* (sob pressão de seleção) e redução populacional. Nesta análise em que os alelos tiveram frequência inicial idêntica na F<sub>1</sub> observou-se que o alelo *cqmI<sub>REC</sub>* assumiu uma frequência majoritária em todas as gerações a partir da F<sub>7</sub>. Esta avaliação foi de longa duração, e a colônia foi mantida em condições de manutenção de densidade e alimentação consideradas ótimas e sob pressão de seleção com o *L. sphaericus*. Este resultado foi similar à avaliação prévia feita por Chalegre et al. (2015), sendo que a colônia teste foi mantida sob as mesmas condições, mas sem pressão de seleção. Em ambas as análises o alelo *cqmI<sub>REC</sub>*, predominou indicando uma vantagem adaptativa sob estas condições, e o efeito de pressão de seleção não foi determinante para sua seleção. Durante a avaliação desta subcolônia, o efeito *bottleneck* provocado no número de adultos que formaram a geração parental F<sub>11</sub> teve uma repercussão bastante crítica na colônia. Os adultos F<sub>11</sub> acasalaram e produziram milhares de larvas que se desenvolveram com sucesso, mas houve uma mortalidade drástica de 98% de adultos da geração F<sub>12</sub> que ocorreu após o repasto sanguíneo. As frequências alélica e genotípica dos sobreviventes mostram que apesar do pequeno número analisado (15 de 21 indivíduos) o alelo *cqmI<sub>REC</sub>* teve mais uma vez vantagem adaptativa em resposta a esta condição.

A avaliação de competição dos alelos de longa duração mostrou a vantagem do alelo *cqm1<sub>REC</sub>*, entretanto, este resultado não explica como ocorreu substituição do alelo *cqm1<sub>REC</sub>* pelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* detectada na colônia R2362, a partir da qual eles foram selecionados e identificados (CHALEGRE et al., 2015). Nesta colônia os alelos co-existiam e foram selecionados, mas no início, o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* tinha a maior frequência inicial sendo substituído pelo alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* ao longo das gerações. Assim outra avaliação foi feita para analisar o impacto de dois fatores principais, a alta densidade larvária e baixa disponibilidade de alimento durante ensaios de curta duração (18 dias). Estas condições foram escolhidas, pois podem ocorrer ao longo da manutenção da colônia e ter influenciado a dinâmica dos alelos. A taxa de produção de adultos, a partir de larvas submetidas à alta densidade e baixa disponibilidade de alimento mostram uma clara vantagem de indivíduos homozigotos para o alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>*. Estes dados sugerem fortemente que ao longo da manutenção de colônias no insetário um ou os dois fatores avaliados foram responsáveis pelo aumento da frequência do *cqm1<sub>REC-2</sub>*, visto que indivíduos portando este alelo têm uma significativa vantagem de sobrevivência sob estas condições. Portanto os dados deste estudo identificaram variáveis que determinam vantagem para cada alelo e podem contribuir na informação do que pode ocorrer no campo, pois, os indivíduos podem ser submetidos a situações adversas e não controladas. Deve ser lembrado que *C. quinquefasciatus* é um organismo *r*-estrategista que possui uma intensa dinâmica populacional com elevações e reduções drásticas de densidade, alta capacidade reprodutiva, alta capacidade de colonização de habitats instáveis e outros fatores que podem influenciar a dinâmica destes alelos na população (REGIS et al., 2001).

É importante ressaltar que em *screenings* dos alelos *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* em populações da região metropolitana do Recife, o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* foi encontrado em quatro populações que não possuem histórico de tratamento com *L. sphaericus*, com frequências na ordem de  $10^{-3}$  e  $10^{-2}$  e em uma população tratada com *L. sphaericus*, na frequência de  $10^{-2}$  (CHALEGRE et al., 2012). Enquanto que no *screening* realizado nestas mesmas populações, revelou que o alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* foi detectado em apenas uma dessas populações não tratadas com frequência na ordem de  $10^{-3}$  (MENEZES et al., 2016). Sendo assim, estes estudos sugerem que o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* parece ter uma maior adaptação nas populações de campo analisadas e os achados deste estudo apontam que a seleção e aumento da frequência do *cqm1<sub>REC-2</sub>* também pode ocorrer e ser favorecida sob certas condições específicas o que, possivelmente, deve ter ocorrido na colônia R2362.

A densidade, quantidade e qualidade de alimento são fatores fundamentais para o bom desenvolvimento das larvas (BERGO et al., 1990; GMINIG et al., 2002). A densidade larval é um aspecto primordial para propiciar um desenvolvimento homogêneo, pois a alta densidade de larvas gera competição por espaço e por alimento, fatores que influenciam no tempo de desenvolvimento pré-imaginal, no tamanho dos indivíduos e no processo de pupação (BESERRA; FERNANDES; RIBEIRO, 2009; LÉONARD; JULIANO, 1995). Um estudo realizado visando avaliar a influência da densidade no desenvolvimento e tamanho de adultos de *Aedes aegypti*, mostrou que há uma relação inversamente proporcional entre a densidade larval e o tamanho dos adultos obtidos (GAMA et al., 2005). Além disso, outros estudos sugerem que a variação no tamanho dos mosquitos é de significância epidemiológica, porque tem sido relacionada com a capacidade de dispersão de vôo, fecundidade e longevidade (HARAMIS; 1983; SIEGEL et al., 1992).

No âmbito destes ensaios de competição foi possível obter outras informações relevantes sobre o impacto das condições testadas. O primeiro foi a ausência de influência do tratamento ou da pressão de seleção para favorecer um dos alelos; a consequência drástica do efeito *bottleneck* na mortalidade de adultos da geração subsequente e os efeitos negativos da alta densidade e disponibilidade de alimento. Nestes últimos observou-se que a condição de alta densidade provocou efeitos mais acentuados pois reduziu a taxa de obtenção de adultos e prolongou a cinética de obtenção de adultos. Já a baixa disponibilidade de alimento afetou sobretudo a produção de adultos.

### **9.3 Perfil transcriptômico diferencial das colônias resistentes e suscetível**

Na busca de identificar aspectos diferenciais das colônias resistentes a nível molecular, foi realizada uma comparação do transcriptoma global do intestino de larvas. As colônias resistentes vêm sendo mantidas sob pressão de seleção por mais de 90 gerações sob condições de laboratório e a análise demonstrou que ambas as colônias resistentes (REC, REC-2) possuem um perfil diferencial em relação à colônia suscetível (S). É importante ainda destacar que o estudo foi executado com larvas que não foram submetidas ao tratamento com o *L. sphaericus*, antes da extração de RNA. Portanto este estudo visou detectar o perfil de genes que estão sendo expressos sob a condição de manutenção padrão das colônias e que foram sendo co-selecionados por mais de 200 gerações.

O primeiro destaque da análise entre as duas colônias R e a S, entre os genes encontrados nesta avaliação, foi a significativa subexpressão do gene “Neutral and basic amino acid transport protein rBAT”, que codifica o receptor Cqm1 da toxina Bin. Estudos anteriores apontaram que a ausência desse receptor, devido mutações neste gene, é o principal mecanismo de resistência à toxina Bin (CHALEGRE et al., 2012, CHALEGRE et al., 2015; DARBOUX et al., 2007; GUO et al., 2013; ROMÃO et al. 2006). Estes dados confirmam as análises prévias de expressão relativa por qRT-PCR, (CHALEGRE et al., 2015) que apontaram a baixa expressão de ambos os alelos. A distinção é que naquele estudo de qRT-PCR a baixa expressão do gene *cqm1* foi maior na colônia REC-2 e nesta análise por RNAseq, a baixa expressão mais acentuada ocorreu na colônia REC. O receptor Cqm1 é uma  $\alpha$ -glicosidase e sua interação específica com a toxina no intestino das larvas é necessária para a ação letal da toxina para as larvas (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). As colônias resistentes REC e REC-2, apesar da ausência dessa  $\alpha$ -glicosidase, que tem um papel importante na digestão de carboidratos e fundamental para a sobrevivência dos mosquitos (OPOTA et al., 2008), vêm sendo mantidas por várias gerações, mostrando sua capacidade adaptativa.

O perfil de RNAseq também revelou genes com destaque devido a um baixo padrão diferencial de expressão nas colônias REC e REC-2 em relação à colônia S, tais como a panteteinase e vanin like que têm como função primária conversão do precursor panteteína em ácido pantotênico (vitamina B5) e cisteamina. Esta conversão tem consequência no estresse oxidativo e metabolismo de ácidos graxos, e alguns estudos têm apontado ainda seu envolvimento com a gliconeogênese, inflamação e imunidade, e a processos de detoxificação e reciclagem (BAYYAREDDY et al., 2012; KASKOW et al; 2012; NAQUET et al., 2014; PITARI et al., 2000; POPOVA-BUTLER; DEAN, 2009; ROMMELAERE et al., 2015). O envolvimento desta família de proteínas de mosquitos no modo de ação das toxinas inseticidas ainda não é conhecido e precisa ser melhor investigado. Estudos de panteteinases em outros organismos apontaram que elas podem ser expressas como proteínas de membrana ligadas por âncora GPI (BERRUYER et al., 2006), e esta característica poderia corroborar o seu possível papel como uma proteína que interage com a toxina. Estas proteínas também foram encontradas subexpressas em outra colônia de *C. quinquefasciatus* resistente a *L. sphaericus*, cepa IAB59 (REZENDE et al. submetido, Parasites & Vectors). A expressão diferencial destas proteínas nas larvas resistentes pode ser ainda similar ou até mais baixa

(REC-2, (Log<sup>2</sup>)FC -5.21), do que o próprio receptor Cqm1 (REC-2, (Log<sup>2</sup>)FC entre -3.99), o que aponta a sua importância e associação em larvas com esse fenótipo.

A utilização de inseticidas para o controle destes indivíduos pode causar impacto negativo no crescimento, desenvolvimento e afetam processos metabólicos e bioquímicos dos insetos. Nesta análise também foram encontrados em super expressão genes envolvidos no metabolismo de carboidratos ( $\alpha$ -glicosidase,  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -galactosidase), dentre elas uma paróloga ao gene *cqm1*, CPIJ001632,  $\alpha$ -glucosidase precursor que poderia atuar, do ponto de vista fisiológico, para eventualmente compensar a baixa expressão do receptor Cqm1. Uma investigação realizada em *Anopheles stephensis*, mostrou o aumento do metabolismo de carboidrato após contato com extrato de *Artemisia annua* e isto pode ser atribuído ao estresse causado pelo inseticida (SHARMA et al., 2011). O aumento de outras  $\alpha$ -glicosidases, sobretudo uma paróloga poderia indicar um mecanismo de compensação da baixa expressão Cqm1.

Também foram encontradas lipases, responsáveis pelo metabolismo de lipídeos com um perfil diferencial induzido e que podem ter um papel importante no fitness dessas colônias. Sabe-se que o corpo gorduroso de insetos tem grande importância em sua reserva energética. A maior parte do metabolismo intermediário do inseto ocorre nesse órgão, incluindo metabolismo de lipídios e carboidratos, síntese de proteínas e metabolismo de aminoácidos e nitrogênio (ARRESE; SOULAGES; 2010). O nível de reservas de nutrientes acumulados no corpo gorduroso modula vários aspectos importantes como a taxa de crescimento de insetos, a metamorfose e o desenvolvimento do ovo (ARRESE; SOULAGES; 2010; MIRTH; RIDDIFORD; 2007). Em *Ae. aegypti*, foi observado uma produção com acúmulo celular de gotículas lipídicas em resposta a diversos estímulos imunológicos, como infecções com bactérias e vírus (BARLETTA et al., 2016). Este estudo demonstrou pela primeira vez o papel de genes relacionados com a biossíntese de gotículas gordurosas e metabolismo de lipídeos associados à resposta imune de insetos.

O perfil diferencial de RNAseq também revelou um destaque para genes de enzimas detoxificadoras, tanto no perfil de alta como no de baixa expressão. Esses genes são comumente relacionados à detoxificação metabólica na presença de inseticidas químicos e, portanto, encontrados em superexpressão sob esta condição para executar a função de metabolizar estas moléculas impedindo de chegar a seus alvos no sistema nervoso. Entretanto em nosso estudo, o perfil de genes desta categoria na condição de subexpressão foi predominante, principalmente genes do citocromo P450, que pertencem à família de MFOs.

