

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Suzane Alves dos Santos

**Caracterização de genes dos Receptores Olfatórios (*ORs*) e Proteínas de Ligação a Odorantes (*OBPs*) relacionados à atratividade odorante em populações naturais de *Culex quinquefasciatus* do estado de Pernambuco**

Recife

2022

Suzane Alves dos Santos

**Caracterização de genes dos receptores olfatórios (*ORs*) e proteínas de ligação a odorantes (*OBPs*) relacionados à atratividade odorante em populações naturais de *Culex quinquefasciatus* do estado de Pernambuco**

Tese de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular básica e aplicada.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Coorientadores: Dra. Rosângela Maria Rodrigues Barbosa

Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo

Dr. Walter Soares Leal

Recife

2022

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos  
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

---

- S232a Santos, Suzane Alves dos.  
Caracterização de genes dos receptores olfatórios (*ORs*) e proteínas de ligação a odorantes (*OBPs*) relacionados à atratividade odorante em populações naturais de *Culex quinquefasciatus* do estado de Pernambuco / Suzane Alves dos Santos. — Recife: [s.n.], 2022.  
157 p.: il., graf., tab., mapas; 30 cm.
- Tese (doutorado) — Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.  
Orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres; coorientadores: Rosângela Maria Rodrigues Barbosa, Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo, Walter Soares Leal.  
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde.
1. Receptores odorantes. 2. *Culex* - fisiologia. 3. Proteínas de insetos - genética. 4. *Culex* - genética. 5. Percepção Olfatória. 6. Antenas de artrópodes. 7. Reação em Cadeia da Polimerase - métodos. 8. Proteínas de Insetos. 9. Variação Genética. I. Ayres, Constância Flávia Junqueira. II. Barbosa, Rosângela Maria Rodrigues. III. Romão, Tatiany Patrícia. IV. Leal, Walter Soares. V. Título.

---

CDU 595.771

Suzane Alves dos Santos

**Caracterização de genes dos receptores olfatórios (*ORs*) e proteínas de ligação a odorantes (*OBPs*) relacionados à atratividade odorante em populações naturais de *Culex quinquefasciatus* do estado de Pernambuco**

Tese de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular básica e aplicada.

Aprovada em: 29 de julho de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres (orientadora)  
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

---

Dra. Kamila Gaudêncio da Silva Sales (Membro externo)  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

---

Dra. Norma Machado da Silva (Membro externo)  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira (Membro interno)  
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr. Fábio Lopes de Melo (Membro interno)  
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

*Dedico esta Tese aos meus pais, Rosália Alves dos Santos e Waldir Alves dos Santos, os principais responsáveis pela minha existência nessa vida terrena, minha persistência em busca dos meus objetivos e minha resistência diante das dificuldades. Amo vocês!*

## RESUMO

SANTOS, Suzane Alves dos. Caracterização de genes dos receptores olfatórios (ORs) e proteínas de ligação a odorantes (OBPs) relacionados à atratividade odorante em populações naturais de *Culex quinquefasciatus* do estado de Pernambuco. 2022. Tese (Doutorado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

A percepção olfativa nos insetos é essencial para sua reprodução e sobrevivência em diferentes situações ambientais. Nestes organismos, os órgãos especializados na detecção de voláteis odorantes são as antenas. Aspectos comportamentais como a busca por parceiros para cópula e fontes de alimentação estão ligados à percepção olfativa. O objetivo deste estudo foi investigar em *Culex quinquefasciatus* genes que codificam para receptores olfatórios (ORs) e proteínas de ligação a odorantes (OBPs), visando sua caracterização funcional. Para isso, foram realizados os seguintes passos: 1) Avaliação do padrão de expressão por RT-PCR em diferentes tecidos (antenas, patas de fêmeas, corpo de fêmea sem cabeça e sem patas, corpo de macho inteiro e larva em estágio L4) e RT-qPCR em 3 estados fisiológicos de fêmeas de mosquito (pós-emergência, pós-cópula e pós-alimentação sanguínea); 2) Análise transcriptômica de antenas de fêmeas de *C. quinquefasciatus* via RNASeq comparando a colônia de laboratório (CqSLab) e população de campo após a cópula; 3) Caracterização da diversidade genética de genes ORs e OBPs, via sequenciamento de DNA, para avaliar possível efeito de seleção natural sobre estes genes; e 4) Identificação da fonte alimentar preferencial de fêmeas da espécie em cinco municípios do estado de Pernambuco. Os genes ORs e OBPs foram selecionados com base na literatura. Os resultados da RT-PCR mostraram que todos os 17 genes investigados são expressos em antenas de fêmeas, cinco destes foram exclusivos deste tecido (*CquiOR2*, *CquiOR64*, *CquiOR93*, *CquiOBP11* e *CquiOBP16*). Quanto a expressão diferencial por RT-qPCR, 6 genes (*CquiOBP2*, *CquiOBP5*, *CquiOBP10*, *CquiOBP11*, *CquiOR2* e *CquiOR93*) foram avaliados, juntamente ao gene *18S*. A expressão dos genes *CquiOBP5* e *CquiOBP10* foi significativamente diferente entre os estados pós-cópula e pós-alimentação sanguínea nas fêmeas de CqSLab ( $p < 0,05$ ). Nossos resultados sugerem especialização da função dos genes estudados e divergência no padrão de expressão de mosquitos de campo em comparação aos mosquitos de laboratório e, portanto, demonstra a necessidade de ter cautela na interpretação de dados de estudos apenas com colônias de laboratório. A análise do transcriptoma revelou um panorama de 680 genes com expressão diferencial (ED) em antenas de fêmeas pós-cópula entre campo e CqSLab, havendo vários genes envolvidos com a detecção olfativa, dentre eles *CquiOBP10*, que também se destacou na RT-qPCR como gene mais expresso em antenas de fêmeas de campo. Os dados de diversidade genética revelaram elevado número de haplótipos raros para todos os genes e populações. Os testes de AMOVA corroboraram isso e mostraram que a diversidade genética está concentrada em nível intrapopulacional. O padrão de evolução molecular foi diferente entre os genes estudados e o efeito da seleção natural sobre eles foi divergente. Quanto à caracterização da preferência alimentar da espécie, observou-se predominância de repasto sanguíneo em humanos (76,99%), demonstrando alta antropofilia destas populações. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram achados de grande relevância sobre os genes olfatórios estudados, e abre possibilidades para o desenvolvimento de novos estudos que permitam um melhor entendimento do papel da diversidade global, frequência e distribuição das variantes dos genes olfatórios, podendo impactar no desenvolvimento de novos repelentes ou atraentes de armadilhas de mosquitos.

**Palavras-chave:** percepção olfativa; receptores odorantes; antropofilia, evolução molecular.

## ABSTRACT

SANTOS, Suzane Alves dos. Characterization of olfactory receptor genes (ORs) and odorant binding proteins (OBPs) related to odor attractiveness in natural populations of *Culex quinquefasciatus* from the state of Pernambuco. 2022. Thesis (Academic Doctorate in Biosciences and Biotechnology in Health) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Olfactory perception in insects is essential for its reproduction and survival in different environmental situations. In these organisms, the organs specialized in the detection of odorant volatiles are the antennae. Behavioral aspects, such as the search for mating partners and for blood sources, are linked to olfactory perception. The aim of this study was to investigate in *C. quinquefasciatus* genes coding for olfactory receptors (ORs) and odorant binding proteins (OBPs), aiming at their functional characterization. For this, the following steps were performed: 1) Evaluation of the expression pattern by RT-PCR in different tissues (antennae, female legs, female body without head and legs, complete male body and larvae in L4) and RT-qPCR in 3 physiological states (post-emergence, post-mating and post-blood feeding); 2) Transcriptomic analysis of *C. quinquefasciatus* female antennae via RNASeq, comparing laboratory colony (CqSLab) and field population post-mating; 3) Characterization of the genetic diversity of ORs and OBPs genes, via DNA sequencing, to evaluate a possible effect of natural selection on these genes; and 4) Identification of the host preference of females of the species in five municipalities in the state of Pernambuco. ORs and OBPs genes were selected based on literature. The RT-PCR results showed that all 17 genes investigated were detected in female antennae, five were unique to this tissue (CquiOR2, CquiOR64, CquiOR93, CquiOBP11 and CquiOBP16). In the study of differential expression by RT-qPCR 6 genes (CquiOBP2, CquiOBP5, CquiOBP10, CquiOBP11, CquiOR2 and CquiOR93) were evaluated, using the 18S gene. The expression of CquiOBP5 and CquiOBP10 was significantly different between the post-mating and post blood-feeding samples of CqSLab females ( $p < 0.05$ ). Our results suggest specialization of the function of the genes studied and divergence in the expression pattern of field mosquitoes compared to CqSLab mosquitoes, and therefore, caution should be exercised in the interpretation of data from laboratory mosquito studies. The transcriptome revealed a panorama of 680 genes with differentiated expression (ED) in antennae of post-mating females between the field and the CqSLab, with several genes involved with olfactory detection, including CquiOBP10, which also stood out in RT-qPCR as the gene most expressed in antennae of field females. Genetic diversity data revealed a high number of rare haplotypes for all genes and populations. AMOVA tests corroborated this and showed that genetic diversity is concentrated at an intrapopulation level. The pattern of molecular evolution and the effect of natural selection was divergent on these genes. Regarding the characterization of the host preference, there was a predominance of blood meals in humans (76.99%), demonstrating a high anthropophily of these populations. Our results demonstrate relevant findings about olfactory genes studied, encouraging the development of other studies that can bring a better understanding of the role of global diversity, frequency and distribution of olfactory gene variants that can impact the development of new repellents or mosquito trap attractants.

