



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

YURI MATEUS GARCIA DA SILVA

**Panteteinases de *Culex quinquefasciatus*: padrão de
transcrição e detecção em larvas suscetíveis e resistentes
ao larvicida *Lysinibacillus sphaericus***

Recife
2025

YURI MATEUS GARCIA DA SILVA

Panteteinases de *Culex quinquefasciatus*: padrão de transcrição e detecção em larvas suscetíveis e resistentes ao larvicida *Lysinibacillus sphaericus*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Coorientadora: Heverly Suzany Gouveia de Menezes

Recife
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Yuri Mateus Garcia da.

Panteteinases de *Culex quinquefasciatus*: padrão de transcrição e detecção em larvas suscetíveis e resistentes ao larvicida *Lysinibacillus sphaericus* / Yuri Mateus Garcia da Silva. - Recife, 2025.

94p. : il., tab.

Orientador(a): Maria Helena Neves Lobo Silva Filha

Coorientador(a): Heverly Suzany Gouveia de Menezes

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2025.

Inclui referências, apêndices.

1. Transcritos. 2. Imunodetecção. 3. Mosquitos. 4. Controle . 5. Resistência.
I. Silva Filha, Maria Helena Neves Lobo . (Orientação). II. Menezes, Heverly Suzany Gouveia de. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

YURI MATEUS GARCIA DA SILVA

Panteteinases de *Culex quinquefasciatus*: padrão de transcrição e detecção em larvas suscetíveis e resistentes ao larvicida *Lysinibacillus sphaericus*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Instituto Aggeu Magalhães/Entomologia

Prof. Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva (1º Titular)
Universidade Federal de Pernambuco/CAA/NCV

Prof. Dra. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho (2º Titular)
Universidade Federal de Pernambuco/Bioquímica

Me. Luísa Maria Inácio da Silva (Suplente)
Instituto Aggeu Magalhães/Entomologia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar comigo em todos os momentos, me concedendo força, sabedoria, saúde e alegria, a Ele toda honra e glória para sempre.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha (Chica), pela oportunidade, por todo conhecimento compartilhado, disposição para me orientar, pela paciência, pelos valiosos ensinamentos que vão além do profissional e por acreditar em mim.

A minha co-orientadora, Dra. Heverly Suzany Gouveia de Menezes, pela dedicação, apoio em tudo que precisei, pelo conhecimento, pelas conversas e pela amizade.

Aos meus pais, Anigmara Garcia e Emilson Carvalho, por toda a ajuda, por todo o esforço feito para me proporcionar a realização de um sonho, pelas orações, conselhos e conversas, amizade e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus avós, Maria Garcia e Arbogasto Medeiros, que sempre se fizeram presente, com incentivo, orações e muita dedicação para me ajudar no que fosse necessário.

A minha namorada, Rhaissa Idalina, minha amiga e parceira para tudo, por estar comigo nos melhores e piores dias, pelo apoio em tudo, pelos conselhos e longas conversas, por sempre estar comigo e acreditar no meu potencial.

Aos meus amigos da graduação, Pedro, Nathalia, Karen, Isabella, Bruno e José, por cada momento, risadas, resumos, estudos, conversas, comemorações, zoações, vocês facilitaram a minha adaptação nessa nova fase da minha vida, foi incrível dividir a graduação com vocês.

Aos meus amigos/irmãos de Rio das Ostras, Guilherme, Vinicius, Arthur e Gabriel, pela nossa amizade, conversas, incentivo e pelos momentos de alegria.

Aos meus familiares, Mirian e Adriano, pelo suporte e conselhos durante essa caminhada.

Aos membros da banca examinadora, por aceitar o convite e contribuir para a melhoria do trabalho.

As técnicas do insetário, pelo apoio e conhecimento na criação dos mosquitos, em especial a Rose, Ceça, Elisângela e Duschinka.

Ao CNPq pela bolsa que me foi concedida. Ao Instituto Aggeu Magalhães

-FIOCRUZ/PE, pela infraestrutura que possibilitou a realização deste trabalho. A coordenação do programa de Iniciação Científica, pelo suporte.

A Universidade Federal de Pernambuco, que me concede a graduação em biomedicina.

Aos meus colegas do laboratório, por todo o apoio, em especial a Derciliano, Luisa, Tanaka, Marcelo, Juliana, Evaldo, Hyago e Maria Julia.

Ao Dr. Itabajara Vaz da UFRGS e a Dra. Maria Aparecida Juliano da UNIFESP, pela colaboração na produção dos anticorpos utilizados. A Tatiana Rezende, Heverly Suzany Menezes e Josimara Nascimento pela contribuição na preparação das amostras de proteína recombinante utilizadas no trabalho.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

“Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam e a convicção das coisas que não se vêem.” Hebreus 11:1

DA SILVA, Yuri Mateus. **Panteteinases de *Culex quinquefasciatus*: padrão de transcrição e detecção em larvas suscetíveis e resistentes ao larvicida *Lysinibacillus sphaericus***. 2025. 94. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

RESUMO

Larvicidas à base de *Lysinibacillus sphaericus* são usados no controle de *Culex quinquefasciatus*, cujo principal fator inseticida é a protoxina Binária (Bin). A resistência à Bin já foi registrada e está associada à ausência do seu receptor, a alfa-glicosidase Cqm1, e ao respectivo perfil de repressão do transcrito *cqm1* que codifica o receptor em larvas resistentes. Análises transcriptômicas de larvas resistentes revelaram que o transcrito que codifica a proteína *panteteinase* (CPIJ017593) está mais reprimido do que o transcrito *cqm1*, sugerindo um possível envolvimento da panteteinase na ação da toxina Bin. A identificação de novos mecanismos de resistência é fundamental para o controle eficaz de vetores, visto que o conhecimento de múltiplos marcadores moleculares permite uma monitorização mais precisa da resistência em campo. Sendo assim, este trabalho visou determinar e comparar o perfil de transcrição dos genes da *panteteinase* e do *cqm1* em larvas e adultos de colônias suscetíveis (S) e resistentes (R), avaliar a capacidade de dois anticorpos no reconhecimento da proteína recombinante e investigar a expressão de panteteinases em amostras de microvilosidades intestinais (BBMF) de larvas S e R. Os perfis de transcrição foram avaliados por qRT-PCR, utilizando primers específicos, e o reconhecimento das panteteinases recombinantes e nativas por Western-Blot com anticorpos policlonais anti peptídeos imunogênicos da panteteinases (anti-LKR e anti-CPE). A análise da quantificação relativa (Rq) de transcritos mostraram que larvas S apresentaram ampla variação na transcrição da panteteinase ($Rq = 2,65 \pm 3,33$), enquanto larvas R mostraram repressão significativa ($Rq = 0,34 \pm 0,28$). Em adultos (S e R), o perfil de transcrição foi semelhante entre os grupos, e independentemente do sexo. O perfil de transcrição do gene *cqm1* mostra um padrão de repressão em larvas R ($Rq = 0,41 \pm 0,25$) comparado às S ($Rq = 1,54 \pm 1,15$), mantendo esse padrão na fase adulta. A avaliação dos anticorpos anti-peptídeos da panteteinase mostrou que ambos reconhecem a panteteinase recombinante com peso esperado de 70 kDa com sensibilidade e especificidade, e o anticorpo anti-LKR teve um melhor desempenho. Em amostras de BBMF de larvas S, proteínas com peso aparente de 70 kDa, correspondente a panteteinase, foi especificamente reconhecida, enquanto que o anticorpo não reconheceu uma banda equivalente em amostras de larvas R. O conjunto de dados reforça que a repressão da panteteinase está relacionada ao fenótipo de resistência à Bin, e sugere que este gene pode ser um segundo marcador da resistência além do gene *cqm1*, que confere este fenótipo, assim como os resultados sugerem que a panteteinase pode ser uma proteína de membrana, podendo participar do mecanismo de resistência. Este é o primeiro estudo de identificação de uma panteteinase em mosquito, e a compreensão deste mecanismo favorece o desenvolvimento de novas ferramentas de controle vetorial.

Palavras-chave: Transcritos. Imunodetecção. Mosquitos. Controle. Resistência.

DA SILVA, Yuri Mateus. ***Culex quinquefasciatus* pantetheinases: transcription pattern and detection in larvae susceptible and resistant to the larvicide *Lysinibacillus sphaericus***. 2025. 94. Final Project (Bachelor's Degree in Biomedicine) – Federal University of Pernambuco, Recife, 2025.

ABSTRACT

Larvicides based on *Lysinibacillus sphaericus* are used to control *Culex quinquefasciatus*, whose main insecticidal factor is the Binary protoxin (Bin). Resistance to Bin has been reported and is associated with the absence of its receptor, the alpha-glucosidase Cqm1, and the corresponding repression profile of the cqm1 transcript encoding the receptor in resistant larvae. Transcriptomic analyses of resistant larvae revealed that the transcript encoding the pantetheinase protein (CPIJ017593) is more repressed than the cqm1 transcript, suggesting a possible involvement of pantetheinase in the action of the Bin toxin. Identifying new resistance mechanisms is essential for effective vector control, since knowledge of multiple molecular markers allows for more precise monitoring of resistance in the field. Therefore, this work aimed to determine and compare the transcription profile of the pantetheinase and cqm1 genes in larvae and adults of susceptible (S) and resistant (R) colonies, evaluate the capacity of two antibodies in recognizing the recombinant protein and investigate the expression of pantetheinases in intestinal microvilli samples (BBMF) of S and R larvae. The transcription profiles were evaluated by qRT-PCR, using specific primers, and the recognition of recombinant and native pantetheinases by Western-Blot with polyclonal antibodies against immunogenic peptides of pantetheinases (anti-LKR and anti-CPE). The analysis of the relative quantification (Rq) of transcripts showed that S larvae presented wide variation in pantetheinase transcription ($Rq = 2.65 \pm 3.33$), while R larvae showed significant repression ($Rq = 0.34 \pm 0.28$). In adults (S and R), the transcription profile was similar between groups, regardless of sex. The transcription profile of the cqm1 gene shows a repression pattern in R larvae ($Rq = 0.41 \pm 0.25$) compared to S ($Rq = 1.54 \pm 1.15$), maintaining this pattern in the adult phase. The evaluation of anti-pantetheinase peptide antibodies showed that both recognize the recombinant pantetheinase with an expected weight of 70 kDa with sensitivity and specificity, and the anti-LKR antibody performed better. In BBMF samples from S larvae, proteins with an apparent weight of 70 kDa, corresponding to pantetheinase, were specifically recognized, while the antibody did not recognize an equivalent band in samples from R larvae. The data set reinforces that pantetheinase repression is related to the Bin resistance phenotype, and suggests that this gene may be a second marker of resistance in addition to the cqm1 gene, which confers this phenotype, just as the results suggest that pantetheinase may be a membrane protein, and may participate in the resistance mechanism. This is the first study identifying a pantetheinase in mosquitoes, and understanding this mechanism favors the development of new vector control tools.

Key words: Transcription. Immunodetection. Mosquitoes. Gene. Resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição mundial do <i>Culex quinquefasciatus</i> .	20
Figura 2 – Ciclo de vida do <i>Culex quinquefasciatus</i> .	22
Figura 3 – <i>Lysinibacillus sphaericus</i> cepa 2362.	24
Figura 4 – Estrutura tridimensional das subunidades BinA e BinB da toxina Bin.	25
Figura 5 – Principais etapas do modo de ação da toxina Binária presente nos cristais de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	26
Figura 6 – Localização <i>in vivo</i> da toxina Bin e as subunidades BinA e BinB no intestino médio de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	27
Figura 7 – Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos do gene do receptor de toxina binária, <i>cqm1</i> , de larvas <i>Culex quinquefasciatus</i> .	28
Figura 8 – Immunoblotting de amostras de proteínas do microvilli do intestino de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	29
Figura 9 – Avaliação da capacidade da ligação do Cqm1 recombinante com a toxina BinB, por meio de ensaios de <i>pulldown</i> em SDS-PAGE a 10%.	29
Figura 10 – Estrutura do monômero Cqm1 mostrando os seus três domínios.	30
Quadro 1 – Populações de <i>Culex pipiens/Culex quinquefasciatus</i> ou colônias selecionadas em laboratório ou expostas a <i>Lysinibacillus sphaericus</i> em campo investigadas quanto à resistência.	31
Figura 11 – Alelos <i>cqm1</i> de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia suscetível (S) e de duas colônias resistentes a <i>L. sphaericus</i> (REC e REC-2) por PCR-multiplex.	34
Figura 12 – Expressão relativa dos alelos <i>cqm1</i> , <i>cqm1_{REC}</i> e <i>cqm1_{REC-2}</i> em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia suscetível e duas colônias resistentes (REC e REC-2) a <i>Lysinibacillus sphaericus</i> , por RT-PCR quantitativa.	35
Figura 13 – Immunoblotting da expressão do Cqm1 em microvilosidades do intestino médio (B) e em larvas inteiras (L) de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetível (CqSF) e resistente (CqRL1/2362) à toxina Bin.	35
Figura 14 – Atividade enzimática de α -glicosidase em gel em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetíveis (S) e resistentes a <i>L. sphaericus</i> (REC e REC-2).	36
Quadro 2 – Perfil de repressão diferencial de transcritos dos genes que codificam o Cqm1 e a panteteinase (<i>pan1</i> e <i>pan2</i>) em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistentes à toxina Binária (RIAB59, REC, REC2) comparados	37

a suscetíveis em redução de transcritos.

Figura 15 – Figuras dos dois perfis de transcrição da *panteteinase* de larvas suscetíveis (S) e resistentes (RIAB59, REC e REC-2) feito por qRT-PCR para validar transcriptoma. 37

Figura 16 – Proteínas do microvilli do intestino de *Culex quinquefasciatus* identificadas por ensaio de *pull-down* como possíveis ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa. 38

Figura 17 – Alinhamento da sequência de aminoácidos das panteteinases de *Cx. quinquefasciatus*. 39

Figura 18 – Expressão da panteteinase recombinante CPIJ017593 de *Culex quinquefasciatus* em SDS-PAGE a 10% corados com azul de Coomassie (CB) e detectadas por imunoblotting com anticorpos monoclonais direcionados à etiqueta de poli-histidina (anti-His) ou anticorpos policlonais contra a panteteinase recombinante (anti-Pan). 40

Figura 19 – Perfil de transcritos da panteteinase em diferentes tecidos de *Mamestra configurata* por reações de RT-PCR. 41

Figura 20 – Perfil eletroforético da panteteinase (Vanina-1) em SDS-PAGE. 42

Figura 21 – Estrutura tridimensional da panteteinase (VNN1) por cristalografia de raio X com dois domínios. 43

Figura 22 – Esquema representando a panteteinase (VANIN) em vias metabólicas de ácidos graxos e do estresse oxidativo. 44

Figura 23 – Perfil comparativo do tamanho e peso do tecido adiposo branco abdominal de camundongos selvagens (WT) e com duplo nocaute do gene codificador da Vanin-1 (*Vanin-1^{-/-}*). 45

Quadro 3 – Primers usados para realizar as reações de qRT-PCR para avaliar a expressão dos genes de *Culex quinquefasciatus*. 49

Figura 24 – Ensaio *in silico* da antigenicidade da panteteinase CPIJ017593 com o Antigenic Index - Jameson-Wolf. 50

Figura 25 – Quantificação relativa (Rq) da transcrição do gene da *panteteinase* CPIJ017593 em larvas do quarto instar de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis (S) comparadas às resistentes (R) à toxina Bin, por qRT-PCR. 54

Figura 26 – Quantificação relativa (Rq) da transcrição do gene da *panteteinase* CPIJ017593 em adultos de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis (S) comparados aos resistentes (R) à toxina Bin, por qRT-PCR. 55

Figura 27 – Quantificação relativa (Rq) da transcrição do gene do <i>cqm1</i> CPIJ013173 em larvas individuais do quarto instar de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetíveis (S) comparadas as resistentes (R) à toxina Bin, por qRT-PCR.	56
Figura 28 – Quantificação relativa (Rq) da transcrição do gene <i>cqm1</i> CPIJ13173 em adultos (machos e fêmeas) individuais de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetíveis (S) comparadas as resistentes (R) à toxina Bin, por meio de qRT-PCR.	57
Figura 29 – Imunodetecção da panteteinase CPIJ017593 de <i>Culex quinquefasciatus</i> produzida de forma recombinante em células Sf9 e em <i>E. coli</i> .	59
Figura 30 – Imunodetecção da panteteinase CPIJ017593 de <i>Culex quinquefasciatus</i> produzida de forma recombinante em <i>E. coli</i> .	59
Figura 31 – Perfil de amostras de panteteinase-Sf9 (14.02.23) CPIJ017593 de <i>Cx. quinquefasciatus</i> produzida de forma recombinante em células Sf9 em eletroforese SDS-PAGE a 10%.	60
Figura 32 – Imunodetecção de amostras de panteteinase CPIJ017593 de <i>Culex quinquefasciatus</i> recombinante produzida em células Sf9 com dois anticorpos primários dirigidos contra peptídeos da proteína.	61
Figura 33 – Imunodetecção das proteínas Cqm1 de <i>Culex quinquefasciatus</i> (60 kDa), Aam1 de <i>Aedes aegypti</i> (73 kDa) e a proteína albumina do soro bovino-BSA (66 kDa) com o anticorpo anti-LKR (1:1000).	62
Figura 34 – Imunodetecção de panteteinases em amostras de microvilosidades intestinais de larvas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> suscetíveis e resistentes ao <i>L. sphaericus</i> com anticorpo primário anti-peptídeo LKR (1:1000).	63
Figura 35 – Imunodetecção de panteteinases em novas amostras de microvilosidades intestinais de larvas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> suscetíveis e resistentes ao <i>L. sphaericus</i> com anticorpo primário anti-peptídeo LKR (1:1000).	64
Figura 36 – Imunodetecção de panteteinases em amostras de extrato de larvas inteiras de <i>Cx. quinquefasciatus</i> suscetíveis e resistentes ao <i>L. sphaericus</i> com anticorpo primário anti-peptídeo LKR (1:1000).	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de patologias humanas com participação direta ou indireta de panteteinases.	45
Tabela 2 – Avaliação das preparações de BBMF de larvas da colônia suscetível (S) e da colônia resistente (R) de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	65
Tabela Suplementar 1 – Avaliação da extração do RNA de larvas do quarto estágio (L4) das colônias suscetível e resistente ao <i>Lysinibacillus sphaericus</i> utilizadas para as reações de qRT-PCR.	87
Tabela Suplementar 2 – Avaliação da extração do RNA de adultos fêmeas com 2-5 dias de muda das colônias suscetível e resistente ao <i>Lysinibacillus sphaericus</i> utilizadas para as reações de qRT-PCR.	88
Tabela Suplementar 3 – Avaliação da extração do RNA de adultos machos com 2-5 dias de muda das colônias suscetível e resistente ao <i>Lysinibacillus sphaericus</i> utilizadas para as reações de qRT-PCR.	89
Tabela Suplementar 4 – Conjunto de dados dos ensaios de quantificação relativa por RT-qPCR de transcrição do gene da <i>panteteinase</i> CPIJ017593 em larvas (amostras individuais) do quarto instar em <i>Culex quinquefasciatus</i> da colônia resistente (R) em comparação com a colônia suscetível (S).	89
Tabela Suplementar 5 – Conjunto de dados dos ensaios de quantificação relativa por RT-qPCR de transcrição do gene da <i>panteteinase</i> CPIJ017593 em adultos (amostras individuais) do quarto instar em <i>Culex quinquefasciatus</i> da colônia resistente (R) em comparação com a colônia suscetível (S).	90
Tabela Suplementar 6 – Conjunto de dados dos ensaios de quantificação relativa por RT-qPCR de transcrição do gene da <i>panteteinase</i> CPIJ017593 em fêmeas individuais do quarto instar em <i>Culex quinquefasciatus</i> da colônia resistente (R) em comparação com a colônia suscetível (S).	91
Tabela Suplementar 7 – Conjunto de dados dos ensaios de quantificação relativa por RT-qPCR de transcrição do gene da <i>panteteinase</i> CPIJ017593 em machos individuais do quarto instar em <i>Culex quinquefasciatus</i> da colônia resistente (R) em comparação com a colônia suscetível (S).	92
Tabela Suplementar 8 – Conjunto de dados dos ensaios RT-qPCR para a quantificação relativa da transcrição do <i>cqm1</i> CPIJ013173 em larvas individuais de <i>Culex quinquefasciatus</i> do quarto instar da colônia resistente (R) em	93

comparação com a colônia suscetível (S).

Tabela Suplementar 9 – Conjunto de dados dos ensaios RT-qPCR para a quantificação relativa da transcrição do gene *cqm1* CPIJ13173 em adultos individuais de *Culex quinquefasciatus* da colônia resistente (R) em comparação com a colônia suscetível (S).

93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Alfa
β	Beta
ΔCt	<i>Deta Ciclo Threshold</i>
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micrómetro
Abs	Absorbância
Anti-CPE	Anticorpo anti peptídeo CPENGDERPCASDG
Anti-His	Anticorpo anti histidina
Anti-LKR	Anticorpo anti peptídeo LKRDQIDGYRTMD
BBMF	<i>Brush Border Membranes Fractions</i> - Frações de membranas de borda em escova
Bin	Toxina Binária
BinA	Subunidade A da Toxina Binária
BinB	Subunidade B da Toxina Binária
BSA	Albumina Sérica Bovina
cm	Centímetro
CoA	Coenzima A
Cqm1	<i>Culex quinquefasciatus</i> maltase 1
CqSLab	<i>Culex quinquefasciatus</i> de referência
C_T	<i>Ciclo Threshold</i> - Limiar do ciclo
DDT	Dicloro-difenil-tricloro-etano
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
kDa	Kilodalton
L	Litro
L1	Larva do primeiro estágio
L2	Larva do segundo estágio
L3	Larva do terceiro estágio

L4	Larva do quarto estágio
ng	Nanograma
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR	<i>Reverse transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa
R	Resistente
R2362	Colônia de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistente ao <i>Lysinibacillus sphaericus</i> 2362
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - Ácido Ribonucleico
RNAseq	Sequenciamento de alta vazão/Sequenciamento de nova geração
Rq	Quantificação relativa
S	Suscetível
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>
U	Unidade
VNN1	Vanina-1
VNN2	Vanina-2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE <i>CULEX QUINQUEFASCIATUS</i>	20
2.2	BIOLOGIA E CONTROLE	21
2.3	LARVICIDAS À BASE DE <i>LYSINIBACILLUS SPHAERICUS</i>	23
2.3.1	Toxina Binária e seu modo de ação	24
2.3.2	Receptor da toxina Binária em <i>Culex quinquefasciatus</i>	27
2.4	RESISTÊNCIA DE <i>CULEX QUINQUEFASCIATUS</i> AO <i>LYSINIBACILLUS SPHAERICUS</i>	30
2.5	PANTETEINASES	36
2.5.1	Panteteinases em Outros Insetos	40
2.5.2	Panteteinases em Humanos	41
3	OBJETIVOS	46
4	METODOLOGIA	47
4.1	COLÔNIAS DE <i>CULEX QUINQUEFASCIATUS</i>	47
4.2	ENSAIOS DE qRT-PCR	47
4.3	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS	49
4.4	PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS DE PROTEÍNAS	50
4.5	ENSAIOS DE IMUNODETECÇÃO (<i>WESTERN-BLOT</i>)	51
4.6	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	52
4.7	COMITÊ DE ÉTICA	52
5	RESULTADOS	53
5.1	TRANSCRIÇÃO DO GENE DA PANTETEINASE	53
5.1.1	Perfil em Larvas	53
5.1.2	Perfil em Adultos	54
5.2	TRANSCRIÇÃO DO GENE DO <i>CQM1</i>	55
5.2.1	Perfil de Transcrição em Larvas	56
5.2.2	Perfil em Adultos	57

5.3	DETECÇÃO DE PANTETEINASES	58
5.3.1	Detecção de Panteteinases Recombinantes	58
5.3.2	Detecção de panteteinases nativas	62
6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICES	82
	APÊNDICE A – Outras atividades desenvolvidas	83
	APÊNDICE B – Artigo publicado	84
	ANEXOS	85
	ANEXO A – Declaração de ética	86
	ANEXO B – Dados brutos	87

1 INTRODUÇÃO

Larvicidas biológicos à base da bactéria *Lysinibacillus sphaericus* (*L. sphaericus*) têm sido utilizados com sucesso para o controle de culicídeos, sobretudo, dos gêneros *Culex* e *Anopheles*, em vários países, inclusive no Brasil (Regis *et al.*, 2000; Silva-Filha *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008). O principal fator inseticida do *L. sphaericus* é um cristal que contém uma protoxina, denominada Binária (Bin). Esta protoxina tem uma elevada ação em *Culex quinquefasciatus* (*Cx. quinquefasciatus*) que ocorre via a sua ingestão pelas larvas e processamento da protoxina em toxina ativa no intestino. A ação da toxina Bin ocorre através de sua ligação específica com receptores localizados na superfície do epitélio intestinal. Em *Cx. quinquefasciatus*, a α -glicosidase *Culex quinquefasciatus* maltase 1 (Cqm1) é uma proteína localizada na membrana celular através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e foi identificada como receptor específico da toxina Bin (Silva-Filha *et al.*, 1999). A etapa de ligação toxina Bin-receptor é uma condição *sine qua non* para a ação do *L. sphaericus*, e qualquer falha nesta interação pode ocasionar resistência. A resistência de *Cx. quinquefasciatus* à toxina Bin já foi registrada e, na maioria dos casos, está associada a mutações no gene *cqm1* que leva a síntese de uma proteína defeituosa e, conseqüentemente, à ausência do receptor Cqm1 no microvilli intestinal (Nielsen-Leroux e Charles, 1992; 2002; Oliveira *et al.*, 2004).