Foram ainda detectadas GSTs e esterases com menor representação. Em diferentes populações de *C. quinquefasciatus*, tratado com permetrina, foram encontrados vários genes do citocromo P450 induzidos, sugerindo que essa família de genes tem importância na resistência a este composto (GONG et al., 2013; LIU et al., 2011; REID et al., 2018). Avaliações com *Anopheles gambiae* também encontraram um padrão de super expressão de genes de esterases e citocromo P450 (DAVID et al., 2005; NIKOU; RANSON; HEMINGWAY; 2003). Já estudos mostram que larvas de *Ae. aegypti* tratadas continuamente com o biolarvicida Bti não apresentaram uma associação com um aumento da atividade destas enzimas e que possivelmente não há relação entre as enzimas detoxificadoras e a resistência a toxinas inseticidas (ARAUJO et al., 2013; CARVALHO et al., 2018), o que corrobora os nossos achados. Vale ressaltar também que contrariamente à maioria dos estudos que avaliam a atividade dessas enzimas em amostras ou extratos proteicos de mosquito inteiro, o nosso estudo avaliou apenas os transcritos e aqueles presentes no intestino das larvas das colônias analisadas.

#### 9.4 Perfil diferencial entre colônias resistentes

A avaliação entre as colônias resistentes mostrou que há um perfil diferencial, porém, o repertório de genes encontrados diferencialmente expressos e a amplitude da expressão diferencial (“(Log<sup>2</sup>)FC ” + 2 e -4) foi mais restrito do que na avaliação que comparou estas colônias com a colônia S (“(Log<sup>2</sup>)FC ” +5.4 e -5.5). Foi encontrado um total de 4878 genes (correspondente a aproximadamente  $\cong 24\%$  do repertório total de genes de *Culex quinquefasciatus*). Dentre os genes encontradas nesta análise, destacam-se com um valor mais significativo de “(Log<sup>2</sup>)FC ”, aqueles que codificam as enzimas detoxificadoras sendo duas citocromo oxidase P450 (CPIJ002535 e CPIJ040083) na colônia REC e o gene *glucosyl/glucoronosyl transferases* na colônia REC-2 (CPIJ003695). Em relação ao metabolismo de carboidratos, CPIJ002066 (*alpha-galactosidase precursor*) na colônia REC e CPIJ001464 (*alpha-amylase A precursor*) na colônia REC-2. Essas enzimas são conhecidas por atuar na digestão. Na colônia REC, também se destacou o gene CPIJ010412 (*Fucosyltransferase 11*), responsável pela glicosilação de proteínas. Ainda na colônia REC, o gene *ATP-binding cassette sub-family A member 3* (CPIJ010067) uma proteína transmembrana se destacou. Essas proteínas são responsáveis por transportar substratos para dentro e fora das células, principalmente íons metálicos, peptídeos, aminoácidos, açúcares e um grande número

de compostos hidrofóbicos e metabólitos e têm importantes funções fisiológicas (BROEHAN et al., 2013;VASILIOU; VASILIOU; NEBERT, 2009). Além disso, esses genes podem transportar drogas e seus metabólitos através da membrana (VASILIOU; VASILIOU; NEBERT, 2009) e em insetos parecem ter um papel importante na resistência a inseticidas (BROEHAN et al., 2013). Na colônia REC-2, houve um destaque que foi a super expressão do gene *ficolin-1 precursor* (CPIJ013538), moléculas que possuem um papel importante na imunidade inata, ativa o sistema de complemento através da via das lectinas (SCHIMID et al., 2011) e reconhece padrões associados a patógenos em superfícies microbianas (MATSUSHITA; FUJITA, 2002). Dados obtidos por Schimid et al. (2011) mostraram que elas podem atuar na remoção de células hospedeiras danificadas e na manutenção da homeostase dos tecidos. Outro gene importante no perfil diferencial da colônia REC-2 foi uma serino peptidase (CPIJ006124, *prolylcarboxypeptidase, putative*), que tem uma função importante na regulação de vários processos metabólicos (VANHOOF et al, 1995). Em um estudo realizado com larvas de *Tenebrio molitor*, foi observado que estas proteínas tem um importante papel na digestão desses insetos (GOPTAR et al, 2013). O gene CPIJ013880 (*heat shock protein 67B2*) também se destacou no perfil diferencial referente a colônia REC-2. Essas proteínas são importantes no dobramento e desdobramento de proteínas, montagem de complexos multiproteicos, controle e sinalização do ciclo celular e proteção de células contra estresse e apoptose (GUPTA et al., 2007). Essas proteínas podem ser um diferencial para a colônia REC-2, porém apenas duas proteínas deste tipo foram encontradas com alta expressão nessa colônia.

## 10 CONCLUSÕES

- a) O fenótipo de resistência conferido pelos dois alelos é similar e não é uma característica diferencial que atribui uma melhor capacidade de competição a algum destes alelos.
- b) O alelo *cqm1<sub>REC</sub>* apresentou maior risco de seleção no decorrer das 20 gerações analisadas, sob condição de pressão de seleção, enquanto que o alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* manteve-se em relativa baixa frequência no curso desta análise.
- c) O efeito “*bottleneck*” na geração F<sub>11</sub> da subcolônia pode estar associado a algum custo biológico crítico.
- d) Os indivíduos resistentes homozigotos para o alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>* apresentam um melhor fitness sob condição de alta densidade larval e em baixa disponibilidade de alimento, durante seu desenvolvimento pré-imaginal. O que pode explicar sua progressão na colônia parental R2362.
- e) As colônias resistentes apresentam um perfil de expressão gênica diferencial, em relação à colônia suscetível, corroborado pela repressão do gene *cqm1* e além de grupos de genes e processos a serem validados funcionalmente.
- f) As colônias resistentes, em relação à suscetível, apresentam um perfil de sub expressão de um grande número de enzimas detoxificadoras, não sendo possível associar a detoxificação metabólica à resistência destes indivíduos.
- g) As colônias resistentes entre si apresentaram um perfil de expressão diferencial, porém relativamente restrito, com destaque para genes de metabolismo de carboidrato e detoxificação metabólica.
- h) O perfil de expressão diferencial entre as colônias resistentes REC e REC-2 não revelou um conjunto significativo de padrão transcricional no intestino que possa atribuir alguma vantagem adaptativa para quaisquer das colônias.

## REFERÊNCIAS

- ACHEE, N. L. et al. A critical assessment of vector control for dengue prevention. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. e0003655, 2015. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/>>. Acesso em: 20 jan. 2018
- ALBUQUERQUE, M. F. P. M. Urbanization, Slums, and Endemics: the production of filariasis in Recife, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.9, n.4, p. 487-497, 1993.
- 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, p. e111114, 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/>>. Acesso em: 12 jan. 2018
- AMORIM, L. B. et al. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure. **Biological Control**, San Diego, v. 42, n. 2, p. 155-160, 2007.
- ANDERSON, J. F. et al. Control of mosquitoes in catch basins in Connecticut with *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Bacillus sphaericus*, and spinosad. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 27, n. 1, p. 45-55, 2011
- ANDRADE, C. F.; NASCIMENTO, M. C. Controle de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) pela eliminação de criadouros no bairro da Graúna, Paraty – RJ. **Revista Controle Biológico**, São Paulo, v. 2, p.33-39, 2010.
- ARAÚJO, A. P. et al. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 6, n. 1, p. 297, 2013.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Anual Review of Entomology**, Palo Alto, v.55, p. 207-225, 2010.
- AYRES, C. F. J. et al. Genetic diversity in brazilian populations of *Aedes albopictus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 6, p. 871-875, 2002
- BALDACCHINO, F. et al. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 71, n. 11, p. 1471-1485, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/15264998>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- BARBAZAN, P. et al. Control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) with *Bacillus sphaericus* in Maroua, Cameroon. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 13, n. 3, p. 263-269, 1997.
- BARBAZAN, P. et al. Impact of treatments with *Bacillus sphaericus* on *Anopheles* populations and the transmission of malaria in Maroua, a large city in a savannah region of

Cameroon. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 14, n. 1, p. 33-39, 1998.

BARLETTA, A. B. F. et al. Emerging role of lipid droplets in *Aedes aegypti* immune response against bacteria and Dengue virus. **Scientific Reports**, Londres, v. 6, p. 19928, 2016. Disponível em: < [www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports)>. Acesso em 13 fev. 2019.

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

BAYYAREDDY, K. et al. Proteome analysis of Cry4Ba toxin-interacting *Aedes aegypti* lipid rafts using ge LC-MS/MS. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 11, n. 12, p. 5843-5855, 2012. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/journal/jprobs>>. Acesso em: 5 jan. 2019.

BECKER, N. **Mosquitoes and their control**. 1st ed. New York: Ed. Kluwer Academic/Plenum, 2003, 577p.

BERGO, E. S. et al. Avaliação do desenvolvimento larval de *Anopheles darlingi* criado em laboratório sob diferentes dietas. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 24, p. 95-100, 1990.

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

BERTI MOSER, J. et al. Pruebas de campo sobre la eficacia y persistencia de tres formulaciones de *Bacillus sphaericus* contra larvas de *Anopheles aquasalis* Curry en manglares del municipio Mariño, estado Sucre, Venezuela. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, Maracay, v. 52, n. 1, p. 67-77, 2012.

BERRUYER, C. et al. Vanin-1 licenses inflammatory mediator production by gut epithelial cells and controls colitis by antagonizing peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activity. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.203, p. 2817-2827, 2006. Disponível em: <<http://jem.rupress.org/>>. Acesso em 5 jan. 2019.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; RIBEIRO, P. S. Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 6, p. 847-852, 2009.

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.

BONIZZONI, M. et al. RNA-seq analyses of changes in the *Anopheles gambiae* transcriptome associated with resistance to pyrethroids in Kenya: identification of candidate-resistance genes and candidate-resistance SNPs. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 8, n. 1, p. 474, 2015.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO MINISTÉRIO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília: **Ministério da saúde** v. 49, n. 49, p. 15, nov 2018

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

BRAVO, A., LIKITVIVATANAVONG S., GILL S. S., SOBERÓN M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, p. 423–431, 2011.

BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. A. U. L. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 6, p. 1333-1337, 1987. Disponível em: <<https://aem.asm.org/>>. Acesso em: 14 jan. 2018.

BROEHAN, G. et al. Functional analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family of *Tribolium castaneum*. **BMC Genomics**, Londres, v. 14, n. 1, p. 6, 2013.

CANTON, P. E. et al. Transcriptional cellular responses in midgut tissue of *Aedes aegypti* larvae following intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. **BMC Genomics**, Londres, v. 16, n. 1, p. 1042, 2015.

CARDOSO-SILVA, C. B. et al. De novo assembly and transcriptome analysis of contrasting sugarcane varieties. **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. e88462, 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/>>. Acesso em: 12 fev. 2019

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

CETIN, H. et al. Operational evaluation of Vectomax® WSP (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* + *Bacillus sphaericus*) against larval *Culex pipiens* in septic tanks. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 31, n. 2, p. 193-195, 2015.

CHALEGRE, K. D. et al. Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1044-1049, 2009. Disponível em: <<https://aem.asm.org/>>. Acesso em: 3 jan. 2018.

CHALEGRE, K. D. et al. Novel mutations associated to *Bacillus sphaericus* resistance are identified in a polymorphic region of the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* gene. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 17, p. 6321-6326, 2012. Disponível em: <<https://aem.asm.org/>>. Acesso em: 3 jan. 2018.

CHALEGRE, K. D. et al. Co-selection and replacement of resistance alleles to *Lysinibacillus sphaericus* in a *Culex quinquefasciatus* colony. **The FEBS Journal**, Bethesda, v. 282, n 18, p. 3592–3602, 2015. Disponível em: <<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/journal/17424658>>. Acesso em 3 jan. 2018.