**Keywords:** olfactory perception; odorant receptors; anthropophily and molecular evolution.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> –	Distribuição mundial da espécie <i>Culex quinquefasciatus</i>	22
<b>Figura 2</b> –	Ciclo de vida da espécie <i>Culex quinquefasciatus</i>	23
<b>Figura 3</b> –	Fêmea da espécie <i>C. quinquefasciatus</i> realizando oviposição	24
<b>Figura 4</b> –	Cérebro e inervação de órgãos olfatórios periféricos de fêmea da espécie <i>Anopheles gambiae</i> .	27
<b>Figura 5</b> –	Representação da localização dos <i>ORs</i> no sistema nervoso sensorial dos mosquitos	29
<b>Figura 6</b> –	Representação esquemática de típico <i>OR</i> de insetos	30
<b>Figura 7</b> –	Representação do reconhecimento de moléculas odorantes pelo sistema nervoso sensorial de mosquitos	31
<b>Figura 8</b> –	Estrutura tridimensional da proteína de ligação a feromônios ( <i>PBP</i> ) de <i>Bombyx mori</i> ( <i>PBPI</i> )	33
<b>Figura 9</b> –	Atlas Municipal da Prefeitura da cidade do Recife, desenvolvido pelo setor de Desenvolvimento Humano no Recife, destacando os bairros componentes da Microrregião 5.1	42
<b>Figura 10</b> –	Atlas Municipal da Prefeitura da cidade do Recife, desenvolvido pelo setor de Desenvolvimento Humano no Recife, destacando os bairros componentes da Microrregião 4.3	42
<b>Figura 11</b> –	Organização das gaiolas para obtenção das fêmeas para experimento de RT-qPCR	46



<b>Figura 12</b> –	Fotografia de lâmina contendo espermatecas de fêmeas inseminadas com espermatozoides de machos de <i>Culex quinquefasciatus</i>	48
<b>Figura 13</b> –	Alimentação artificial realizada nas gaiolas de criação	49
<b>Figura 14</b> –	Sequências dos <i>primers</i> do gene <i>CquiOBP11</i>	61
<b>Figura 15</b> –	Sequências dos <i>primers</i> do gene <i>CquiOBP16</i>	61
<b>Figura 16</b> –	Sequências dos <i>primers</i> do gene <i>CquiOR2</i>	62
<b>Figura 17</b> –	Sequências dos <i>primers</i> do gene <i>CquiOR64</i>	62
<b>Figura 18</b> –	Sequências dos <i>primers</i> do gene <i>CquiOR93</i>	63
<b>Figura 19</b> –	Sequências dos <i>primers</i> do gene <i>CquiOR136</i>	63
<b>Figura 20</b> –	Amplificação dos <i>primers ORs</i> e <i>OBPs</i> alvos para avaliação funcional por PCR convencional	70
<b>Figura 21</b> –	Amplificação de transcritos dos genes <i>ORs</i> e <i>OBPs</i> entre os perfis amostrais por RT-PCR	72
<b>Figura 22</b> –	Expressão diferencial dos genes de estudo em antenas de fêmeas de <i>C. quinquefasciatus</i> em diferentes estados fisiológicos	74
<b>Figura 23</b> –	Gráficos gerados a partir de ensaios de RT-qPCR apresentando expressão diferencial para todos os genes estudados, resultado significativo ( $p < 0,05$ ) para <i>CquiOBP5</i> e <i>CquiOBP10</i>	76
<b>Figura 24</b> –	Qualidade das reads após trimagem, obtida através do FastQC, das amostras de antenas de fêmeas de <i>C. quinquefasciatus</i> da população de campo	78

<b>Figura 25</b> –	Qualidade das <i>reads</i> após trimagem, obtida através do FastQC, das amostras de antenas de fêmeas de <i>C. quinquefasciatus</i> da população CqSLab.	79
<b>Figura 26</b> –	Análise de componentes principais (PCA) das réplicas biológicas de amostras de Campo e CqSLab	81
<b>Figura 27</b> –	Normalização das bibliotecas de cDNA das populações CqSLab e Campo de <i>C. quinquefasciatus</i>	82
<b>Figura 28</b> –	<i>Heatmap</i> do perfil de expressão gênica das populações CqSLab e Campo de <i>C. quinquefasciatus</i>	83
<b>Figura 29</b> –	Representação gráfica em MA plot da distribuição dos genes expressos na população de Campo de <i>C. quinquefasciatus</i>	84
<b>Figura 30</b> –	Rede de interação proteína - proteína de genes superexpressos na população de campo de <i>C. quinquefasciatus</i>	91
<b>Figura 31</b> –	Rede de interação proteína - proteína de genes subexpressos na população de campo de <i>C. quinquefasciatus</i>	93
<b>Figura 32</b> –	Sequência de DNA do gene <i>CquiOBP11</i> (CPIJ006551) exibindo em rosa os polimorfismos observados na região codificadora nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletadas em Pernambuco	95
<b>Figura 33</b> –	Sequência de DNA do gene <i>CquiOBP16</i> (CPIJ012715) exibindo em rosa os polimorfismos observados na região codificadora nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletadas em Pernambuco	96

<b>Figura 34</b> – Sequência de DNA do gene <i>CquiOR2</i> (CPIJ002479) exibindo em rosa os polimorfismos observados na região codificadora nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletadas em Pernambuco	97
<b>Figura 35</b> – Sequência de DNA do gene <i>CquiOR64</i> (CPIJ006216) exibindo em rosa os polimorfismos observados na região codificadora nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletadas em Pernambuco	98
<b>Figura 36</b> – Sequência de DNA do gene <i>CquiOR93</i> (CPIJ039866) exibindo em rosa os polimorfismos observados na região codificadora nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletadas em Pernambuco	99
<b>Figura 37</b> – Sequência de DNA do gene <i>CquiOR136</i> (CPIJ016426) exibindo em rosa os polimorfismos observados na região codificadora nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletadas em Pernambuco	100
<b>Figura 38</b> – Alinhamento entre sequências de <i>Culex quinquefasciatus</i> do gene <i>CquiOBP11</i>	102
<b>Figura 39</b> – Alinhamento entre sequências de <i>Culex quinquefasciatus</i> do gene <i>CquiOBP16</i>	103
<b>Figura 40</b> – Alinhamento entre sequências de <i>Culex quinquefasciatus</i> do gene <i>CquiOR2</i> (parte 1)	104
<b>Figura 40</b> – Alinhamento entre sequências de <i>Culex quinquefasciatus</i> do gene <i>CquiOR2</i> (parte 2)	105
<b>Figura 41</b> – Alinhamento entre sequências de <i>Culex quinquefasciatus</i> do gene <i>CquiOR64</i> (parte 1)	106
<b>Figura 41</b> – Alinhamento entre sequências de <i>Culex quinquefasciatus</i> do gene <i>CquiOR64</i> (parte 2)	107

<b>Figura 42</b> –	Alinhamento entre sequências de <i>Culex quinquefasciatus</i> do gene <i>CquiOR93</i> (parte 1)	108
<b>Figura 42</b> –	Alinhamento entre sequências de <i>Culex quinquefasciatus</i> do gene <i>CquiOR93</i> (parte 2)	109
<b>Figura 43</b> –	Alinhamento entre sequências de <i>Culex quinquefasciatus</i> do gene <i>CquiOR136</i> (parte 1)	110
<b>Figura 43</b> –	Alinhamento entre sequências de <i>Culex quinquefasciatus</i> do gene <i>CquiOR136</i> (parte 2)	111
<b>Figura 44</b> –	Redes de haplótipos para o gene <i>CquiOBP11</i> 2010/2018	122
<b>Figura 45</b> –	Redes de haplótipos para o gene <i>CquiOBP16</i> 2010/2018	123
<b>Figura 46</b> –	Redes de haplótipos para o gene <i>CquiOR2</i> 2010/2018	124
<b>Figura 47</b> –	Redes de haplótipos para o gene <i>CquiOR64</i> 2010/2018	125
<b>Figura 48</b> –	Redes de haplótipos para o gene <i>CquiOR93</i> 2010/2018	126
<b>Figura 49</b> –	Redes de haplótipos para o gene <i>CquiOR136</i> 2010/2018	127
<b>Figura 50</b> –	Porcentagem de espécies identificadas como fonte alimentar sanguínea em fêmeas de <i>C. quinquefasciatus</i> , coletadas em cinco municípios do estado de Pernambuco	130