O nosso grupo de pesquisa selecionou, em laboratório, colônias de *Cx. quinquefasciatus* com alto nível de resistência à toxina Bin que têm servido como modelos de estudo (Chalegre *et al.*, 2008). Uma das colônias é formada por indivíduos homozigotos para um alelo do gene *cqm1*, denominado *cqm1_{REC}*, que possui uma mutação que impede a expressão de receptores Cqm1 no epitélio intestinal.

Este alelo em homozigose confere um alto nível de resistência à toxina Bin por um mecanismo de ausência de sítio-alvo, ou seja, o receptor Cqm1 não é expresso no epitélio intestinal das larvas (Chalegre *et al.*, 2015). Para ter uma visão mais ampla destas características das colônias, o transcriptoma de intestinos de larvas foi realizado para comparar larvas suscetíveis e resistentes, através de sequenciamento de alta vazão (RNAseq). Esta análise revelou que, além do próprio transcrito do receptor Cqm1 (CPIJ013173) subexpresso, as larvas apresentaram um

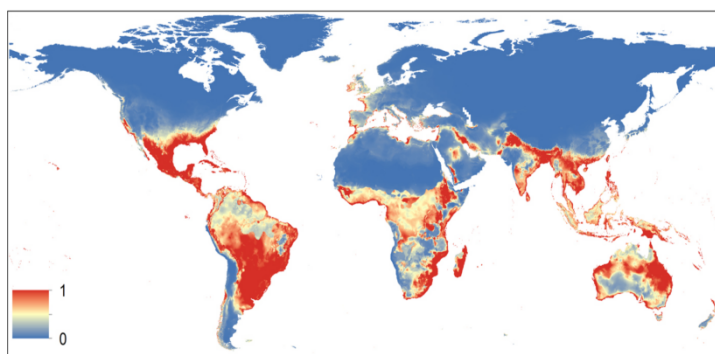
conjunto relevante de genes diferencialmente expressos e que podem ter sido co-selecionados e associados à resistência (Rezende *et al.*, 2019). Dentre os genes diferencialmente expressos na colônia resistente, um gene que codifica a *panteteinase* (CPIJ017593) teve destaque pois apresentou um nível de subexpressão mais acentuado do que o próprio receptor Cqm1 e, por esta razão, foi selecionado para análises mais aprofundadas. Esta molécula pode estar associada à ação da toxina Bin em *Cx. quinquefasciatus* em vista de sua destacada subexpressão em indivíduos resistentes. A caracterização desta proteína e seu papel fisiológico em mosquitos ainda são desconhecidos. Há relatos prévios de sua presença no microvilli intestinal de algumas espécies de insetos como os lepidópteros *Spodoptera frugiperda* (Ferreira *et al.*, 2007; Fuzita *et al.*, 2019), e *Mamestra configurata* (Toprak *et al.*, 2016) em estudos descritivos de proteômica, mas, sem qualquer caracterização destas proteínas. Além disso, a relação entre panteteinases e a ação de toxinas de *Bacillus thuringiensis* em insetos foi observada em larvas do lepidóptero *Ostrinia nubilalis* tratadas com a toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* que apresentam o transcrito do gene de vanin-like proteins diferencialmente expresso, porém sem destaque em relação a outros transcritos que também estavam diferencialmente expressos (Yao *et al.*, 2014; 2017). Portanto, o estudo da panteteinase é de suma importância. Além de aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de resistência ao *L. sphaericus*, a identificação e caracterização desta molécula como novo marcador molecular de resistência à toxina Bin, em mosquitos, pode contribuir para o desenvolvimento de ferramentas mais eficazes para o monitoramento e manejo de vetores, podendo impactar diretamente na saúde pública e na prevenção de doenças.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE *CULEX QUINQUEFASCIATUS*

Culex quinquefasciatus é uma espécie de mosquito com distribuição cosmopolita e sua maior abundância ocorre em áreas tropicais e subtropicais (latitude 39° N a 39° S), que compreende as Américas (do Sul, Central, e o sul da Estados Unidos), Europa (costas Mediterrâneas e Atlântica), África (Central ao Sul e costa Mediterrânea), Ásia (Oriente Médio a China, principalmente na costa do Oceano Índico) e toda a Oceania. (Figura 1) (Alaniz *et al.*, 2018).

Figura 1. Distribuição mundial do *Culex quinquefasciatus*. As cores representam o nível de presença de 0 (azul) a 1 (vermelho).



Fonte: Adaptado de Alaniz *et al.* (2018).

Esta espécie possui grande importância na saúde pública e sanidade animal pois pode atuar como vetor de diversos patógenos, em vista de sua proliferação em áreas rurais, suburbanas e urbanas. Sobretudo, é descrito como o principal vetor do parasita nematódeo *Wuchereria bancrofti*, causador da filariose linfática, e pode atuar também como vetor de arbovírus como o vírus da encefalite de St. Louis, o vírus do Nilo Ocidental e o vírus da encefalite japonesa (Negi *et al.*, 2018). Ademais, é um importante vetor da *Dirofilaria immitis*, causador da dirofilariose canina, além de atuar como vetor competente de alguns protozoários como o *Plasmodium relictum*, que causa malária aviária, e outros arbovírus como por exemplo o vírus da encefalite equina ocidental e o vírus da febre do Vale do Rift. (Negi *et al.*, 2018; Gil *et al.*, 2021). No Brasil, o *Cx. quinquefasciatus* é o principal vetor de *Wuchereria bancrofti*, e pode estar envolvido na transmissão urbana do vírus Zika (Guedes *et al.*, 2017). Também é considerado o vetor secundário do vírus Oropouche, que reemergiu no

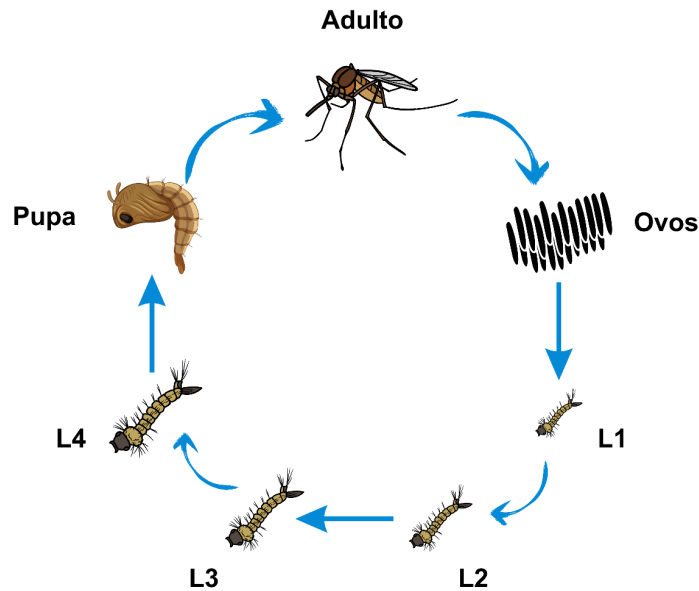
Brasil no ano de 2023, e de acordo com o Ministério da Saúde, até o presente momento (07/2025) 26.495 casos foram confirmados (BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/o/oropouche/painel-epidemiologico>, acessado em 07/2025).

2.2 BIOLOGIA E CONTROLE

Cx. quinquefasciatus é uma espécie pertencente à ordem Diptera, que no Brasil pode ser conhecido como muriçoca, pernilongo, carapanã, dentre outros. Sua distribuição é influenciada pela presença do ser humano, pois esta espécie é extremamente antropofílica e endofílica. Assim, possui uma forte adaptação em áreas onde o ser humano está inserido, como zonas rurais, suburbanas e urbanas, sobretudo em regiões tropicais (Consoli; Oliveira, 1994; Mosquitos: base de vigilância e controle, 2019). As fêmeas possuem como característica a hematofagia noturna, causando grande incômodo por suas picadas, e apesar de apresentar preferência por humanos, podem também se alimentar em outros animais. Esta espécie não apresenta sazonalidade em sua atividade, mas sua presença é mais abundante nos períodos quentes e chuvosos. Os criadouros utilizados pelos mosquitos dessa espécie são diversos, e a oviposição ocorre preferencialmente em ambientes artificiais localizados em áreas peridomiciliares, que apresentam acúmulo de água com elevado teor de matéria orgânica em decomposição, como dejetos de animais, vegetais em decomposição e rejeitos agroindustriais. Esses criadouros podem ser fossas, valetas, sistemas de esgoto, rios com acúmulo de lixo e baixo fluxo e outros. Nesses criadouros, os ovos são depositados na superfície da água, de forma agrupada, organizando-se em estruturas denominadas "jangadas" por flutuarem na superfície da água. (Consoli; Oliveira, 1994; Mosquitos: base de vigilância e controle, 2019; Gil *et al.*, 2021). O ciclo biológico desse mosquito consiste em duas fases: fase aquática e fase aérea. A fase aquática é iniciada a partir da deposição dos ovos na água, e após 1 a 3 dias as larvas eclodem. As larvas se desenvolvem em quatro estádios (L1, L2, L3 e L4) e esta fase do ciclo de vida dura em média de seis a dez dias. Em seguida ocorre a muda para a fase de pupa, última etapa da fase aquática e, em até 48h, ocorre a muda imaginal ou para a fase adulta e alada (Figura 2). O total da fase jovem até a metamorfose pode durar

cerca de 10 dias e os adultos podem sobreviver por cerca de 120 dias em condições de laboratório.

Figura 2. Ciclo de vida do *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: produzida pelo autor.

O controle populacional de mosquitos é de extrema importância para a redução da transmissão de patógenos, bem como de outros danos à saúde causados por estes insetos hematofágicos (Cuthbert *et al.*, 2023). Os culicídeos apresentam características que tornam seu controle desafiador, como elevada taxa reprodutiva, curto ciclo biológico, capacidade de colonizar ambientes temporários. Por isso, diferentes abordagens podem ser utilizadas como estratégias de controle de vetores incluindo controle mecânico (remoção de criadouros), uso de agentes químicos (larvicidas e adulticidas), biológicos (introdução de predadores naturais), métodos de controle genéticos (técnica de insetos estéreis), dentre outras (Global vector global responses 2017 - 2030. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241512978>).

Frequentemente as estratégias de controle de vetores visam a associação do controle mecânico e/ou gestão do ambiente, responsáveis pela eliminação dos criadouros, com o uso de agentes larvicidas e adulticidas para a redução da densidade populacional (Achee *et al.*, 2015, 2019; Killeen *et al.*, 2017). A maioria dos agentes larvicidas/adulticidas ainda é de origem química com baixo nível de

seletividade, e o seu uso gera uma preocupação devido a sua capacidade de causar danos ao meio ambiente e a outros organismos não-alvos, devido à baixa seletividade. Além disso, estes agentes químicos podem levar os insetos a desenvolverem resistência (Moyes *et al.*, 2017).

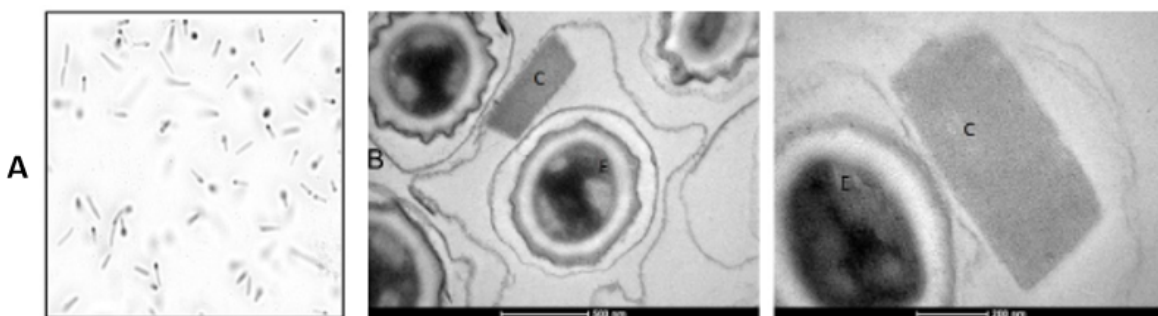
Para o controle de *Cx. quinquefasciatus* no Brasil, ainda persiste o modelo de controle tradicional, desde a década de 1950 que é baseado no uso intensivo de larvicidas e adulticidas químicos convencionais (Hemingway *et al.*, 2006). O primeiro inseticida químico utilizado, de forma sistemática e disseminada, foi o organoclorado dicloro-difenil-tricloro-etano (DDT) seguido das classes de organofosforados, carbamatos e piretroides (Becker, 2003). A partir da descoberta da ação larvicida da bactéria *Bacillus sphaericus* em 1989, o Brasil passou a produzi-la em larga escala e, posteriormente, o mesmo foi adotado como larvicida no controle de *Cx. quinquefasciatus* no Programa para Eliminação da Filariose (Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus*, 2011). Foi realizada nas áreas urbanas da cidade do Recife-PE uma série de testes-piloto utilizando o larvicida, que mostraram a sua eficiência e, atualmente, compreende todos os bairros da cidade (Regis *et al.*, 1995, 2000).

2.3 LARVICIDAS À BASE DE *LYSINIBACILLUS SPHAERICUS*

Os larvicidas microbianos à base de bactérias entomopatógenas foram desenvolvidos na busca por novos compostos inseticidas ambientalmente seguros e eficazes para o controle populacional de mosquitos, como alternativas aos agentes químicos convencionais (Lacey, 2007). Dentre as bactérias entomopatógenas mais utilizadas, destaca-se o *L. sphaericus*, uma bactéria Gram-positiva com distribuição cosmopolita, crescimento aeróbico e esporulante (Figura 3 A). Linhagens desta espécie têm sido prospectadas e utilizadas para produção de larvicidas usados com sucesso no controle de culicídeos de importância para a saúde pública dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*, em vários países, inclusive no Brasil (Regis *et al.*, 2000; Silva-Filha *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008). O principal fator inseticida do *L. sphaericus* é um cristal que contém uma protoxina, denominada Binária (Figura 3 B), produzido por algumas cepas altamente tóxicas (por exemplo: 1593, 2362 e C3-41) durante o processo de esporulação (Berry *et al.*, 2012). Deve ser ressaltado que isolados de *L. sphaericus* podem produzir outras toxinas com

ação letal para larvas de mosquitos, porém, a protoxina Bin é aquela com maior poder larvicida e é o ingrediente ativo nos produtos comerciais disponíveis (Charles *et al.*, 1997). A protoxina Bin possui características importantes na sua ação larvicida para *Culicidae*, destacando-se uma elevada potência, alta especificidade e longa persistência em condições de campo (Silva-Filha *et al.*, 2021).

Figura 3. *Lysinibacillus sphaericus* cepa 2362. **(A)** Aspecto de um cultivo esporulado observado ao microscópio óptico. **(B)** Corte transversal de células em fase final de esporulação cristal (C) e esporo (E) em micrografia eletrônica.

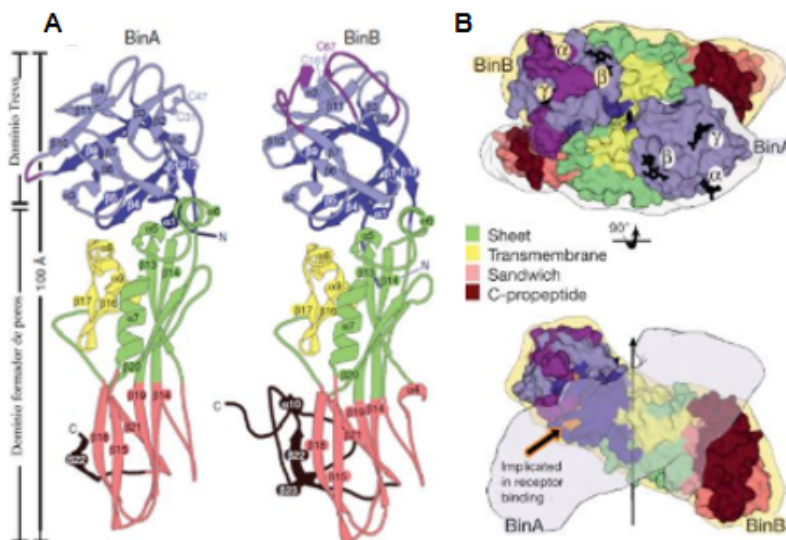


Fonte: **(A)** Sharma, Kumar (2022); **(B)** A. Pereira-Neves (2018).

2.3.1 Toxina Binária e seu modo de ação

A protoxina Bin é uma proteína heterodimérica composta por duas subunidades, BinA (42 kDa) e BinB (51 kDa), sendo as mesmas produzidas durante a fase de esporulação da bactéria (Nicolas *et al.*, 1993). Individualmente as subunidades não têm uma toxicidade elevada, mas quando presentes em concentrações equimolares elas atuam em sinergia e com alta potência (Charles *et al.*, 1997). Em cepas altamente tóxicas são produzidos cristais que contêm as subunidades nesta condição ótima para a ação larvicida. Os estudos funcionais destas subunidades revelaram que a BinA é responsável pela toxicidade celular, e BinB é o componente de ligação ao receptor (Baumann *et al.*, 1991; Nicolas *et al.*, 1993; Charles *et al.*, 1997; Romão; De Melo-Neto; Silva-Filha, 2011). A estrutura da toxina Bin foi determinada por cristalografia de raios X, no qual cada subunidade compreende dois domínios: um domínio β -trevo N-terminal e um domínio formador de poros C-terminal (Figura 4 A). A orientação externa do dímero BinA-BinB indica sua acessibilidade a glicoproteínas e glicolipídios da superfície celular, o que pode auxiliar a sua concentração na superfície celular antes da ligação ao receptor (Colletier *et al.*, 2016) (Figura 4 B).

Figura 4. Estrutura tridimensional das subunidades BinA e BinB da toxina Bin. **(A)** Estrutura das toxinas BinA e BinB. **(B)** Representação da superfície do dímero BinAB.

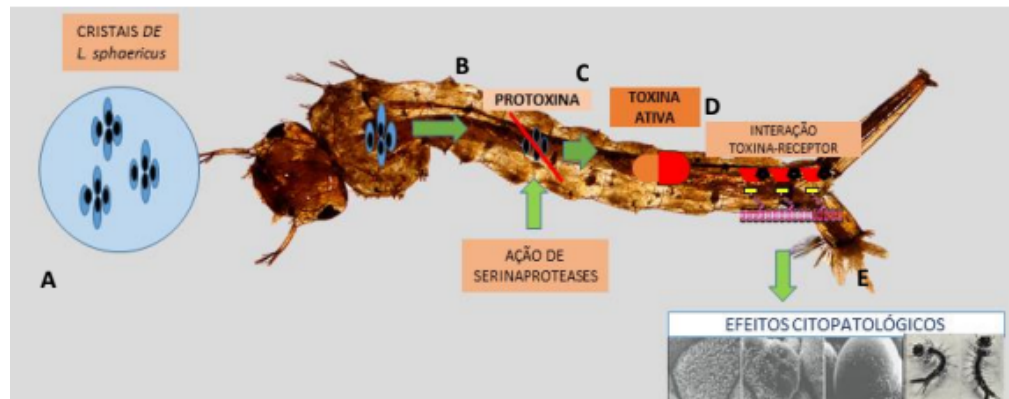


Fonte: Adaptado de Colletier *et al.* (2016).

A ação da protoxina Bin se inicia a partir da ingestão dos cristais pelas larvas, e as principais etapas descritas abaixo estão sumarizadas na Figura 5. Ao chegar ao intestino médio os cristais são solubilizados pelo pH alcalino liberando as duas protoxinas no lúmen intestinal, que serão ativadas por serina-proteases (Broadwell; Baumann, 1987; Sharma; Kumar, 2022). As subunidades ativas da toxina têm a capacidade de se ligar especificamente formando um heterodímero (Surya *et al.*, 2016). Neste estado, o heterodímero pode se ligar com alta afinidade ao seu sítio alvo, que são os receptores específicos presentes ligados ao epitélio intestinal das larvas, através da subunidade BinB (Charles *et al.*, 1997). Após a ligação, as duas subunidades são internalizadas na célula, onde a subunidade BinA induz eventos citopatológicos como vacuolização, autofagia e apoptose, levando a larva à morte (Berry, 2012). Um estudo da ação das subunidades em larvas suscetíveis e resistentes foi demonstrado por imunofluorescência *in vivo* no intestino das larvas (Nascimento *et al.*, 2020). Larvas suscetíveis tratadas com a toxina Bin e suas subunidades marcadas mostram a sua localização segundo sua função: a toxina Bin é detectada no intestino médio, e um maior aumento permite sua visualização na superfície devido a ligação de BinB aos receptores e dentro das células devido à internalização de BinB/BinA (Figura 6 A). Quando observadas a ação das subunidades separadamente, a BinA ingerida não foi detectada em nenhuma região

do intestino médio (Figura 6 B), enquanto a BinB ingerida foi detectada nas superfícies das células do ceco e do intestino médio, porém sem ser internalizada nas células (Figura 6 C). Quando larvas resistentes ingerem a Bin, ela não é detectada pois não há receptores no epitélio destas larvas (Figura 6 D).

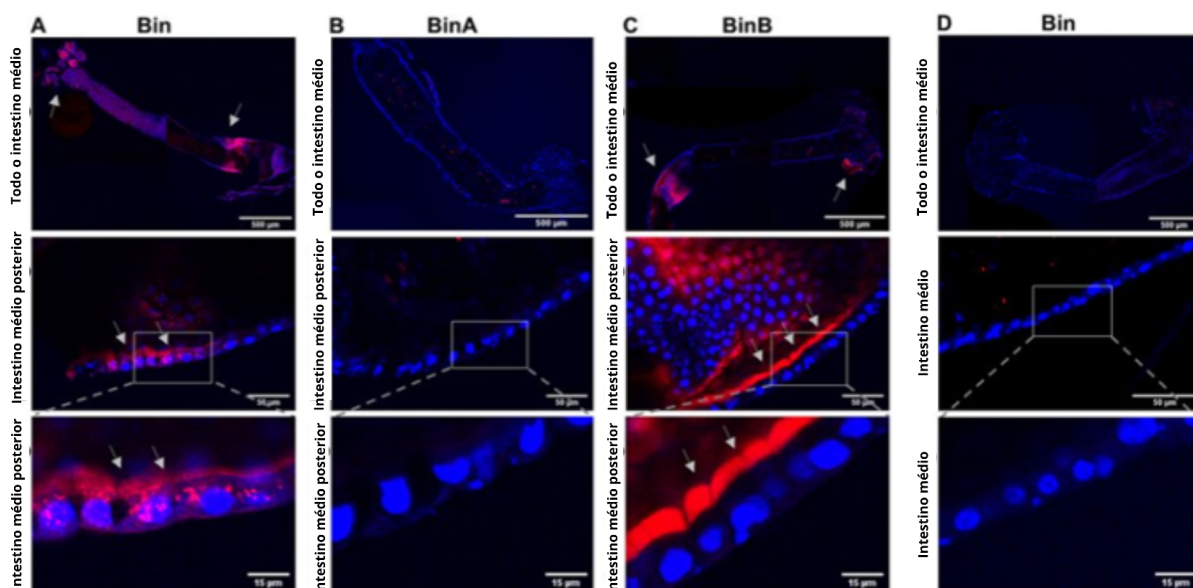
Figura 5. Principais etapas do modo de ação da toxina Binária presente nos cristais de *Lysinibacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Menezes, 2023.

Legenda: 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.

Figura 6. Localização *in vivo* da toxina Bin e as subunidades BinA e BinB (marcação em vermelho) no intestino médio de larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetível (**A, B e C**) e resistente (**D**) a Bin, por ensaios de imunofluorescência.



Fonte: Adaptado de Nascimento *et al.* (2020).

2.3.2 Receptor da toxina Binária em *Culex quinquefasciatus*

Conforme descrito o receptor da toxina Bin para *Cx. quinquefasciatus* é uma α -glicosidase (EC 3.2.1.20), ligada a membrana epitelial das células do intestino através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (Silva-Filha *et al.*, 2014). O receptor Cqm1 é codificado pelo gene *cqm1* (CPIJ013173) que possui 1851 nucleotídeos, e uma fase aberta de leitura com 1743 pares de bases (pb) (Romão *et al.*, 2006) (Figura 7). A transcrição do gene *cqm1* resulta em uma proteína com 580 aminoácidos de peso molecular predito de 66 kDa, expressa no epitélio intestinal das larvas. A proteína Cqm1 é expressa de forma abundante no microvilli intestinal de larvas suscetíveis (Figura 8) onde está ligada ao microvilli por âncora GPI (Ferreira *et al.*, 2010). A proteína Cqm1 foi expressa sob a forma recombinante em *Escherichia coli* (*E. coli*) e células Sf9 e utilizadas para estudos funcionais da capacidade de ligação à subunidade BinB em ensaios de ligação *in vitro* através de sua imunodeteção por anticorpos (Figura 9) (Ferreira *et al.*, 2014). O sítio de ligação da Cqm1 à toxina Bin está na região N-terminal da proteína localizada entre os aminoácidos S129 e A312. Ensaios de mutagênese sítio-dirigida demonstraram que os aminoácidos 159GG160, localizados em uma região de uma alça exposta na

estrutura da proteína, são essenciais para a interação com a toxina Bin (Ferreira et al. 2014). A estrutura do receptor Cqm1 foi posteriormente obtida por cristalografia de raios X (Sharma; Kumar, 2019) e possui três domínios (Figura 10): domínio A é constituído por duas alças, o B por α -hélices sendo descontínuo com dobra em barril e o C possui folhas β e constituem o domínio C-terminal do monômero.

Figura 7. Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos do gene do receptor de toxina binária, *cqm1*, de larvas *Culex quinquefasciatus*. A deleção de 19 nucleotídeos encontrada na sequência genética de larvas mutadas está em caixa. A localização do códon de parada da tradução subsequente está em caixa em negrito.