CHARLES, J. F. Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. **Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie**, Paris, v. 138, p. 471-484, 1987.

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

CHARLES, J. F. et al. Binding of the 51-and 42-kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 156, n. 1, p. 153-159, 1997.

CHEVILLON, C. et al. Population structure and dynamics of selected genes in the mosquito *Culex pipiens*. **Evolution**, Londres, v. 49, n. 5, p. 997-1007, 1995.

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

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1994. 228p.

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

DARBOUX, I. et al. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 99, n. 9, p. 5830-5835, 2002. Disponível em: <<https://www.pnas.org/>>. Acesso em 5 jan. 2018.

DARBOUX, I. et al. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 2022-2029, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/14625822>>. Acesso em 5 jan. 2018.

DAVID, J. et al. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 102, n. 11, p. 4080-4084, 2005. Disponível em: <<https://www.pnas.org/>>. Acesso em 14 jan. 2019.

DAVIDSON, E. W. Variation in binding of *Bacillus sphaericus* toxin and wheat germ agglutinin to larval midgut cells of six species of mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 53, n. 2, p. 251-259, 1989.

DE MELO, J. V. et al. Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. **Micron**, New York, v. 39, p. 1342-1350, 2008. Disponível em: <<https://www.journals.elsevier.com/micron>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

DIAZ, L. A. et al. Transmission of endemic St Louis encephalitis virus strains by local *Culex quinquefasciatus* populations in Cordoba, Argentina. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 107, n. 5, p. 332-334, 2013.

- DINIZ, D. F. A. et al. Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 1, p. 662, 2015.
- DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 15-21, 2013.
- DRITZ, D. A. et al. Control of mosquito larvae in seasonal wetlands on a wildlife refuge using Vectomax™ CG. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 27, n. 4, p. 398-403, 2011.
- DU, Y. et al. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 110, n. 29, p. 11785-11790, 2013. Disponível em: <<https://www.pnas.org/>>. Acesso em 10 fev. 2019.
- ELIZONDO-QUIROGA, D. et al. Zika Virus in Salivary Glands of Five Different Species of Wild-Caught Mosquitoes from Mexico. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 809, 2018.
- FERREIRA, L. M. et al. The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI6 anchored alpha-glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 40, p. 604-610, 2010.
- FERREIRA, L. M.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Bacterial larvicides for vector control: mode of action of toxins and implications for resistance. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 23, n. 10, p. 1137-1168, 2013. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/loi/cbst20>>. Acesso em: 5 jan. 2018.
- FERREIRA, L. M. et al. Non conserved residues between Cqm1 and Aam1 mosquito  $\alpha$ -glucosidases are critical for the capacity of Cqm1 to bind the binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 50, p. 34-42, 2014.
- FEYEREISEN, R. Insect cytochrome P450. In: GILBERT, L. L., IATROU, K., GILL, S. **Comprehensive Molecular Insect Science**, New York, p. 1-77, 2005.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.
- FONTES, G. et al. Lymphatic filariasis in Brazil: epidemiological situation and outlook for elimination. **Parasites & Vectors**, London, v. 5, n. 1, p. 272, 2012.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 2002. 860p.
- FRANCESCHINI, A. et al. STRING v9.1: Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 41, pD808–D815, 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

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

FU, S. et al. ZIKA virus isolated from mosquitoes: a field and laboratory investigation in China, 2016. **Science China Life Sciences**, Anhui, p. 1-8, 2017

FUJITA, T. Evolution of the lectin–complement pathway and its role in innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 2, n. 5, p. 346, 2002.

FUJITA, T; MATSUSHITA, M.; ENDO, Y. The lectin-complement pathway–its role in innate immunity and evolution. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 198, n. 1, p. 185-202, 2004.

GAHAN, L. J.; GOULD, F.; HECKEL, D. G. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. **Science**, Washington, v. 293, n. 5531, p. 857-860, 2001.

GAMA, R. A. et al. Efeito da densidade larval no tamanho de adultos de *Aedes aegypti* criados em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 64-66, 2005.

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

GONG, Y. et al. Permethrin induction of multiple cytochrome P450 genes in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. **International Journal of Biological Sciences**, Bethesda, v. 9, n. 9, p. 863, 2013.

GOPTAR, I. A. et al. A digestive prolyl carboxypeptidase in *Tenebrio molitor* larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 501-509, 2013.

GUEDES, D.R.D et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **BioRxiv**, Nova York, p. 073197, 2017. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

GUILLEMAUD, T. et al. Evolution of resistance in *Culex pipiens*: allele replacement and changing environment. **Evolution**, London, v. 52, n. 2, p. 443-453, 1998.

GUO, Q. et al. Single nucleotide deletion of *cqm1* gene results in the development of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 59, n. 9, p. 967-973, 2013.

GUPTA, S. C. et al. Induction of hsp70, alterations in oxidative stress markers and apoptosis against dichlorvos exposure in transgenic *Drosophila melanogaster*: modulation by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, Amsterdam, v. 1770, n. 9, p. 1382-1394, 2007. Disponível em: <<https://www.journals.elsevier.com/biochimica-et-biophysica-acta-general-subjects>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

HARAMIS, L. D. Increased adult size correlated with parity in *Aedes triseriatus*. **Mosquito News**, New York, v. 43, p. 77-79, 1983.

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

HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S. H. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 1-12, 1998.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 30, n. 11, p. 1009-1015, 2000. Disponível em: <<https://www.journals.elsevier.com/insect-biochemistry-and-molecular-biology>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 45, n. 1, p. 371-391, 2000.

HERTLEIN, M. B. et al. A review of spinosad as a natural product for larval mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 26, n. 1, p. 67-87, 2010.

HOUGARD, J.M. Formulations and persistence of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larval sites in tropical Africa. In: **Bacterial Control of Mosquitoes and Black-Flies: Biochemistry, Genetics and Applications of *Bacillus thuringiensis Israelensis* and *Bacillus sphaericus***. New Brunswick: Rutgers University Press, 1990, pp. 295-306.

HOUGARD, J. M. et al. Campaign against *Culex quinquefasciatus* using *Bacillus sphaericus*: results of a pilot project in a large urban area of equatorial Africa. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 71, n. 3-4, p. 367-375, 1993.

HUANG, F. et al. Extended monitoring of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab maize in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **GM Crops & Food**, Austin, v. 3, n. 3, p. 245-254, 2012.

JAIN, M. Next-generation sequencing technologies for gene expression profiling in plants. **Briefings in Functional Genomics**, London, v. 11, n. 1, p. 63-70, 2011.

JONES, G. W. et al. A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 21, n. 14, p. 4112-4120, 2007. Disponível em: <<https://www.fasebj.org/>>. Acesso em: 5 jan 2018.

JONES, G. W. et al. The Cry48Aa-Cry49Aa binary toxin from *Bacillus sphaericus* exhibits highly restricted target specificity. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 9, p. 2418-2424, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/14622920>>. Acesso em: 5 jan 2018.

- KALFON, A. et al. Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297: an electron microscope study of crystal-like inclusions biogenesis and toxicity to mosquito larvae. **Microbiology**, New York, v. 130, p. 893-900, 1984.
- KASKOW, B. J. et al. Diverse biological activities of the vascular non-inflammatory molecules–The Vanin pantetheinases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 417, n. 2, p. 653-658, 2012.
- KILLEEN, G. F. et al. Developing an expanded vector control toolbox for malaria elimination. **BMJ Global Health**, London, v. 2, n. 2, p. e000211, 2017. Disponível em: <<https://gh.bmj.com/>>. Acesso em: 15 fev. 2019
- LABBÉ, P.; LENORMAND, T.; RAYMOND, M. On the worldwide spread of an insecticide resistance gene: a role for local selection. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 18, n. 6, p. 1471-1484, 2005. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosgenetics/>>. Acesso em: 15 jan. 2018
- LABBÉ, P. et al. Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the mosquito *Culex pipiens*. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 3, n. 11, p. e205, 2007a. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosgenetics/>>. Acesso em: 15 jan. 2018
- LABBÉ, P. et al. Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. **Molecular Biology and Evolution**, London, v. 24, n. 4, p. 1056-1067, 2007b. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mbe>>. Acesso em: 15 jan. 2018.
- LABBÉ, P. et al. Resistance gene replacement in the mosquito *Culex pipiens*: fitness estimation from long-term cline series. **Genetics**, Austin, v. 182, n. 1, p. 303-312, 2009.
- LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 23, n. 2, p. 133-163, 2007.
- LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 132, p. 1-41, 2015.
- LÉONARD, P. M.; JULIANO, S. A. Effect of leaf litter and density on fitness and population performance of the hole mosquito *Aedes triseriatus*. **Ecological Entomology**, Saint Albans, v. 20, n. 2, p. 125-136, 1995.
- LENORMAND, T. et al. Evaluating gene flow using selected markers: a case study. **Genetics**, Austin, v. 149, n. 3, p. 1383-1392, 1998. Disponível em: <<https://www.genetics.org/>>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- LERAT, E. et al. TETools facilitates big data expression analysis of transposable elements and reveals an antagonism between their activity and that of piRNA genes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 45, n. 4, p. e17-e17, 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

- LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Reviews of Entomology**, Palo Alto, v. 52, p. 231-253, 2007.
- LIMPANAWAT, S.; PROMDONKOY, B.; BOONSERM, P. The C-terminal domain of BinA is responsible for *Bacillus sphaericus* binary toxin BinA-BinB interaction. **Current Microbiology**, New York, v. 59, n. 5, p. 509-513, 2009.
- LIU, N. et al. Multiple cytochrome P450 genes: their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 8, p. e23403, 2011. Disponível em: <<https://journals.plos.org/>>. Acesso em 15 fev. 2019.
- LIU, Y., et al. Correlation between carboxylesterase alleles and insecticide resistance in *Culex pipiens* complex from China. **Parasites & Vectors**, London, v. 4, n. 1, p. 236, 2011
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, London, v. 15, n. 12, p. 550, 2014.
- LOZANO, L. C.; AYALA, J. A.; DUSSÁN, J. *Lysinibacillus sphaericus* S-layer protein toxicity against *Culex quinquefasciatus*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 33, n. 10, p. 2037-2041, 2011.
- 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. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics>>. Acesso em: 15 fev. 2018.
- LV, Yuan et al. Comparative transcriptome analyses of deltamethrin-susceptible and-resistant *Culex pipiens pallens* by RNA-seq. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 291, n. 1, p. 309-321, 2016.
- MANTHEY, H. D. et al. Complement component 5a (C5a). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 41, n. 11, p. 2114-2117, 2009. Disponível em: <<https://www.journals.elsevier.com/the-international-journal-of-biochemistry-and-cell-biology>>. Acesso em: 28 de. 2018.
- MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. The role of ficolins in innate immunity. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 205, n. 4-5, p. 490-497, 2002.
- MELO, D. C. T. V. **Avaliação do desempenho biológico de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) resistente a *Bacillus sphaericus***. 2013. 65 f. Monografia (Graduação) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- MELO-SANTOS, M. A. V. et al. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 113, n. 2, p. 180-189, 2010.