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	– Genes de receptores olfatórios ( <i>ORs</i> ) e proteínas de ligação a odorantes ( <i>OBPs</i> ) candidatos e código de acesso do Vectorbase para obtenção da sequência gênica para desenho de <i>primers</i>	44
<b>Quadro 2</b>	– Sequências dos <i>primers</i> desenhados a partir dos genes <i>ORs</i> e <i>OBPs</i> , tamanho dos genes, <i>amplicons</i> gerados pela amplificação e temperatura de anelamento dos <i>primers</i>	45
<b>Quadro 3</b>	– Sequências dos <i>primers</i> para estudo do polimorfismo, desenhados a partir dos genes <i>ORs</i> e <i>OBPs</i> .	64
<b>Quadro 4</b>	– Genes alvos do estudo e percentagem de identidade com as sequências do banco de dados do NCBI, através de Blastn	71
<b>Quadro 5</b>	– Genes alvo do estudo após validação por RT-qPCR, concentração ideal de <i>primer</i> , de RNA e eficiência dos <i>primers</i>	73
<b>Quadro 6</b>	– Sumário de informações sobre as sequências dos genes olfatórios. O tamanho das sequências está apresentado em pares de bases (pb)	94
<b>Quadro 7</b>	– Sumário da diversidade genética global dos genes odorantes (2010 e 2018)	116
<b>Quadro 8</b>	– <i>Fst</i> entre populações para o gene <i>CquiOBP11</i>	118
<b>Quadro 9</b>	– <i>Fst</i> entre populações para o gene <i>CquiOBP16</i>	119
<b>Quadro 10</b>	– <i>Fst</i> entre populações para o gene <i>CquiOR2</i>	119
<b>Quadro 11</b>	– <i>Fst</i> entre populações para o gene <i>CquiOR64</i>	119
<b>Quadro 12</b>	– <i>Fst</i> entre populações para o gene <i>CquiOR93</i>	120
<b>Quadro 13</b>	– <i>Fst</i> entre populações para o gene <i>CquiOR136</i>	120
<b>Quadro 14</b>	– Análise da variância molecular (AMOVA) entre as populações avaliadas de <i>Culex quinquefasciatus</i> do estado de Pernambuco nos anos de 2010 e 2018	121

<b>Quadro 15</b> – Registro de animais presentes nas residências visitadas para a coleta de mosquitos	128
<b>Quadro 16</b> – Quantitativo de fêmeas avaliadas por área de coleta e espécies identificadas como fonte de alimentação sanguínea.	129

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Mapeamento das bibliotecas de Campo e CqSLab	77
<b>Tabela 2</b> – Genes selecionados entre os superexpressos como os mais induzidos na população de campo de fêmeas de <i>C. quinquefasciatus</i> pós-cópula	85
<b>Tabela 3</b> – Genes selecionados entre os subexpressos como os mais reprimidos na população de campo de fêmeas de <i>C. quinquefasciatus</i> pós-cópula	89
<b>Tabela 4</b> – Índices de diversidade genética observados em populações de <i>C. quinquefasciatus</i> do estado de Pernambuco	114
<b>Tabela 5</b> – Testes de neutralidade nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> do estado de Pernambuco	117

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	19
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	22
2.1 <i>Culex quinquefasciatus</i>	22
2.2 IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO MOSQUITO <i>Culex quinquefasciatus</i>	24
2.3 SISTEMA NERVOSO SENSORIAL DOS MOSQUITOS, A OLFAÇÃO	26
2.4 <i>ORs</i> : RECEPTORES OLFATÓRIOS	28
2.5 <i>OBPs</i> : PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A ODORANTES	32
2.6 <i>Culex quinquefasciatus</i> E HEMATOFAGIA	34
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	37
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b>	38
<b>5 HIPÓTESE</b>	39
<b>6 OBJETIVOS</b>	40
6.1 GERAL	40
6.2 ESPECÍFICOS	40
<b>7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b>	41
7.1 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES <i>ORs</i> E <i>OBPs</i> SELECIONADOS EM ANTENAS DE FÊMEAS DE <i>Culex quinquefasciatus</i> ENTRE DIFERENTES ESTADOS FISIOLÓGICOS	41
7.2 ÁREAS DE ESTUDO	41
7.3 MOSQUITOS UTILIZADOS NO ESTUDO	43
7.4 ORGANIZAÇÃO DOS MOSQUITOS PARA RT-PCR	43
7.5 ENSAIO QUALITATIVO DE EXPRESSÃO DE GENES <i>ORs</i> E <i>OBPs</i> POR RT-PCR	44
7.6 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS EM TRÊS ESTADOS FISIOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DOS GENES <i>ORs</i> E <i>OBPs</i> QUANTO A EXPRESSÃO DIFERENCIAL ATRAVÉS DE RT-qPCR	46



7.7 ESCOLHA DOS GENES CANDIDATOS DE <i>ORs</i> E <i>OBPs</i> E DESENHO DOS <i>PRIMERS</i>	49
7.8 EXTRAÇÃO DE DNA PARA PCRS CONVENCIONAIS DE TESTE DE EFICIÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i>	50
7.9 PCR CONVENCIONAL E SEQUENCIAMENTO CAPILAR DOS GENES DE <i>ORs</i> E <i>OBPs</i>	50
7.10 ENSAIOS DE RT-PCR	50
7.11 OTIMIZAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> POR RT-qPCR	51
7.12 EXPRESSÃO DIFERENCIAL ENTRE ESTADOS FISIOLÓGICOS POR RT-qPCR	52
<b>8 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE ANTENAS DE FÊMEAS DE <i>Culex quinquefasciatus</i> APÓS A CÓPULA</b>	54
8.1 AMOSTRAS DE MOSQUITOS	54
8.2 PREPARO DAS AMOSTRAS DE RNA	54
8.3 PRODUÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE cDNA	55
8.4 ANÁLISE DOS DADOS	56
8.4.1 Avaliação da qualidade das <i>reads</i>	56
8.4.2 Trimagem das <i>reads</i>	56
8.4.3 Mapeamento das <i>reads</i> contra o genoma de referência	57
8.4.4 Contagem das <i>reads</i>	57
8.4.5 Análise da expressão diferencial	57
<b>9 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE FÊMEAS DE <i>Culex quinquefasciatus</i> PROVENIENTES DE POPULAÇÕES DE CAMPO</b>	59
9.1 POPULAÇÕES DE MOSQUITOS UTILIZADAS PARA INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA	59
9.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR ESPÉCIE-ESPECÍFICA DAS FÊMEAS DE CAMPO	60

9.3 DESENHO DOS <i>PRIMERS</i> PARA ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES QUIMIOSSENSORIAIS SELECIONADOS	60
9.4 PCRS CONVENCIONAIS ESPECÍFICAS	64
9.5 ANÁLISE DOS DADOS	65
<b>9.5.1 Diversidade genética</b>	65
<b>9.5.2 Testes de neutralidade</b>	66
<b>9.5.3 Diferenciação genética</b>	66
<b>9.5.4 Rede de haplótipos</b>	66
<b>10 IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL PREFERENCIAL DE FONTE ALIMENTAR SANGUÍNEA DE FÊMEAS DA ESPÉCIE <i>C. quinquefasciatus</i> COLETADAS EM CINCO MUNICÍPIOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO</b>	67
10.1 FÊMEAS DE <i>C. quinquefasciatus</i> UTILIZADAS NO ESTUDO DA PREFERÊNCIA ALIMENTAR	67
10.2 EXTRAÇÃO DE DNA	68
10.3 PCR DO GENE <i>cytb</i>	68
10.4 ANÁLISE DOS DADOS	69
<b>11 RESULTADOS</b>	70
11.1 RESULTADOS DA PCR CONVENCIONAL E SEQUENCIAMENTO CAPILAR DOS GENES DE <i>ORs</i> E <i>OBP<sub>s</sub></i>	70
11.2 RESULTADOS DOS ENSAIOS DE RT-PCR	71
11.3 RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> DOS GENES ALVO POR RT-qPCR EM QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA	72
11.4 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES ALVO EM DIFERENTES ESTADOS FISIOLÓGICOS POR RT-qPCR	73
11.5 RESULTADO DAS ANÁLISES TRANSCRIPTÔMICAS DE ANTENAS DE FÊMEAS DE <i>C. quinquefasciatus</i> CqSLab E CAMPO, APÓS A CÓPULA, POR RNAseq	77
11.6 RESULTADO DOS ALINHAMENTOS E CONTAGEM DE <i>reads</i>	80

11.7 RESULTADO DA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL	80
11.8 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	84
11.9 ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL GÊNICO POR ONTOLOGIA DO GENE	89
11.10 REDES DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA	90
<b>12 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS GENES QUIMIOSSENSORIAIS</b>	<b>94</b>
12.1 DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA	118
12.2 REDES DE HAPLÓTIPOS	121
<b>13 RESULTADOS DO LEVANTAMENTO DE ANIMAIS PRESENTES NAS CASAS SELECIONADAS PARA COLETA DE MOSQUITOS</b>	<b>128</b>
13.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA PREFERÊNCIA ALIMENTAR SANGUÍNEA DE FÊMEAS DE <i>C. quinquefasciatus</i> COLETADAS EM CINCO MUNICÍPIOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO	128
<b>14 DISCUSSÃO</b>	<b>131</b>
<b>15 CONCLUSÕES</b>	<b>141</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>142</b>
<b>ANEXO A – QUESTIONÁRIOS DE AVALIAÇÃO DAS RESIDÊNCIAS</b>	<b>151</b>
<b>ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>153</b>
<b>ANEXO C – CARTA À SECRETARIA ACADÊMICA SOBRE ANUÊNCIA CEP</b>	<b>154</b>
<b>ANEXO D – CARTA DE ANUÊNCIA CEP</b>	<b>155</b>
<b>APÊNDICE A – PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE ESPERMATECA</b>	<b>156</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A olfação é um dos sentidos mais importantes para a sobrevivência e reprodução de diferentes espécies. Para os insetos, de maneira geral, a percepção das situações no ambiente ao seu redor, bem como a sua reação para estes eventos, depende deste sentido (WICHER; MIAZZI, 2021). Aspectos comportamentais como a busca por abrigo, alimento, cópula e comunicação em grupo, sejam intraespecíficos ou interespecíficos, estão ligados à percepção olfatória nos insetos (CARRAHER et al., 2015; DONG et al., 2021; FAN et al., 2011; GU et al., 2022; MITRA et al., 2021). O sistema olfatório tem como principais funções a detecção e a identificação de um vasto número de moléculas voláteis sinalizadoras (ácidos, álcoois, ésteres e aromáticos), através da ativação de numerosos componentes envolvidos na transdução de sinal e processamento neuronal (DONG et al., 2021; WICHER; MIAZZI, 2021).