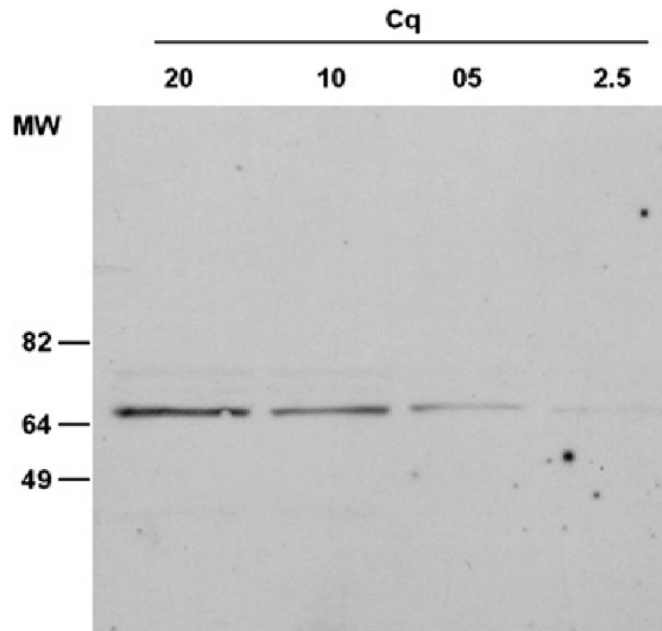
```

                                Primer 1
gaaagtttcaatcgagctgctctccgagcaagatgcgacgcctgggagctttgagcctagtcgctctgttggcgatgacgcgtcaacgggc 90
                                M R P L G A L S L V A L L A M T V N G 19
                                Primer 2
tagcgattcgcgaacccggaactcgaaggactggtatcagcagcgagcttctaccagatctatccgaggtcggttttggacagcaacggcg 180
                                L A I R E P D S K D W Y Q H A T F Y Q I Y P R S F L D S N G 49
atgggattggtgatttggcggggatcacctccaagatgaagtaacttggcggatattgggattgacgcgacgtggttgagccgcgcgttca 270
                                D G I G D L A G I T S K M K Y L A D I G I D A T W L S P P F 79
agtcaccgcgtgaaagactttgggtatgatgtgtcggttctacgctatccagccggagtagcgggaatttgacggattttgacaagtgg 360
                                K S F L K D F G Y D V S D F Y A I Q P E Y G N L T D F D K L 109
tggaggaaatcgacaaagaatgggcatcaagctgatgctggattttattccgaaccactcgagtgaccagcagcgagtggtttgtgaagtctg 450
                                V E E S H K N G I K L M L D F I P N E S S D Q H E W F V K S 139
tggcgcgggacccggagtagcagtgacttttatgtgtggagaccccgccgaggggtggtccgcgaataattggatctcggtatttg 540
                                V A R D P E Y S D F Y V W R P P A T G G G P P N N W I S V F 169
gagggtcggcgttgacatataatacagcgagaggggagtaactatctgcaccagtttacgcctcagcagccggatttgaactaccggaatc 630
                                G G S A W T Y N T A R G E Y Y L H Q F T P Q Q P D L N Y R N 199
cgaaggtgctggcggagatgaccaagatgttgttctctggttggaccgtggagtgatgggttccggttggacgctatcaaccacatgt 720
                                P K V L A E M T K M L F F W L D R G V D G F R L D A I N H M 229
tcgaggatgagcaggttccgggatgagccgttgtctgggtgggacagtcgggagtagcagattctttggatcacatttataccaaggaca 810
                                F E D E Q F R D E P L S G W G Q S G E Y D S L D H I Y T K D 259
tcccgatgtgtatgtgtgtttacaactggcgggacagatcagatattcccgaggagaagggccgtactatcattctgatgacgg 900
                                I P D V Y D V V Y N W R D Q M D K Y S A E K G R T I I L M T 289
aagcgtattcagcagcagcaggaacgatgctgtactacgagagtcgggacccgaagcgcagggagctcacatgccgttcaactccagc 990
                                E A Y S S I E G T M L Y Y E S A D R K R Q G A H M P F N F Q 319
tgatctatgactttaagaaggagcagaacccggttgggtgaagagttcgatcgactggttgatgaacaacatgccggctcgacacactc 1080
                                L I Y D F K K E Q N A V G L K S S I D W W M N N M P A R H T 349
caagctgggtagctggatgcgatgactcgcgggttagcgtcagcagtgtagttagatcggttgatcaggtcatgacgttgcgtgcata 1170
                                P S W V A G S H D H S R V A S R V G L D R V D Q V M T L L H 379
ccctgcggggactagttattacgtattacggtgaagaggttagccatgcaggacttcaaaaggctcagcagttcgacaaccgagatccga 1260
                                T L P G T S I T Y Y G E E V A M Q D F K E A Q Q F D N R D P 409
acgggacgcggatgcagtgaggactcgtcgaccagtgccgggttcagtagcaacacacacacgtggtccgagttcatccggactacgctc 1350
                                N R T P M Q W D S S T S A G F S T N T N T W L R V H P D Y A 439
ggtagaacgtagcgtgatgcagaagaatccacaagtaacctccaccactccagcatctgaccaagcttcgacggcaccggacagatgc 1440
                                R Y N V D V M Q K N P Q S T F H H F Q H L T K L R R H R T M 469
agagtggtagtgatcgtgcacaagcgggtcggaaccaaggtgtacgcattgctgagggaaactccgtggtgaggttcgttctgacgggtgc 1530
                                Q S G E Y V H K T V G T K V Y A L L R E L R G E D S F L T V 499
tgaacatggccggagcagaggataccgtggatctgggagatttctgtaattctccgcagaagatgcgagtcgaggtggcgcaaccgaact 1620
                                L N M A G A E D T V D L G D F V N L P Q K M R V E V A Q P N 529
ccaagtcgaaggcgggcaatgaggtcgacatcggaagttgacgctgggacgcgtacgattcggttgtgctgagagcaacgggttctgctgg 1710
                                S K S K A G N E V D I G K L T L G P Y D S V V L R A T V S S 559
cagctgctatcaacctttcgatttggttctgctgacgattatggccaggtatattttcgtgtagtcataaattacgggtcacgtgcatgg 1800
                                A A A I N L S I G L L L A I M A R Y I F V . 580
ctgatacaggcgttaattagcctttgtaacataaaactctcttatcaacc 1851

```

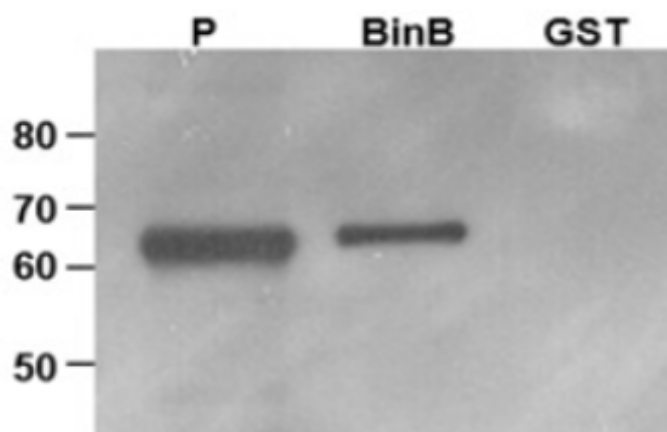
Fonte: Romão et al. (2006).

Figura 8. Immunoblotting de amostras de proteínas do microvilli do intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* (Cq). Amostras de proteínas (2,5 a 20 µg) imunodetectadas com um anticorpo anti-Cqm1. (MW) marcadores de peso molecular em kDa.



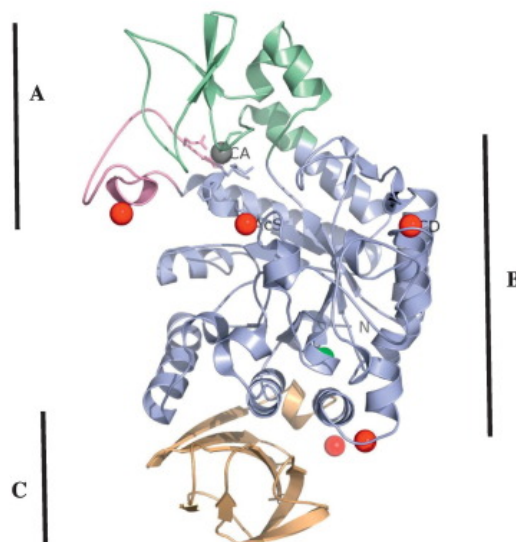
Fonte: Adaptado de Ferreira *et al.* (2010).

Figura 9. Avaliação da capacidade da ligação da proteína Cqm1 recombinante com a toxina BinB, por meio de ensaios de *pull-down* em SDS-PAGE a 10%. Proteína Cqm1 incubada com BinB (teste) ou apenas GST (controle negativo) imobilizadas em esferas de glutathiona-sepharose. P. Carga proteica equivalente à quantidade incubada com as esferas.



Fonte: Adaptado de Nascimento *et al.* (2017).

Figura 10. Estrutura do monômero Cqm1 mostrando os seus três domínios.



Fonte: Sharma; Kumar (2019).

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

2.4 RESISTÊNCIA DE *CULEX QUINQUEFASCIATUS* AO *LYSINIBACILLUS SPHAERICUS*

Mutações no gene do receptor podem levar a seleção de resistência à toxina Bin. Já foram documentados casos de resistência em *Cx. quinquefasciatus* em campo (Sinègre *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 1995; Nielsen-Leroux *et al.*, 1997, 2002; Yuan *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2004) e após seleção em laboratório (Wirth *et al.*, 2000; Pei *et al.*, 2002; Romão *et al.*, 2006; Chalegre *et al.*, 2015). Na maioria destes casos, ocorre uma falha de ligação entre a toxina Bin e ao receptor Cqm1, devido à ausência desta proteína no microvilli do epitélio intestinal das larvas pela perda da âncora GPI (Nielsen-Leroux, 1995, 2002; Pei *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2004; Silva-Filha; Berry; Regis, 2014).

Os registros de resistência e os alelos do gene *cqm1* com mutações, que originam transcritos que codificam proteínas truncadas sem a âncora GPI, impedindo a expressão das α -glicosidases Cqm1 no microvilli intestinal, estão sumarizadas no Quadro 1. Em populações de *Cx. quinquefasciatus* de Recife, foram identificados quatro destes alelos, sendo dois provenientes de uma colônia, selecionada em laboratório e dois identificados em campo. Os alelos nomeados *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2}, selecionados em laboratório, conferem um elevado grau de resistência à toxina Bin,

pois estas mutações impedem a expressão dos receptores no epitélio intestinal das larvas (Chalegre *et al.*, 2015).

Quadro 1. Populações de *Culex pipiens/Culex quinquefasciatus* ou colônias selecionadas em laboratório ou expostas a *Lysinibacillus sphaericus* em campo investigadas quanto à resistência.

Origem	País	Amostra	Alelos r	RR	Herança (a)	Ligação ao receptor	Referência
Campo	França	Porto St-Louis	ND	>20.000	ND	ND	Cancino-Rodezno <i>et al.</i> , 2010
		SPHAE	ND	>20.000	R/S	Sim	Nielsen-Leroux <i>et al.</i> , 1997, 2002
		BP	<i>cpm1BP</i> / <i>cpm1BP-del</i>	>10.000	R/S	Não	Bedoya-Perez <i>et al.</i> , 2013; Chalegre <i>et al.</i> , 2012
	Índia	Cochim	ND	5000	ND	Não	Sinegré, 1994
	China	RFCq1	ND	>20.000	ND	ND	Yuan <i>et al.</i> , 2000;
	Tailândia	Wat Pikul	ND	>125.000	ND	ND	Chevillon <i>et al.</i> , 2001
	Tunísia	TÚNIS	ND	~750	R/S	Sim	Nielsen-Leroux <i>et al.</i> , 2002
	Brasil	Coque	ND	~10	ND	Sim	Silva-Filha <i>et al.</i> , 1995
		Recife	<i>cqm1REC-D16</i> / <i>cqm1REC-D25</i>	3-6	ND	Sim	Amorim <i>et al.</i> , 2010
		EUA	Chico	ND	687	ND	ND
	Salt Lake		ND	>20.000	ND	ND	Su <i>et al.</i> , 2004
	Laboratório	EUA	GEO	<i>cpm1GEO</i>	>100.000	R/A	Não
L-SEL			ND	37	ND	ND	Rodcharoen <i>et al.</i> , 1994
Brasil		R2362	<i>cqm1REC</i>	>100.000	R/A	Não	Romão <i>et al.</i> , 2006; Su <i>et al.</i> , 2018
		RIAB59	<i>cqm1REC</i>	~40.000	R/A	Não	Su <i>et al.</i> , 2018; Pei <i>et al.</i> , 2002
		REC	<i>cqm1REC</i>	>3425	R	Não	Amorim <i>et al.</i> , 2007; Darboux <i>et al.</i> , 2007
REC-2		<i>cqm1REC-2</i>	>3475	R	Não	Amorim <i>et al.</i> , 2007; Darboux <i>et al.</i> , 2007	
China		RLCq2/IAB59	<i>cqm1REC</i>	>100.000	R/A	Não	Su <i>et al.</i> , 2018
		RLCq1/C3-41	<i>cqm1R</i>	>100.000	R/A	Não	Yuan <i>et al.</i> , 2000; Chalegre <i>et al.</i> , 2015

Fonte: Silva-Filha *et al.* (2021).

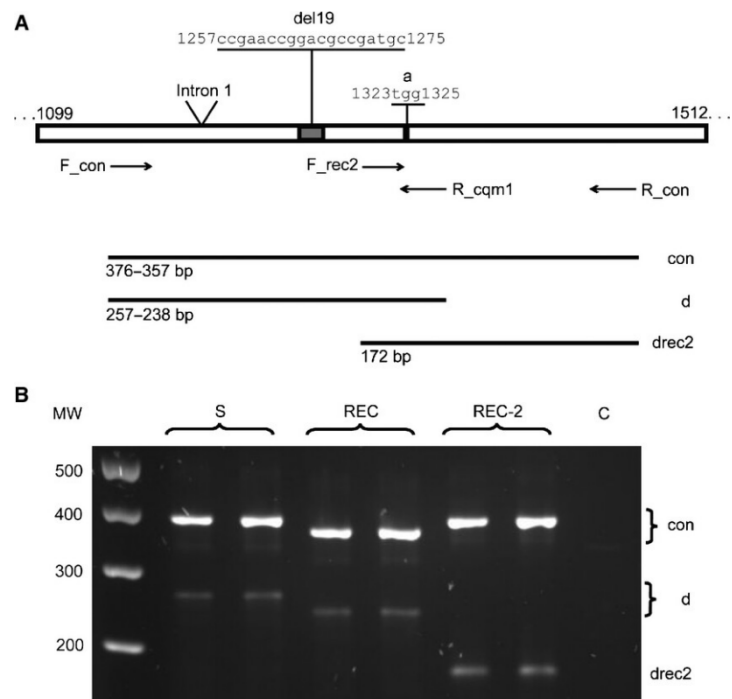
Nota: RR: Razão de resistência. (a) Herança da resistência: R: Recessiva; A: Autossômica; S: Ligada ao sexo. ND: Não Determinada.

Dentre os registros de alelos mutados, o principal alelo de resistência, *cqm1_{REC}*, apresenta uma deleção de 19 pb, compreendendo os nucleotídeos 1257–1275, que provoca um códon de parada prematuro na posição 1362 e, consequentemente, na síntese de uma proteína truncada, de 437 aminoácidos, desprovida da âncora GPI, como representado na Figura 11 (Romão *et al.*, 2006; Chalegre *et al.*, 2009). O alelo *cqm1_{REC-2}* possui uma mutação pontual (G1292A) que também gera um códon de parada prematuro na posição 431, levando igualmente à produção de uma proteína truncada (Chalegre *et al.*, 2015). Estes códons de parada prematuros levam à produção de proteínas truncadas e sem âncora GPI, portanto não podem se localizar no epitélio intestinal e se ligar à toxina Bin (Chalegre *et al.*, 2015). A proteína completa apresenta 580 resíduos de aminoácidos, já a codificada pelo alelo *cqm1_{REC}* consiste em 408 resíduos de aminoácidos originais da proteína Cqm1 completa, seguidos por 28 resíduos resultantes do quadro de leitura alterado. Por outro lado, a proteína codificada pelo alelo *cqm1_{REC-2}* compreende 430 resíduos da proteína original. Estes alelos têm herança recessiva, portanto, apenas indivíduos homozigotos têm o fenótipo de resistência. Estes alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* já foram detectados em populações de *Cx. quinquefasciatus* no Recife (Chalegre *et al.*, 2009; Menezes *et al.*, 2016) utilizando um ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) alelo específica (Figura 11). Esta ferramenta permite identificar o genótipo dos indivíduos para estes alelos.

Análises de expressão gênica revelaram que os transcritos correspondentes aos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* apresentam níveis significativamente reduzidos quando comparados ao alelo selvagem *cqm1* (Figura 12) (Chalegre *et al.*, 2015). Possivelmente, os transcritos truncados gerados pelos alelos de resistência são reconhecidos como RNAs aberrantes e podem ser degradados pela via de decaimento de RNA (Romão *et al.*, 2006). Ensaio de imunodeteção com anticorpos anti-Cqm1 corroboram a ausência da proteína Cqm1 em amostras de membranas apicais de epitélio intestinal (*Brush Border Membrane Fraction*) de larvas homozigotas para os alelos de resistência (Figura 13), demonstrando ausência ou forte redução da expressão da proteína nessas linhagens comparadas com larvas suscetíveis (Romão *et al.*, 2006; Amorim *et al.*, 2010; Chalegre *et al.*, 2015). Um padrão equivalente pode ser observado em ensaios enzimáticos de atividade alfa-glicosidase *in gel*, ou zimogramas, que detectam bandas catalíticas em amostras de larvas suscetíveis e resistentes. Neste ensaio, a banda correspondente

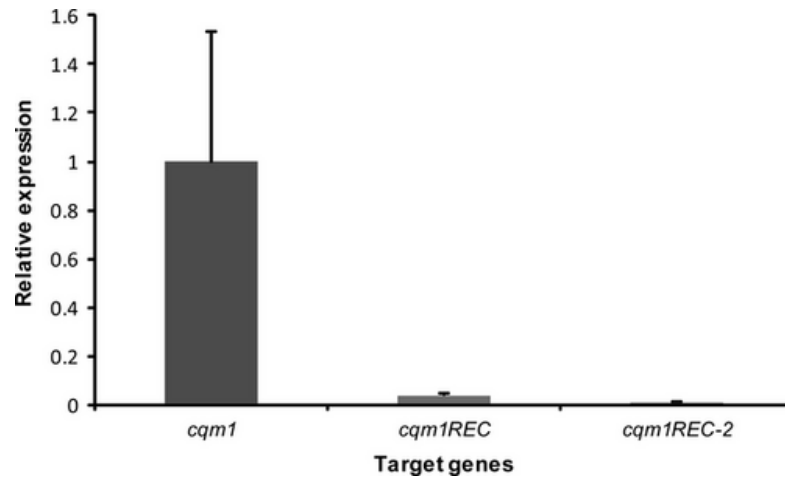
à Cqm1 está ausente em larvas R (Figura 14). Assim, indivíduos cuja resistência é conferida por estes alelos em homozigose podem ser caracterizados através de PCR alelo específica, padrões de transcritos reprimidos e ausência da respectiva proteína Cqm1 por imunodeteção ou por zimograma.

Figura 11. Alelos *cqm1* de larvas de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia suscetível (S) e de duas colônias resistentes a *L. sphaericus* (REC e REC-2) por PCR-multiplex. **(A)** Representação esquemática do gene com a deleção de 19 nucleotídeos (del19) do alelo *cqm1*_{REC} e a transição G1324A no alelo *cqm1*_{REC-2} e dos transcritos e seus códons de parada. **(B)** Perfil de fragmentos gênicos amplificados por PCR de larvas homozigotas suscetíveis para *cqm1* (S, 376 e 257 pb) e larvas resistentes homozigotas para *cqm1*_{REC} (REC, 357 e 238 pb) ou *cqm1*_{REC-2} (REC-2, 376 e 172 pb). MW. peso molecular. C. Amostras sem DNA.



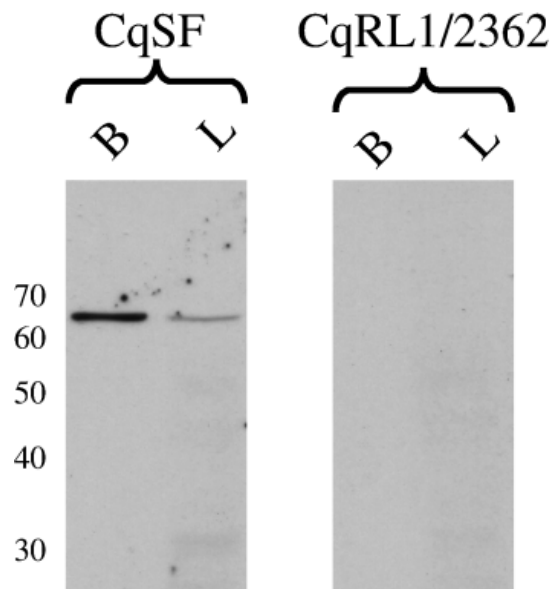
Fonte: Chalegre *et al.* (2015).

Figura 12. Expressão relativa dos alelos *cqm1*, *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* em pools de larvas de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia suscetível e duas colônias resistentes (REC e REC-2) a *Lysinibacillus sphaericus*, por RT-PCR quantitativa. Os valores são médias $\pm$ Desvio padrão.



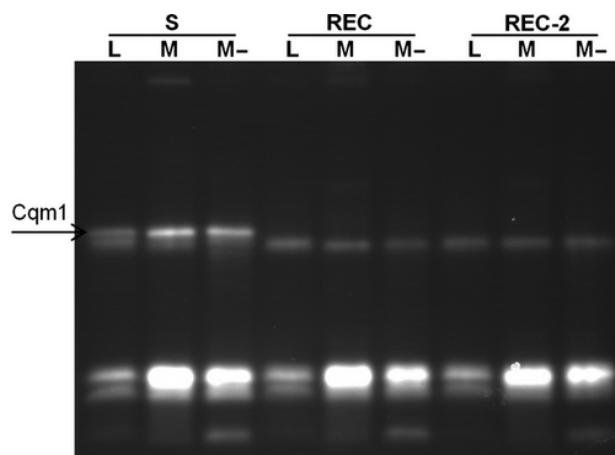
Fonte: Chalegre *et al* (2015).

Figura 13. Immunoblotting da expressão do Cqm1 em amostras de microvilosidades do intestino médio (B) e em larvas inteiras (L) de *Culex quinquefasciatus* suscetível (CqSF) e resistente (CqRL1/2362) à toxina Bin.



Fonte: Adaptado de Romão *et al.* (2006).

Figura 14. Atividade enzimática de α -glicosidase em gel em larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis (S) e resistentes a *L. sphaericus* (REC e REC-2). Extratos de larvas inteiras (L), de intestinos médios dissecados (M) e de intestinos médios dissecados sem a membrana peritrófica (M-).



Fonte: Chalegre *et al* (2015).

2.5 PANTETEINASES

Estudos do transcriptoma comparativos de larvas resistentes e suscetíveis à inseticidas têm sido realizados com o objetivo de obter uma visão mais ampla de genes e vias que podem estar relacionados ao fenótipo de resistência. Um estudo transcriptômico por sequenciamento de nova geração (RNAseq) do intestino de larvas de *Cx. quinquefasciatus* de três colônias resistentes (RIAB59, REC e REC2) à toxina Bin comparado a larvas de uma colônia suscetível (CqSLab) (Rezende *et al.*, 2019, 2024). O transcrito do gene *cqm1*, que confere a resistência nestas colônias, mostrou um status de repressão, como esperado, e corroborou o fenótipo de resistência. No entanto, foi observado que, dentre outros transcritos com alto nível de repressão, se destacaram os transcritos de duas moléculas denominadas panteteinases (CPIJ017593, CPIJ017592), cuja quantificação relativa foi ainda menor do que transcritos do gene *cqm1* (Quadro 2). Dentre as duas moléculas da panteteinase, a CPIJ017593 apresentou a menor quantificação relativa, e o seu padrão de repressão foi confirmado por ensaios de qRT-PCR usando amostras de RNA extraído dos *pools* de intestinos de larvas usados no RNAseq (Figura 15) (Rezende *et al.*, 2019 e 2024). Esta panteteinase foi detectada em meio a outras proteínas em amostras de microvilli intestinal (BBMF) de larvas de *Culex quinquefasciatus* (Figura 16), em um estudo que buscou proteínas candidatas a ser

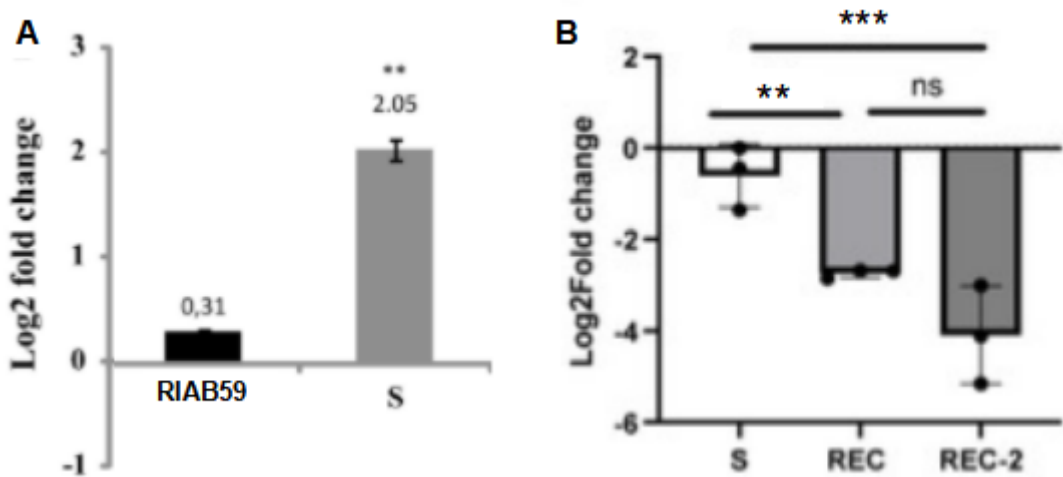
um possível receptor da toxina Cry48Aa/Cry49Aa, um outro componente inseticida produzida pelo *L. sphaericus* (Rezende *et al.*, 2017). Na literatura, não há dados sobre panteteinases de mosquitos, além destes dados obtidos em nossos trabalhos. Em outros insetos, os dados também são escassos contrastando com um muitos estudos de panteteinases em humanos, como será descrito na seção 2.5.2.