- MENEZES, H. S. G. et al. A new allele conferring resistance to *Lysinibacillus sphaericus* is detected in low frequency in *Culex quinquefasciatus* field populations. **Parasites & Vectors**, London, v. 9, n. 1, p. 70, 2016.
- MIRTH, C. K.; RIDDIFORD, L. M. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. **Bioessays**, Cambridge, v. 29, n. 4, p. 344-355, 2007.
- MORIN, S. et al. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 100, n. 9, p. 5004-5009, 2003. Disponível em: <<https://www.pnas.org/>>. Acesso em 12 fev. 2018.
- MULLA, M. S. et al. Emergence of resistance and resistance management in field populations of tropical *Culex quinquefasciatus* to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 19, n. 1, p. 39-46, 2003.
- NAQUET, P. et al. Role of the Vnn1 pantetheinase in tissue tolerance to stress. **Biochemistry Society Transactions**, London, v. 42, p. 1094-1100, 2014. Disponível em: <<http://www.biochemsoctrans.org/>>. Acesso em: 17 jan. 2019
- NEVES, A. P. **Aspecto do *Lysinibacillus sphaericus* cepa 2362**. [Recife, 2018]. 1 fotografia. 28 jan. 2018.
- NICOLAS, L. et al. Respective role of the 42- and 51-kDa component of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 106, p. 275-280, 1993.
- NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 210, n. 2, p. 585-590, 1992.
- NIELSEN-LEROUX, C. et al. Resistance in the laboratory population of *Culex quinquefasciatus* to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 228, p. 206-210, 1995.
- NIELSEN-LEROUX, C. et al. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* mosquito larvae (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu v. 34, p. 321-327, 1997.
- NIELSEN-LEROUX, C. et al. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west-Mediterranean countries. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 39, p. 729-735, 2002.
- NIKOU, D.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J.. An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. **Gene**, Amsterdam, v. 318, p. 91-102, 2003.
- NISHIWAKI, H. et al. Cloning, functional characterization, and mode of action of a novel insecticidal pore-forming toxin, sphaericolysin, produced by *Bacillus sphaericus*. **Applied**

**and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 10, p. 3404-3411, 2007.  
Disponível em: < <https://aem.asm.org/>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

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. **Microbiology**, New York, v. 138, n. 7, p. 1515-1526, 1992. Disponível em: < <https://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro>>. Acesso em: 3 jan. 2018.

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

OAKESHOTT, J. G. et al. Evolutionary Genetics of Drosophila Esterases. **Genetica**, The Hague, v. 90, n. 2-3, p. 239-268, 1993.

OPOTA, O., et al. Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B - Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v149, p. 419-427, 2008

OPOTA, O. et al. *Bacillus sphaericus* binary toxin elicits host cell autophagy as a response to intoxication. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 2, e14682, 2011. Disponível em: <<https://journals.plos.org/>>. Acesso em 15 fev. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Bioassay method for the titration of *Bacillus sphaericus* preparations with RB standard**. Informal consultations on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Geneva, 1985.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Elimination of lymphatic filariasis as a public health problem**. Agenda item 20. Geneva, 1997.

PASTEUR, N.; SINÈGRE, G.; GABINAUD, A. *Est-2* and *Est-3* polymorphisms in *Culex pipiens* L. from southern France in relation to organophosphate resistance. **Biochemical Genetics**, New York, v. 19, n. 5, p. 499-508, 1981.

PASTEUR, N.; SINÈGRE, G. Esterase polymorphism and sensitivity to Dursban organophosphorus insecticide in *Culex pipiens* populations. **Biochemical Genetics**, New York, v. 13, n. 11, p. 789-803, 1975.

PEI, G. F. et al. A strain of *Bacillus sphaericus* causes a slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 6, p. 3003-3009, 2002. Disponível em: < <https://aem.asm.org/>>. Acesso em: 3 jan. 2018.

PERNAMBUCO. Secretaria de Estado de Saúde. **Projeto SANAR: Doenças negligenciadas**, 2011. Recife, 2011. Disponível em: < <http://portal.saude.pe.gov.br/programa/secretaria-executiva-de-vigilancia-em-saude/programa-sanar-doencas-negligenciadas>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

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

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

PRIEST, F. G. et al. Distribution and characterization of mosquitocidal toxin genes in some strains of *Bacillus sphaericus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 4, p. 1195-1198, 1997. Disponível em: < <https://aem.asm.org/>>. Acesso em: 28 jan. 2018.

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

RAYMOND, M. et al. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. **Journal of Economic Entomology**, College Park MD, v. 79, n. 6, p. 1452-1458, 1986. Disponível em: < <https://academic.oup.com/jee> >. Acesso em: 4 jan. 2018.

RAYMOND, M. et al. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation?. In: HENDRY, A. P. **An introduction to Microevolution: Rate, Pattern, Process**. Dordrecht: Springer, 2001, p. 287-296.

REID, W. R. et al. Gene expression profiles of the Southern house mosquito *Culex quinquefasciatus* during exposure to permethrin. **Insect Science**, Tucson, v. 25, n. 3, p. 439-453, 2018.

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

REGIS, L. et al. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 1, p. 115-119, 1995.

REGIS, L. et al. Integrated control of the filariasis vector with community participation, in an urban area of Recife. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 12, p. 473-482, out./dez. 1996.

REGIS, L. et al. Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Olinda, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 94, n. 5, p. 488-492, 2000.

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

RINKEVICH, F. D.; DU, Y.; DONG, K. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 106, n. 3, p. 93-100, 2013.

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. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v. 39, n. 3, p. 233-249, 2010.

ROMMELAERE, S. et al. Serum pantetheinase/vanin levels regulate erythrocyte homeostasis and severity of malaria. **American Journal of Pathology**, New York, v. 185, p. 3039-3052, 2015. Disponível em: < <https://ajp.amjpathol.org/>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

ROMÃO, T. P. et al. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its  $\alpha$ -glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. **The FEBS Journal**, Bethesda, v. 273, n. 7, p. 1556-1568, 2006. Disponível em: <<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/journal/17424658>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

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

SCHMID, M. et al. Ficolin-B marks apoptotic and necrotic cells. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 217, n. 6, p. 610-615, 2011.

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

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

SHIN, D. et al. Transcriptomics of differential vector competence: West Nile virus infection in two populations of *Culex pipiens quinquefasciatus* linked to ovary development. **BMC Genomics**, London, v. 15, n. 1, p. 513, 2014.

SIEGEL, J. P. et al. Statistical appraisal of the weight–wing length relationship of mosquitoes. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 29, n. 4, p. 711-714, 1992.

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

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

- SILVA-FILHA, M. H.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Insect Biochemistry Molecular Biology**, Oxford, v. 29, p. 711-721, 1999.
- SILVA-FILHA M. H. N. L, et al. Impact of a 26-month *Bacillus sphaericus* trial on the preimaginal density of *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Recife, Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 17, p. 45–50. 2001.
- SILVA-FILHA M. H. N. L, et al. *Culex quinquefasciatus* field populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. **Biological Control**, San Diego, v. 44, p. 227-234, 2008.
- SILVA-FILHA, M. H. N. L.; BERRY, C.; REGIS, L. *Lysinibacillus sphaericus*: toxins and mode of action, applications for mosquito control and resistance management. In: TREHERNE, J. E. et al. **Advances in Insect Physiology**. Cambridge: Academic Press, 2014. p. 89-176.
- SILVA-FILHA, M. H. N. L. Resistance of mosquitoes to entomopathogenic bacterial-based larvicides: current status and strategies for management. In: FIUZA, L.M. et al. **Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus**. Berlin: Springer International Publishing, 2017. p. 239-257.
- SINÈGRE, G. et al. First field occurrence of *Culex pipiens* resistance to *Bacillus sphaericus* in southern France. **Abstracts of VIIIITH European Meet Society of Vector Ecology**, Cambridge, v. 17, p.5-8, 1994.
- SINGH, G. J. P., GILL, S. S. An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 52, p. 237-247, 1988.
- SINGKHAMANAN, K. et al. Identification of amino acids required for receptor binding and toxicity of the *Bacillus sphaericus* binary toxin. **FEMS Microbiology letters**, Amsterdam, v. 303, n. 1, p. 84-91, 2010
- SKOVMAND, O., SANOGO, E. Experimental formulations of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis israelensis* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in Burkina Faso. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 36, 62–67, 1999.
- SPARKS, T. C. et al. Resistance and cross-resistance to the spinosyns—a review and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 102, n. 1, p. 1-10, 2012.
- SU, T.; CHENG, M. Laboratory selection of resistance to spinosad in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 51, n. 2, p. 421-427, 2014.

- TABASHNIK, B. E. et al. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 97, n. 24, p. 12980-12984, 2000. Disponível em: <<https://www.pnas.org/>>. Acesso em: 18 fev. 2018.
- TANGSONGCHAROEN, C. et al. *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin induces apoptosis in susceptible *Culex quinquefasciatus* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 128, p. 57–63, 2015.
- TANGSONGCHAROEN, C. et al. Molecular analysis of *Culex quinquefasciatus* larvae responses to *Lysinibacillus sphaericus* Bin toxin. **PLoS One**, San Francisco, v. 12 n. 4, e0175473, 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/>>. Acesso em: 20 jan. 2018
- TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 9, p. 1105–11, 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics>>. Acesso em: 5 fev. 2019.
- VANHOOF, G. et al. Proline motifs in peptides and their biological processing. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 9, n. 9, p. 736-744, 1995.
- VASILIOU, V.; VASILIOU, K.; NEBERT, D. W. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. **Human Genomics**, London, v. 3, n. 3, p. 281, 2009.
- VIEIRA, M. A. C. S et al. Case report: West Nile virus encephalitis: the first human case recorded in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 93, p. 377-379, 2015.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.
- WIRTH, M. C. et al. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 37, p. 534-540, 2000.
- WIRTH, M. C. et al. Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 19, p. 6066-6071, 2007.
- XU, X. et al. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac {delta}-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 948 –954, 2005.
- YUAN, Z. et al. High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from southern China. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 10, n. 1, p. 41-49, 2000.
- ZHAO, J. Z. et al. Examination of the F2 screen for rare resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxins in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park MD, v. 95, n. 1, p. 14-21, 2002.

ZHAO, J. Z. et al. Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 40, p. 113–118, 2010.

## **APÊNDICE A - POLIMORFISMOS DO GENE *CQMI* EM POPULAÇÕES DE *C. PIPPIENS* RESISTENTES A *L. SPHAERICUS* (EUA)**

Neste projeto também foi realizado uma análise paralela relativa a investigação de quatro populações do complexo *Culex pipiens* resistentes a *L. sphaericus* cujo mecanismo também pode estar relacionado ao gene *cqml*. Como mutações do gene *cqml* são os principais responsáveis pela resistência ao *L. sphaericus*, as sequências deste gene foram investigadas na busca de polimorfismos possivelmente relacionados a este fenótipo, sobretudo aqueles já descritos. Uma dessas amostras é resistente ao *L. sphaericus* e também ao Spinosad, agente de controle biológico cujas toxinas agem em receptores diferentes da toxina Bin do *L. sphaericus*. O mecanismo de resistência a este componente ainda não foi descrito.

### **OBJETIVO**

Identificar polimorfismos do gene *cqml* em amostras de populações do complexo *Culex pipiens* resistentes ao *L. sphaericus*.

### **METODOLOGIA**

As sequências do gene *cqml* de três amostras de larvas de *Culex pipiens* e duas de *Culex pipiens quinquefasciatus* resistentes a *L. sphaericus* e uma resistente simultaneamente a *L. sphaericus* e Spinosad oriundas de localidades nos EUA (Quadro 1) foram avaliadas. Esta análise está sendo feita em colaboração com o Dr. Steven Su do Serviço de Controle de Vetores “West Valley Mosquito and Vector Control District” de uma região do estado da Califórnia (EUA). No caso, a resistência destas populações foi avaliada previamente pelo Dr. Steven Su, através de bioensaios, e as amostras foram enviadas para análise molecular do gene *cqml* em busca de polimorfismos potencialmente ser associados à resistência, conforme descrito abaixo. Todas apresentam um alto nível de resistência a *L. sphaericus*.

**Quadro 1** - Amostras de larvas de *Culex pipiens* (Cp) e *Culex pipiens quinquefasciatus* (Cq) resistentes (R) ao *Lysinibacillus sphaericus* (*L. sphaericus*) e Spinosad (Spi) oriundas dos EUA.