Os órgãos que estão diretamente ligados à percepção olfatória nos insetos são as antenas, é nelas que se inicia o reconhecimento de voláteis odorantes (MITRA et al., 2021). As antenas dos insetos são agrupadas em dez tipos morfológicos básicos e apesar das diferenças estruturais, apresentam papel comum. A evolução adaptativa resultou em variações morfológicas deste órgão, atreladas à especialização funcional (FAN et al., 2011; SIM; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2012). É possível afirmar que as antenas são os órgãos olfatórios mais importantes para os mosquitos, pois abrigam em seu interior a maior parte dos neurônios olfatórios desses organismos (YE; LIU; LIU, 2016).

Os receptores olfatórios (*ORs*) e as proteínas de ligação a odorantes (*OBP*s) são proteínas consideradas essenciais para a sensibilidade olfativa (FAN et al., 2011). Os receptores olfatórios (*ORs*) são canais iônicos ativados por ligantes, proteínas com alta sensibilidade capazes de discriminar diversos tipos de voláteis odorantes. Esses receptores são caracterizados como proteínas integrais de membrana encontradas na membrana dos dendritos dos neurônios receptores olfatórios (*ORNs*), abrigados no interior das sensilas, presentes na superfície das antenas (CARRAHER et al., 2015; WICHER; MIAZZI, 2021). As proteínas de ligação a odorantes (*OBP*s) são classificadas como proteínas secretadas altamente abundantes na linfa das sensilas das antenas dos insetos e nos palpos maxilares, apresentam tamanho reduzido, são solúveis em água e especializadas em carrear moléculas odorantes hidrofóbicas através da linfa aquosa sensilar até os neurônios sensoriais olfatórios (*ORNs*), contribuindo para a percepção olfativa específica nos insetos (DONG et al., 2021; FAN et al., 2011; SIM; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2012; TIAN et al., 2021).

A espécie *Culex quinquefasciatus* Say, 1983 (Diptera: Culicidae) é classificada como endofílica e antropofílica, porém as fêmeas podem realizar seu repasto sanguíneo tanto no intra quanto no peridomicílio (BHATTACHARYA; BASU; SAJAL BHATTACHARYA, 2016). McBride et al., 2014 afirmam que espécies de mosquito domiciliadas, como *C. quinquefasciatus*, tendem a realizar seu repasto sanguíneo em humanos, característica que favorece a transmissão de diferentes patógenos. Por sua grande importância como espécie vetora de patógenos causadores de doenças ao homem, como a filariose bancroftiana, encefalites (St. Louis e Equina), entre outras, *C. quinquefasciatus* é uma espécie amplamente utilizada em pesquisas genéticas (BHATTACHARYA; BASU; SAJAL BHATTACHARYA, 2016; GU et al., 2022).

A espécie possui três cromossomos metacêntricos: cromossomo 1 considerado o menor de todos, seguido pelo cromossomo 2 de tamanho intermediário e o cromossomo 3, o maior do grupo. Estudos sobre o sequenciamento do genoma completo da espécie demonstraram que o número de genes que codificam proteínas em *C. quinquefasciatus* é superior aos descritos para as espécies *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. Além disso, *C. quinquefasciatus* apresenta o maior repertório de receptores olfatórios entre os dípteros (BHATTACHARYA; BASU; SAJAL BHATTACHARYA, 2016).

A atratividade dos insetos se dá através da ativação dos receptores olfatórios (ORS), mediante a presença de moléculas odorantes. Os mosquitos podem ser atraídos por voláteis odorantes emitidos por hospedeiros, como por exemplo o Sulcatone (6-methyl-5hepten-2-one), presente no odor emitido por humanos (FAN et al., 2011; MCBRIDE et al., 2014). Estudo de McBride et al., 2014 mostrou que o odorante sulcatone estimula fortemente o receptor olfatório *OR4*, sugerindo que o aumento na expressão deste receptor pode auxiliar os mosquitos a distinguir entre hospedeiros humanos e não-humanos. Neste mesmo estudo, a espécie *A. gambiae* (Diptera: Culicidae), vetor da malária, teve pelo menos 4 genes ORs fortemente ativados pelo sulcatone.

A escolha da fonte alimentar em algumas espécies de insetos está associada a variações dos genes quimiossensoriais em nível de sequência de DNA, por inserções de pares de bases na sequência do gene, ou variações em nível de expressão de mRNA (SHIAO et al., 2015). O comportamento de busca pelo hospedeiro, característico de mosquitos hematófagos, está diretamente ligado a expressão gênica olfativa e, conseqüentemente, a composição do repertório de genes olfatórios (GU et al., 2022).

Reduzir o contato dos mosquitos vetores de patógenos com a população humana é a única forma de prevenir algumas doenças que tem seus agentes etiológicos transmitidos por estes organismos. Entre os esforços para reduzir este contato está a ampla utilização de diferentes compostos químicos repelentes. A utilização dos repelentes é um hábito que se tornou bastante comum após epidemia do vírus Zika, além de ser recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) como forma de prevenir o contato com mosquitos.

Os repelentes comercializados são formulados à base de compostos químicos como DEET (N, N-dimetil-meta-toluamida) e IR3535 (Etilbutilacetilaminopropionato), e o uso excessivo destes produtos pela população humana pode levar à seleção de variantes genéticas que possuam como característica a capacidade de alcançar hospedeiros humanos, apesar da presença da barreira repelente. Estes químicos que repelem mosquitos, bem como outros insetos, atuam principalmente no sistema olfativo destes organismos. O uso excessivo e continuado de repelentes pode desencadear alterações de percepção em receptores olfatórios dedicados a aversão em populações destes organismos por exemplo, através da redução dos níveis de transcritos e conseqüentemente, gerar mudanças comportamentais nos mesmos ao longo do tempo, como a capacidade de realizar hematofagia mesmo na presença de repelentes (CLARK; RAY, 2016; XU et al., 2014).

Aprofundar o conhecimento sobre a diversidade genética de genes olfatórios é de grande importância, pois estudos nesta área são reduzidos. Trazer esse conhecimento para as populações do estado de Pernambuco, onde *C. quinquefasciatus* apresenta elevada densidade populacional, onde há a circulação de múltiplos arbovírus e o uso de repelentes se tornou um hábito entre as pessoas, pode mostrar um foco para o futuro desenvolvimento de estratégias de controle, como armadilhas mais direcionadas, e combate, como repelentes baseados em descobertas genéticas.

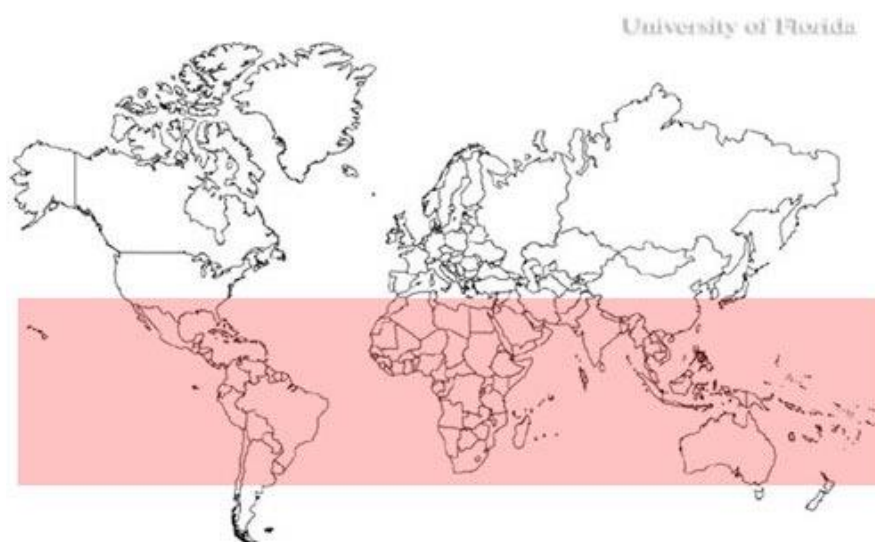
Ao responder questões como: qual a fonte alimentar preferencial da espécie *C. quinquefasciatus* em regiões do estado de Pernambuco, qual o padrão de expressão dos genes quimiossensoriais associados a atratividade odorante, e se há presença ou ausência de regiões polimórficas no DNA que codifica para estes genes, poderemos enriquecer a literatura e assim, estimular o desenvolvimento de novos estudos em torno do combate aos vetores afim de implementar ações que busquem a redução da transmissão de doenças de impacto na saúde pública, além de contribuir para estudos eco epidemiológicos, uma vez que é possível avaliar o risco de transmissão de patógenos diante da confirmação da antropofilia da espécie estudada

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Culex quinquefasciatus*

*Culex quinquefasciatus* Say, 1983 (Diptera: Culicidae) faz parte do complexo *Culex pipiens* Linnaeus, juntamente com outras espécies de mesmo gênero. Esta é uma espécie trópico-cosmopolita, amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do globo (Figura 1), considerada uma espécie bem estabelecida no Brasil onde pode ser encontrada na maioria das cidades, principalmente em áreas urbanizadas, onde se beneficia das alterações antrópicas no ambiente (WILKE et al., 2014; WILKE; DE CARVALHO; MARRELLI, 2017; YADOULÉTON et al., 2015).