Quadro 2. Perfil de repressão diferencial de transcritos dos genes que codificam o Cqm1 e a panteteinase (pan1 e pan2) em larvas de *Culex quinquefasciatus* resistentes à toxina Binária (RIAB59, REC, REC2) comparados a suscetíveis em redução de transcritos.

Log Fold Change (p value)				
Gene	ID	RIAB59	REC	REC2
Cqm1	CPIJ013173	-4.65 (9.1 10 ⁻¹⁴)	-5.84 (9.3 10 ⁻⁸⁰)	-4.14 (7.3 10 ⁻⁸⁷)
Pan1	CPIJ017593	-7.13 (1.5 10 ⁻⁴⁹)	-8.77 (4.6 10 ⁻¹³)	-8.17 (2.1 10 ⁻¹²)
Pan2	CPIJ017592	-7.13 (1.5 10 ⁻⁴⁹)	-7.86 (1.1 10 ⁻¹⁰)	-8.26 (9 10 ⁻¹²)

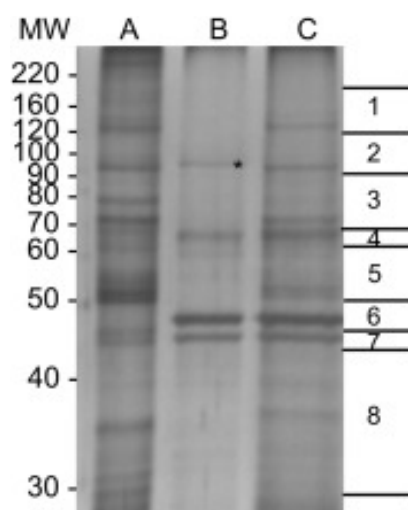
Fonte: Adaptado de Rezende *et al* (2019, 2024).

Figura 15. Figuras dos dois perfis de transcrição da *panteteinase* CPIJ017593 de larvas suscetíveis (S) e resistentes (RIAB59, REC e REC-2) feito por qRT-PCR para validar o transcriptoma apresentado no quadro 2.



Fonte: Adaptado de Rezende *et al* (2019 e 2024).

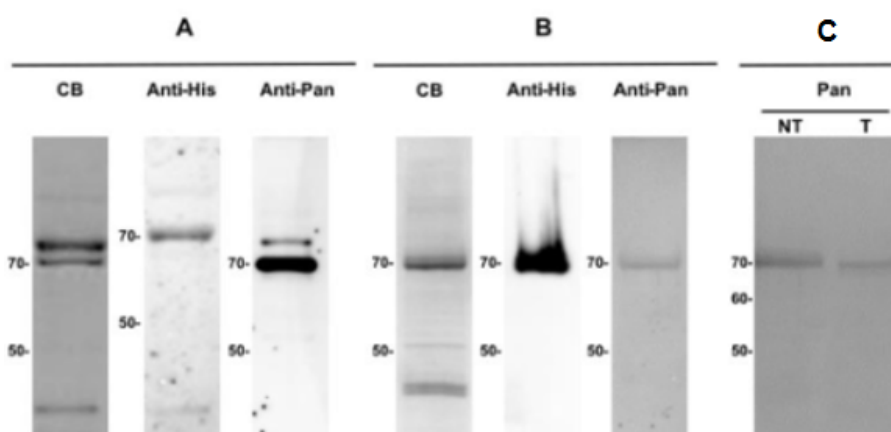
Figura 16. Proteínas do microvilli do intestino de *Culex quinquefasciatus* identificadas por ensaio de *pull-down* como possíveis ligantes da toxina Cry48Aa/Cry49Aa. **(A)** Proteínas do microvilli. **(B)** Toxina Cry48Aa/Cry49Aa imobilizadas em esferas de CNBr. **(C)** Proteínas do microvilli com capacidade de ligação à toxina imobilizada nas esferas. A espectrometria de massas de proteínas da faixa C, mostrou a panteteinase, dentre outras proteínas identificadas.



Fonte: Rezende *et al.* (2017).

Uma análise *in silico* utilizando o banco de dados VectorBase, identificou seis genes parálogos em *Cx. quinquefasciatus* que codificam diferentes variantes da panteteinase, cujas sequência estão alinhadas na Figura 17 (Rezende *et al.*, 2024). A sequência genômica da *panteteinase* (CPIJ017593) apresenta 2419 pb cuja fase aberta de leitura possui 1551 pb. A transcrição deste gene resulta em uma proteína com 516 aminoácidos com peso molecular de 57 kDa (<https://www.vectorbase.org> acessado em 07/2025). A proteína recombinante apresentou um peso molecular observado (~70 kDa) superior ao previsto (57 kDa), sendo reconhecida por anticorpos específicos (anti-Histidina e anti-panteteinase) e confirmada por espectrometria de massas (Figura 18). Foi investigado se modificações pós-traducionais de glicosilação poderiam ser a razão para a diferença do peso esperado e observado. Não foi encontrada uma presença de glicosídeos compatível com essa diferença (Figura 18 C), e esta questão ainda necessita ser esclarecida. Os dados indicam que a panteteinase recombinante mantém sua identidade e integridade em diferentes sistemas de expressão, com modificações glicosídicas mínimas. A expressão da proteína em *E.coli* permitiu a produção de anticorpos policlonais anti-panteteinases que foram usados para investigar a expressão da

Figura 18. Expressão da panteteinase recombinante CPIJ017593 de *Culex quinquefasciatus* em SDS-PAGE a 10% corados com azul de Coomassie (CB) e detectadas por imunoblotting com anticorpos monoclonais direcionados à etiqueta de poli-histidina (anti-His) ou anticorpos policlonais contra a panteteinase recombinante (anti-Pan). **(A)** Proteína recombinante expressa em *E. coli*. **(B)** A mesma proteína expressa em células Sf9. **(C)** Tratamento com endoglicosidase da panteteinase recombinante (Pan) em células Sf9 incubadas com a enzima PNGase F a 37 °C durante 4 h e visualizadas com CB. NT. Incubação sem a enzima. T. Incubação com a enzima.



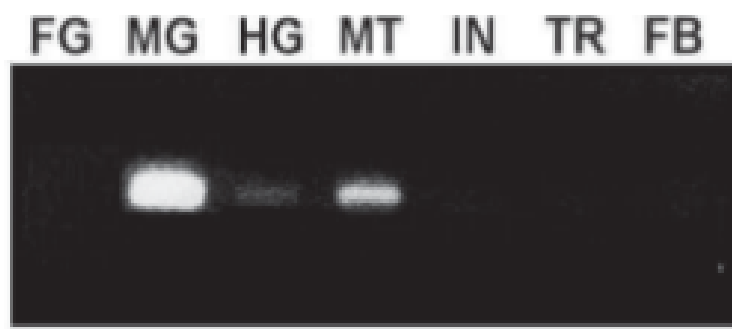
Fonte: Adaptado de Rezende *et al.* (2024).

2.5.1 Panteteinases em outros Insetos

As panteteinases já foram identificadas a nível genômico em diferentes classes de artrópodes. Há 1006 genes codificantes da panteteinase, de acordo com o NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene acessado em 06/2025), sendo 107 genes descritos em artrópodes. Estes genes já foram detectados em espécies tais como *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, *Spodoptera frugiperda*, *Ostrinia nubilalis* e *Mamestra configurata*. Diferente dos estudos em humanos, a maior parte dos estudos sobre as panteteinases/*Vanin-like proteins* em insetos foram identificadas a partir de análises proteômicas e transcriptômicas, sem uma caracterização funcional desta molécula. Em uma análise proteômica de larvas de *Bombyx mori*, uma *Vanin like protein* foi detectada em células da glândula de seda deste inseto (Zhang *et al.*, 2006). Outro relato é a presença destas proteínas na membrana microvilar do intestino médio de *Spodoptera frugiperda*, com homologia a VNN1 de *Drosophila melanogaster* (Ferreira *et al.*, 2007), identificada em uma análise proteômica da membrana do microvilli do intestino médio, com sequência codificante de âncora GPI

(Fuzita *et al.*, 2019). Em outro estudo, em transcritos diferencialmente expressos de larvas suscetíveis de *Ostrinia nubilalis*, após tratamento com a toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*, foram detectados dois genes homólogos às panteteinases de *Mamestra configurata* e de *Bombyx mori* (Yao *et al.*, 2014), assim como estes genes foram detectados em larvas resistentes a esta toxina, porém sem destaque de expressão diferencial (Yao *et al.*, 2017). Toprak *et al.* (2016) realizaram uma análise proteômica do intestino de *Mamestra configurata*, e identificaram uma panteteinase homóloga às enzimas descritas em *Papilio xuthus*, *Nasonia vitripennis* e *Tribolium castaneum*. A enzima identificada, denominada McPAN (código de acesso: HM357848), encontra-se ilustrada na Figura 19 e foi associada a uma possível atividade hidrolítica no organismo do inseto. Além dos estudos de Rezende *et al.* (2017, 2019, 2024), os estudos de Yao *et al.* (2014, 2017) foram os únicos que detectaram panteteinases, ou seus transcritos diferencialmente expressos, em insetos suscetíveis ou resistentes às toxinas de bactérias entomopatógenas.

Figura 19. Perfil de transcritos do gene da panteteinase em diferentes tecidos de *Mamestra configurata* por reações de RT-PCR. FG: Intestino anterior; MG: Intestino médio; HG: Intestino posterior; MT: Tubos de malpighi; IN: Tegumento; TR: Traqueia; FB: Corpo gorduroso.



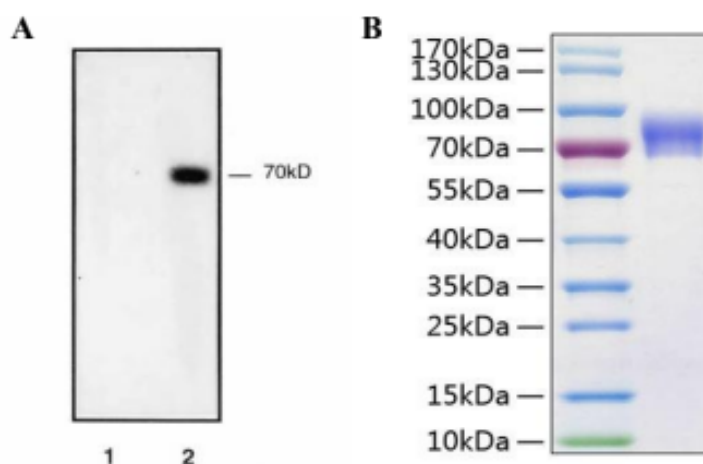
Fonte: Toprak *et al.* (2016).

2.5.2 Panteteinases em Humanos

Ao contrário de insetos, panteteinases em humanos vêm sendo bem estudadas. As *vanin-like proteins* ou vaninas, foram identificadas pela primeira vez em extratos de rins de cavalo (Calvine *et al.*, 1968; Duprè; Cavallini, 1979). Estas proteínas também foram identificadas em diferentes tecidos de outros vertebrados como mamíferos e aves (Bartucci *et al.*, 2019) e maior parte dos estudos têm sido

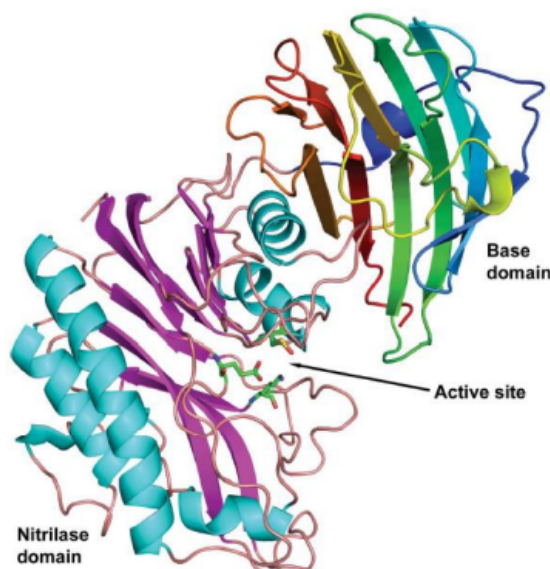
feitos em humanos e camundongos. Em humanos, os dois principais genes que codificam as panteteinases são denominados *vnn1* e *vnn2*. O gene *vnn1* é responsável pela produção da VNN1, expressa como uma proteína de membrana em diferentes tecidos, incluindo fígado, rins, pulmões, trato gastrointestinal, baço, sangue e pele (Yamashita *et al.*, 2017). Já a VNN2 também apresenta expressão nesses mesmos órgãos, porém em concentrações mais elevadas nos neutrófilos circulantes, possivelmente em função de seu envolvimento na regulação dos processos de adesão e migração dessas células (Nitto; Onodera, 2013; Bartucci *et al.*, 2019). Estas proteínas em humanos possuem peso molecular de 70 kDa (Figura 20), o que também difere do peso predito de 57 kDa (Aurrand-Lions *et al.*, 1996). Neste caso, foi comprovado que a diferença é devido a N-glicosilação da proteína (Suzuki *et al.*, 1999; Ruan *et al.*, 2010; Kaskow *et al.*, 2012). A estrutura tridimensional da panteteinase humana foi elucidada por meio de cristalografia de raios X, contribuindo significativamente para o aprofundamento do conhecimento sobre essa enzima (Boersma *et al.*, 2014) (Figura 21). Estruturalmente, a proteína é composta pelo domínio base e o domínio nitrilase e a isoforma da panteteinase VNN1 se apresenta com a conformação monomérica, e não há evidências de oligomerização.

Figura 20. Perfil eletroforético da panteteinase (Vanina-1) em SDS-PAGE. **(A)** Imunodetecção da proteína nativa de camundongo. **(B)** Proteína recombinante expressa em células HEK293.



Fonte: (A) Aurrand-Lions *et al.* (1996). (B) MyBioSource, com o código de acesso do produto MBS9141761.

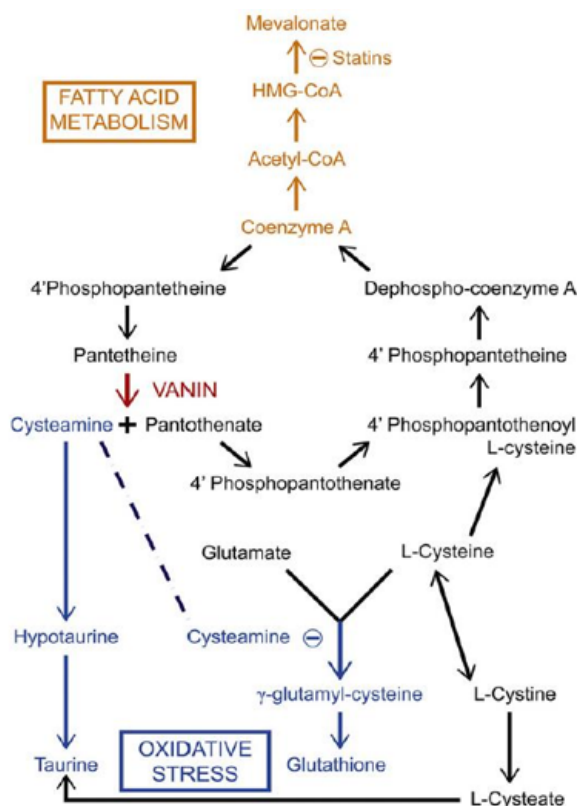
Figura 21. Estrutura tridimensional da panteteinase (VNN1) por cristalografia de raio X com dois domínios. O domínio nitrilase é representado por α -hélices (ciano) e folha- β (roxo) onde encontra-se o sítio ativo da proteína. O domínio base, que consiste quase inteiramente na estrutura secundária de folha- β (azul escuro a vermelho escuro).



Fonte: Boersma *et al.* (2014).

Funcionalmente, as panteteinases são enzimas da classe de hidrolases (EC 3.5.1.92) com capacidade de clivar a panteteína, originada a partir do ciclo da Coenzima A (CoA), em ácido pantotênico (ou vitamina B5) e cisteamina (Bartucci *et al.*, 2019). O ácido pantotênico é um importante cofator na produção e degradação de lipídios (Kaskow *et al.*, 2012), e pode estar envolvida nos processos de homeostase e imunidade (Ferreira; Naquet; Manautou, 2015). Já o outro produto, a cisteamina, atua como precursor na biossíntese de hipotaurina e taurina, além de poder ser convertida em cisteína (Sharma *et al.*, 1995; Kaskow *et al.*, 2012; Jeitner; Pinto; Cooper, 2018). Tanto a cisteamina quanto seus derivados, como a taurina, apresentam propriedades oxirredutoras, contribuindo para a regulação do estresse oxidativo nas células, além de exercerem efeitos citoprotetores. (Nitto; Onodera, 2013; Ferreira; Naquet; Manautou, 2015; Jeitner; Pinto; Cooper, 2018). A figura 22 representa a panteteinase integrada nestas vias metabólicas.

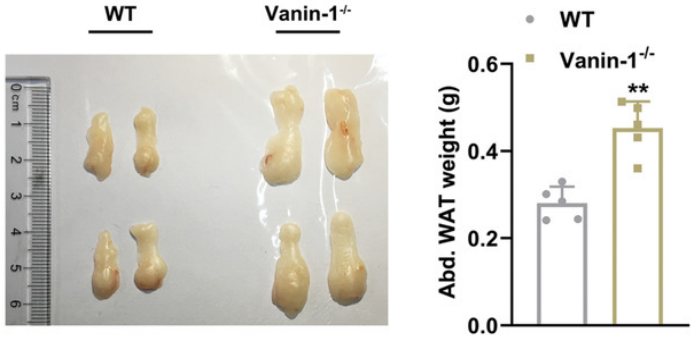
Figura 22. Esquema representando a panteteinase (VANIN) em vias metabólicas de ácidos graxos e do estresse oxidativo.



Fonte: Kaskow *et al.* (2012).

Estudos de caracterização funcional tem demonstrado o importante papel das panteteinases em processos fisiológicos e patológicos (Galland *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2001; Bartucci *et al.*, 2019). A panteteinase tem, por exemplo, um papel central na regulação da lipólise do tecido adiposo atuando como um sensor de estresse oxidativo (Chen *et al.*, 2020). Camundongos com uma dupla deleção do gene *Vanin-1* (*Vanin-1^{-/-}*) apresentaram maior acúmulo de gordura nesse tecido, sem alteração dos demais tecidos, indicando o papel específico da panteteinase neste tecido (Figura 23). Este estudo mostrou ainda que a introdução de mRNA de *Vanin-1* no tecido adiposo abdominal ativou a lipólise, resultando em redução da gordura. As vaninas também são estudadas em diversas patologias humanas (Tabela 1). Em vista da importância da vanina-1 humana em doenças degenerativas, muitas ferramentas de detecção e quantificação estão disponíveis comercialmente tais como vaninas recombinantes, anticorpos policlonais/monoclonais anti-vanina e kits de ELISA. Assim, estudos de caracterização e identificação das panteteinases de *Cx. quinquefasciatus* são necessários no escopo de nosso estudo.

Figura 23. Perfil comparativo do tamanho e peso do tecido adiposo branco abdominal de camundongos selvagens (WT) e com duplo nocaute do gene codificador da Vanin-1 (*Vanin-1^{-/-}*).



Fonte: Chen *et al.* (2020).

Tabela 1. Exemplos de patologias humanas com participação direta ou indireta de panteteinases.

Órgão	Patologia	Organismo	Referência
Baço, fígado e sangue	Malária	Camundongo	1
Cérebro	Doença de Huntington (DH)	Camundongo	2
Fígado	Esteatose DHGNA* e NASH**	Humano	3 e 4
	Hepatotoxicidade	Camundongo	5
Intestino	Doença inflamatória intestinal (DII), Colite e Câncer colorretal	Humano	6, 7 e 8
	Câncer colorretal e Esquistossomose	Camundongo	9 e 10
Pâncreas	Diabetes 1	Camundongo	11
Pele	Psoríase	Camundongo	12
Pulmão	Asma	Humano	13
Rins	Lesão renal	Humano	14
	Tumores adrenais	Camundongo	15
Diversos	Esclerose sistêmica e Isquemia arterial	Camundongo	16 e 17

*DHGNA: Doença hepática gordurosa não alcoólica; **NASH: Esteato-hepatite não alcoólica. Fonte: **1:** Min-Oo *et al.*, 2007; Rommelaere *et al.*, 2015; **2:** Karpuj *et al.*, 2002; **3:** Bartucci *et al.*, 2019; **4:** Bartucci *et al.*, 2019; Povero *et al.*, 2013, 2015; **5:** Ferreira *et al.*, 2016; **6:** Gensollen *et al.*, 2013; **7:** Berruyer *et al.*, 2006; **8:** Chai *et al.*, 2016; **9:** Pouyet *et al.*, 2010; **10:** Martin *et al.*, 2004; **11:** Roisin-Bouffay *et al.*, 2008; **12:** Jansen *et al.*, 2009; **13:** Xiao *et al.*, 2016; **14:** Zierfuss *et al.*, 2024; **15:** Late *et al.*, 2014; **16:** Kavian *et al.*, 2016; **17:** Dammanahalli; Stevens; Terkeltaub, 2012.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para a caracterização da panteteinase de *Culex quinquefasciatus* a partir da análise comparativa de transcrição do gene e expressão da proteína em indivíduos suscetíveis e resistentes ao larvicida *Lysinibacillus sphaericus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o perfil de transcrição do gene da panteteinase por quantificação relativa de larvas e de adultos.
- b) Avaliar o perfil de transcrição do gene *cqm1* por quantificação relativa de larvas e de adultos.
- c) Avaliar a capacidade de dois anticorpos para o reconhecimento de panteteinases recombinantes
- d) Avaliar a expressão de panteteinases nativas em amostras de microvilli intestinal de larvas.

4 METODOLOGIA

4.1 COLÔNIAS DE *CULEX QUINQUEFASCIATUS*

Neste estudo, foram utilizadas larvas do 4º instar e adultos de duas colônias de *Cx. quinquefasciatus*, sendo uma de referência e uma resistente ao larvicida *L. sphaericus*, denominadas, respectivamente, CqSLab e R2362/REC.

A colônia CqSLab é a colônia de referência, suscetível a inseticidas, estabelecida com ovos coletados em Recife e mantida há mais de dez anos no insetário do Instituto Aggeu Magalhães (IAM-Fiocruz) (Menezes *et al.*, 2021). A colônia R2362/REC foi selecionada com o larvicida *L. sphaericus* 2362 em laboratório e apresenta um nível de alta razão de resistência ($RR > 100.000$) a este composto (Pei *et al.*, 2002). A resistência da colônia é devido a uma falha de ligação da toxina Bin aos receptores Cqm1 do epitélio. Conforme descrito na introdução, indivíduos homozigotos para o alelo *cqm1*_{REC} não expressam o receptor Cqm1, portanto, a toxina não pode se ligar a este alvo (Romão *et al.*, 2006; Chalegre *et al.*, 2015). A colônia R2362/REC vem sendo mantida por mais de 200 gerações em insetário. A partir deste tópico as colônias CqSLab e R2362/REC, serão denominadas S e R, respectivamente.

As colônias foram mantidas no insetário do Departamento de Entomologia do IAM-Fiocruz sob condições controladas de temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa ($70 \pm 20\%$) e fotoperíodo (14:10 horas, claro:escuro) (Menezes *et al.*, 2021). As larvas foram mantidas em recipientes plásticos (45,5 cm [altura] x 28 cm [largura] x 7,7 cm [profundidade]) contendo 2L de água potável, e foram alimentadas com ração para gatos (Friskies®). Os adultos foram alimentados com solução de sacarose a 10% e água *ad libitum*. A cada semana foi ofertado para as fêmeas um repasto de sangue desfibrinado de coelho, durante 1h, em um sistema de alimentação artificial (Crespo *et al.*, 2024).

4.2 ENSAIOS DE qRT-PCR

Os ensaios da Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa Quantitativa (qRT-PCR) tiveram o objetivo de quantificar e comparar o padrão de transcrição dos genes estudados, em larvas e adultos individuais. Para tal, foi feita a

extração de RNA total dos espécimes utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Como amostras, foram utilizadas larvas do início do quarto estágio (até 12 horas após a muda) e adultos (machos e fêmeas) com três a cinco dias de idade de cada colônia, de forma individual. As amostras foram avaliadas em relação à concentração e qualidade no NanoDrop 2000c® (Thermo Scientific). A concentração de RNA das amostras foi mantida entre 30-500 ng/μl e, em termos de qualidade, uma razão de absorbância a 280 nm/260 nm entre 1,7 e 2 foi definido como critério para triagem de amostras de boa qualidade. As amostras fora destes padrões foram descartadas.

Para as reações, foram desenhados primers específicos para os genes alvos (*panteteinase* CPIJ017593, *cqm1* CPIJ013173) e para o gene usado como controle endógeno (subunidade ribossômica 18S), descritos no Quadro 3. As reações a partir de amostras de RNA extraídas de cada indivíduo foram realizadas em duplicata usando o Kit QuantiTect® SYBR Green RT-PCR® (QIAGEN) para as reações de qRT-PCR one-step, segundo instruções do fabricante. As reações foram feitas usando o SYBR Green Mix (2x, 5 μl), enzima transcriptase reversa (0.5 U) RNA molde (100 ng), primers forward e reverse (0,2 μM/primer) para os genes alvos e para o gene controle. Como controle negativo das reações, foram utilizadas amostras sem o RNA extraído. As reações foram realizadas no equipamento ABI 7500® (Applied Biosystems) disponível no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do IAM. A quantificação relativa foi feita através do programa 7500 software v.2.0.5 da Applied Biosystems®. As análises foram realizadas pelo método do CT (*Ciclo Threshold*) comparativo (Livak and Schmittgen, 2001). Para todos os ensaios, uma amostra de indivíduo suscetível (larva ou adulto) foi selecionada como referência-calibrador. Neste caso, esta amostra foi escolhida cujo valor de ΔC_t foi o mais próximo possível a média de ΔC_t do grupo representativo de larvas suscetíveis analisadas.