Espécie	Descrição	Nome da Amostra	Local de origem
Cp	Suscetível	Ls-S WV	Laboratório UC Riverside
	R- <i>L. sphaericus</i>	Ls-R SLC	Salt Lake City MAD
	R- <i>L. sphaericus</i>	Ls-R Butte	MVCD
Cq	R- <i>L. sphaericus</i>	Ls-R UCR	UC Riverside
	R- <i>L.</i>		
	<i>sphaericus</i> /Spi	Sp-R/Ls-R	<i>L. sphaericus</i> -xR (Lab)

Fonte: autora

A clonagem e sequenciamento deste gene foram feitos a partir de amostras de DNA extraído de larvas preservadas em álcool 70%. O DNA total foi extraído em *pools* de três larvas conforme protocolo descrito por Ayres et al. (2002) e as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µl contendo: 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 mM de cada primer específico para o gene *cqm1* (*forward* 5'-ATG CGA CCG CTG GGA GCT TTG -3'; *reverse* 5'- CAC GAA AAT ATA CCT GGC CAT AAT CGC -3'), 2U da enzima Platinum® Taq DNA Polymerase® High Fidelity (Invitrogen) em tampão fornecido pelo fabricante (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,4 mM), além de DNA molde (100 ng) extraído das larvas. Cada amostra foi amplificada em um termociclador programado para uma etapa de desnaturação a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 50 seg, 65°C por 60 seg e 72 °C por 50 seg, e uma etapa final de 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram separados em eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo, foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta (UV). As amostras dos amplicons obtidos do gene *cqm1* foram purificadas com o kit GFX™ DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) e clonadas no vetor plasmidial pGEM®TEasy (Promega). A combinação vetor plasmidial/fragmento de PCR foi tratada com o T4 DNA ligase® (3 U/µl) e após esta etapa de ligação, o DNA plasmidial foi empregado na transformação de bactérias *Escherichia coli* quimiocompetentes cepa DH5-α. Colônias foram selecionadas em meio Luria-Bertani (LB) com ampicilina (50 ng/µl) por 16 horas a 37 °C, e as células foram submetidas à extração de DNA plasmidial por lise alcalina, utilizando o QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen), segundo as recomendações do fabricante. As minipreparações foram quantificadas e encaminhadas para o sequenciamento automático no ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) do NPT - IAM. Oito *primers* foram empregados para obter a sequência

completa do gene *cqm1*, dos quais seis são internos para o gene *cqm1*, além de dois *primers* específicos para o plasmídeo pGEM®T-Easy, M13 *forward* e M13 *reverse* (Quadro 2). Cada associação de *primers* permitiu amplificar fragmentos de aproximadamente 800 pb, que foram alinhados para obter a sequência completa do gene *cqm1*. Os eletroferogramas das reações foram analisados através do programa SeqMan (DNASTAR). Após o refinamento manual, as sequências foram alinhadas e a análise de possíveis polimorfismos no gene *cqm1* foi realizada através do programa MegaAlign (DNASTAR) e BioEdit.

**Quadro 2** - *Primers* utilizados para o sequenciamento do gene *cqm1* e seus alelos.

Primer	Sequência (5'-3')
Seq Cqm1 1 F	CGACAGGGGGTGGTCCGCCG
Seq Cqm1 1 R	CCCTCCAAATACCGAGATCC
Seq Cqm1 2 F	CGCCAFGGAGCTCACATGCCG
Seq Cqm1 2 R	CAGCTGGAAGTTGAACGGC
Seq Cqm1 3 F	GTACCTTCCACCACTTCCAG
Seq Cqm1 3 R	CGTACACCTTGGTTCCGACCGTC

Fonte: a autora

## RESULTADOS

A comparação entre as sequências de cDNA das amostras de *C. pipiens* SLC, Butte e Sp-R/Ls-R demonstrou mutações exclusivas de cada, mas a nível de sequência de aminoácidos as mutações são neutras, excetuando-se a posição 569 (L→stop) (Quadro 3). Esta mutação já foi descrita por Darboux et al. (2002) na caracterização de alelo *cpm1<sub>GEO</sub>* encontrado na colônia GEO, oriunda do estado da Califórnia. Esta é uma mutação nucleotídica na posição do gene 1813 (T→A) que gera uma substituição do aminoácido Leucina por um stop códon prematuro na posição 569 (L→stop) que impede a expressão do receptor com os 12 últimos aminoácidos hidrofóbicos (LLLAIMARYIFV) também responsáveis pela sinalização da âncora GPI. Portanto esta análise demonstra que o mecanismo de resistência de três amostras populacionais está associado ao alelo *cpm1<sub>GEO</sub>*, em populações oriundas da região onde este alelo foi originalmente descrito. A amostra UCR possui seis alterações de aminoácidos exclusivas desta linhagem, existentes nas posições 178 (T→Q), 182 (E→G), 331 (V→I), 430 (T→S), 450 (P→S) e 466 (H→Y) (Quadro 2). Porém, estes polimorfismos não parecem estar relacionados com mutações associadas à resistência à toxina Bin já descritas do gene *cqm1*, sendo necessário investigar o impacto na funcionalidade da proteína hipotética. Os

aminoácidos mutados, por exemplo, podem ter importância na estrutura da proteína Cqm1 e seus respectivos domínios de ligação da toxina.

## CONCLUSÕES

- a) - A resistência de três colônias de *Culex pipiens* resistentes ao *L. sphaericus* oriundas da Califórnia, Estados Unidos, é devido ao alelo *cpm1<sub>GEO</sub>* que foi descrito originalmente nesta região.
- b) O mecanismo da colônia de UCR – Riverside resta a ser elucidado e não está relacionado a nenhuma das oito mutações já descritas que conferem resistência neste gene.

**Quadro 3** - Polimorfismos nas sequências deduzidas de aminoácidos de proteínas em relação ao gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus* e *cpm1* de *Culex pipiens* de populações resistentes ao *L. sphaericus*.

Posição	Populações <sup>b</sup>					
	<i>cpm1</i> <sup>a</sup>	Ls-R (SLC)	Ls-R (Butte)	<i>cqm1</i>	Ls-R (UCR)	Sp-R/Ls-R
26	D	D	N	D	N	N
27	A	S	S	S	S	S
95	A	D	D	A	A	D
113	A	A	A	S	S	A
115	K	M	M	K	K	M
141	A	V	V	A	V	V
148	E	D	D	D	D	D
153	K	R	R	R	R	R
172	P	S	S	S	S	S
178	A	T	T	S	Q*	T
202	L	V	V	V	V	V
237	D	H	H	D	D	H
246	P	P	P	S	P	P
265	N	D	D	D	D	D
331	V	V	V	V	I*	V
369	D	H	D	D	D	D
378	M	L	L	L	L	L
430	T	T	T	T	S*	T
450	P	P	P	P	S*	P
465	G	R	R	R	R	R
466	H	H	H	H	Y*	H
486	L	L	M	L	L	M
523	V	I	V	V	V	V
556	T	T	T	T	M*	T
569	L	STOP	STOP	L	L	STOP

<sup>a</sup> sequência de referência para os genes de *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus*, respectivamente

<sup>b</sup> Ls-R (SLC, Butte e UCR) são resistentes a *L. sphaericus* de Salt Lake City, Chico e UC Riverside

\* Alterações únicas de aminoácidos

**APÊNDICE B - PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DIFERENCIAL DE LARVAS DE  
CULEX QUINQUEFASCIATUS CONSIDERANDO AS ENZIMAS  
DETOXIFICADORAS<sup>A</sup> DAS COLÔNIAS RESISTENTES REC E REC-2<sup>B</sup> EM  
RELAÇÃO À COLÔNIA S.**

<b>Colônia REC</b>			
<b>ID</b>	<b>Anotação Vectorbase</b>	<b>(Log<sub>2</sub>)FC</b>	<b>padj</b>
<b>Induzidos</b>			
<b>Monooxidases de função mista</b>			
CPIJ040083	COX3: cytochrome c oxidase subunit III	3.71	1.2560e-08
CPIJ010175	CYP9J48: cytochrome P450 9J48	2.96	4.8866e-17
CPIJ010546	CYP9J34: cytochrome P450 9J34	2.91	1.2311e-20
CPIJ002535	CYP6AG9: cytochrome P450 6AG9	2.73	3.8192e-12
CPIJ010230	CYP12F10: cytochrome P450 12F10	2.06	2.9830e-06
CPIJ010541	CYP9J37: cytochrome P450 9J37	2.01	2.2421e-12
CPIJ001757	CYP4H39: cytochrome P450 4H39	2.01	5.2723e-13
CPIJ004411	CYP6Z12: cytochrome P450 6Z12	1.94	1.4467e-09
CPIJ010548	CYP9J39: cytochrome P450 9J39	1.68	0.00212918
CPIJ017014	CYP6AG14: cytochrome P450 6AG14	1.67	8.4823e-07
CPIJ005956	CYP6BZ2: cytochrome P450 6BZ2	1.62	5.5883e-10
CPIJ016854	CYP6N22: cytochrome P450 6N22	1.59	0.00017701
CPIJ006721	CYP4H37: cytochrome P450 4H37	1.53	1.1377e-07
CPIJ020229	CYP4D42: cytochrome P450 4D42	1.49	0.00077894
CPIJ005957	CYP6AA9: cytochrome P450 6AA9	1.39	3.5298e-08
CPIJ005958	CYP6AA8: cytochrome P450 6AA8	1.36	3.2342e-06
CPIJ001759	CYP4H40: cytochrome P450 4H40	1.22	3.4274e-05
CPIJ010231	CYP12F9: cytochrome P450 12F9	1.17	0.00305428
CPIJ009474	CYP4D40: cytochrome P450 4D40	1.17	0.00012552
CPIJ003376	CYP6BY4: cytochrome P450 6BY4	1.16	0.02340668
CPIJ010480	CYP4J20: cytochrome P450 4J20	1.13	0.00652667
CPIJ015428	CYP6Z10: cytochrome P450 6Z10	1.09	2.8400e-05
CPIJ015223	CYP6F4: cytochrome P450 6F4	1.08	0.00223735
CPIJ001758	CYP4H38: cytochrome P450 4H38	1.08	0.00138472
CPIJ010537	CYP9J45: cytochrome P450 9J45	1.08	0.00072864
CPIJ005955	CYP6P14: cytochrome P450 6P14	1.06	9.0120e-05
CPIJ005959	CYP6AA7: cytochrome P450 6AA7	1.04	4.4554e-05
CPIJ001380	CYP314A1: cytochrome P450 314A1	1.02	0.01063849
CPIJ012685	CYP315A1: cytochrome P450 315A1	1.01	0.00670787
CPIJ002537	CYP6AG11: cytochrome P450 6AG11	1.00	0.00163125
<b>Glutathione-S-transferase</b>			
CPIJ002680	Glutathione S-transferase	1.63	0.00448867
CPIJ020053	glutathione transferase AtGST, putative	1.33	0.00258498
<b>Esterases</b>			
CPIJ007824	esterase B1 precursor	1.05	9.2532e-05

(continua)

**Reprimidos****Monooxidases de função mista**

CPIJ016853	CYP6N21P: cytochrome P450 6N21P	-2.47	8.0883e-08
CPIJ016849	CYP6M12: cytochrome P450 6M12	-2.41	4.2932e-09
CPIJ016855	CYP6N20: cytochrome P450 6N20	-2.04	2.2421e-12
CPIJ010538	CYP9J46: cytochrome P450 9J46	-1.73	8.3949e-05
CPIJ019704	CYP6N24: cytochrome P450 6N24	-1.70	0.02446419
CPIJ019673	CYP6AG15: cytochrome P450 6AG15	-1.55	0.00023977
CPIJ020199	CYP6N20: cytochrome P450 6N20	-1.39	0.00184921
CPIJ016852	CYP6N19: cytochrome P450 6N19	-1.37	0.04148087
CPIJ014050	cytochrome c oxidase copper chaperone	-1.32	0.00191865
CPIJ019817	Cytochrome c oxidase assembly protein COX19	-1.29	0.03695700
CPIJ016848	CYP6M14: cytochrome P450 6M14	-1.27	0.00020784

**Glutathiona-S-transferase**

CPIJ018626	Glutathione-s-transferase theta, gst	-3.03	3.7896e-16
CPIJ018624	Glutathione-s-transferase theta, gst	-2.55	5.9875e-11
CPIJ018627	Glutathione S-transferase 1-1	-1.90	3.9685e-12
CPIJ002675	Glutathione S-transferase 1	-1.81	5.0788e-07
CPIJ002678	Glutathione transferase I	-1.29	0.01988490
CPIJ002676	Glutathione S-transferase D7	-1.28	0.00043964
CPIJ018629	Glutathione-s-transferase theta, gst	-1.04	0.00026683