Figura 1 – Distribuição mundial da espécie *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Hill e Connelly, 2009.

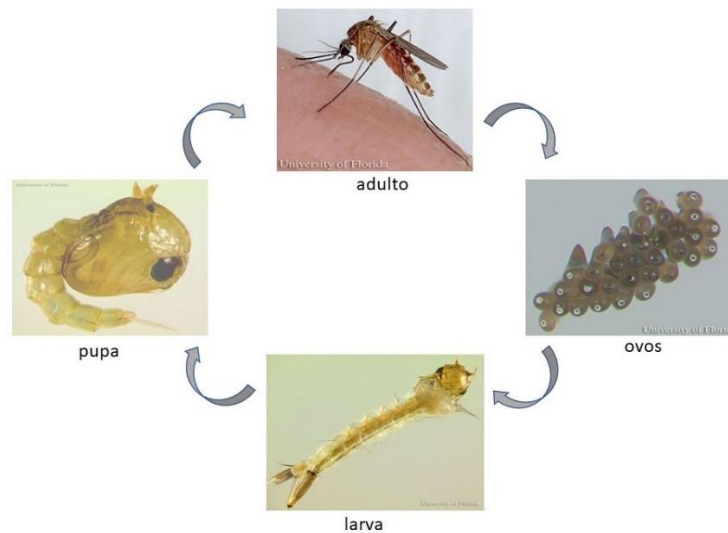
Esta espécie de mosquito é conhecida pela população humana por estar bem adaptada ao ambiente desordenadamente urbanizado, que apresenta precárias condições sanitárias e favorece sua proliferação. Por sua forte associação aos habitats humanos, em muitos países a espécie é vulgarmente conhecida como “*southern house mosquito*”.

A fase imatura de *C. quinquefasciatus* se desenvolve em criadouros artificiais produzidos pela atividade humana, como recipientes descartados contendo água rica em material orgânico em decomposição. Também é possível encontrar representantes da espécie

em locais como águas poluídas e estagnadas: caixas de passagem, esgotos, valas. Os mosquitos são responsáveis por incômodo e perturbação, principalmente do sono de pessoas que moram em regiões com temperaturas mais elevadas, pois realizam alimentação sanguínea essencialmente no período noturno, quando as fêmeas ficam mais vorazes e insistentes no ato da picada, que causa prurido e irritação local (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; GUO et al., 2016).

O ciclo de vida de *C. quinquefasciatus* é composto por 4 fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 2).

**Figura 2** – Ciclo de vida da espécie *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Hill e Connelly, 2009.

Os ovos são depositados pelas fêmeas de forma agrupada em formações chamadas de “jangadas” contendo até 250 ovos, diretamente sobre a água dos criadouros (Figura 3).



Figura 3 – Fêmea da espécie *C. quinquefasciatus* realizando oviposição.



Fonte: Hill e Connelly, 2009.

Diferente dos ovos da espécie *Aedes aegypti*, os ovos de *Culex sp.* não permanecem viáveis longe do contato com a água. Após um curto período pós-postura as larvas eclodem e se desenvolvem neste ambiente aquático do criadouro, onde se alimentam e crescem. A fase larval é composta por quatro estádios: L1, L2, L3 e L4. Após esta, vem a fase de pupa, onde esses organismos já não se alimentam mais e estão em processo de preparação para a emergência do inseto adulto. Esta fase dura cerca de 48h e após isso inicia-se o processo de emergência do mosquito adulto alado, última fase do desenvolvimento (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Predadores naturais são escassos em criadouros com águas ricas em matéria orgânica, por este motivo os indivíduos de *C. quinquefasciatus* se desenvolvem bem nestes ambientes, o que favorece o desenvolvimento crescente das populações de mosquito (WILKE et al., 2014).

Devido às características fisiológicas e comportamentais que permitem o desenvolvimento e transmissão de diferentes patógenos, esta espécie é vetor de agentes causadores de doenças, potencial que lhe confere grande importância médica e epidemiológica.

## 2.2 IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO MOSQUITO *Culex quinquefasciatus*

A espécie *C. quinquefasciatus* possui grande importância médica e epidemiológica, devido ao seu potencial para transmitir diferentes patógenos, como vírus e parasitas. É uma espécie doméstica, considerando quantidades significativas de espécimes observados no interior das habitações humanas em regiões tropicais e subtropicais, e oportunista quanto a

alimentação sanguínea, se alimentando em diferentes organismos presentes no habitat urbano como cães, aves e preferencialmente seres humanos. (EPELBOIN et al., 2017; FARAJOLLAHI et al., 2011; MOLAEI et al., 2007).

Bom exemplo deste comportamento oportunista é a preferência alimentar de *C. quinquefasciatus* em duas diferentes localidades: no sudeste da Ásia a espécie em questão se alimenta predominantemente em humanos, e é o principal vetor da filariose linfática na região; já no Havái as fêmeas se alimentam predominantemente em aves, sendo considerada como vetor mais eficiente de malária aviária na região (FARAJOLLAHI et al., 2011). Essa adaptabilidade alimentar da espécie facilita a circulação de patógenos entre animais e homem, ocasionando epidemias de zoonoses, doenças causadas por patógenos que possuem ciclos de amplificação envolvendo outras espécies além do humano, como primatas não-humanos, pequenos mamíferos e pássaros, como reservatórios. (FARAJOLLAHI et al., 2011; GREENBERG et al., 2013).

Ao redor do mundo entre as regiões tropical e subtropical, a espécie *C. quinquefasciatus* é responsável pela transmissão de vírus como *West Nile Virus* (WNV) na América do Norte, *St. Louis Encephalitis Virus* (SLEV) amplamente distribuído no continente americano desde o Canadá até a Argentina, entre outros. É vetor também do parasita filarial *Wuchereria bancrofti*, causador da filariose linfática no Brasil e em outras regiões endêmicas das Américas como Haiti, República Dominicana e Guiana (DA SILVA JUNIOR et al., 2017; DIAZ et al., 2013; FARAJOLLAHI et al., 2011; GREENBERG et al., 2013).

No contexto epidemiológico do território brasileiro, *C. quinquefasciatus* é considerado o único vetor responsável pela transmissão do parasita causador da filariose linfática, que incapacita pessoas acometidas pela doença. No país existe foco ativo de transmissão da filariose em Recife e região metropolitana, onde muitas pessoas ainda são infectadas, apesar de todo o esforço da vigilância epidemiológica para diagnosticar e tratar a população das áreas de risco (DA SILVA JUNIOR et al., 2017; RAMESH et al., 2018).

Diante do impacto causado na população humana pelas doenças ocasionadas por patógenos transmitidos por esta espécie de mosquito, é importante compreender sua ecologia, biologia e fisiologia, a fim de utilizá-las a favor do estabelecimento de estratégias para vigilância e controle desse mosquito. A fisiologia do sistema olfatório dos mosquitos precisa

ser mais bem compreendida, visto que é a partir deste sentido que ocorre a aproximação entre mosquitos e hospedeiros.

### 2.3 SISTEMA NERVOSO SENSORIAL DOS MOSQUITOS, A OLFAÇÃO

O sistema nervoso sensorial dos mosquitos é o responsável pela identificação dos estímulos odorantes, o cérebro tem como principais funções receber os estímulos, computá-los e comandar as ações comportamentais do organismo. Em mosquitos hematófagos, por exemplo, é o sistema nervoso que comanda a identificação de hospedeiros potenciais para realização da alimentação sanguínea. Entre os insetos, o sistema nervoso olfatório é considerado altamente conservado (WANG et al., 2010; WOLFF; RIFFELL, 2018).