Quadro 3. Primers usados para realizar as reações de qRT-PCR para avaliar a expressão dos genes de *Culex quinquefasciatus*.

Gene ID ¹	Amplicon (pb)	Primers (5'-3') ²
18S [1]	159	F CGCGGTAATTCCAGCTCCACTA R GCATCAAGCGCCACCATATAGG
CPIJ017593 (<i>pant</i>) [2]	228	F TCTTTGCCTGCACCGGGACCA R CGAATGGTTTGCCATCCTTCGT
CPIJ013173 (<i>cqm1</i>) [3].	228	F GAACCGGACTCGAAGGACTG R CTCCGGCTGAATATCGTAGAAATC

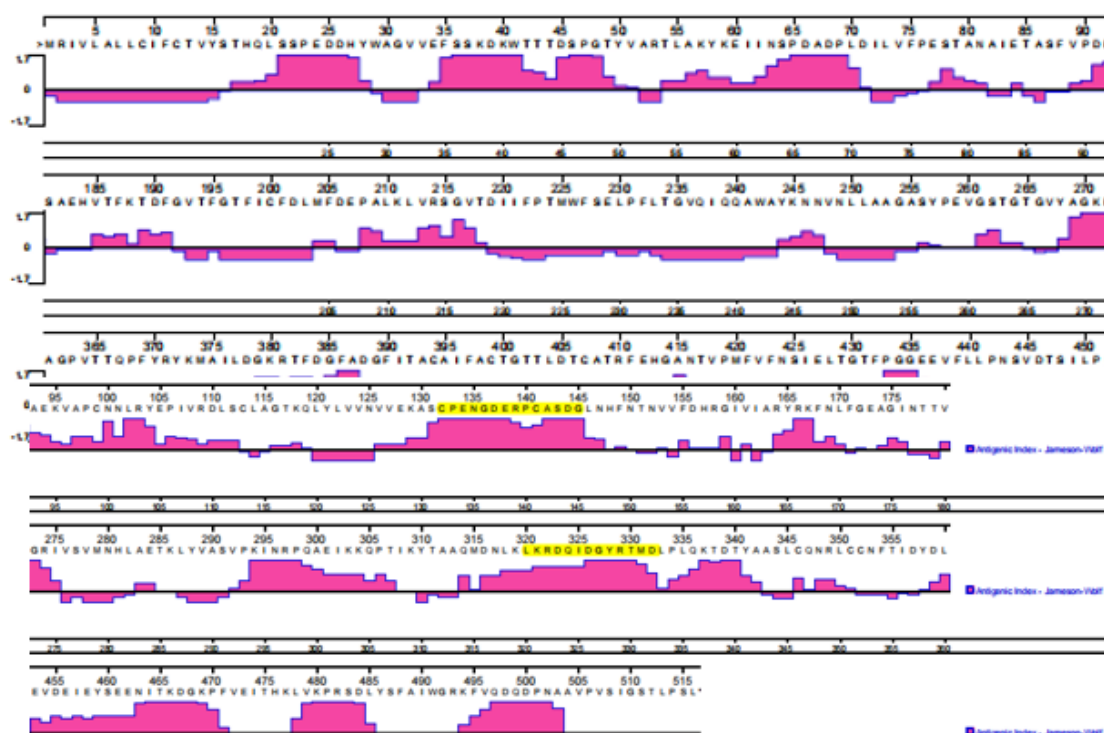
¹ LIU *et al.*, 2011. [1] 18S: gene de controle de proteína ribossomal. [2] *pant*: panteteinase. [3] *cqm1*: *Culex quinquefasciatus* maltase 1.

² REZENDE *et al.*, 2019. Primers *forward* (F) and *reverse* (R) desenhados usando o PrimerSelect (DNASTAR) com bases na sequência obtidas na plataforma VectorBase (<https://vectorbase.org>).

4.3 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Com o objetivo de detectar se a proteína é expressa no epitélio intestinal das larvas, foram produzidos anticorpos policlonais contra antígenos da panteteinase CPIJ017593. Estes anticorpos foram produzidos visando superar a dificuldade descrita na seção 2.5 sobre o baixo desempenho de anticorpos policlonais produzidos contra a panteteinase recombinante de *E. coli*. As sequências dos peptídeos foram selecionadas a partir da análise *in silico* com o “Antigenic Index - Jameson-Wolf”, pelo Dr. Itabajara Vaz da UFRGS (Figura 24). A partir dessa análise foram selecionados dois peptídeos da panteteinase contendo 13-14 resíduos da CPIJ017593 (LKRDQIDGYRTMD e CPENGDERPCASDG). Os peptídeos foram obtidos por síntese, conjugados à formamida, pela Dra. Maria Aparecida Juliano na UNIFESP. Em seguida, cada amostra de peptídeo foi usada individualmente como antígeno para imunização de coelhos e produção de anticorpos policlonais na empresa CélulaB (<http://www.ufrgs.br/celulab>). Os soros imunes obtidos a partir da imunização dos animais com cada peptídeo obtido, aqui denominados anti-LKR e anti-CPE, foram testados de forma individual.

Figura 24. Ensaio *in silico* da antigenicidade da panteteinase CPIJ017593 com o Antigenic Index - Jameson-Wolf.



Fonte: Antigenic Index - Jameson-Wolf, análise fornecida pelo Dr. Itabajara Vaz.

4.4 PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS DE PROTEÍNAS

Os anticorpos anti-LKR e anti-CPE foram utilizados com o objetivo de detectar se a proteína da panteteína se encontrava em larvas de *Cx. quinquefasciatus*. Para isso, os anticorpos foram inicialmente testados para o reconhecimento de amostras da panteteinase recombinantes e em seguida foram usadas as preparações a partir de larvas que poderiam conter panteteinases nativas, conforme descrito abaixo.

As amostras da panteteinase recombinante (CPIJ017593) foram usadas para averiguar se os anticorpos produzidos são capazes de reconhecer a proteína recombinante produzida previamente nos sistemas procarioto e eucarioto, por membros da equipe do laboratório, que estavam armazenadas a -80 C para uso (Rezende *et al.*, 2024).

No sistema procarioto, foi feita a clonagem do gene que codifica a panteteinase em *E. coli* cepa BL21. Após a expressão da proteína, esta foi purificada utilizando Resina Ni-NTA® (Qiagen) (Rezende *et al.*, 2024). Este gene também foi clonado e expresso na linhagem celular do lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (Sf9). As células de Sf9 foram transfectadas com o plasmídeo de expressão, e as culturas

celulares foram então selecionadas com Zeocin™ (Thermo Fisher Scientific), para a obtenção de linhagens celulares estáveis. Os detalhes da produção destas proteínas estão disponíveis em Rezende *et. al* (2024).

As amostras nativas preparadas utilizando larvas do quarto instar de *Cx. quinquefasciatus* de ambas as colônias (S e R), foram as seguintes: amostras de extrato total de três larvas em tampão PBS com inibidores de proteases, e amostras de frações de microvilosidades do intestino médio (BBMF - *Brush Border Membrane Fraction*). Estas foram preparadas utilizando intestinos dissecados (n =30) ou larvas inteiras (3-5 g), segundo Silva-Filha (1997). Este método tem como princípio o isolamento parcial de frações ricas em microvilosidades através de etapas de incubação de extratos de larvas com cátions (Mg^{++}) e centrifugação diferencial para separação de membranas apicais das células. Após a preparação das amostras de BBMF, foi feita a dosagem proteica pelo método de Bradford (1976), com modificações. Foi usado o reativo específico (Biorad #5000002) que interage com as proteínas presentes promovendo uma reação colorimétrica mensurada a uma absorbância de 595 nm. A dosagem em microgramas foi feita baseada em uma curva padrão da proteína albumina sérica bovina (BSA).

A qualidade das amostras também foi avaliada pela detecção da atividade da enzima α -glicosidase (EC 3.2.1.20), que é um marcador do enriquecimento de proteínas presentes no microvilli intestinal, usando o substrato sintético p-nitrophenyl- α -D-glucanopyranoside (pN α G, Sigma N1377), segundo protocolo previamente estabelecido (Chalegre *et al.*, 2005). Este substrato é clivado pelas α -glicosidases presentes no meio produzindo o grupamento p-nitrophenol que promove uma reação colorimétrica que foi mensurada a uma absorbância 405 nm. O nível de enriquecimento da enzima na fração final obtida foi feita de forma comparativa entre a atividade de α -glicosidase em uma quantidade fixa de proteína (10 μ g) do homogenato inicial e a atividade de uma amostra de microvilli (10 μ g) obtida ao final da preparação. As amostras foram armazenadas a -70°C até a utilização.

4.5 ENSAIOS DE IMUNODETECÇÃO (WESTERN-BLOT)

Esta etapa visou avaliar a capacidade dos anticorpos policlonais anti-LKR e anti-CPE de reconhecer a panteteinase recombinante (CPIJ017593) para,

posteriormente, empregar estes anticorpos para a detecção de panteteinases nativas em amostras de larvas de *Cx. quinquefasciatus*. Para os ensaios de imunodeteção, as amostras de proteínas foram separadas em eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) em gel a 10%. Em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Cytiva®). Esta foi submetida à coloração com Vermelho de Ponceau para avaliar a qualidade da transferência e marcação de pesos moleculares. Em sequência, cada membrana foi submetida a procedimento de imunodeteção usando o equipamento Snap i.d. (Millipore). As principais etapas estão descritas a seguir e foram realizadas a temperatura ambiente: bloqueio da membrana com 0,1% de leite desnatado (Molico®) em tampão TBS-T 1X (1,5 M Tris-HCl; 5 M NaCl; 0.1% Tween 20; pH 7.6) por 30 segundos; incubação de anticorpos policlonais primários (anti-LKR ou anti-CPE) com diluições entre 1:1.000 e 1:100 (a depender do anticorpo utilizado) em tampão TBS-T 1X por 20 minutos; incubação de um anticorpo secundário IgG-Rabbit conjugado com horseradish peroxidase, com diluição de 1:10.000 em tampão TBS-T por 10 minutos. Entre cada etapa, foram feitas lavagens da membrana (5 vezes), por 15 segundos, com o tampão TBS-T 1X. A detecção foi através de reação de quimioluminescência usando o reagente Immobilon® Forte Western HRP Substrate (Millipore) e o sinal foi detectado no equipamento IBright CL1000™ Imaging System (Thermo Scientific).

4.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados obtidos foram analisados no GraphPad Prism versão 10.1.2 e expressos como valores médios com desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas foram calculadas usando o Teste T não paramétrico. Os valores são considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

4.7. COMITÊ DE ÉTICA

Este projeto não inclui procedimentos relacionados às exigências de conduta envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, resolução CNS 196/96 e complementares, bem como não contém pesquisa com animais vertebrados (Anexo A).

5 RESULTADOS

5.1 TRANSCRIÇÃO DO GENE DA PANTETEINASE

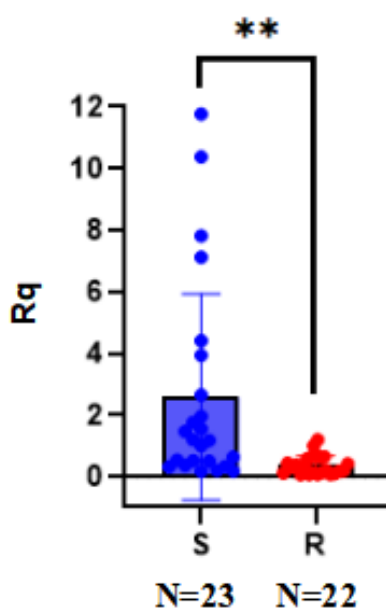
O principal objetivo dessa etapa foi determinar o padrão comparativo de transcrição do gene que codifica a panteteinase (CPIJ017593) de *Cx. quinquefasciatus*, em amostras individuais de larvas e adultos, de uma colônia suscetível (S) e outra resistente ao larvicida *L. sphaericus* (R). As avaliações foram feitas por análise de quantificação relativa (Rq) por meio da qRT-PCR, do gene alvo e do gene 18S. Para a qualidade da análise comparativa foi feita uma padronização das amostras de amostras de RNA utilizadas para os ensaios de qRT-PCR. Um amplo número de amostras de RNA foi obtido e após triagem pelos padrões de qualidade, apenas parte delas atendeu aos parâmetros adequados de concentração e razão de absorbância 280 nm/260 nm (Abs 280/260). Assim, os parâmetros médios de Abs 260/280 obtidos nas amostras foram os seguintes: 1,75 para RNA de larvas, 1,74 (S) e 1,77 (R) para machos, 1,8 (S) e 1,8 (R) para fêmeas. Esses dados demonstram que as amostras de RNA utilizadas nos ensaios de qRT-PCR apresentaram boa qualidade o que permite que os resultados obtidos robustos para a análise comparativa. Os dados de avaliação das amostras de RNA estão descritos no Anexo B (Tabelas Suplementares 1 - 3).

5.1.1 Perfil em Larvas

Ao analisar os resultados das reações de qRT-PCR, transcritos da panteteinase estudada foram detectados em larvas S e R. As larvas S (n =23) apresentaram um perfil de expressão variado da panteteinase em larvas em relação à amostra de referência (Figura 25). A média da Rq nestas amostras foi de $2,65 \pm 3,33$, com valores de Rq desde 11 vezes maiores que a referência até 5 vezes menores que a mesma, como descrito na tabela suplementar 4. Neste grupo, 13 e 10 larvas apresentam um valor de Rq acima e abaixo da referência, respectivamente, mostrando assim um amplo intervalo de valores de quantificação dos transcritos. As amostras de larvas resistentes mostraram um perfil de expressão significativamente mais reprimido, com um valor de Rq médio de $0,34 \pm 0,28$ ($p < 0,05$). Dentre as 22 larvas R analisadas, quase a totalidade apresentou valores de

Rq abaixo da referência. Portanto, a transcrição da panteteinase apresentou um padrão de repressão nas larvas R, comparadas às larvas S.

Figura 25. Quantificação relativa (Rq) da transcrição do gene da *panteteinase* CPIJ017593 em larvas do quarto instar de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis (S) comparadas às resistentes (R) à toxina Bin, por qRT-PCR. As amostras são larvas individuais (pontos), a coluna e a barra representam a média e o desvio padrão, respectivamente. O valor de ($p < 0,05$) indica diferença estatisticamente significativa.



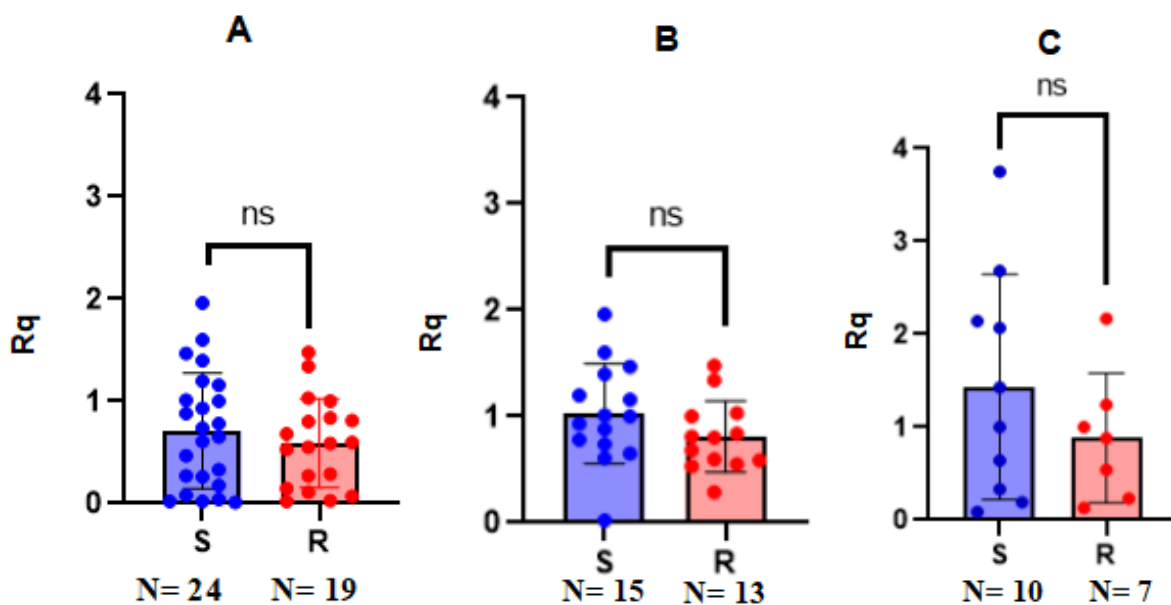
Fonte: figura produzida pelo autor.

5.1.2 Perfil em Adultos

Na fase adulta, a quantificação relativa da panteteinase foi feita, com machos e fêmeas das colônias S e R. Analisados sem distinção, os adultos de ambas as colônias apresentaram uma expressão de transcritos variada, no qual indivíduos S apresentaram Rq média de $0,70 \pm 0,56$, e para indivíduos R um valor menor de $0,57 \pm 0,42$, que não foi significativamente estatístico (Figura 26 A, Tabela suplementar 5). O gráfico aponta uma grande dispersão de valores de Rq dos indivíduos das duas colônias. Quando os dados são analisados por sexo, as fêmeas S apresentaram uma média maior ($1,03 \pm 0,47$) que fêmeas R ($0,79 \pm 0,33$) (Figura 26 B, Tabela suplementar 6). Os machos S apresentaram Rq média de $1,48 \pm 1,20$, enquanto os machos R de $0,87 \pm 0,70$ (Figura 26 C, Tabela suplementar 7). Em ambas as comparações, os indivíduos R possuem um valor médio de Rq menor, mas, está

diferença não é significativa ($p > 0,05$) entre as colônias, na análise global de adultos, ou por sexo. Assim, os dados mostram que o perfil de transcrição do gene da panteteinase é similar em adultos R e S, diferente do padrão de repressão deste gene observado em larvas R. A amostra de referência utilizada para a análise global e de fêmeas, foi a amostra de uma fêmea S, com ΔCt mais próximo da média, pois é o sexo que realiza o repasto sanguíneo e, portanto, é o principal alvo. Para a análise em machos, foi utilizada uma amostra de um macho S como referência.

Figura 26. Quantificação relativa (Rq) da transcrição do gene da *panteteinase* CPIJ017593 em adultos de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis (S) comparados aos resistentes (R) à toxina Bin, por qRT-PCR. **(A)** Adultos. **(B)** Fêmeas. **(C)** Machos. As amostras são adultos individuais (pontos), a coluna e a barra representam a média e o desvio padrão, respectivamente. O valor de $p > 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa.



Fonte: produzida pelo autor.

5.2 TRANSCRIÇÃO DO GENE DO *CQM1*

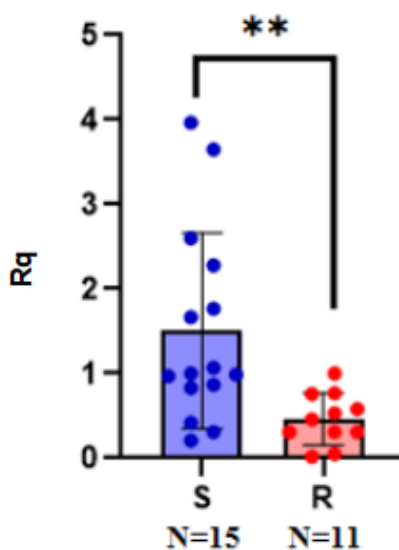
O receptor *Cqm1* é o marcador de resistência de larvas de *Cx. quinquefasciatus* ao larvicida *L. sphaericus*, pois a ausência desta proteína no epitélio intestinal impede o modo de ação da toxina Bin nas larvas, conforme apresentado no referencial teórico (seção 2.4). O transcriptoma comparativo do intestino das larvas mostrou o perfil de sub expressão do transcrito do gene *cqm1* em *pools* de intestinos de larvas R, conforme esperado e revelou as panteteinases

por apresentarem um padrão de repressão de transcritos mais acentuado do que o receptor. Assim, neste estudo a transcrição do gene *cqm1* em larvas e adultos foi determinada de forma individual, pois esse padrão não foi investigado além de servir como um padrão comparativo.

5.2.1 Perfil de Transcrição em Larvas

Esta análise foi feita segundo os mesmos critérios metodológicos usados para o perfil de panteteinases. Os resultados mostraram que as larvas S apresentaram um padrão de expressão variado em relação à amostra de referência (Figura 27). A média da quantificação relativa (Rq) foi de $(1,54 \pm 1,15)$ com valores desde 4 vezes maiores até 5 vezes menores (Tabela suplementar 8). As larvas R mostraram um padrão de expressão reprimido, sendo a Rq média de $(0,41 \pm 0,25)$, e neste grupo todas as amostras apresentaram valores de Rq abaixo da referência. Portanto, esta análise mostrou que a transcrição do *cqm1* apresentou um padrão significativo ($p < 0,05$) de repressão em indivíduos R comparados aos indivíduos S.

Figura 27. Quantificação relativa (Rq) da transcrição do gene do *cqm1* CPIJ013173 em larvas individuais do quarto instar de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis (S) comparadas as resistentes (R) à toxina Bin, por qRT-PCR. Cada coluna representa a média e o desvio padrão obtido de cada colônia. Estatisticamente, o valor de ($p < 0,05$) indica diferença significativa entre as colônias.

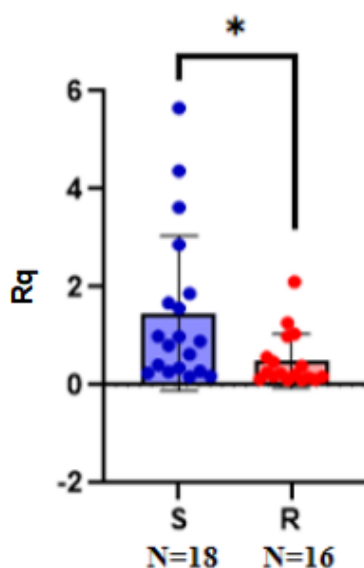


Fonte: produzida pelo autor.

5.2.2 Perfil em Adultos

Na fase adulta, a quantificação relativa do gene *cqm1* foi feita com indivíduos das colônias S e R, global sem distinção de sexo (Figura 28). Os adultos da colônia S apresentaram um perfil variado em relação a amostra de referência do Cqm1, de valores que vão de 5 vezes acima da referência até 5 vezes menor, assim a média de Rq representou um valor abaixo do desvio padrão ($1,49 \pm 1,57$) (Tabela suplementar 9). Adultos da colônia R apresentaram um perfil de repressão ($0,47 \pm 0,54$), e os valores de Rq dos indivíduos estavam abaixo da mesma referência, em quase sua totalidade. Portanto, a análise mostrou que a transcrição do *cqm1* apresentou um padrão de repressão em indivíduos R de ambas as fases de vida comparados aos indivíduos S.

Figura 28. Quantificação relativa (Rq) da transcrição do gene *cqm1* CPIJ13173 em adultos (machos e fêmeas) individuais de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis (S) comparadas as resistentes (R) à toxina Bin, por meio de qRT-PCR. Cada coluna representa a média e o desvio padrão obtido de cada colônia. Estatisticamente, o valor de ($p < 0,05$) indicou que há diferença significativa entre as colônias.



Fonte: produzida pelo autor.

5.3 DETECÇÃO DE PANTETEINASES

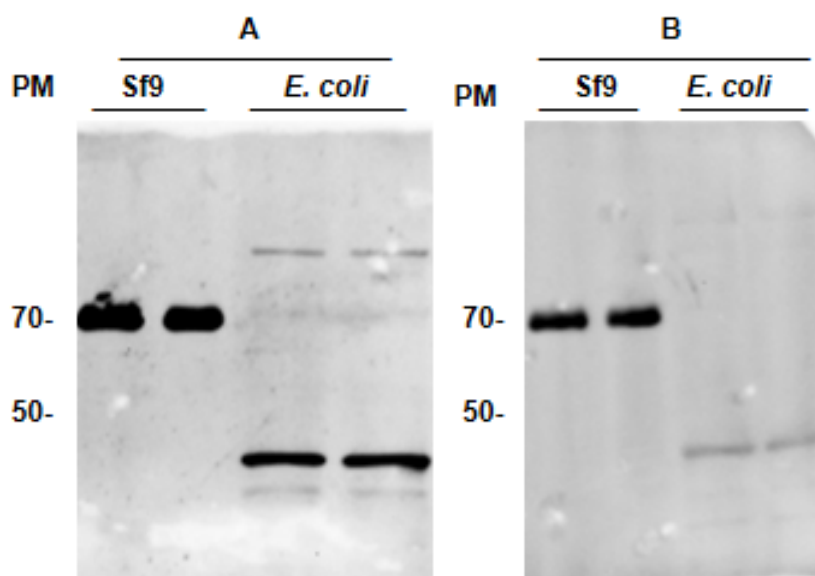
Após a detecção do perfil diferencial de transcrição do gene da panteteinase em larvas S e R, esta etapa teve como objetivo detectar a expressão da respectiva proteína no epitélio intestinal das larvas, utilizando os anticorpos policlonais descritos no item 4.3.

5.3.1 Detecção de Panteteinases Recombinantes

Inicialmente, os anticorpos policlonais anti-peptídeos da panteteinase, anti-LKR e anti-CPE, foram avaliados em relação a sua capacidade de reconhecimento específico da panteteinase CPIJ017593 recombinante e semipurificada em resina de níquel. O objetivo foi adequar e padronizar o uso dos anticorpos policlonais anti-peptídeos para avaliar a detecção de panteteinases nativas em amostras biológicas de *Cx. quinquefasciatus*.