**Esterases**

CPIJ016341	alpha-esterase	-2.50	1.2159e-05
CPIJ013917	esterase B1 precursor	-1.91	7.0485e-11
CPIJ013918	esterase B1 precursor	-1.76	6.8668e-16

**Colônia REC-2**

<b>ID</b>	<b>Anotação Vectorbase</b>	<b>(Log<sub>2</sub>)FC</b>	<b>Padj</b>
-----------	----------------------------	----------------------------	-------------

**Induzidos****Monooxidases de função mista**

CPIJ010175	CYP9J48: cytochrome P450 9J48	2.32	0.00017853
CPIJ010546	CYP9J34: cytochrome P450 9J34	2.19	9.3978e-12
CPIJ020229	CYP4D42: cytochrome P450 4D42	2.14	4.3423e-11
CPIJ003361	CYP6BY2: cytochrome P450 6BY2	1.87	8.7128e-07
CPIJ001757	CYP4H39: cytochrome P450 4H39	1.45	7.2655e-08
CPIJ010541	CYP9J37: cytochrome P450 9J37	1.44	3.9292e-08
CPIJ015428	CYP6Z10: cytochrome P450 6Z10	1.21	3.7023e-06
CPIJ010231	CYP12F9: cytochrome P450 12F9	1.19	0.00050422
CPIJ004411	CYP6Z12: cytochrome P450 6Z12	1.17	0.00013778
CPIJ017014	CYP6AG14: cytochrome P450 6AG14	1.17	0.00078117
CPIJ014220	CYP9M12: cytochrome P450 9M12	1.09	0.00018537
CPIJ001759	CYP4H40: cytochrome P450 4H40	1.06	7.0153e-06
CPIJ009478	CYP4D42: cytochrome P450 4D42	1.03	0.00078117
CPIJ005956	CYP6BZ2: cytochrome P450 6BZ2	1.03	3.0271e-06

(continua)

CPIJ014219	CYP9M10P: cytochrome P450 9M10-de1b	1.00	0.01817578
------------	-------------------------------------	------	------------

**Glutathiona-S-transferase**

CPIJ020053	glutathione transferase AtGST, putative	1.06	0.00242015
------------	---	------	------------

**Reprimidos****Monooxidases de função mista**

CPIJ016846	CYP6M13: cytochrome P450 6M13	-2.66	7.7962e-06
CPIJ016852	CYP6N19: cytochrome P450 6N19	-2.07	4.0134e-14
CPIJ019704	CYP6N24: cytochrome P450 6N24	-1.81	0.00100968
CPIJ016848	CYP6M14: cytochrome P450 6M14	-1.75	5.2852e-09
CPIJ019673	CYP6AG15: cytochrome P450 6AG15	-1.66	4.1147e-05
CPIJ010538	CYP9J46: cytochrome P450 9J46	-1.65	1.2014e-05
CPIJ016855	CYP6N20: cytochrome P450 6N20	-1.61	8.2221e-08
CPIJ020199	CYP6N20: cytochrome P450 6N20	-1.52	0.00091517
CPIJ019702	CYP6M16: cytochrome P450 6M16	-1.39	0.00333432
CPIJ016853	CYP6N21P: cytochrome P450 6N21P	-1.18	0.00653079
CPIJ011127	CYP4H34: cytochrome P450 4H34	-1.12	0.00323356
CPIJ003082	CYP9J42: cytochrome P450 9J42	-1.10	0.00030927
CPIJ014050	cytochrome c oxidase copper chaperone	-1.02	0.03219584
CPIJ010544	CYP9J33: cytochrome P450 9J33	-1.01	0.00024832

**Glutathiona-S-transferase**

CPIJ018624	Glutathione-s-transferase theta, gst	-2.84	1.5863e-14
CPIJ018626	Glutathione-s-transferase theta, gst	-2.67	3.2924e-18
CPIJ002676	Glutathione S-transferase D7	-2.17	1.3381e-10
CPIJ002675	Glutathione S-transferase 1	-1.86	0.00318963
CPIJ000031	Glutathione S-transferase	-1.61	2.9457e-08
CPIJ002679	Glutathione S-transferase theta-2	-1.55	0.03652686
CPIJ018627	Glutathione S-transferase 1-1	-1.41	9.5589e-09
CPIJ002678	Glutathione transferase I	-1.36	0.00205536

**Esterases**

CPIJ013918	esterase B1 precursor	-1.09	3.8495e-06
------------	-----------------------	-------	------------

<sup>a</sup> Foram selecionadas enzimas das classes Monooxidases de função mista (MFO), Glutathiona-S-transferase (GST) e Esterases (EST).

<sup>b</sup> Em verde genes induzidos iguais para as colônias REC e REC-2, em vermelho genes reprimidos iguais para as colônias REC e REC-2.

**APENDICE C – DESCRIÇÃO DE *CLUSTERS* STRING DE GENES DE *CULEX QUINQUEFASCIATUS* SUPER E REPRIMIDOS NA COLÔNIA RESISTENTE REC EM RELAÇÃO À SUSCEPTÍVEL.**

<b>Cluster</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Anotação</b>
<b>Super-expresso</b>		
<b>1. Synaptic protein putative (28 genes)</b>	CPIJ000611	Sulfate transporter 1.2
	CPIJ007652	synaptic vesicle protein, putative
	CPIJ008065	Caspase-1
	CPIJ016551	Caspase-1
	CPIJ011346	Notch
	CPIJ008531	lactase-phlorizin hydrolase precursor
	CPIJ014140	Putative uncharacterized protein
	CPIJ006731	numb-associated kinase, putative
	CPIJ008946	Sugar transporter
	CPIJ001812	Sugar transporter
	CPIJ000988	Sugar transporter
	CPIJ008944	Sugar transporter
	CPIJ008283	Multidrug resistance protein 2
	CPIJ018355	smad, putative
	CPIJ005640	Heat shock protein 26
	CPIJ003259	Tubulin beta-2C chain
	CPIJ010052	Ankyrin repeat domain-containing protein 44
	CPIJ008490	Ankyrin repeat domain-containing protein 44
	CPIJ006282	serine/threonine protein kinase, putative
	CPIJ009756	DNA topoisomerase 3-beta
	CPIJ006370	Tak1
	CPIJ001777	ataxia telangiectasia mutated, putative
	CPIJ009758	serine/threonine protein kinase, putative
	CPIJ017156	Ankyrin repeat and SOCS box protein 13
	CPIJ003603	Putative uncharacterized protein
	CPIJ006497	Putative uncharacterized protein
	CPIJ002025	Putative uncharacterized protein
	CPIJ003589	Putative uncharacterized protein
<b>2. Glutathione transferase atgst (8 genes)</b>	CPIJ019446	copper transport protein
	CPIJ013879	DNA polymerase theta
	CPIJ000415	Phosphatidyltransferase
	CPIJ006409	Alanine-glyoxylate aminotransferase
	CPIJ002680	Glutathione S-transferase
	CPIJ020053	glutathione transferase AtGST, putative
	CPIJ003198	Neuropathy target esterase/swiss cheese phosphatidylcholine-sterol acyltransferase precursor
	CPIJ010979	

(continua)

<b>3. Cyp6z10 cytochrome p450</b> (25 genes)	CPIJ005958	CYP6AA8: cytochrome P450 6AA8
	CPIJ015428	CYP6Z10: cytochrome P450 6Z10
	CPIJ010068	ATP-binding cassette sub-family A member 7
	CPIJ010067	ATP-binding cassette sub-family A member 3
	CPIJ013381	Sorbitol dehydrogenase dehydrogenase/reductase SDR family member 7 precursor
	CPIJ011026	
	CPIJ008959	Ribulokinase 2
	CPIJ012752	cysteine synthase
	CPIJ006606	Molybdopterin cofactor synthesis protein a
	CPIJ007581	Vanin-like protein 1 precursor, putative
	CPIJ018848	Mitochondrial protein import protein MAS5 NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial precursor
	CPIJ003305	
	CPIJ003304	Isocitrate dehydrogenase [NADP]
	CPIJ006761	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
	CPIJ012364	Abc transporter
	CPIJ009744	Putative uncharacterized protein
	CPIJ000005	Malate synthase Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase
	CPIJ001195	
	CPIJ001759	CYP4H40: cytochrome P450 4H40
	CPIJ009637	sterol desaturase, putative
	CPIJ020229	CYP4D42: cytochrome P450 4D42
	CPIJ015670	4-coumarate-CoA ligase 3
	CPIJ002867	AMP dependent coa ligase, putative
	CPIJ000426	Acetyl-coenzyme A synthetase
	CPIJ001556	acyl-coenzyme A oxidase 3
<b>4. Arabnose 1 dehydrogenase</b> (2 genes)	CPIJ006248	D-arabinose 1-dehydrogenase
	CPIJ010259	voltage and ligand gated potassium channel
<b>5. Anionic trypsin protease</b> (13 genes)	CPIJ006081	trypsin alpha precursor
	CPIJ016105	trypsin-3 precursor
	CPIJ016224	anionic trypsin-2 precursor
	CPIJ011382	chymotrypsin 1 precursor
	CPIJ002138	chymotrypsinogen, putative
	CPIJ002128	mast cell protease 2 precursor
	CPIJ017792	Serine protease
	CPIJ006075	trypsin beta precursor
	CPIJ016301	Serine protease inhibitor A3G
	CPIJ009131	Serpin B4
	CPIJ011298	Brachyurin kallikrein-6 precursor
	CPIJ016104	

(continua)

<b>6. Leucine protein uncharacterized</b> (15 genes)	CPIJ009106	angiotensin-converting enzyme precursor
	CPIJ000133	Putative uncharacterized protein
	CPIJ009107	Angiotensin-converting enzyme
	CPIJ015813	Putative uncharacterized protein
	CPIJ001265	Alkaline phosphatase
	CPIJ012036	aminopeptidase N precursor
	CPIJ000344	39S ribosomal protein L24, mitochondrial precursor
	CPIJ011273	39S ribosomal protein 54, mitochondrial precursor
	CPIJ004718	Putative uncharacterized protein
	CPIJ010345	Putative uncharacterized protein
	CPIJ003521	Putative uncharacterized protein
	CPIJ010972	Zinc finger protein
	CPIJ012250	Troponin C
	CPIJ005191	leucine-rich repeat-containing protein 15 precursor
	CPIJ000316	Putative uncharacterized protein
<b>7. Brown fat uncoupling</b> (3 genes)	CPIJ004238	Mitochondrial brown fat uncoupling protein
	CPIJ007566	Mitochondrial cytochrome c1
	CPIJ018192	Putative uncharacterized protein
<b>8. Cysteine dioxygenase</b> (2 genes)	CPIJ010456	Cysteine dioxygenase
	CPIJ020056	Cysteine dioxygenase
<b>Sub-expresso</b>		
<b>1. High choriolytic enzyme</b> (3 genes)	CPIJ002941	high choriolytic enzyme 1 precursor
	CPIJ017039	cd36 antigen, putative
	CPIJ010029	Suppressor of profilin 2
<b>2. Acid dehydrogenase</b> (44 genes)	CPIJ007736	Steroid dehydrogenase
	CPIJ005656	Oxidoreductase
	CPIJ016922	Serine 3-dehydrogenase
	CPIJ008853	Maltose phosphorylase
	CPIJ004872	protein phosphatase 2C isoform beta
	CPIJ013880	Heat shock protein 67B2
	CPIJ013923	glucosyl/glucuronosyl transferases
	CPIJ003695	glucosyl/glucuronosyl transferases
	CPIJ017634	Disulfide oxidoreductase
	CPIJ003007	elongase, putative
	CPIJ011602	NADH-cytochrome b5 reductase
	CPIJ010601	N-terminal acetyltransferase A complex catalytic subunit ARD1
	CPIJ011854	CD98hc amino acid transporter protein
		(continua)