A composição estrutural do sistema olfatório dos insetos tem como principais partes: o lobo antenal (*AL – Antennal Lobe*), neurônios sensoriais olfatórios (*OSNs – Olfactory Sensory Neurons*), glomérulos e projeções neuronais (*PNs – Projection Neurons*). O lobo antenal atua como um sistema de retransmissão dos sinais olfativos: recebe o estímulo dos *OSNs* e envia esta informação para os centros cerebrais através de projeções neuronais. No interior do lobo antenal são encontrados os glomérulos, peças importantes na decodificação da informação olfativa. Os glomérulos trabalham em conjunto, formando uma rede interconectada por neurônios locais (*LN<sub>s</sub> – Local Neurons*) que compõem uma espécie de “mapa espacial de odores”, onde são traduzidos e interpretados os estímulos para posterior envio às áreas cerebrais superiores (WHEELWRIGHT; WHITTLE; RIABININA, 2021). A espécie *A. gambiae*, pertencente à família *Culicidae* assim como *C. quinquefasciatus*, apresenta antenas inervadas por neurônios receptores olfatórios e esses neurônios são projetados das antenas para o Lobo antenal (Figura 4) (RIABININA et al., 2016).

**Figura 4** – Cérebro e inervação de órgãos olfatórios periféricos de fêmea da espécie *Anopheles gambiae*.



Fonte: Modificado de (WHEELWRIGHT; WHITTLE; RIABININA, 2021)

Legenda: Imagem mostrando o cérebro e órgãos olfatórios periféricos de fêmea de *A. gambiae*, marcados com GFP (*Green Fluorescent Protein*). A seta branca evidencia a inervação das antenas (destacadas em verde), contendo axônios de OSNs que se conectam a glomérulos no lobo antenal (AL), responsáveis pela decodificação de odorantes. Na imagem também podem ser vistos os palpos maxilares e aparelho bucal, com inervações mostradas em verde, se conectando a outras partes do cérebro do mosquito.

O sistema nervoso sensorial dos mosquitos está intimamente ligado a receptores geneticamente determinados para captar informações do ambiente, permitindo que detectem moléculas odorantes emitidas por organismos hospedeiros específicos (MCBRIDE et al., 2014). Pesquisas apontam que dentro de uma espécie de hospedeiro potencial existe variação nos tipos e níveis de odorantes emitidos, e tal fato poderia explicar por que algumas pessoas atraem mais mosquitos que outras. Isso porque cada um dos receptores presentes no sistema nervoso sensorial dos mosquitos está “programado” para identificar apenas um determinado grupo de odorantes (WOLFF; RIFFELL, 2018). Ao longo do processo evolutivo, os mosquitos desenvolveram seu complexo sistema sensorial, capaz de detectar e responder tanto a compostos orgânicos voláteis (VOCs – *Volatile Organic Compounds*) como também,

ocasionalmente, à compostos inorgânicos, como dióxido de carbono, amônia, entre outros (HILL; IGNELL, 2021).

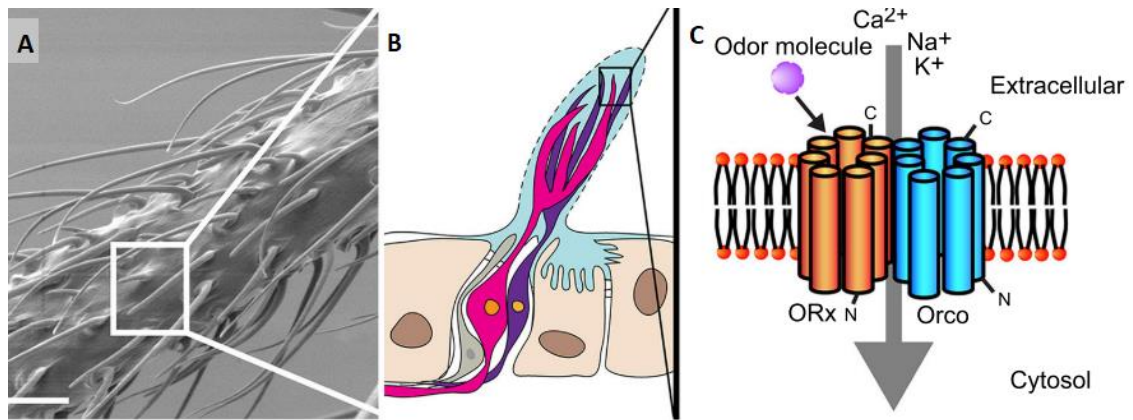
O comportamento de busca pelo hospedeiro é ativado mesmo a longas distâncias (55 - 70 m), através da detecção da presença no ambiente do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), geralmente exalado durante a respiração ou mesmo através da pele do hospedeiro. À medida que a fêmea hematófaga se aproxima, VOCs (compostos orgânicos voláteis) são emitidos a partir do corpo do hospedeiro, e juntamente ao CO<sub>2</sub> informam ao sistema sensorial do mosquito que aquela é uma potencial fonte de alimentação sanguínea (MARTINEZ et al., 2021).

As principais famílias de proteínas envolvidas na identificação de moléculas odorantes são: proteínas de ligação a odorantes (*OBPs – Odorant Binding Proteins*), receptores de odorantes (*ORs – Odorant Receptors*), receptores gustatórios (*GRs – Gustatory Receptors*) e receptores ionotrópicos (*IRs – Ionotropic Receptors*) (LEAL, 2013; PELOSI et al., 2018).

Aprofundaremos o estudo de dois grupos de proteínas: *OBPs* e *ORs*, diretamente ligadas a identificação de moléculas odorantes em mosquitos. As *OBPs* são responsáveis pelo recebimento e transporte das moléculas odorantes vindas do ambiente e as *ORs* são responsáveis pelo recebimento destas moléculas e transdução deste sinal para o sistema nervoso central do inseto.

#### 2.4 ORS: RECEPTORES OLFATÓRIOS

Assim como ocorre em outros insetos, os mosquitos apresentam como parte de seu sistema nervoso sensorial os receptores olfatórios (*ORs*), proteínas integrais de membrana localizadas nos dendritos dos neurônios receptores olfatórios (*ORNs*) presentes no interior das sensilas (estruturas similares aos pelos) localizadas na superfície das antenas, como também de outros órgãos sensoriais periféricos (Figura 5 A-C) (CARRAHER et al., 2015; WOLFF; RIFFELL, 2018). Os *ORs* são complexos heteroméricos (*ORx + ORco*) formados por uma subunidade variável obrigatoriamente unida a uma subunidade conservada, dando origem a um canal iônico ativado por ligante (Figura 5 C) (KYTHREOTI et al., 2021).

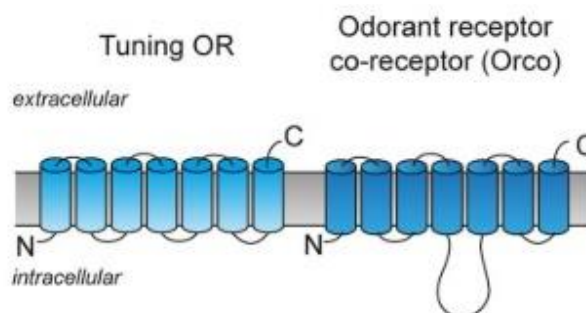
Figura 5 – Representação da localização dos *ORs* no sistema nervoso sensorial dos mosquitos.

Fonte: Modificado de (WOLFF; RIFFELL, 2018).

Legenda: A) Micrografia eletrônica de varredura (~10 $\mu$ m) mostrando a superfície de uma antena de mosquito coberta por sensilas; B) Desenho esquemático representando a estrutura interna de uma sensila. É possível ver os poros na cutícula (representados pela linha pontilhada) por onde penetram as moléculas odorantes. No interior da sensila: em azul está representada a linfa aquosa sensilar que preenche toda a cavidade ao redor dos dendritos, e são vistos dois *ORNs* (representados pelas cores rosa e roxo), tendo os dendritos evidenciados; C) Esquema da organização de um receptor olfatório hipotético, onde é possível ver as subunidades *ORx* (variável) e *Orco* (conservada) formando o canal iônico ativado por ligante.

Este complexo heteromérico pode ser específico em reconhecer apenas um tipo de molécula odorante ou ser ajustado de forma ampla, podendo ligar-se a diferentes tipos de molécula. As moléculas odorantes se ligam ao complexo heteromérico na subunidade variável *ORx* através de um sítio de ligação que confere sensibilidade química, ativando o canal e iniciando a troca iônica entre o meio extracelular e o citosol. A abertura do poro iônico através do *ORN* provoca a despolarização do neurônio para propagação de um potencial de ação, decodificado pelo cérebro do inseto, informando a decisão de resposta comportamental (BRITO; MOREIRA; MELO, 2016; CAREY et al., 2010; CARRAHER et al., 2015; DEL MÁRMOL; YEDLIN; RUTA, 2021; KYTHREOTI et al., 2021).

Estruturalmente, os *ORs* dos insetos são proteínas que apresentam uma topologia de sete domínios transmembrana, tendo sua porção N terminal voltada para o meio intracelular e a porção C terminal voltada para o ambiente extracelular (Figura 6) (BENTON et al., 2006; LUNDIN et al., 2007).

Figura 6 – Representação esquemática de típico *OR* de insetos.

Fonte: Modificado de (WICHER; MIAZZI, 2021).

Legenda: A proteína *OR* típica de insetos está representada neste esquema, mostrando as duas subunidades componentes do complexo (*ORx* + *ORco*). *ORs* são proteínas de 7 domínios transmembrana, com porção C terminal para o meio extracelular e porção N terminal voltada para o meio intracelular.