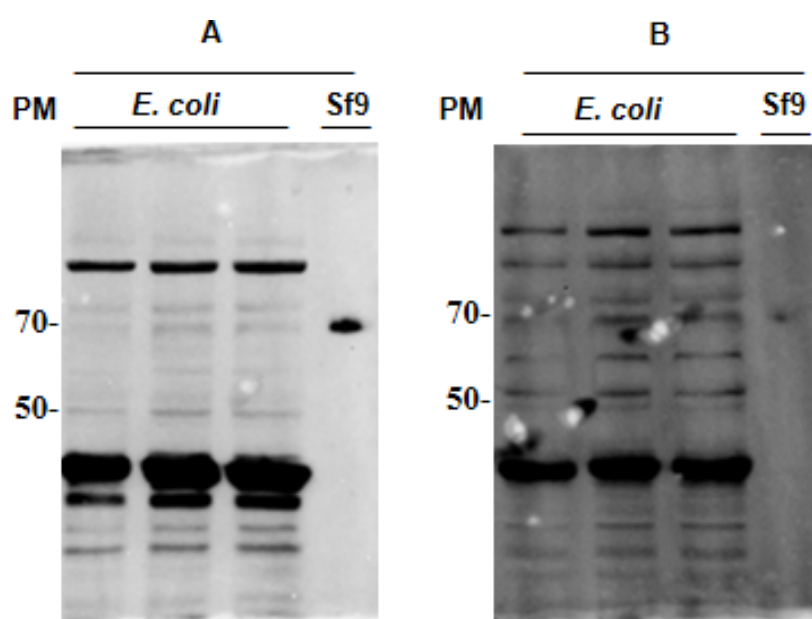
Os dois anticorpos, anti-LKR e anti-CPE, foram testados em ensaios de imunodetecção da proteína recombinante produzida em *E. coli* e em células Sf9. Nesta primeira análise ambos os anticorpos anti-LKR e anti-CPE detectaram uma proteína com peso molecular aparente de 70 kDa nas amostras de proteína recombinante produzida em Sf9, com reconhecimento intenso e ausência de outros sinais potencialmente inespecíficos (Figura 29). Por outro lado, nenhum dos anticorpos reconheceu uma proteína do tamanho esperado nas amostras de *E. coli*. Neste caso, os dois anticorpos mostraram um padrão similar de detecção de duas bandas com tamanhos superior e inferior ao peso esperado de 70 kDa. Em seguida, para reavaliar o padrão de reconhecimento pelos anticorpos da panteteinase expressa em *E. coli*, foi realizado um ensaio utilizando apenas estas amostras, e uma amostra da panteteinase expressa em Sf9 como controle positivo. Novamente foi detectado um padrão de reconhecimento inespecífico de bandas, inclusive uma banda de 70 kDa mas com fraca intensidade, tanto pelo anti-LKR (Figura 30 A), quanto pelo anti-CPE (Figura 30 B).

Figura 29. Imunodeteção da panteteinase CPIJ017593 de *Culex quinquefasciatus* produzida de forma recombinante em células Sf9 e em *E. coli*. **(A)** Anticorpo anti-peptídeo LKR (1:1.000). **(B)** Anticorpo anti-peptídeo CPE (1:1.000). PM. Marcador de peso molecular em kDa à esquerda.



Fonte: produzida pelo autor.

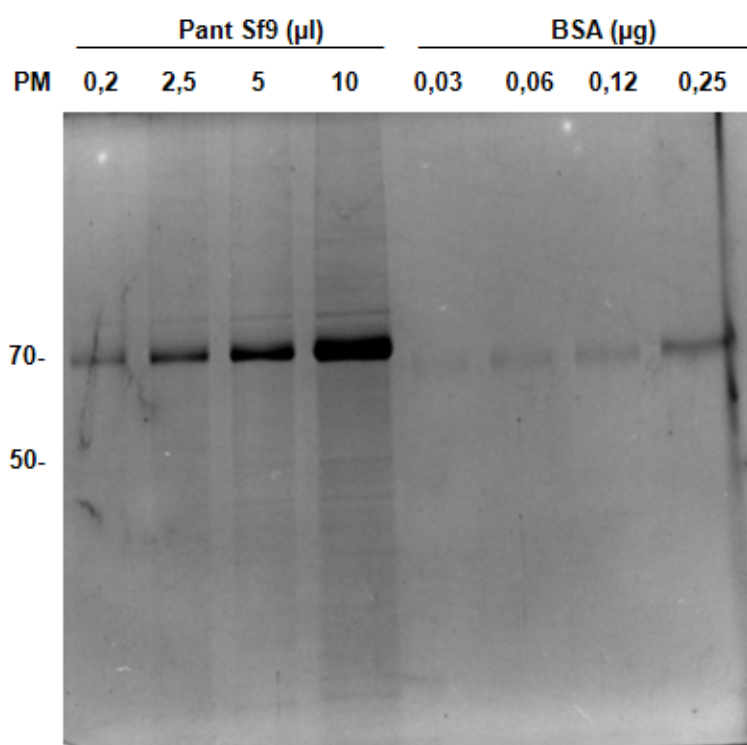
Figura 30. Imunodeteção da panteteinase CPIJ017593 de *Culex quinquefasciatus* produzida de forma recombinante em *E. coli*. Panteteinase recombinante em Sf9 de 70 kDa na pista à direita de cada painel (controle positivo). **(A)** Anticorpo anti-peptídeo LKR (1:1.000). **(B)** Anti-peptídeo CPE (1:1.000). PM. Marcador de peso molecular em kDa à esquerda.



Fonte: produzida pelo autor.

Para ter estimativa da sensibilidade dos anticorpos foi feita uma determinação da concentração proteica (μg proteína/ μl amostra) em amostras de panteteinase CPIJ017593 expressa em células Sf9. Para tal, amostras padrão com quantidades conhecidas (μg) da proteína BSA (Figura 31) e amostras de panteteinase expressa em Sf9 (14.02.23) com diferentes volumes, foram separadas em eletroforese por SDS-PAGE a 10%. Após a coloração com azul de Coomassie a quantificação foi determinada com base na comparação da densidade do sinal colorimétrico, através do equipamento IBright CL1000™ Imaging System. A concentração estimada da panteteinase Sf9 (14.02.23), foi de 0,17 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Esta amostra foi selecionada para ser utilizada como referência e controle positivo para os ensaios posteriores.

Figura 31. Perfil de amostras de panteteinase-Sf9 (14.02.23) CPIJ017593 de *Cx. quinquefasciatus* produzida de forma recombinante em células Sf9 em eletroforese SDS-PAGE a 10%. Diferentes quantidades de albumina do soro bovino estão representadas nas pistas e foram estimadas para panteteinases. Coloração com azul de Coomassie. PM. Marcador de peso molecular em kDa à esquerda.

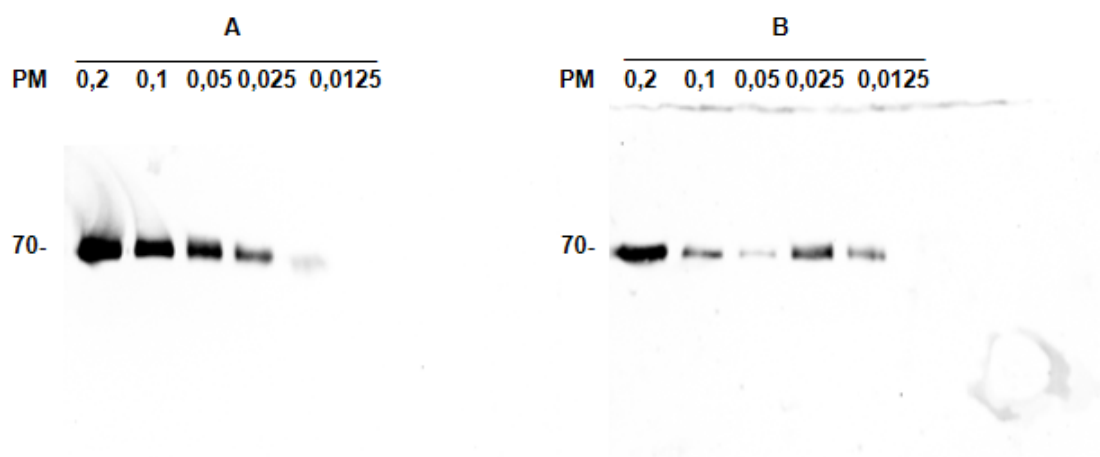


Fonte: produzida pelo autor.

Após a estimativa da concentração da panteteinase Sf9, foram feitos ensaios de imunodeteção de diferentes quantidades da amostra pelos anticorpos anti-LKR e anti-CPE, para avaliar a sensibilidade, ou seja, a quantidade mínima de proteína que

seria detectável pelos anticorpos. Ambos os anticorpos detectaram a panteteinase de 70 kDa em todas as quantidades até 0,0125 µg. A comparação do desempenho dos anticorpos, indicou que o anticorpo anti-LKR é mais sensível, pois mostrou um reconhecimento mais intenso das amostras comparado à detecção com o anti-CPE, usado na mesma titulação 1:1.000 (Figura 32).

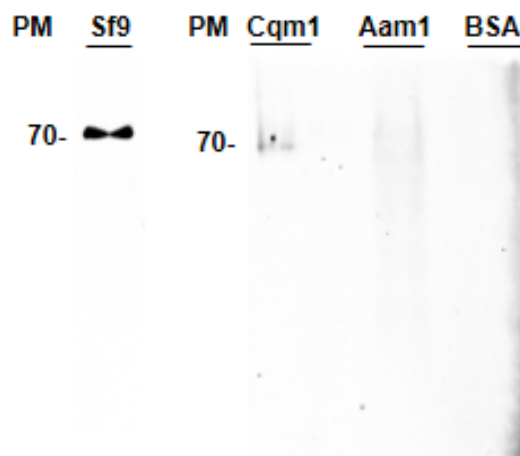
Figura 32. Imunodeteção de amostras de panteteinase CPIJ017593 de *Culex quinquefasciatus* recombinante produzida em células Sf9 com dois anticorpos primários dirigidos contra peptídeos da proteína. **(A)** Anticorpo Anti-LKR 1:1.000. **(B)** Anticorpo Anti-CPE 1:1.000. Amostras de proteína em µg. PM. Marcador de peso molecular em kDa à esquerda.



Fonte: produzida pelo autor.

Em vista da maior sensibilidade do anticorpo anti-LKR, este foi utilizado para as demais análises do estudo. Para estimar a especificidade deste anticorpo foi feito um ensaio utilizando diferentes proteínas, que não deveriam potencialmente ser reconhecidas pelo anticorpo, e a panteteinase Sf9 como controle positivo. Como amostras teste foram utilizadas a proteína Cqm1 de *Cx. quinquefasciatus* (60 kDa), a proteína Aam1 de *Aedes aegypti* (73 kDa) e a proteína BSA (66 kDa). O anticorpo reconheceu a panteteinase Sf9 de 70 kDa com forte intensidade, e bandas específicas não foram detectadas nas demais amostras, exceto um discreto sinal na amostra Cqm1, indicando a especificidade do anticorpo para a proteína alvo (Figura 33).

Figura 33. Imunodeteccção das proteínas Cqm1 de *Culex quinquefasciatus* (60 kDa), Aam1 de *Aedes aegypti* (73 kDa) e a proteína albumina do soro bovino-BSA (66 kDa) e a panteteinase recombinante em Sf9 (70 kDa), controle positivo, com o anticorpo anti-LKR (1:1000). PM. Marcador de peso molecular em kDa à esquerda.



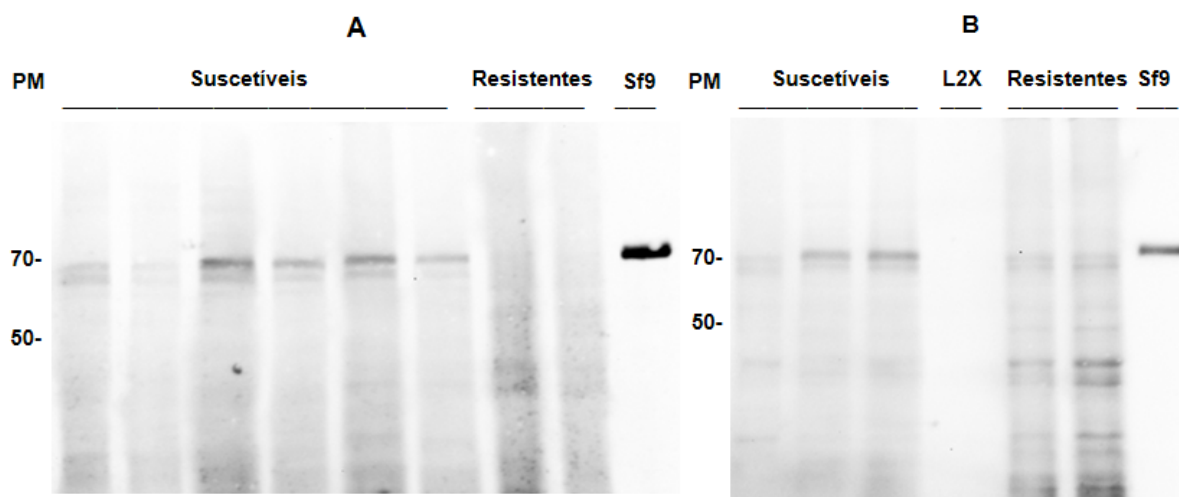
Fonte: produzida pelo autor.

5.3.2 Detecção de panteteinases nativas

Após os ensaios que demonstraram a capacidade de detecção dos anticorpos anti-peptídeos para panteteinase recombinante, foi iniciada a etapa de imunodeteccção de panteteinase nativas para investigar a sua expressão em larvas de *Cx. quinquefasciatus* suscetíveis e resistentes. Nestes ensaios foram utilizadas amostras de microvilosidades do epitélio intestinal (BBMF) disponíveis no laboratório, pois os transcritos da panteteinase foram detectados inicialmente em amostra de epitélio intestinal (Rezende *et al.*, 2017, 2019, Menezes *et al.*, 2023). O anticorpo anti-peptídeo LKR foi utilizado para a detecção da proteína nestas amostras. Este anticorpo reconheceu uma banda com peso aparente de 70 kDa em todas as amostras de BBMF de larvas suscetíveis, analisadas em duplicata, o que é consistente com os resultados obtidos com amostras recombinantes e indica a presença desta proteína no epitélio intestinal das larvas (Figura 34 A). Nas amostras de BBMF de larvas resistentes não houve o reconhecimento de uma banda equivalente. Outros ensaios de imunodeteccção mostraram um resultado similar, porém, com menor discriminação, pois o reconhecimento da proteína de 70 kDa está ausente em uma das amostras de BBMF de larvas suscetíveis e foram detectadas bandas inespecíficas nas amostras de larvas resistentes (Figura 34 B). A amostra de

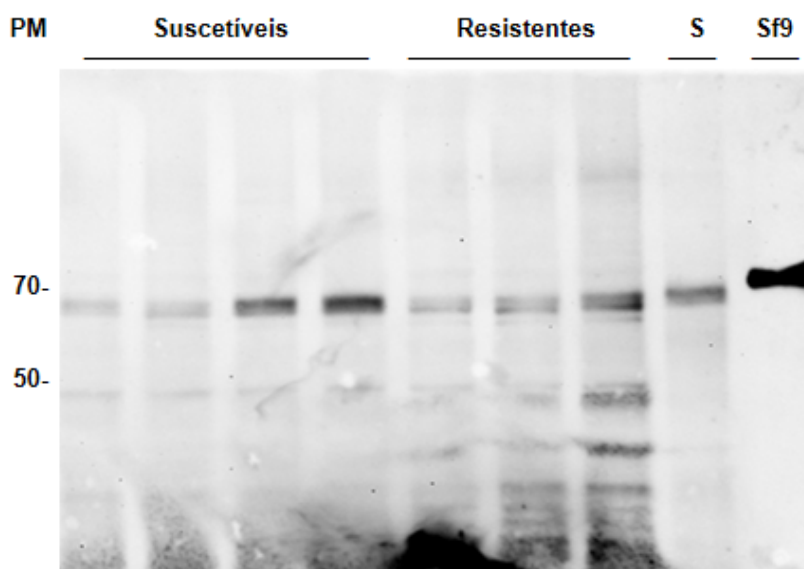
panteteinase-Sf9 recombinante, usada como controle positivo, foi detectada em ambos os ensaios. Em seguida, novos ensaios com estas amostras de BBMF foram realizados e a detecção da banda de 70 kDa não foi reproduzível em parte deles. Novas amostras de BBMF de ambas as colônias foram produzidas a fim de testar preparações mais recentes, partindo da hipótese de instabilidade das proteínas nas BBMF's. Uma sinopse das avaliações das BBMF's usadas está disponível na Tabela 2. Todas as preparações atingiram o critério mínimo de concentração proteica > 1 mg/ml e enriquecimento mínimo de 1.5 vezes da atividade da enzima marcadora de microvilli intestinal alfa-glicosidase. Os resultados demonstraram a detecção de uma banda discretamente inferior à 70 kDa em todas as amostras sendo, portanto, inconsistente (Figura 35). Uma terceira abordagem para detecção de panteteinases nativas foi feita com o anticorpo anti-LKR (1:1.000) utilizando como amostras de extrato de larvas inteiras, porém, não houve detecção de uma banda específica de 70 kDa (Figura 36). Nestes ensaios o controle positivo foi detectado demonstrando a validade dos procedimentos experimentais. Assim, os resultados sugerem que há uma expressão diferencial da panteteinase nestas larvas, apesar dos ensaios de imunodetecção apresentarem algumas falhas de detecção em BBMF de larvas S.

Figura 34. Imunodetecção de panteteinases em amostras de microvilosidades intestinais de larvas de *Cx. quinquefasciatus* suscetíveis e resistentes ao *L. sphaericus* com anticorpo primário anti-peptídeo LKR (1:1000). Panteteinase recombinante em Sf9 de 70 kDa à direita (controle positivo Sf9). **(A)** Seis amostras suscetíveis e duas resistentes. **(B)** Três amostras suscetíveis, pista sem amostra proteica (L2x), duas amostras resistentes. PM. Marcador de peso molecular em kDa à esquerda.



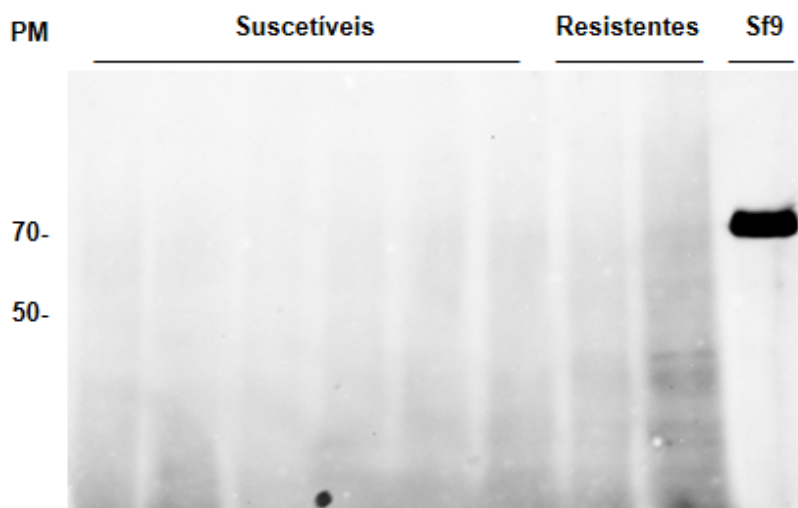
Fonte: produzida pelo autor.

Figura 35. Imunodeteção de panteteinases em novas amostras de microvilosidades intestinais de larvas de *Cx. quinquefasciatus* suscetíveis e resistentes ao *L. sphaericus* com anticorpo primário anti-peptídeo LKR (1:1000). Panteteinase recombinante em Sf9 de 70 kDa à direita (controle positivo Sf9). (S) Suscetível. PM. Marcador de peso molecular em kDa à esquerda.



Fonte: produzida pelo autor.

Figura 36. Imunodeteção de panteteinases em amostras de extrato de larvas inteiras de *Cx. quinquefasciatus* suscetíveis e resistentes ao *L. sphaericus* com anticorpo primário anti-peptídeo LKR (1:1000). PM. Marcador de peso molecular em kDa à esquerda.



Fonte: produzida pelo autor.

Tabela 2. Avaliação das preparações de BBMF de larvas da colônia suscetível (S) e da colônia resistente (R) de *Culex quinquefasciatus*. Proteína Mg/ml. Quantidade de proteína por volume. Enriquecimento da atividade α -glicosidase. Presença de BBMF na preparação.

Preparações de BBMF	Proteína Mg/ml	Enriquecimento da atividade α-glicosidase
S feita em 04/02/2025	5,24	2,26
S feita em 11/02/2025	2,64	2,19
R feita em 18/02/2025	1,52	1,62
R feita em 11/03/2025	2,83	3,0

Fonte: produzida pelo autor.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como principal objetivo determinar o perfil de transcrição do gene da panteteinase em larvas e adultos de *Cx. quinquefasciatus* suscetíveis (S) e resistentes (R) ao *L. sphaericus* e a detecção desta proteína em larvas. Foram identificados seis genes parálogos em *Cx. quinquefasciatus* que codificam diferentes variantes da panteteinase (Rezende et al., 2024). Dentre os genes descritos o alvo deste estudo foi a CPIJ017593, baseada em dados prévios que mostraram a destacada repressão deste gene da panteteinase no perfil transcriptômico por RNAseq de três colônias resistentes a este composto (Rezende et al., 2019, 2024). Diante disso, o perfil de transcrição do gene da panteteinase foi descrito por ensaios de qRT-PCR para determinar, por quantificação relativa, os transcritos deste gene em amostras individuais de larvas bem como em adultos, visto que no RNAseq a avaliação foi feita com três *pools* de larvas (Rezende et al., 2019, 2024). O presente trabalho analisou a transcrição do gene da *panteteinase* e do gene *cqm1* em cada indivíduo a fim de analisar e obter um perfil de expressão deste gene comparativamente entre os indivíduos das colônias resistentes e suscetíveis.

Os dados em larvas individuais mostraram um padrão de repressão de transcrição da panteteinase relativamente homogêneo em larvas R, enquanto o perfil de transcritos foi variável na transcrição em larvas S. A quantificação relativa, sugere uma alta variação de transcritos da panteteinase entre os indivíduos S de uma mesma colônia, o que não foi possível caracterizar a partir das análises em *pools* de intestinos (Rezende et al. 2019, 2024). No entanto, ainda não sabemos os tecidos específicos onde a panteteinase é expressa, visto que foram analisados intestinos no RNAseq e larvas inteiras no atual estudo. No inseto *Mamestra configurata* os transcritos de panteteinase foram detectados em diversos tecidos: como intestino (anterior, médio e posterior), túbulos de Malpighi, traqueia e corpo gorduroso (Toprak et al., 2016). O perfil de larvas S contrasta com as larvas resistentes visto que a maioria apresentou um perfil reprimido, ou seja, com valor de Rq abaixo da referência. Sabendo disso, a *panteteinase* pode ser um novo gene marcador da resistência de *Cx. quinquefasciatus* ao *L. sphaericus*.

Além de analisar a expressão do gene da *panteteinase* em larvas, foi

realizada uma pesquisa inédita da transcrição deste gene em adultos de *Cx. quinquefasciatus*. Nesta avaliação, a panteteinase apresentou um padrão similar entre adultos S e R, analisados sem distinção ou com distinção do sexo, diferente do padrão de repressão encontrado em larvas R. A detecção de transcritos em adultos foi menor do que em larvas, sugerindo uma menor expressão nesta fase de vida. Novos estudos são necessários para determinar se esta proteína exerce um papel diferencial em larvas e adultos, bem como nos diferentes tecidos. Os estudos do gene da panteteinase CPIJ017593 em *Cx. quinquefasciatus* e outros insetos, se restringiram a detecção em larvas (Toprak *et al.*, 2016; Fuzita *et al.*, 2019; Rezende *et al.*, 2024). É ainda possível que panteteinases codificadas por outros genes, disponíveis do GeneBank e descritos por Rezende *et al.* (2024), possam ser mais relevantes na fase adulta de *Cx. quinquefasciatus* do que a panteteinase CPIJ017593, uma vez que estes genes ainda não foram investigados em adultos e podem apresentar um maior número de transcritos.

Alelos do gene *cqm1* conferem a resistência em *Cx. quinquefasciatus* ao *L. sphaericus* e, portanto, o seu perfil de expressão é um marcador (Romão *et al.*, 2006; Chalegre *et al.*, 2015). No presente estudo, o perfil de transcrição do gene *cmq1* por qRT-PCR em larvas também revelou que ocorre uma grande variação entre indivíduos S. Não é possível determinar se estes padrões de transcrição poderiam determinar variações de suscetibilidade *in vivo* de larvas individuais. As larvas individuais R apresentaram o mesmo perfil de repressão comparados aos S, reafirmando a redução da abundância de transcritos em larvas resistentes. Em adultos, apesar do estudo da transcrição deste gene ser inédita, foi observado o mesmo perfil de repressão em indivíduos R observado em larvas. Sugerindo que este gene permanece reprimido durante a fase adulta do *Cx. quinquefasciatus*, o que difere da panteteinase.

No estudo prévio de caracterização da panteteinase CPIJ017593 de *Cx. quinquefasciatus* (Rezende *et al.*, 2024) foi feita a expressão heteróloga da proteína em *E. coli* e células de inseto Sf9, e o reconhecimento por anticorpos monoclonal anti-His (1:5.000) e por anticorpos policlonais anti-panteteinase (1:100), produzidos previamente. Os anticorpos anti-His reconheceram a panteteinase recombinante de forma intensa, como esperado, pois as proteínas foram expressas com uma “tag” de

histidinas (Rezende *et al.*, 2024). Entretanto, o anticorpo anti-panteteinase apresentou um fraco reconhecimento das proteínas recombinantes, sobretudo aquelas expressas em Sf9. Este anticorpo também teve um fraco desempenho para detectar a panteteinase de BBMF de forma intensa e específica, mesmo em baixa diluição (1:100). Por esta razão o presente estudo buscou avaliar novos anticorpos (anti-LKR e anti-CPE) identificados *in silico* contra peptídeos da panteteinase com alto potencial antigênico.