---

	CPIJ013173	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT
	CPIJ002336	Putative uncharacterized protein
	CPIJ013752	Acyl-CoA Delta(11) desaturase
	CPIJ004400	ornithine aminotransferase, mitochondrial
	CPIJ014050	cytochrome c oxidase copper chaperone
	CPIJ019817	Cytochrome c oxidase assembly protein COX19
	CPIJ017662	Peroxisome biogenesis factor 1
	CPIJ009186	Complement component
	CPIJ016097	Peroxisomal membrane protein 70 abcd3
	CPIJ020199	CYP6N20: cytochrome P450 6N20
	CPIJ017671	Ubiquitin thioesterase OTU1
	CPIJ005348	lipase 3 precursor
	CPIJ011934	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase
	CPIJ016453	Acyl-coa dehydrogenase
	CPIJ005214	Ceramide glucosyltransferase
	CPIJ019193	Dihydroceramide delta(4)-desaturase
	CPIJ012503	gamma-glutamylcysteine synthetase, putative
	CPIJ015408	branched-chain amino acid aminotransferase
	CPIJ005595	Fatty acid synthase S-acetyltransferase
	CPIJ011600	Long-chain-fatty-acid coa ligase
	CPIJ009956	D-amino acid oxidase
	CPIJ014557	Nitrilase and fragile histidine triad fusion protein NitFhit
	CPIJ012341	Malic enzyme
	CPIJ014889	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha
	CPIJ003395	Reductase protein
	CPIJ015947	purine nucleoside phosphorylase
	CPIJ016639	acetyl-coa synthetase
	CPIJ008729	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial precursor
	CPIJ014581	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
	CPIJ003456	Uricase
	CPIJ013919	Xanthine dehydrogenase/oxidase
<b>3. Prosalpha4 26s proteasome</b>	CPIJ011644	Ubiquitin-protein ligase
<b>(13 genes)</b>	CPIJ000716	ion channel nompc
	CPIJ018694	Ion channel nompc
	CPIJ013539	ankyrin repeat and SOCS box protein 10
	CPIJ018744	ankyrin 2,3/unc44
	CPIJ005690	ASNA1: arsenical pump-driving ATPase
	CPIJ017540	Coatomer subunit delta
	CPIJ001197	Golgi-specific brefeldin a-resistance factor

---

(continua)

CPIJ002590 Amsh

	CPIJ017386	proteasome subunit beta type 8 precursor
	CPIJ008264	proteasome subunit beta type 7 precursor
	CPIJ001361	proteasome subunit beta type 3
	CPIJ007179	Prosalpha4: 26S proteasome alpha 4 subunit
<b>4. Glutathione transferase trna (18 genes)</b>	CPIJ015475	Thiamin pyrophosphokinase 1
	CPIJ003279	Tryptophanyl-tRNA synthetase
	CPIJ002063	Mitochondrial ribosomal protein L42
	CPIJ018629	Glutathione-s-transferase theta, gst
	CPIJ002675	Glutathione S-transferase 1
	CPIJ018627	Glutathione S-transferase 1-1
	CPIJ002676	Glutathione S-transferase D7
	CPIJ018626	Glutathione-s-transferase theta, gst
	CPIJ018624	Glutathione-s-transferase theta, gst
	CPIJ002678	Glutathione transferase I
	CPIJ016525	Histidyl-tRNA synthetase
	CPIJ015476	Aspartyl-tRNA synthetase
	CPIJ017452	lysyl-tRNA synthetase
	CPIJ003753	Methionyl-tRNA formyltransferase
	CPIJ004709	Bifunctional protein fold
	CPIJ000730	Arginyl-tRNA synthetase
	CPIJ015212	Aspartyl-tRNA synthetase
	CPIJ013588	Mitochondrial 28S ribosomal protein S2
<b>5. Trafficking protein glycotransferase (35 genes)</b>	CPIJ007404	Guanine nucleotide-binding protein sub beta 1
	CPIJ006918	Putative uncharacterized protein
	CPIJ002989	Oseg1
	CPIJ013401	Mical
	CPIJ011962	Multidrug resistance-associated protein 14
	CPIJ010842	Transmembrane trafficking protein
	CPIJ001371	serine/threonine-protein phosphatase 4 catal sub
	CPIJ018565	Peptide methionine sulfoxide reductase
	CPIJ015623	Predicted protein
	CPIJ006912	Maggie
	CPIJ015241	Alkaline phosphatase glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial precursor
	CPIJ003608	
	CPIJ009280	Pgk: Phosphoglycerate kinase
	CPIJ006688	kinesin heavy chain subunit
	CPIJ006724	tubulin alpha-1 chain
	CPIJ019851	Myosin i
	CPIJ003661	alpha-1,2-Mannosidase
	CPIJ009935	mannosyl-oligosaccharide $\alpha$ -1,2-mannosidase
		(continua)
	CPIJ003821	Sel11 protein

CPIJ019225	Calmodulin
CPIJ003399	Peroxiredoxins, prx-1, prx-2, prx-3
CPIJ008450	Peroxiredoxin-6
CPIJ007327	protein disulfide-isomerase A6 precursor
CPIJ005137	Sec61 protein complex gamma subunit, putative
CPIJ007196	hypoxia up-regulated 1
CPIJ007376	Calreticulin
CPIJ002043	Translocon-associated protein, delta subunit
CPIJ018234	translocon-associated protein sub alpha
CPIJ009620	Serine/threonine-protein phosphatase 5
CPIJ003550	78 kDa glucose-regulated protein precursor
CPIJ011246	Heat shock protein 83
CPIJ007228	heat shock protein, putative
CPIJ009388	Thermosome subunit alpha dolichyl-diphosphooligosaccharide prot glycotransferase
CPIJ005168	
CPIJ008679	Oligosaccharyl transferase

**6. Ribosome factor protein  
(39 genes)**

CPIJ003580	cle7, putative
CPIJ003710	Putative uncharacterized protein
CPIJ012815	Mannose-1-phosphate guanyltransferase
CPIJ020069	Methionine aminopeptidase 2
CPIJ007346	TTC27 protein
CPIJ002909	Far upstream binding protein
CPIJ002334	Importin-4
CPIJ015011	Putative uncharacterized protein
CPIJ010271	zinc finger 622-like Williams Beuren syndrome chromosome region 22
CPIJ001394	
CPIJ007014	Splicing factor 3B subunit 3
CPIJ009445	DEAD box ATP-dependent RNA helicase
CPIJ002096	Importin-7
CPIJ008595	ran
CPIJ010145	Midasin
CPIJ010146	Putative uncharacterized protein
CPIJ008476	Putative uncharacterized protein heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, putative
CPIJ001612	
CPIJ012850	Splicing factor u2af large subunit DNA-directed RNA polymerase II 16 kDa polypeptide
CPIJ006734	
CPIJ000540	Putative uncharacterized protein DNA-directed RNA polymerase I 40 kDa polypeptide
CPIJ003123	
CPIJ016931	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1

(conclusão)

---

CPIJ009793	Glioma tumor suppressor candidate region gene
------------	---

---

		2 protein
	CPIJ015389	Proliferation-associated 2g4
	CPIJ015682	Translation initiation factor if-2
	CPIJ011259	Eukaryotic translation initiation factor
	CPIJ012840	39S ribosomal protein L24, mitochondrial
	CPIJ009285	Ribosome production factor 1
	CPIJ005330	60S ribosome sub biogen protein NIP7 homolog
	CPIJ018833	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3
	CPIJ008588	mRNA turnover protein 4
	CPIJ005010	Fibrillarin
	CPIJ007556	Regulator of ribosome biosynthesis
	CPIJ010674	Proliferating-cell nucleolar antigen p120
	CPIJ012888	rRNA processing protein Ebp2
	CPIJ000795	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4
	CPIJ005033	Nucleolar protein NHP2
<b>7. Cytochrome p450 6n24</b> (4 genes)	CPIJ016849	CYP6M12: cytochrome P450 6M12
	CPIJ019704	CYP6N24: cytochrome P450 6N24
	CPIJ016853	CYP6N21P: cytochrome P450 6N21P
	CPIJ009498	Adrenodoxin
<b>8. Niemann pick c1</b> (3 genes)	CPIJ018326	Niemann-Pick Type C-2
	CPIJ012180	NPC2 homolog
	CPIJ014970	niemann-Pick C1 protein precursor
<b>9. Trypsin 2 precursor</b> (3 genes)	CPIJ000770	trypsin precursor
	CPIJ000771	trypsin-2 precursor
	CPIJ001505	Putative uncharacterized protein
<b>10. Hematopoietic signal domain</b> (4 genes)	CPIJ006347	actin binding protein, putative Hematopoietic signal peptide-containing
	CPIJ006776	membrane domain-containing 1
	CPIJ005257	transmembrane protein 85
	CPIJ014590	Putative uncharacterized protein
<b>11. Inosine 5 monophosphate</b> (3 genes)	CPIJ002337	Ribonucleoside-diphosphate reduct small chain
	CPIJ005468	Adenosine diphosphatase
	CPIJ011687	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase

---

**APÊNDICE D – DESCRIÇÃO DE *CLUSTERS* STRING DE GENES DE *CULEX QUINQUEFASCIATUS* SUPER E REPRIMIDOS NA COLÔNIA RESISTENTE REC-2 EM RELAÇÃO À SUSCEPTÍVEL.**

<b>Cluster</b>	<b>Gene id</b>	<b>Anotação</b>
<b>Super-expressos</b>		
<b>1. Synaptic vesicle protein (21 genes)</b>	CPIJ004417	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
	CPIJ000377	Homogentisate 1,2-dioxygenase
	CPIJ003603	Putative uncharacterized protein
	CPIJ003589	Putative uncharacterized protein
	CPIJ017156	Ankyrin repeat and SOCS box protein 13
	CPIJ001777	ataxia telangiectasia mutated, putative
	CPIJ009655	Elongation factor 1-alpha
	CPIJ020053	glutathione transferase AtGST, putative
	CPIJ008490	Ankyrin repeat domain-containing protein 44
	CPIJ005640	Heat shock protein 26
	CPIJ000191	Sugar transporter
	CPIJ001812	Sugar transporter
	CPIJ004944	Origin recognition complex subunit 4
	CPIJ011346	Notch
	CPIJ012979	Crumbs
	CPIJ001773	Synaptic vesicle protein
	CPIJ007652	synaptic vesicle protein, putative
	CPIJ018848	Mitochondrial protein import protein MAS5
	CPIJ000344	39S ribosomal protein L24, mitochondrial precursor
	CPIJ017149	l(2) long form, putative
	CPIJ006761	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
<b>2. Alkaline phosphatase putative (16 genes)</b>	CPIJ014296	Troponin i
	CPIJ009743	Troponin t, invertebrate
	CPIJ013259	myosin light chain 1, putative
	CPIJ003058	Troponin C
	CPIJ000853	Myosin heavy chain
	CPIJ000852	Myosin-Id
	CPIJ012573	Actin
	CPIJ019840	Actinin
	CPIJ003974	Putative uncharacterized protein
	CPIJ002358	titin, putative
	CPIJ003562	Putative uncharacterized protein
	CPIJ001265	Alkaline phosphatase
	CPIJ015813	Putative uncharacterized protein
	CPIJ013085	Sarcalumenin

(continua)