Estudos mostram que considerando estrutura e função os *ORs* e *GRs* estão relacionados, e juntos constituem uma linhagem expandida dentro da superfamília dos receptores gustatórios. Enquanto os *GRs* podem ser encontrados em diferentes espécies de artrópodes, os *ORs* são observados exclusivamente em insetos (WICHER; MIAZZI, 2021). De acordo com (GETAHUN et al., 2012), *ORNs* que expressam *ORs*, comparados àqueles que expressam *IRs*, são mais sensíveis à estímulos odorantes pulsados, ou seja, que apresentam baixo fluxo molecular, mostrando que os *ORs* são melhores na identificação de estímulos odorantes, mesmo aqueles que são interrompidos (pulsados).

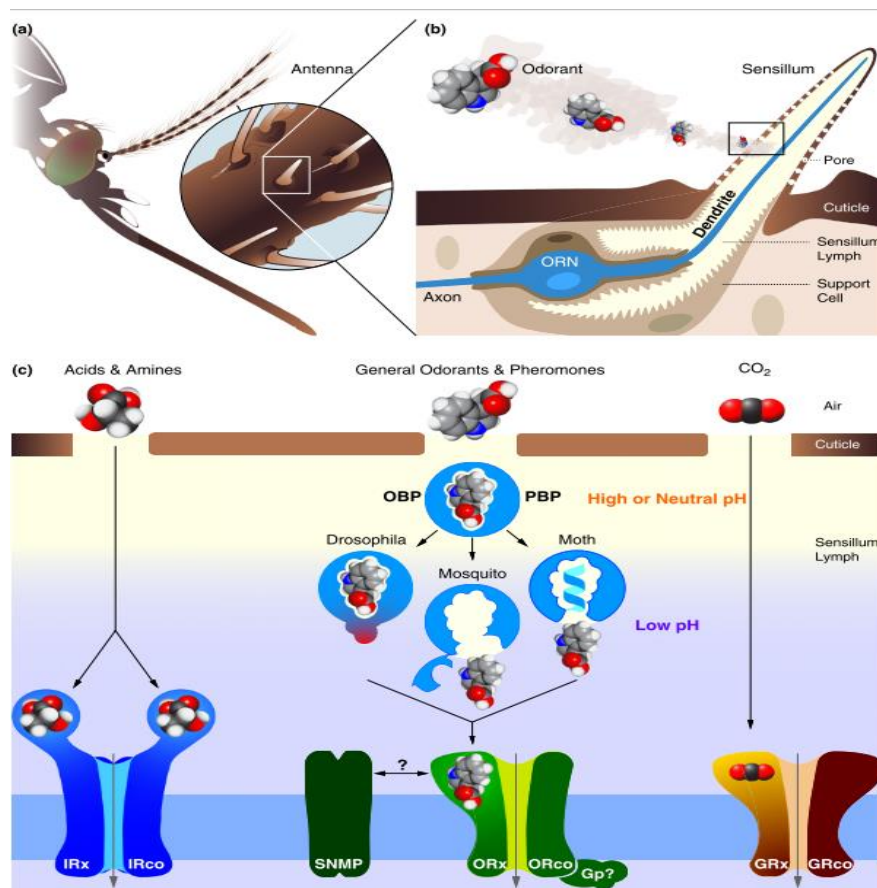
Os *ORs* são o acesso molecular para o sistema nervoso sensorial dos insetos e suas consequentes respostas comportamentais, essenciais para a sobrevivência e reprodução destes organismos. Porém os *ORs* não atuam sozinhos, estão conectados a uma cadeia cooperativa composta por redes de proteínas, organelas e interações celulares que influenciam como um odor será percebido (KYTHREOTI et al., 2021; WICHER; MIAZZI, 2021).

Estudos sobre olfação conduzidos em laboratório com a espécie *A. aegypti* demonstraram que *ORs* de fêmeas desta espécie de mosquito são ativados por diferentes compostos como ácido láctico, dióxido de carbono e uma gama de ácidos carboxílicos, responsáveis por atrair as fêmeas para o contato com o hospedeiro. Estas observações reafirmam a importância destas proteínas receptoras de moléculas odorantes, sem sua atividade não haveria detecção refinada de tais moléculas (MITRA et al., 2021).



O caminho feito pelas moléculas de odor desde o ambiente até o meio intracelular, consiste das seguintes etapas: os odorantes penetram nas sensilas através de poros presentes na superfície da cutícula, chegam ao lúmen e encontram ambiente preenchido por linfa aquosa sensilar em toda cavidade ao redor dos dendritos (Figura 5 B). Neste ambiente, as moléculas odorantes, geralmente com a característica hidrofóbica, são carregadas pelas *OBP*s até a membrana dos dendritos dos neurônios receptores olfatórios (*ORN*s), onde se localizam os *OR*s (Figura 7 A-C), proteínas especializadas em transporte de odorantes (LEAL, 2013; WANG et al., 2010).

Figura 7– Representação do reconhecimento de moléculas odorantes pelo sistema nervoso sensorial de mosquitos.



Fonte: (SUH; BOHBOT; ZWIEBEL, 2014)

Legenda: a) cabeça de uma fêmea de mosquito, evidenciando antena e sensilas; b) Imagem descrevendo o encontro de moléculas odorantes com a sensila, atravessando os poros e chegando ao lúmen. São vistos no desenho também *ORN*, a prolongação do dendrito por toda a extensão da sensila, a linfa sensilar e a célula de suporte; c) Esquema do reconhecimento de diferentes moléculas provenientes do ambiente por diferentes tipos de receptores: *IRx*, *SNMP*, *ORx* e *GRx*. Observa-se no centro da imagem o recebimento de uma molécula odorante pela *OBP*, transporte através da linfa aquosa sensilar, e entrega ao complexo *ORx + ORco*, através do qual a molécula passará ao encontro do sistema nervoso sensorial central.



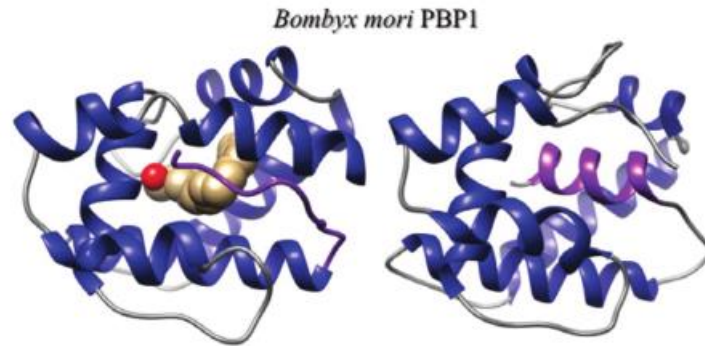
## 2.5 OBPs: PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A ODORANTES

As proteínas de ligação a odorantes (*OBPs*) de insetos são pequenas proteínas solúveis em água e de baixo peso molecular (<30 kDa), geralmente consistindo em cadeias de 130-150 aminoácidos, com uma profundidade de cavidade aproximada de 2,3 nm (PORTILLA-PULIDO et al., 2020). Estas pequenas proteínas apresentam excelente estabilidade a variações de temperatura, contra a proteólise e agentes desnaturantes. São as *OBPs* as responsáveis por mediar o primeiro contato do sistema olfatório dos mosquitos com o ambiente externo, as moléculas odorantes que ultrapassam os poros presentes na cutícula das sensilas, ao chegarem na linfa sensilar são recebidas pelas *OBPs*, que vão garantir que tais moléculas hidrofóbicas cheguem até os *ORs* íntegras para dar prosseguimento ao reconhecimento olfatório (BRITO; MOREIRA; MELO, 2016; CAREY; CARLSON, 2011; DE et al., 2018; DONG et al., 2021; PELOSI et al., 2018; SUH; BOHBOT; ZWIEBEL, 2014).

Essas proteínas globulares apresentam grande diversidade dentro da mesma família, incluindo também proteínas especializadas no transporte de feromônios (*PBPs* - proteínas de ligação a feromônios) até os receptores específicos, além de acreditar-se que são capazes de se ligar a uma grande variedade de moléculas odorantes (CAREY; CARLSON, 2011; DE et al., 2018; FAN et al., 2011; PELOSI et al., 2018).

Estes polipeptídios são formados principalmente por domínios  $\alpha$ -helicoidais, que definem uma cavidade de ligação hidrofóbica composta por arginina 23 (Arg23), tirosina 54 (Tyr54) e isoleucina 125 (Ile125). Esses resíduos interagem com as moléculas odorantes hidrofóbicas e facilitam seu transporte pelas *OBPs* através da linfa (PORTILLA-PULIDO et al., 2020). Quanto à organização estrutural, as proteínas pertencentes à família das *OBPs* podem ser classificadas em relação ao número de cisteínas como *C-minus OBPs* (menor número de cisteínas) ou *C-plus OBPs* (maior número de cisteínas). Dentro desta família existem também as *OBPs* atípicas, classificadas assim por possuírem domínios adicionais. A primeira *OBP* caracterizada estruturalmente foi a *PBP1* (*pheromone-binding protein 1*) da espécie *Bombyx mori*, popularmente conhecida como bicho-da-seda (Figura 8). As *OBPs* podem sofrer alterações conformacionais devido a ligação de moléculas ligantes ou alterações no pH do meio aquoso da linfa sensilar (PELOSI et al., 2018).