Os dois anticorpos reconheceram a proteína heteróloga produzida em Sf9 com de 70 kDa, indicando que a proteína detectada é a panteteinase, em vista da compatibilidade do peso aparente e confirmação prévia por espectrometria de massas. Desta forma, ambos os anticorpos são sensíveis ao reconhecimento da proteína expressa em Sf9. Entretanto, o mesmo reconhecimento não foi observado em amostras de panteteinases expressas em *E. coli*, visto que além do reconhecimento de uma proteína de 70 kDa, houve a detecção de outras proteínas por motivos que ainda precisam ser avaliados, tais como outras proteínas com sequências peptídicas similares às reconhecidas pelos anticorpos ou a ligação a proteínas não-alvo pelo anticorpo secundário. Os ensaios de imunodetecção da panteteinases nativas utilizando preparações de BBMF's mostraram a expressão nestas amostras, que corrobora o perfil dos respectivos transcritos. Foi detectada uma banda de 70 kDa em amostras S, enquanto sua ausência ou fraca intensidade em amostras resistentes é compatível com o perfil de repressão encontrado para este gene. A imunodetecção mostrada no presente estudo em amostras de BBMF, corrobora a sua primeira detecção em larvas de *Cx. quinquefasciatus* como uma proteína ligada à membrana intestinal (Rezende *et al.*, 2017). Entretanto, a imunodetecção das panteteinases em BBMF, pelo menos sob as condições testadas, não mostrou reprodutibilidade suficiente. Em consequência, a detecção em amostras de larvas inteiras não foi discriminatória, o que foi relativamente esperado, visto que é uma amostra mais complexa do que a BBMF que é uma amostra hipoteticamente mais rica em panteteinases. Uma das possíveis razões para a dificuldade seria a abundância limitada da panteteinase no epitélio intestinal. A imunodetecção da Cqm1 em amostras de BBMF ou de mesmo de larvas, por exemplo, é uma ferramenta robusta para discriminar larvas S e R (Romão *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2010). A imunodetecção da panteteinase em BBMF foi

discriminatória, mas não mostrou a robustez. Esses resultados permitem admitir que o padrão diferencial dos indivíduos S e R não foi claro por detecção proteica, enquanto o padrão de transcritos foi elucidativo. A possibilidade de investigar o padrão discriminatório através de ensaios enzimáticos, como foi demonstrado para a proteína Cqm1 (Amorim *et al.*, 2010; Chalegre *et al.*, 2015), não foi realizada pois sistemas de detecção enzimática ainda não estão comercialmente disponíveis para panteteinases, mesmo no caso das proteínas humanas, embora a atividade enzimática já tenha sido determinada experimentalmente (Rommeleare *et al.*, 2014).

Considerando a caracterização funcional, até o momento, não há dados sobre o potencial envolvimento das panteteinases no modo de ação das proteínas inseticidas microbianas, sendo necessário uma melhor compreensão da sua associação com o fenótipo de resistência. Como descrito no referencial teórico, em humanos a função primária das panteteinases é catalisar a conversão de panteteína em pantetonato e cisteamina (Kaskow *et al.*, 2012). A panteteína está envolvida no metabolismo de ácidos graxos, pois participa do ciclo da CoA, e a liberação cisteamina implicada no estresse oxidativo e em ciclos inflamatórios (Ferreira *et al.*, 2015). Além disso, apresentam um importante papel na lipólise (Chen *et al.*, 2020). Neste contexto, as larvas de *Cx. quinquefasciatus* resistentes à toxina Bin de nosso estudo apresentaram possíveis aspectos associados a alterações do metabolismo de lipídeos. O transcriptoma destas larvas também apresentou vários genes diferencialmente expressos associados ao metabolismo de lipídios e carboidratos (Rezende *et al.*, 2019, 2024), assim como reservas energéticas alteradas de larvas e adultos (Menezes *et al.*, 2023). Porém, ainda não há nenhuma investigação do envolvimento das panteteinases no metabolismo de lipídeos em insetos. Outro envolvimento da panteteína se dá no sistema imune de mosquito. Sabe-se que a coenzima A (CoA), sintetizada a partir de panteteína e restaurada com pantotenato, é essencial para o desenvolvimento do *Plasmodium* em humanos e mosquitos (Hart *et al.*, 2016). O *Plasmodium* depende do pantotenato exógeno para produzir CoA, e a redução de pantotenato em *Anopheles stephensi* foi associada à diminuição da infecção (Simão-Gurge *et al.*, 2021). Tais achados sugerem que as panteteinases poderiam ter funções importantes no metabolismo, imunidade e homeostase dos mosquitos.

Além dos estudos realizados, poderia ser desenvolvida uma nova abordagem em busca de mutações que pudessem ser responsáveis pela menor transcrição a partir da investigação do polimorfismo das sequências das panteteinases em larvas R e S. Mutações na sequência influenciam na transcrição genética, como é evidenciado no gene que codifica o receptor Cqm1. Larvas resistentes apresentam uma mutação na sua sequência de alelos recessivos, que leva a formação de um códon de parada prematuro, influenciando na transcrição deste gene (Chalegre *et al.*, 2015). Mutações *nonsense* também poderiam ser encontradas nos genes que codificam as panteteinases, para isso, são necessários novos estudos neste âmbito. Em síntese, nas colônias avaliadas, foi possível sugerir a potencial atuação da panteteinase como marcador de resistência de *Cx. quinquefasciatus* a Bin. No entanto, é fundamental destacar a importância de realizar novos estudos para compreender o seu papel fisiológico e seu potencial envolvimento no modo de ação da toxina Bin, ou eventual mecanismo de co-seleção com o fenótipo de resistência.

7 CONCLUSÃO

- A *panteteinase* pode atuar como um novo gene marcador da resistência à Bin, além do gene *cqm1* nas linhagens estudadas, mas ainda faz-se necessário mais estudos.
- O perfil de quantificação relativa de transcritos da *panteteinase* permitiu a discriminação de indivíduos suscetíveis e resistentes, enquanto ensaios de imunodeteção desta proteína não apresentou a mesma consistência.
- A menor abundância de transcritos da panteteinase CPIJ017593 em adultos sugere que uma menor importância fisiológica nesta fase.
- O perfil de quantificação relativa de transcritos do *cqm1* mostrou que o gene se mantém sub expresso em larvas e adultos individuais.
- O uso de anticorpos policlonais anti peptídeos da panteteinase teve sucesso e demonstrou uma alta capacidade de reconhecimento da proteína.
- Uma análise comparativa de imunodeteção da panteteinase e da Cqm1 em amostras de BBMF sugerem uma menor abundância ou estabilidade da panteteinase.

REFERÊNCIAS

- ACHEE, N. L. et al. A Critical Assessment of Vector Control for Dengue Prevention. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003655, 7 maio 2015.
- ACHEE, N. L. et al. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. e0006822, 3 jan. 2019.
- ALANIZ, A. J. et al. Global spatial assessment of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*: a scenario of Zika virus exposure. **Epidemiology and Infection**, v. 147, 26 nov. 2018.
- AMORIM, L. B. et al. Stability of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* evaluated by molecular tools. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 4, p. 311–316, 4 abr. 2010.
- ANDRADE, C. et al. Susceptibilidade de Populações de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) Sujeitas ao Controle com *Bacillus sphaericus* Neide no Rio Pinheiros, São Paulo. **BioAssay**, v. 2, n. 0, 3 jul. 2009.
- AURRAND-LIONS, M. et al. Vanin-1, a Novel GPI-Linked Perivascular Molecule Involved in Thymus Homing. **Immunity**, v. 5, n. 5, p. 391–405, 1 nov. 1996.
- BARTUCCI, R. et al. Vanin 1: Its Physiological Function and Role in Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 3891, 9 ago. 2019.
- BAUMANN, P. et al. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. **Microbiological reviews**, v. 55, n. 3, p. 425–436, 1 set. 1991.
- BECKER, N. Ice granules containing endotoxins of microbial agents for the control of mosquito larvae - A new application technique. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 19, n. 1, p. 63–66, 2003.
- BEDOYA-PÉREZ, L. et al. Role of UPR Pathway in Defense Response of *Aedes aegypti* against Cry11Aa Toxin from *Bacillus thuringiensis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 8467–8478, 17 abr. 2013.
- BERRUYER, C. et al. Vanin-1 licenses inflammatory mediator production by gut epithelial cells and controls colitis by antagonizing peroxisome proliferator-activated receptor γ activity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 13, p. 2817–2827, 4 dez. 2006.
- BERRY, C. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 1, p. 1–10, jan. 2012.
- BOERSMA, Y. L. et al. The structure of vanin 1: a key enzyme linking metabolic disease and inflammation. **Acta Crystallographica Section D-biological Crystallography**, v. 70, n. 12, p. 3320–3329, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus*** [online]. Brasília: Ministério da Saúde, p. 46, 2011.

BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1333–1337, 1 jun. 1987.

CANCINO-RODEZNO, A. et al. The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 58–63, jan. 2010.

CAVALLINI, D. et al. Identification of pantethinase in horse kidney extract. **FEBS Letters**, v. 1, n. 2, p. 119–121, ago. 1968.

Célula B - Serviço de Produção de Anticorpos. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/celulab/>>. Acesso em: 20 jul. 2025.

CHAI, C. Y. et al. VNN1 overexpression is associated with poor response to preoperative chemoradiotherapy and adverse prognosis in patients with rectal cancers. **American Journal of Translational Research**, v. 8, n. 10, p. 4455–4463, 2016.

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**, v. 75, n. 4, p. 1044–1049, 19 dez. 2008.

CHALEGRE, K. D. et al. Novel Mutations Associated with Resistance to *Bacillus sphaericus* in a Polymorphic Region of the *Culex quinquefasciatus* cqm1 Gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 17, p. 6321–6326, 7 jul. 2012.

CHALEGRE, K. D. et al. Co-selection and replacement of resistance alleles to *Lysinibacillus sphaericus* in a *Culex quinquefasciatus* colony. **FEBS Journal**, v. 282, n. 18, p. 3592–3602, 1 jul. 2015.

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**, v. 156, n. 1, p. 153–159, 1 nov. 1997.

CHEN, S. et al. Systemic Nanoparticle-Mediated Delivery of Pantetheinase Vanin-1 Regulates Lipolysis and Adiposity in Abdominal White Adipose Tissue. **Advanced Science**, v. 7, n. 14, 8 jun. 2020.

CHEVILLON, C. et al. Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): Interaction Between Recessive Mutants and Evolution in Southern France. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 5, p. 657–664, 1 set. 2001.

COLLETIER, J.-P. et al. De novo phasing with X-ray laser reveals mosquito larvicide BinAB structure. **Nature**, v. 539, n. 7627, p. 43–47, 28 set. 2016.

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

CRESPO, M. et al. Exposure to Zika and chikungunya viruses impacts aspects of the vectorial capacity of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **PloS one**, v. 19, n. 5, p. e0281851–e0281851, 15 maio 2024.

CUTHBERT, R. N. et al. Invasive hematophagous arthropods and associated diseases in a changing world. *Parasites & Vectors*, v. 16, n. 1, 17 ago. 2023.

DAMMANAHALLI K. J.; STEVENS, S.; TERKELTAUB, R. Vanin-1 Pantetheinase Drives Smooth Muscle Cell Activation in Post-Arterial Injury Neointimal Hyperplasia. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39106–e39106, 13 jun. 2012.

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**, v. 99, n. 9, p. 5830–5835, 30 abr. 2002.

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

DE LATE, P. L. et al. Vanin-1 Inactivation Antagonizes the Development of Adrenocortical Neoplasia in Sf-1 Transgenic Mice. **Endocrinology**, v. 155, n. 7, p. 2349–2354, 8 abr. 2014.

DUPRÈ S.; CAVALLINI, D. Purification and properties of pantetheinase from horse kidney. **Methods in enzymology on CD-ROM/Methods in enzymology**, p. 262–267, 1979.

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

FERREIRA, D. W. et al. Enhanced hepatotoxicity by acetaminophen in Vanin-1 knockout mice is associated with deficient proliferative and immune responses. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 4, p. 662–669, abr. 2016.

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

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

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

FUZITA, F. J. et al. Detergent-resistant domains in *Spodoptera frugiperda* midgut microvillar membranes and their relation to microapocrine secretion. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 235, p. 8–18, 24 maio 2019.

GALLAND, F. et al. Two Human Genes Related to Murine Vanin-1 Are Located on the Long Arm of Human Chromosome 6. **Genomics**, v. 53, n. 2, p. 203–213, out. 1998.

GENSOLLEN, T. et al. Functional Polymorphisms in the Regulatory Regions of the VNN1 Gene Are Associated with Susceptibility to Inflammatory Bowel Diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, n. 11, p. 2315–2325, 14 ago. 2013.

GIL M. F. et al. *Culex quinquefasciatus* larvae development arrested when fed on *Neochloris aquatica*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 12, p. e0009988–e0009988, 3 dez. 2021.

GUEDES, D. R. et al. Zika vírus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 1, p. 1–11, jan. 2017.

HART, R. J. et al. Genetic Characterization of *Plasmodium* Putative Pantothenate Kinase Genes Reveals Their Essential Role in Malaria Parasite Transmission to the Mosquito. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 20 set. 2016.

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.

JANSEN, P. A. M. et al. Expression of the Vanin Gene Family in Normal and Inflamed Human Skin: Induction by Proinflammatory Cytokines. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 9, p. 2167–2174, 26 mar. 2009.

JEITNER, T. M.; PINTO, J. T.; COOPER, A. J. L. Cystamine and cysteamine as inhibitors of transglutaminase activity *in vivo*. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 5, 5 set. 2018.

JITTAWADEE RODCHAROEN; MULLA, M. S. Resistance Development in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus*. **Journal of Economic Entomology**, v. 87, n. 5, p. 1133–1140, 1 out. 1994.

KARPUJ, M. V. et al. Prolonged survival and decreased abnormal movements in transgenic model of Huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine. **Nature Medicine**, v. 8, n. 2, p. 143–149, 1 fev. 2002.

KASKOW, B. J. et al. Diverse biological activities of the vascular non-inflammatory molecules – The Vanin pantetheinases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417, n. 2, p. 653–658, 13 jan. 2012.

KAVIAN N. et al. Imbalance of the Vanin-1 Pathway in Systemic Sclerosis. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 8, p. 3326–3335, 15 out. 2016.

KILLEEN, G. F. et al. Developing an expanded vector control toolbox for malaria

elimination. **BMJ Global Health**, v. 2, n. 2, p. e000211, 1 abr. 2017.

LACEY L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 2, p. 133-163, 1 jul. 2007.

LIU, Y. et al. Correlation between carboxylesterase alleles and insecticide resistance in *Culex pipiens* complex from China. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 236, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001.

MARTIN, F. et al. Vanin genes are clustered (human 6q22-24 and mouse 10A2B1) and encode isoforms of pantetheinase ectoenzymes. **Immunogenetics**, v. 53, n. 4, p. 296-306, maio. 2001.

MARTIN, F. et al. Vanin-1^{-/-} mice show decreased NSAID- and *Schistosoma*-induced intestinal inflammation associated with higher glutathione stores. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 4, p. 591-597, 15 fev. 2004.

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**, v. 9, n. 1, 4 fev. 2016.

MENEZES, H. S. G. et al. Molecular and biological features of *Culex quinquefasciatus* homozygous larvae for two *cqm1* alleles that confer resistance to *Lysinibacillus sphaericus* larvicides. **Pest Management Science**, v. 77, n. 7, p. 3135-3144, 28 fev. 2021.

MENEZES, H. S. G. et al. A *Culex quinquefasciatus* strain resistant to the binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus* displays altered enzyme activities and energy reserves. **Parasites & vectors**, v. 16, n. 1, 9 ago. 2023.

MIN-OO, G. et al. Complex genetic control of susceptibility to malaria: positional cloning of the Char9 locus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 3, p. 511-524, 20 fev. 2007.

MOYES, C. L. et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, 20 jul. 2017.

NASCIMENTO, N. A. et al. N-glycosylation influences the catalytic activity of mosquito α -glucosidases associated with susceptibility or refractoriness to *Lysinibacillus sphaericus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 81, p. 62-71, fev. 2017.

NASCIMENTO, N. A. et al. Functional *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa Is Necessary To Synergize *Lysinibacillus sphaericus* Binary Toxin (Bin) against Bin-Resistant and -Refractory Mosquito Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 7, 18 mar. 2020.

NCBI. **Gene** - NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>>. Acesso em: jun. 2025.

NEGI, C.; VERMA, P. Review on *Culex quinquefasciatus*: Southern House Mosquito. **International Journal of Life-Sciences Scientific Research**, v. 4, n. 1, jan. 2018.

NICOLAS, L. et al. Respective role of the 42- and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. **Fems Microbiology Letters**, v. 106, n. 3, p. 275–279, 1 fev. 1993.

NIELSEN-LEROUX, C. et al. Resistance in a Laboratory Population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* Binary Toxin is Due to a Change in the Receptor on Midgut Brush-Border Membranes. **European Journal of Biochemistry**, v. 228, n. 1, p. 206–210, fev. 1995.

NIELSEN-LEROUX, C. et al. Resistance to *Bacillus sphaericus* Involves Different Mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Larvae. **Journal of Medical Entomology**, v. 34, n. 3, p. 321–327, 1 maio 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**, v. 39, n. 5, p. 729–735, 1 set. 2002.

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**, v. 210, n. 2, p. 585–590, dez. 1992.

NITTO, T.; ONODERA, K. The Linkage Between Coenzyme A Metabolism and Inflammation: Roles of Pantetheinase. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 123, n. 1, p. 1–8, 2013.

OLIVEIRA, F. et al. Inheritance and Mechanism of Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 1, p. 58–64, 1 jan. 2004.

Painel Epidemiológico Oropouche. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/o/oropouche/painel-epidemiologico>>.

PEI, G. et al. A Strain of *Bacillus sphaericus* Causes Slower Development of Resistance in *Culex quinquefasciatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 3003–3009, 1 jun. 2002.

POUYET L. et al. Epithelial vanin-1 controls inflammation-driven carcinogenesis in the colitis-associated colon cancer model. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 16, n. 1, p. 96–104, 1 jan. 2010.

POVERO, D. et al. Lipid-induced toxicity stimulates hepatocytes to release angiogenic microparticles that require Vanin-1 for uptake by endothelial cells. **Science signaling**, v. 6, n. 296, p. ra88, ago. 2013.

POVERO, D. et al. Lipid-Induced Hepatocyte-Derived Extracellular Vesicles Regulate

Hepatic Stellate Cells via MicroRNA Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ . **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 1, n. 6, p. 646-663.e4, nov. 2015.

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**, v. 11, n. 1, p. 1–5, 1995.

REGIS, L. N. 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. 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**, v. 94, n. 5, p. 488–492, 1 set. 2000.

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

REZENDE, T. M. T. et al. A differential transcriptional profile by *Culex quinquefasciatus* larvae resistant to *Lysinibacillus sphaericus* IAB59 highlights genes and pathways associated with the resistance phenotype. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, 20 ago. 2019.

REZENDE, T. M. T. et al. *Culex quinquefasciatus* Resistant to the Binary Toxin from *Lysinibacillus sphaericus* Displays a Consistent Downregulation of Pantetheinase Transcripts. **Biomolecules**, v. 14, n. 1, p. 33–33, 25 dez. 2023.

RODRIGUES B. I. et al. Controle da malária: eficácia de formulados de *Bacillus sphaericus* 2362 contra larvas de espécies de *Anopheles* em criadouros artificiais-tanques de piscicultura e criadouros de olaria. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 2, 6 nov. 2008.

ROISIN-BOUFFAY, C. et al. Mouse vanin-1 is cytoprotective for islet beta cells and regulates the development of type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 7, p. 1192–1201, 8 maio. 2008.

ROMÃO T. P. et al. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its α -glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. **FEBS Journal**, v. 273, n. 7, p. 1556–1568, 5 abr. 2006.

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**, v. 321, n. 2, p. 167–174, 6 jun. 2011.

ROMMELAERE, S. et al. Serum Pantetheinase/Vanin Levels Regulate Erythrocyte Homeostasis and Severity of Malaria. **American Journal Of Pathology**, v. 185, n. 11, p. 3039–3052, 4 set. 2015.

RUAN, B. H. et al. A fluorescent assay suitable for inhibitor screening and vanin tissue quantification. **Analytical Biochemistry**, v. 399, n. 2, p. 284–292, 15 abr. 2010.

SHARMA, M. et al. Mosquito-larvicidal binary toxin receptor protein (Cqm1): crystallization and X-ray crystallographic analysis. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, v. 74, n. 9, p. 571–577, 1 set. 2018.

SHARMA, M.; KUMAR, V. Crystal structure of BinAB toxin receptor (Cqm1) protein and molecular dynamics simulations reveal the role of unique Ca(II) ion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 1315–1325, 1 nov. 2019.

SHARMA, M.; KUMAR, V. Mosquito-larvicidal Binary (BinA/B) proteins for mosquito control programs —advancements, challenges, and possibilities. **Current Research in Insect Science**, v. 2, p. 100028, 2022.

SHARMA, R. et al. The uptake and metabolism of cystamine and taurine by isolated perfused rat and rabbit lungs. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 27, n. 7, p. 655–664, jul. 1995.

SILVA FILHA, M. H. N. L.; BERRY, C.; REGIS, L. *Lysinibacillus sphaericus*: Toxins and Mode of Action, Applications for Mosquito Control and Resistance Management. In: **Advances in Insect Physiology**. Cambridge: Academic Press, 2014. v. 47p. 89–176.

SILVA-FILHA M. H. N. L. et al. Low-Level Resistance to *Bacillus sphaericus* in a Field-Treated Population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 88, n. 3, p. 525–530, 1 jun. 1995.

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 Control Mosquito Association**, v. 17, n. 1, p. 45–50, 1 mar. 2001.

SILVA-FILHA, M. H. N. L. et al. Bacterial Toxins Active against Mosquitoes: Mode of Action and Resistance. **Toxins**, v. 13, n. 8, p. 523, 27 jul. 2021.

SILVA-FILHA, M. H. N. L.; 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**, v. 247, n. 3, p. 754–761, ago. 1997.

SILVA-FILHA, M. H. N. L.; NIELSEN-LEROUX, C.; JEAN-FRANÇOIS CHARLES. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 8, p. 711–721, ago. 1999.

SIMÃO-GURGE, R. M. et al. Activation of *Anopheles stephensi* Pantothenate Kinase and Coenzyme A Biosynthesis Reduces Infection with Diverse *Plasmodium* Species in the Mosquito Host. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 807–807, 29 maio 2021.

SINÈGRE, G. et al. First field occurrence of *Culex pipiens* resistance to *Bacillus sphaericus* in southern France. **Abstracts of VIIITH European Meet Society of Vector Ecology**, Cambridge, v. 17, p. 5-8, 1994.

Su, T.; Mulla, M.S. Documentation of high-level *Bacillus sphaericus* 2362 resistance in field populations of *Culex quinquefasciatus* breeding in polluted water in Thailand. **Journal of American Mosquito Control Association**. v. 20, p. 405–411, 2004.

SU, T. et al. Resistance to *Lysinibacillus sphaericus* and Other Commonly Used Pesticides in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Chico, California. **Journal of medical entomology**, v. 55, n. 2, p. 423–428, mar. 2018a.

SU, T. et al. High Resistance to *Bacillus sphaericus* and Susceptibility to Other Common Pesticides in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Salt Lake City, UT. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 2, p. 506–513, 1 nov. 2018b.

SURYA, W. et al. Binary Toxin Subunits of *Lysinibacillus sphaericus* Are Monomeric and Form Heterodimers after In Vitro Activation. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0158356, 24 jun. 2016.

SUZUKI, K. et al. A Novel Glycosylphosphatidyl Inositol-Anchored Protein on Human Leukocytes: A Possible Role for Regulation of Neutrophil Adherence and Migration. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 7, p. 4277–4284, 1 abr. 1999.

TOPRAK, U. et al. Identification of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix proteins and enzymes involved in peritrophic matrix chitin metabolism. **Insect Science**, v. 23, n. 5, p. 656–674, 3 jun. 2015.

WHO/TDR. Global Vector Control Response 2017 - 2030. Geneva: WHO; 2017.

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.

XIAO, C. et al. Vanin-1 expression and methylation discriminate pediatric asthma corticosteroid treatment response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 4, p. 923-931.e3, out. 2015.

YAMASHITA, N. et al. Metabolic pathway catalyzed by Vanin-1 pantetheinase plays a suppressive role in influenza virus replication in human alveolar epithelial A549 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 489, n. 4, p. 466–471, 5 ago. 2017.

YAO, J. et al. Changes in Gene Expression in the Larval Gut of *Ostrinia nubilalis* in Response to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Protoxin Ingestion. **Toxins**, v. 6, n. 4, p. 1274–1294, 3 abr. 2014.

YAO, J. et al. Comparisons of Transcriptional Profiles of Gut Genes between Cry1Ab-Resistant and Susceptible Strains of *Ostrinia nubilalis* Revealed Genes Possibly Related to the Adaptation of Resistant Larvae to Transgenic Cry1Ab Corn. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 2, p. 301–301, 30 jan. 2017.

YUAN, Z. et al. High-Level Field Resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 41–49, 1 fev. 2000.

ZHANG, P. et al. Proteome analysis of silk gland proteins from the silkworm, *Bombyx mori*. **PROTEOMICS**, v. 6, n. 8, p. 2586–2599, 12 abr. 2006.