---

	CPIJ003989	laminin subunit alpha precursor
	CPIJ014779	Putative uncharacterized protein
<b>3. Trypsin inhibitor serine (15 genes)</b>	CPIJ016697	Leukocyte elastase inhibitor
	CPIJ016301	Serine protease inhibitor A3G
	CPIJ012013	serine protease inhibitor, serpin
	CPIJ016224	anionic trypsin-2 precursor
	CPIJ006075	trypsin beta precursor
	CPIJ002659	Transmembrane protease
	CPIJ001979	Putative uncharacterized protein
	CPIJ009625	proclotting enzyme precursor
	CPIJ017789	Serine protease
	CPIJ002138	chymotrypsinogen, putative
	CPIJ011382	chymotrypsin 1 precursor
	CPIJ017792	Serine protease
	CPIJ017793	Elegaxobin-2
	CPIJ011298	Brachyurin
	CPIJ006792	spaetzle 1B
<b>4. Fibrinogen ficolin precursor (8 genes)</b>	CPIJ006967	Putative uncharacterized protein
	CPIJ002938	meprin A subunit beta precursor
	CPIJ015785	transferrin precursor
	CPIJ012040	ficolin-1 precursor
	CPIJ006120	microfibril-associated glycoprotein 4 precursor
	CPIJ012831	Fibrinogen and fibronectin
	CPIJ007727	Fibrinogen and fibronectin
	CPIJ013538	ficolin-1 precursor
<b>5. Dehydrogenase reductase sdr (9 genes)</b>	CPIJ012752	cysteine synthase
	CPIJ002835	serine-pyruvate aminotransferase
	CPIJ006409	Alanine-glyoxylate aminotransferase
	CPIJ003432	Aldehyde dehydrogenase
	CPIJ005432	NAD-dependent methanol dehydrogenase
	CPIJ011026	dehydrogenase/reductase SDR family member 7 precursor
	CPIJ002534	Sodium/iodide cotransporter
	CPIJ002361	sodium/solute symporter, putative
	CPIJ000151	Sodium/solute symporter
<b>6. Cysteine dioxygenase (2 genes)</b>	CPIJ020056	Cysteine dioxygenase
	CPIJ010456	Cysteine dioxygenase

(continua)

---

**Sub-expressos**
**1. Glutathione transferase****d7****(21 genes)**

CPIJ011602 NADH-cytochrome b5 reductase  
 CPIJ005214 Ceramide glucosyltransferase  
 CPIJ003395 Reductase protein  
 CPIJ005348 lipase 3 precursor  
 CPIJ000225 UDP-glucuronosyltransferase R-21  
 CPIJ010762 glucosyl/glucuronosyl transferases  
 CPIJ020264 UDP-glucuronosyltransferase 2B15 precursor  
 CPIJ018626 Glutathione-s-transferase theta, gst  
 CPIJ018627 Glutathione S-transferase 1-1  
 CPIJ002678 Glutathione transferase I  
 CPIJ002679 Glutathione S-transferase theta-2  
 CPIJ002676 Glutathione S-transferase D7  
 CPIJ018624 Glutathione-s-transferase theta, gst  
 CPIJ017634 Disulfide oxidoreductase  
 CPIJ017306 Sterol desaturase  
 CPIJ000031 Glutathione S-transferase  
 CPIJ002675 Glutathione S-transferase 1  
 CPIJ007010 Peroxisomal membrane protein pmp34  
 CPIJ016097 Peroxisomal membrane protein 70 abcd3  
 CPIJ020199 CYP6N20: cytochrome P450 6N20  
 CPIJ003059 acyl-CoA oxidase

**2. Elongase putative steroid****(2 genes)**

CPIJ003007 elongase, putative  
 CPIJ007736 Steroid dehydrogenase

**3. Proteasome subunit ankyrin****(15 genes)**

CPIJ017540 Coatomer subunit delta  
 CPIJ018694 Ion channel nompc  
 CPIJ018744 ankyrin 2,3/unc44  
 CPIJ013539 ankyrin repeat and SOCS box protein 10  
 CPIJ019172 Histone deacetylase  
 CPIJ008163 Skeletal muscle/kidney enriched inositol 5-phosphatase  
 CPIJ019125 ATP-binding cassette sub-family G member 4  
 CPIJ012675 Sugar transporter  
 CPIJ011962 Multidrug resistance-associated protein 14  
 CPIJ002194 Synaptojanin  
 CPIJ004537 Double-strand break repair protein MRE11  
 CPIJ013525 Putative uncharacterized protein  
 CPIJ015971 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11  
 CPIJ000897 proteasome subunit alpha type 1  
 CPIJ017386 proteasome subunit beta type 8 precursor

(continua)

**4. Pyruvate dehydrogenase****e1****(13 genes)**

CPIJ019704 CYP6N24: cytochrome P450 6N24  
 CPIJ016853 CYP6N21P: cytochrome P450 6N21P  
 CPIJ001316 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating  
 CPIJ000337 isocitrate dehydrogenase cytoplasmic  
 CPIJ005595 Fatty acid synthase S-acetyltransferase  
 CPIJ011633 short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial  
 CPIJ012907 Luciferin 4-monooxygenase  
 CPIJ016453 Acyl-coa dehydrogenase  
 CPIJ010515 Phosphoenolpyruvate carboxykinase  
 CPIJ008729 4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial precursor  
 CPIJ016639 acetyl-coa synthetase  
 CPIJ012341 Malic enzyme  
 CPIJ014889 Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha

**5. Peroxiredoxins prx 3****(9 genes)**

CPIJ005064 alpha-amylase precursor  
 CPIJ004872 protein phosphatase 2C isoform beta  
 CPIJ013919 Xanthine dehydrogenase/oxidase  
 CPIJ008904 alpha-glucosidase, putative  
 CPIJ013173 Neutral and basic amino acid transport protein rBAT  
 CPIJ003399 Peroxiredoxins, prx-1, prx-2, prx-3  
 CPIJ007327 protein disulfide-isomerase A6 precursor  
 CPIJ002337 Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain  
 CPIJ005468 Adenosine diphosphatase

**6. Mrna turnover protein****(13 genes)**

CPIJ003818 Putative uncharacterized protein  
 CPIJ007196 Putative uncharacterized protein  
 CPIJ014363 Rrp15 protein  
 CPIJ009657 Putative uncharacterized protein  
 CPIJ012182 Putative uncharacterized protein  
 CPIJ006734 DNA-directed RNA polymerase II 16 kDa polypeptide  
 CPIJ008859 Putative uncharacterized protein  
 CPIJ003123 DNA-directed RNA polymerase I 40 kDa polypeptide  
 CPIJ006169 WD repeat protein 74  
 CPIJ006466 H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4  
 CPIJ012840 39S ribosomal protein L24, mitochondrial precursor  
 CPIJ005330 60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog  
 CPIJ008588 mRNA turnover protein 4

**7. Branched vanin  
pantetheinase****(6 genes)**

CPIJ015408 branched-chain amino acid aminotransferase  
 CPIJ007583 pantetheinase precursor  
 CPIJ017592 Vanin-like protein 1 precursor, putative  
 CPIJ017593 pantetheinase precursor  
 CPIJ002523 Spermidine synthase

(conclusão)

---

	CPIJ009093	Ornithine decarboxylase
<b>8. DNA damage-binding</b>	CPIJ002989	Oseg1
<b>(2 genes)</b>	CPIJ017291	DNA damage-binding 1-like
<b>9. Sel1 putative</b>		
<b>uncharacterized</b>	CPIJ002336	Putative uncharacterized protein
<b>(3 genes)</b>	CPIJ003821	Sel11 protein
	CPIJ009449	Putative uncharacterized protein

---

**APENDICE E – DESCRIÇÃO DE *CLUSTERS* STRING DE GENES DE *CULEX QUINQUEFASCIATUS* SUPER E REPRIMIDOS NA COLÔNIA RESISTENTE REC EM RELAÇÃO À REC-2.**

<b>Cluster</b>	<b>Gene id</b>	<b>Anotação</b>
<b>Super-expressos</b>		
<b>Toll9 protein tyrosine (8 genes)</b>	CPIJ012325	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 21
	CPIJ002913	Putative uncharacterized protein
	CPIJ000897	proteasome subunit alpha type 1
	CPIJ008490	Ankyrin repeat domain-containing protein 44
	CPIJ000058	Receptor protein tyrosine kinase
	CPIJ006515	Toll9, putative
	CPIJ004946	leucine-rich repeat-containing protein 15 precursor
	CPIJ006370	Tak1
<b>UDP glucuronosyltransferase precursor (5 genes)</b>	CPIJ011358	Putative uncharacterized protein
	CPIJ000225	UDP-glucuronosyltransferase R-21
	CPIJ000039	glucosyl/glucuronosyl transferases
	CPIJ000037	UDP-glucuronosyltransferase 2B20 precursor
	CPIJ002897	APG8: autophagy related gene
<b>Mannosyl glycoprotein 1 (2 genes)</b>	CPIJ003929	Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein beta-1
	CPIJ010412	Fucosyltransferase 11
<b>Trans enoyl coa (4 genes)</b>	CPIJ013528	pyruvate dehydrogenase
	CPIJ005435	Peroxisomal 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase
	CPIJ003059	acyl-CoA oxidase
	CPIJ015227	acetyl-coa acetyltransferase 2, putative
<b>Alpha-glucosidase putative (3 genes)</b>	CPIJ016362	alpha-glucosidase precursor
	CPIJ008904	alpha-glucosidase, putative
	CPIJ009306	neutral alpha-glucosidase ab precursor
<b>3 Phosphate acyltransferase (2 genes)</b>	CPIJ001670	glycerol-3-phosphate acyltransferase, putative
	CPIJ012839	1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase, putative
<b>Replication factor 14kD (2 genes)</b>	CPIJ003130	replication factor A, 14kD-subunit, putative
	CPIJ009756	DNA topoisomerase 3-beta
<b>Cystathionine gamma lyase (2 genes)</b>	CPIJ006619	Cystathionine gamma-lyase
	CPIJ010456	Cysteine dioxygenase

(continua)

<b>Sub-expressos</b>	
<b>Arginine splicing factor</b> (8 genes)	CPIJ008595 ran
	CPIJ018694 Ion channel nompc
	CPIJ008675 Diphthine synthase
	CPIJ003279 Tryptophanyl-tRNA synthetase
	CPIJ002909 Far upstream binding protein
	CPIJ008786 Arginine/serine-rich splicing factor
	CPIJ019323 Histone-lysine n-methyltransferase
	CPIJ005834 elongation factor G 1, mitochondrial precursor
<b>Cationic amino acid</b> (4 genes)	CPIJ004246 Insect cationic amino acid transporter
	CPIJ013173 Neutral and basic amino acid transport protein rBAT
	CPIJ005060 alpha-amylase B precursor
	CPIJ008851 Maltose phosphorylase
<b>Molybdenum cofactor synthesis</b> (4 genes)	CPIJ013880 Heat shock protein 67B2
	CPIJ008450 Peroxiredoxin-6
	CPIJ001621 molybdenum cofactor synthesis protein 3
	CPIJ012752 cysteine synthase
<b>Myosin chain 1</b> (6 genes)	CPIJ003456 Uricase
	CPIJ013085 Sarcalumenin
	CPIJ010029 Suppressor of profilin 2
	CPIJ019851 Myosin i
	CPIJ009743 Troponin t, invertebrate
	CPIJ013259 myosin light chain 1, putative
<b>Potassium chloride symporter</b> (2 genes)	CPIJ012779 potassium/chloride symporter, putative
	CPIJ015177 Serine/threonine-protein kinase OSR1
<b>Dihydrolipoamide branched chain</b> (2 genes)	CPIJ006326 dihydrolipoamide branched chain transacylase E2
	CPIJ006455 enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor
<b>Ribosomal putative protein</b> (7 genes)	CPIJ010525 dendritic cell protein
	CPIJ002063 Mitochondrial ribosomal protein L42
	CPIJ008604 mitochondrial ribosomal protein, L48, putative
	CPIJ008421 ribosomal protein L28, putative
	CPIJ002183 60S ribosomal protein L21
	CPIJ001270 60S ribosomal protein L10a
	CPIJ004890 Putative uncharacterized protein
<b>Glioma tumor candidate</b> (7 genes)	CPIJ003009 Putative uncharacterized protein
	CPIJ010145 Midasin
	Glioma tumor suppressor candidate region gene 2
	CPIJ009793 protein
	CPIJ009445 DEAD box ATP-dependent RNA helicase

(conclusão)

---

	CPIJ016931	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1
	CPIJ004960	Nucleolar GTP-binding protein
	CPIJ015389	Proliferation-associated 2g4
<b>Glutathione transferase gst</b>	CPIJ017452	lysyl-tRNA synthetase
<b>(6 genes)</b>	CPIJ018632	Glutathione-s-transferase theta, gst
	CPIJ018629	Glutathione-s-transferase theta, gst
	CPIJ002683	Glutathione S-transferase 1-1
	CPIJ009620	Serine/threonine-protein phosphatase 5
	CPIJ011246	Heat shock protein 83

---