ZIERFUSS, B. et al. Urinary vanin-1 as a novel biomarker for survival in peripheral artery disease. **Vascular Medicine**, v. 29, n. 4, p. 390–397, 12 abr. 2024.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Outras atividades desenvolvidas

- Cursos e participações em congressos

- Curso de biossegurança, Fundação Oswaldo Cruz, Unidade Fiocruz Pernambuco, 2022.
- Apresentação oral de trabalho na Reunião Anual de Iniciação Científica (RAIC) - 31° RAIC, 2023; 32° RAIC, 2024; 33° RAIC, 2025.
- Participação e apresentação oral de trabalho na 11° Semana de Biociências e Biotecnologia em Saúde (SBBS), 6-10 de Novembro de 2023.
- Monitor da disciplina de Bioquímica 1 para o curso de Biomedicina e Enfermagem (UFPE), 2023-2024.
- Fundador e Vice-presidente da Liga Acadêmica de Bioquímica e Biotecnologia Aplicada, 2024 - atual.
- Vice-presidente do I Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia (SIMBBIOTEC) organizado pela Liga Acadêmica de Bioquímica e Biotecnologia Aplicada (LABBA), 13-15 de 2024.
- Participação e apresentação de trabalho no 51° Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, 22-25 de Setembro de 2024.
- Participação e apresentação de trabalho na 12° SBBS, 4-8 de Novembro de 2024.
- Monitor da disciplina de Exames Bacteriológicos para o curso de Biomedicina (UFPE), 2025.
- Vice-presidente e apresentação de trabalho no II SIMBBIOTEC, organizado pela LABBA, 22-25 de Abril de 2025.
- Ministrante do minicurso “Imunodeteção por Western blotting: Fundamentos e Aplicações práticas” no II SIMBBIOTEC, 22-25 de Abril de 2025.

- Premiações:

- Menção honrosa na 31° RAIC em 22-29 de Maio de 2023.
- 1° Lugar de apresentação oral na 11° SBBS, 6-10 de Novembro de 2023.
- Menção honrosa no II SIMBBIOTEC, 22-25 de Abril de 2025.
- 3° Lugar na 33° RAIC em 13-16 de Maio de 2025.

APÊNDICE B

Artigo publicado

Open Access Article

***Culex quinquefasciatus* Resistant to the Binary Toxin from *Lysinibacillus sphaericus* Displays a Consistent Downregulation of Pantetheinase Transcripts**

by Tatiana M. T. Rezende ¹ , Heverly S. G. Menezes ¹ , Antonio M. Rezende ² , Milena P. Cavalcanti ² , Yuri M. G. Silva ¹ , Osvaldo P. de-Melo-Neto ² , Tatiany P. Romão ¹  and Maria Helena N. L. Silva-Filha ^{1,3,*} 

¹ Department of Entomology, Instituto Aggeu Magalhães-Fiocruz, Recife 50740-465, PE, Brazil

² Department of Microbiology, Instituto Aggeu Magalhães-Fiocruz, Recife 50740-465, PE, Brazil

³ National Institute for Molecular Entomology, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed.

Biomolecules **2024**, *14*(1), 33; <https://doi.org/10.3390/biom14010033>

Submission received: 29 September 2023 / Revised: 7 December 2023 / Accepted: 11 December 2023 /
Published: 25 December 2023

(This article belongs to the Special Issue Identification and Characterization of Receptors for *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Toxins)

Download 

Browse Figures

Review Reports

Versions Notes

Abstract

Culex quinquefasciatus resistance to the binary (Bin) toxin, the major larvicidal component from *Lysinibacillus sphaericus*, is associated with mutations in the *cqm1* gene, encoding the Bin-toxin receptor. Downregulation of the *cqm1* transcript was found in the transcriptome of larvae resistant to the *L. sphaericus* IAB59 strain, which produces both the Bin toxin and a second binary toxin, Cry48Aa/Cry49Aa. Here, we investigated the transcription profiles of two other mosquito colonies having Bin resistance only. These confirmed the *cqm1* downregulation and identified transcripts encoding the enzyme pantetheinase as the most downregulated mRNAs in both resistant colonies. Further quantification of these transcripts reinforced their strong downregulation in Bin-resistant larvae. Multiple genes were found encoding this enzyme in *Cx. quinquefasciatus* and a recombinant pantetheinase was then expressed in *Escherichia coli* and Sf9 cells, with its presence assessed in the midgut brush border membrane of susceptible larvae. The pantetheinase was expressed as a ~70 kDa protein, potentially membrane-bound, which does not seem to be significantly targeted by glycosylation. This is the first pantetheinase characterization in mosquitoes, and its remarkable downregulation might reflect features impacted by co-selection with the Bin-resistant phenotype or potential roles in the Bin-toxin mode of action that deserve to be investigated.

Keywords: transcriptome; RNA-seq; vanin-like protein; receptor; Cqm1; pesticidal toxins; microbial larvicides

ANEXOS

ANEXO A

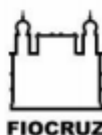
Declaração de Ética



SOBRE QUESTÕES DE ÉTICA

Declaro para todos os fins que o projeto "**Pantanteinases de *Culex quinquefasciatus*: padrão de transcrição e detecção em larvas suscetíveis e resistentes ao larvicida *Lysinibacillus sphaericus***", desenvolvido sob minha coordenação no Departamento de Entomologia desta instituição, não inclui procedimentos relacionados às exigências de conduta envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, resolução CNS 196/96 e complementares, bem como não contém de pesquisa com animais vertebrados.

Recife, 21 de julho de 2025.



Assinado de
forma digital por
Maria Helena
Neves Lobo Silva
Filha:6127910242
0
Dados: 2025.07.22
09:26:59 -03'00'

ANEXO B

Dados brutos

Tabela Suplementar 1. Avaliação da extração do RNA de larvas do quarto estágio (L4) das colônias suscetível e resistente ao *Lysinibacillus sphaericus* utilizadas para as reações de qRT-PCR.

Larvas L4				
Colônia suscetível			Colônia resistente	
ID	Concentração ng/ul	Razão absorbância 280/260	Concentração ng/ul	Razão absorbância 280/260
1	226	1,75	198,5	1,72
2	274,6	1,74	178,4	1,75
3	93,9	1,74	62,3	1,87
4	74,8	1,88	246,2	1,9
5	157,2	1,72	120,3	1,74
6	113,3	1,74	269,3	1,88
7	146,9	1,85	39,6	1,76
8	144	1,74	125,4	1,7
9	145,5	1,73	138,1	1,71
10	53,2	1,77	197,3	1,8
11	70,3	1,75	31,3	1,72
12	56,3	1,74	223,5	1,84
13	172,7	1,82	161,5	1,74
14	74,2	1,84	156,1	1,73
15	155,1	1,73	145,3	1,7
16	131,5	1,75	243,2	1,85
17	75,7	1,71	246,2	1,84
18	338,8	1,97	478,9	1,76
19	235,2	1,85	302,7	1,96
20	100,2	1,72	234,7	1,84
21	97,4	1,79	148	1,71
22	102,7	1,72	203,2	1,79
23	228,3	1,85	235,4	1,82
24	241,2	1,87	241,4	1,84
25	201,6	1,82	328,6	1,97
26	146	1,73	240,6	1,84
27	202,9	1,81	245,6	1,83
28	483,9	1,73	218,7	1,81
29	150,9	1,74	322,6	1,93
30	101,4	1,7	233,8	1,82
31	158	1,78	173,6	1,75
32	261,8	1,89	161,6	1,7

33	195,3	1,78	218,2	1,78
34	195,4	1,8	197,9	1,79
35	177,3	1,79	307,8	1,93
36	268,5	1,9	165,2	1,73
37	277,5	1,91	271,6	1,88
38	150,5	1,74	228,9	1,82
39	219	1,82		
40	166,4	1,8		
41	221,3	1,83		
Média	157,20	1,78	218,45	1,81
Desvio padrão	83,93	0,06	82,32	0,07

Fonte: produzida pelo autor.

Tabela Suplementar 2. Avaliação da extração do RNA de adultos fêmeas com 2-5 dias de muda das colônias suscetível e resistente ao *Lysinibacillus sphaericus* utilizadas para as reações de qRT-PCR.

Adultos				
Colônia suscetível			Colônia resistente	
ID	Concentração	Razão absorbância	Concentração	Razão absorbância
Fêmeas	ng/ul	280/260	ng/ul	280/260
1	129,1	1,76	220,6	1,8
2	146,4	1,72	232,2	1,8
3	132	1,74	300,2	1,9
4	224,3	1,77	236,5	1,8
5	283,9	1,9	247,9	1,84
6	297,1	1,84	280,9	1,88
7	172,1	1,8	181,3	1,78
8	291,9	1,9	196,6	1,79
9	195,8	1,79	218,3	1,83
10	297,6	1,91	180,4	1,8
11	238,6	1,84	258,3	1,8
12	309,5	1,93	250,8	1,83
13	249	1,83	223,5	1,8
14	127,1	1,85	140,6	1,78
15			124,4	1,83
16			139	1,78
17			211,3	1,83
Média	231,45	1,84	220,60	1,8
Desvio padrão	67,27	0,06	47,84	0,03

Fonte: produzida pelo autor.

Tabela Suplementar 3. Avaliação da extração do RNA de adultos machos com 2-5 dias de muda das colônias suscetível e resistente ao *Lysinibacillus sphaericus* utilizadas para as reações de qRT-PCR.

Adultos				
Colônia suscetível			Colônia resistente	
ID	Concentração	Razão absorbância	Concentração	Razão absorbância
Machos	ng/ul	280/260	ng/ul	280/260
1	188,7	1,74	167,7	1,73
2	199,1	1,73	167,5	1,76
3	172,1	1,71	241,9	1,83
4	159,1	1,69	169,5	1,76
5	201,3	1,74	203,3	1,77
6	191	1,72	271,7	1,87
7	284	1,87	129,4	1,72
8	305	1,9	286,7	1,89
9	240,4	1,84	253,5	1,83
10	183,1	1,72	226,5	1,81
11	230,8	1,8	148,2	1,71
12	153,4	1,73	252,8	1,85
13	202,6	1,76	195,2	1,74
14	61,7	1,72	165,5	1,72
15	211,1	1,79	166,4	1,73
16	143,7	1,71	180,2	1,76
17			217,7	1,77
18			178,5	1,74
19			190,2	1,78
20			192,6	1,75
21			61,7	1,77
Média	195,05	1,74	190,20	1,76
Desvio padrão	54,70	0,06	50,43	0,05

Fonte: produzida pelo autor.

Tabela Suplementar 4. Conjunto de dados dos ensaios de quantificação relativa por RT-qPCR de transcrição do gene da *panteteinase* CPIJ017593 em larvas (amostras individuais) do quarto instar em *Culex quinquefasciatus* da colônia resistente (R) em comparação com a colônia suscetível (S). Ct. Limiar de ciclo. Δ Ct. Diferença entre o Ct do gene controle e do gene alvo. $\Delta\Delta$ Ct. Diferença entre o Δ Ct das amostras e da amostra de referência. Rq. Quantificação relativa. DP. Desvio padrão. REF. Amostra de referência.

Suscetível						Resistente				
N	Ct 18S	Ct Pant	ΔCt	$\Delta\Delta$Ct	Rq	Ct 18S	Ct Pant	ΔCt	$\Delta\Delta$Ct	Rq
REF	8,92	26,76	17,84	0	1	8,92	26,76	17,84	0	1
1	12,9	30,49	17,59	-0,25	1,19	10,99	30,24	19,25	1,41	0,38

2	11,5	30,01	18,51	0,67	0,63	11,54	31,08	19,54	1,7	0,31
3	9,32	28,06	18,74	0,91	0,53	12,72	31,84	19,12	1,28	0,41
4	8,39	24,09	15,7	-2,14	4,41	10,34	32,11	21,76	3,93	0,07
5	8,01	28,18	20,16	2,33	0,2	9,88	30,89	21,02	3,18	0,11
6	12,37	28,24	15,86	-1,98	3,94	12,83	31,85	19,01	1,18	0,44
7	8,66	25,95	17,29	-0,55	1,46	10,31	32,15	21,84	4	0,06
8	8,31	25,92	17,61	-0,23	1,17	9,96	31,27	21,34	3,47	0,09
9	13,52	27,8	14,28	-3,56	11,7	12,64	31,13	18,4	0,65	0,64
10	10,9	27,77	16,87	-0,97	1,95	12,8	34,52	21,71	3,87	0,07
11	11,01	30,48	19,46	1,62	0,32	12,25	33,06	20,81	2,97	0,13
12	9,2	28,65	19,45	1,61	0,33	11,49	32,24	20,76	2,92	0,13
13	9,21	28,52	19,31	1,47	0,36	13,23	31,57	18,34	0,5	0,71
14	10,24	27,44	17,21	-0,63	1,55	12,26	32,51	20,25	2,41	0,19
15	9,93	24,81	14,87	-2,96	7,81	11,37	31,46	20,09	2,25	0,21
16	8,9	23,91	15,01	-2,83	7,12	10,94	32,67	21,73	3,89	0,07
17	9,95	24,42	14,46	-3,38	10,4	11,27	30,8	19,53	1,69	0,31
18	11,04	31,52	20,48	2,64	0,16	12,08	30,7	18,62	0,78	0,58
19	10,47	30,79	20,32	2,49	0,18	12,36	32,65	20,29	2,45	0,18
20	12,08	30,88	18,8	0,96	0,51	10,7	29,2	18,5	0,66	0,63
21	10,93	27,36	16,43	-1,41	2,65	11,09	29,62	18,53	0,69	0,62
22	10,68	29,53	18,85	1,01	0,5	10,78	28,37	17,59	-0,25	1,19
23	11,87	28,9	17,02	-0,81	1,76					
Média	10,41	27,99	17,58		2,65	11,54	31,45			0,34
DP	1,49	2,22			3,3	0,98	1,33			0,28

Fonte: tabela produzida pelo autor.

Tabela Suplementar 5. Conjunto de dados dos ensaios RT-qPCR para a quantificação relativa da transcrição da *panteteinase* CPIJ017593 em indivíduos adultos de *Culex quinquefasciatus* da colônia resistente (R) em comparação com a colônia suscetível (S). CT. Limiar de ciclo. ΔCt . Diferença entre o Ct do gene controle e do gene alvo. $\Delta\Delta Ct$. Diferença entre o ΔCt das amostras e da amostra de referência. Rq. Quantificação relativa. DP. Desvio padrão. REF. Amostra de referência. M. Machos. F. Fêmeas.

Suscetível						Resistente					
N	CT18S	CTPant	ΔCt	ΔΔCt	Rq		CT 18S	Ct Pant	ΔCt	ΔΔCt	Rq
REF- F	15,02	28,24	13,22	0	1,00		15,02	28,24	13,22	0	1,00
M	16,89	32,6	15,71	2,49	0,18	M	14,55	33,69	19,14	5,92	0,02
M	14,26	33,98	19,73	6,51	0,01	M	15,05	32,18	17,13	3,91	0,07
M	16,14	30,95	14,81	1,59	0,33	M	12,75	31,13	18,38	5,16	0,03

M	16,52	31,65	15,13	1,91	0,27	M	14,01	29,93	15,92	2,7	0,15
M	16,33	34,93	18,6	5,38	0,02	M	15,54	31,95	16,41	3,19	0,11
M	16,71	31,03	14,32	1,1	0,47	M	16,23	31,34	15,11	1,89	0,27
M	15,74	32,6	16,86	3,64	0,08	F	13,41	27,19	13,78	0,56	0,68
M	15,77	33,6	17,83	4,61	0,04	F	13,23	26,76	13,53	0,31	0,81
M	16,01	31,19	15,18	1,96	0,26	F	13,45	26,63	13,18	-0,04	1,03
F	13,57	25,82	12,25	-0,97	1,96	F	12,61	26,16	13,55	0,33	0,8
F	12,89	25,44	12,55	-0,67	1,6	F	13,86	27,81	13,95	0,73	0,6
F	12,97	31,87	18,9	5,68	0,02	F	14,51	27,31	12,8	-0,42	1,34
F	14,95	27,62	12,67	-0,55	1,47	F	13,97	26,62	12,65	-0,57	1,48
F	14,08	26,82	12,74	-0,48	1,4	F	15,17	28,65	13,48	0,26	0,84
F	14,58	27,78	13,2	-0,02	1,01	F	14,79	28,76	13,97	0,75	0,59
F	13,81	26,81	13	-0,22	1,16	F	13,9	28,03	14,13	0,91	0,53
F	14,78	28,19	13,41	0,19	0,88	F	14,08	29,1	15,02	1,8	0,29
F	14,87	28,7	13,84	0,61	0,65	F	12,76	26,85	14,09	0,87	0,55
F	15,21	28,53	13,32	0,1	0,93						
F	13,59	26,55	12,96	-0,26	1,2						
F	14,08	27,65	13,57	0,35	0,78						
F	13,97	27,9	13,93	0,71	0,61						
F	13,25	26,9	13,65	0,43	0,74						
Média	14,82	29,53	14,7		0,7	14,1	28,89	14,79		0,57	
DP	1,22	2,79			0,56	0,98	2,23			0,42	

Fonte: produzida pelo autor.

Tabela Suplementar 6. Conjunto de dados dos ensaios RT-qPCR para a quantificação relativa da transcrição da *panteteinase* CPIJ017593 em fêmeas individuais de *Culex quinquefasciatus* da colônia resistente (R) em comparação com a colônia suscetível (S). CT. Limiar de ciclo. ΔCt . Diferença entre o Ct do gene controle e do gene alvo. $\Delta\Delta Ct$. Diferença entre o ΔCt das amostras e da amostra de referência. Rq. Quantificação relativa. DP. Desvio padrão. REF. Amostra de referência.

Suscetível						Resistente				
N	CT18S	CTPant	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Rq	CT 18S	Ct Pant	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Rq
REF	15,02	28,24	13,22	0	1	15,02	28,24	13,22	0	1
1	13,57	25,82	12,25	-0,97	1,96	13,41	27,19	13,78	0,56	0,68
2	12,89	25,44	12,55	-0,67	1,6	13,23	26,76	13,53	0,31	0,81
3	12,97	31,87	18,9	5,68	0,02	13,45	26,63	13,18	-0,04	1,03
4	14,95	27,62	12,67	-0,55	1,47	12,61	26,16	13,55	0,33	0,8
5	14,08	26,82	12,74	-0,48	1,4	13,86	27,81	13,95	0,73	0,6

6	14,58	27,78	13,2	-0,02	1,01	14,51	27,31	12,8	-0,42	1,34
7	13,81	26,81	13	-0,22	1,16	13,97	26,62	12,65	-0,57	1,48
8	14,78	28,19	13,41	0,19	0,88	15,17	28,65	13,48	0,26	0,84
9	14,87	28,7	13,84	0,61	0,65	14,79	28,76	13,97	0,75	0,59
10	15,21	28,53	13,32	0,1	0,93	13,9	28,03	14,13	0,91	0,53
11	13,59	26,55	12,96	-0,26	1,2	14,08	29,1	15,02	1,8	0,29
12	14,08	27,65	13,57	0,35	0,78	12,76	26,85	14,09	0,87	0,55
13	13,97	27,9	13,93	0,71	0,61					
14	13,25	26,9	13,65	0,43	0,74					
Média	14,04	27,61	13,57		1,03	13,81	27,49	13,68		0,79
DP	0,72	1,5			0,47	0,74	0,93			0,33

Fonte: produzida pelo autor.

Tabela Suplementar 7. Conjunto de dados dos ensaios RT-qPCR para a quantificação relativa da transcrição da *panteteinase* CPIJ017593 em machos individuais de *Culex quinquefasciatus* da colônia resistente (R) em comparação com a colônia suscetível (S). CT. Limiar de ciclo. ΔCt . Diferença entre o Ct do gene controle e do gene alvo. $\Delta\Delta Ct$. Diferença entre o ΔCt das amostras e da amostra de referência. Rq. Quantificação relativa. DP. Desvio padrão. REF. Amostra de referência.

Suscetível						Resistente				
N	CT18S	CTPant	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Rq	CT 18S	Ct Pant	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Rq
REF	16,1	32,33	16,23	0	1	16,1	32,33	16,23	0	1
1	16,89	32,6	15,71	-0,52	1,43	14,55	33,69	19,14	2,91	0,13
2	14,26	33,98	19,73	3,5	0,09	15,05	32,18	17,13	0,9	0,54
3	16,14	30,95	14,81	-1,42	2,68	12,75	31,13	18,38	2,15	0,23
4	16,52	31,65	15,13	-1,1	2,14	14,01	29,93	15,92	-0,31	1,24
5	16,33	34,93	18,6	2,37	0,19	15,54	31,95	16,41	0,18	0,88
6	16,71	31,03	14,32	-1,91	3,75	16,23	31,34	15,11	-1,12	2,17
7	15,74	32,6	16,86	0,63	0,64					
8	15,77	33,6	17,83	1,6	0,33					
9	16,01	31,19	15,18	-1,05	2,07					
Média	16,04	32,51	16,46		1,48	14,69	31,7	17,02		0,87
DP	0,73	1,35			1,2	1,12	1,14			0,7

Fonte: produzida pelo autor.

Tabela Suplementar 8. Conjunto de dados dos ensaios RT-qPCR para a quantificação relativa da transcrição do *cqm1* CPIJ013173 em larvas individuais de *Culex quinquefasciatus* do quarto instar da colônia resistente (R) em comparação com a colônia suscetível (S). CT. Limiar de ciclo. Δ Ct. Diferença entre o Ct do gene controle e do gene alvo. $\Delta\Delta$ Ct. Diferença entre o Δ Ct das amostras e da amostra de referência. Rq. Quantificação relativa. DP. Desvio padrão. REF. Amostra de referência.

Suscetível						Resistente				
N	CT18S	CT Cqm1	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	Rq	CT 18S	CT Cqm1	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	Rq
REF	12,84	30,68	17,84	0	1,00	12,84	30,68	17,84	0	1,00
1	13,9	30,92	17,02	-0,82	1,77	13,48	32,11	18,63	0,79	0,58
2	13,57	30,67	17,1	-0,74	1,67	13,14	31,9	18,76	0,92	0,53
3	12,66	28,51	15,85	-1,99	3,97	13,86	33,4	19,54	1,7	0,31
4	13,76	31,65	17,89	0,05	0,97	14,66	33,63	18,97	1,13	0,46
5	14,21	32,06	17,85	0,01	0,99	14,33	33,85	19,52	1,68	0,31
6	13,8	30,45	16,65	-1,19	2,28	14,81	33,04	18,23	0,39	0,76
7	13,85	29,82	15,97	-1,87	3,65	14,09	32,31	18,22	0,38	0,77
8	13,87	33,42	19,55	1,71	0,31	12,37	34,46	22,09	4,25	0,05
9	13,57	31,32	17,75	-0,09	1,07	12,7	32,23	19,53	1,69	0,31
10	13,91	31,95	18,04	0,2	0,87	11,41	35,3	23,89	6,05	0,02
11	13,89	31,99	18,1	0,26	0,83					
12	14,87	31,33	16,46	-1,38	2,6					
13	12,03	32,1	20,07	2,23	0,21					
14	11,69	30,77	19,08	1,24	0,42					
Média	13,54	31,21	17,67		1,54	13,49	33,22	19,74		0,41
DP	0,82	1,14			1,15	1,03	1,06			0,25

Fonte: produzida pelo autor.

Tabela Suplementar 9. Conjunto de dados dos ensaios RT-qPCR para a quantificação relativa da transcrição do gene *cqm1* CPIJ13173 em adultos individuais de *Culex quinquefasciatus* da colônia resistente (R) em comparação com a colônia suscetível (S). CT. Limiar de ciclo. Δ Ct. Diferença entre o Ct do gene controle e do gene alvo. $\Delta\Delta$ Ct. Diferença entre o Δ Ct das amostras e da amostra de referência. Rq. Quantificação relativa. DP. Desvio padrão. REF. Amostra de referência. M. Machos. F. Fêmeas.

Suscetível						Resistente				
N	CT18S	CT Cqm1	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	Rq	CT 18S	CT Cqm1	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	Rq
REF - F	14,35	33,57	19,22	0	1,00	14,35	33,57	19,22	0	1,00
1 - F	13,59	34,68	21,09	1,87	0,27	F 13,75	34,34	20,59	1,37	0,39
2 - F	14,8	33,37	18,57	-0,65	1,57	F 14,06	36,45	22,39	3,17	0,11

3 - F	13,97	35,7	21,73	2,51	0,18	F	12,8	34,37	21,57	2,35	0,2
4 - F	13,25	32,63	19,38	0,16	0,9	F	13,2	35,6	22,41	3,19	0,11
5 - F	14,04	33,93	19,89	0,67	0,63	F	13,53	34,9	21,37	2,15	0,23
6 - F	14,02	35,76	21,74	2,52	0,17	F	12,41	34,83	22,42	3,2	0,11
7 - F	13,95	34,67	20,72	1,5	0,35	F	15,11	33,25	18,15	-1,08	2,11
8 - F	13,6	32,07	18,47	-0,75	1,68	F	14,74	33,9	19,17	-0,05	1,04
9 - F	14,38	33,61	19,23	0,01	0,99	M	16,26	35,14	18,88	-0,34	1,27
10 - F	13,12	34,41	21,29	2,07	0,24	M	14,69	35,89	21,2	1,98	0,25
11 - M	14,93	32,02	17,09	-2,13	4,38	M	15,38	35,44	20,06	0,84	0,56
12 - M	14,51	34,04	19,53	0,31	0,81	M	14,67	34,97	20,3	1,08	0,47
13 - M	15,74	32,46	16,72	-2,5	5,66	M	14,34	36,08	21,74	2,52	0,17
14 - M	15,64	33,34	17,7	-1,52	2,87	M	13,67	35,96	22,29	3,07	0,12
15 - M	15,48	33,8	18,32	-0,9	1,87	M	13,97	35,68	21,72	2,5	0,18
16 - M	15,65	33,01	17,36	-1,86	3,63	M	15,92	37,9	21,98	2,76	0,15
17 - M	13,83	34,89	21,06	1,84	0,28						
18 - M	14,08	34,59	20,51	1,29	0,41						
Média	14,37	33,83	19,47		1,49		14,28	35,29	21,01		0,47
DP	0,81	1,1			1,57		1,04	1,17			0,54

Fonte: produzida pelo autor.