**Figura 8** – Estrutura tridimensional da proteína de ligação a feromônios (*PBP*) de *Bombyx mori* (*PBP1*).



Fonte: (PELOSI et al., 2018)

Legenda: Exemplo representativo de proteínas de ligação a ligantes envolvida na comunicação química de insetos.

No interior das sensilas, as *OBPs* são sintetizadas por células acessórias especializadas, secretadas na linfa aquosa sensilar, e neste ambiente são encontradas em altas concentrações. Muitos papéis têm sido sugeridos para as *OBPs*, entre todos os mais apontados e estudados são a função de proteger moléculas odorantes hidrofóbicas contra a ação das *ODEs* (enzimas responsáveis pela degradação de odorantes) e o transporte dos odorantes através da linfa das sensilas ao encontro dos *ORs* (BRITO; MOREIRA; MELO, 2016). Outras importantes funções atribuídas a essas proteínas são: ação anti-inflamatória de proteínas relacionadas a *OBPs* de insetos por dois domínios, estando presente na saliva de insetos hematófagos; associação à resistência a inseticidas, e participação na formação da casca de ovos de insetos (PELOSI et al., 2018; SHEN et al., 2022).

De acordo com alguns autores as *OBPs* são os agentes mais importantes do sistema olfatório dos insetos, pois estas proteínas desempenham papel essencial na percepção e transmissão de moléculas odorantes aos locais de reconhecimento, estão envolvidas na transdução de sinal, além de participarem de uma gama de respostas comportamentais, como a busca pelas fêmeas de mosquito por locais adequados para a oviposição (GHAVAMI; KHOEINI; DJADID, 2020; SHEN et al., 2022).

Muito se discute sobre o modo de ação das *OBPs*, porém duas hipóteses são mais conhecidas: evidências mostram que as *OBPs* carregam os odorantes de forma passiva até o encontro dos *ORs* e as moléculas odorantes de forma independente se ligam aos receptores. No

entanto, também existe a observação de *OBPs* agindo de forma mais ativa, quando a formação de um complexo específico *OBP*-odorante é importante para a ativação do receptor (BRITO; MOREIRA; MELO, 2016; LEAL, 2013).

Na espécie *C. quinquefasciatus* a primeira proteína olfatória identificada foi uma *OBP*, a *CquiOBP1* responsável pelo transporte de feromônio ligado à oviposição, além de também realizar transporte de outros odorantes (CAREY; CARLSON, 2011; SUH; BOHBOT; ZWIEBEL, 2014).

Diante da ampla variedade de proteínas dentro da família das *OBPs* e suas discutidas funções, torna-se de grande importância a investigação aprofundada sobre os genes que codificam estas proteínas e sua relação com a percepção olfativa em mosquitos da espécie *C. quinquefasciatus*.

## 2.6 *Culex quinquefasciatus* E HEMATOFAGIA

*Culex quinquefasciatus* Say, 1983 (Diptera: Culicidae) apresenta distribuição geográfica trópico-cosmopolita, indivíduos da espécie são encontrados em grandes quantidades nas regiões tropicais e subtropicais do globo. A espécie é considerada bem estabelecida no Brasil por ser observada na maioria das cidades, principalmente em áreas urbanizadas onde se beneficia das alterações antrópicas no ambiente, preferindo localidades com condições precárias de saneamento básico (REZENDE et al., 2019; WILKE et al., 2014; WILKE; DE CARVALHO; MARRELLI, 2017; YADOULÉTON et al., 2015).

Os mosquitos desta espécie apresentam duas características marcantes, endofilia e antropofilia. A endofilia corresponde ao hábito de fêmeas e machos de *C. quinquefasciatus* se abrigarem no interior das habitações humanas, principalmente nos dormitórios, antes e após a alimentação sanguínea. Já a antropofilia está relacionada ao hábito alimentar da espécie, que realiza hematofagia preferencialmente em humanos (AZMI; DAS; CHATTERJEE, 2015; BHATTACHARYA; BASU; SAJAL BHATTACHARYA, 2016; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; GUO et al., 2016).

A antropofilia de uma população de mosquitos é medida com base na proporção de picadas em humanos. De acordo com o índice de sangue humano (do inglês *Human Blood Index* – HBI), definido como a proporção de mosquitos alimentados que apresentam reação positiva para sangue humano, se em uma dada população avaliada o número de mosquitos identificados

alimentados exclusivamente com sangue humano for maior em proporção que as demais fontes sanguíneas, aquela população é considerada antropofílica (DIXIT et al., 2001).

Estudos relatam variação no hábito alimentar da espécie *C. quinquefasciatus* quanto a escolha do hospedeiro, sendo por este motivo classificada como oportunista, pois as fêmeas podem se alimentar em diferentes organismos presentes no habitat urbano: cães, aves, coelhos, roedores. Ainda assim, em países como o Brasil a espécie é classificada como antropofílica, realizando hematofagia preferencialmente em humanos (EPELBOIN et al., 2017; FARAJOLLAHI et al., 2011; MOLAEI et al., 2007). No sudeste da Ásia a espécie também se alimenta predominantemente em humanos e é o principal vetor da filariose linfática na região. Já no Havaí, as fêmeas se alimentam predominantemente em aves, sendo por lá o vetor mais eficiente de malária aviária (FARAJOLLAHI et al., 2011; MANIMEGALAI; SUKANYA, 2014). No Quênia, pesquisadores coletaram fêmeas de *C. quinquefasciatus* alimentadas com sangue humano no interior das habitações, reforçando as características supracitadas para a espécie, endofilia e antropofilia (MUTURI et al., 2008). Tal adaptabilidade alimentar da espécie facilita a circulação de patógenos entre animais e homem, ocasionando epidemias de zoonoses (FARAJOLLAHI et al., 2011; GREENBERG et al., 2013).

O potencial vetorial da espécie varia com a localidade, entre as regiões tropical e subtropical. *C. quinquefasciatus* é responsável pela transmissão de vírus como West Nile Virus (WNV) na América do Norte, e St. Louis Encephalitis Vírus (SLEV). No Brasil é o único vetor do parasita filarial *Wuchereria bancrofti*, causador da filariose linfática tanto no país, como em outras regiões endêmicas das Américas: Haiti, República Dominicana e Guiana (BHATTACHARYA; BASU; SAJAL BHATTACHARYA, 2016; BRANDA et al., 2021; DA SILVA JUNIOR et al., 2017; DIAZ et al., 2013; FARAJOLLAHI et al., 2011; GREENBERG et al., 2013).

A antropofilia da espécie *C. quinquefasciatus* tem sido motivo de debates e polêmicas, que giram em torno desta importante característica relacionada a disseminação de patógenos, como vírus Zika. Kenney et al., 2017 sugerem em seu estudo que a espécie não possui antropofilia. Segundo os autores, o índice de alimentação sanguínea em humanos comumente demonstra que o sangue humano representa apenas 2% de toda a ingestão de sangue em mosquitos do gênero *Culex* na América do Norte. Por este motivo, segundo os mesmos autores, fêmeas da espécie não podem ter potencial papel vetorial na disseminação do vírus Zika.

Em contrapartida Guedes et al., 2017 isolaram o vírus Zika e sequenciaram parcialmente seu genoma, a partir de fêmeas de *C. quinquefasciatus* coletadas em campo no intradomicílio de residências habitadas por pessoas que apresentaram sintomas clínicos da infecção viral. Os autores, inocularam células VERO com amostras de dois *pools* de fêmeas positivas para a infecção com os menores *Cts* (*cycle threshold*) observados em experimento de PCR em tempo real e então isolaram o vírus destas amostras, o que removeu qualquer dúvida sobre o fato de que as fêmeas da espécie estavam carregando partículas virais ativas no município de Recife, Pernambuco, Brasil.

Estes achados, que confirmam a antropofilia e potencial vetorial da espécie, geraram repercussão e publicação de carta ao editor por Roundy et al., 2017, questionando o grupo brasileiro e afirmando que não havia evidências suficientes no estudo para comprovar o potencial da espécie *C. quinquefasciatus* como vetora do vírus Zika. Segundo os autores, outros trabalhos observaram refratariedade da espécie para a infecção oral em condições laboratoriais, levantando a necessidade de mais estudos que reproduzissem tais resultados.

Como resposta foi publicada carta ao editor (AYRES et al., 2017), afirmando que os resultados observados em Recife são fidedignos, pois foi avaliado grande número de indivíduos (1.496 espécimes), o maior número de amostras entre os estudos publicados desde a emergência da epidemia de Zika.

Apesar de toda a discussão em torno da espécie, no Brasil *C. quinquefasciatus* é uma espécie comprovadamente endofílica e antropofílica, incriminada na disseminação de diversos patógenos.

Diante do impacto causado na população humana pela transmissão de patógenos por esta espécie de mosquito, levando milhares de pessoas ao adoecimento e até mesmo a óbito, todos os anos, é de grande importância aprofundar os conhecimentos sobre a fisiologia da espécie *C. quinquefasciatus*, inclusive sobre seu sistema olfatório, sistema este que auxilia os mosquitos no encontro de seus hospedeiros para o repasto sanguíneo. Entender melhor a composição e funcionamento deste sistema na identificação dos hospedeiros humanos permitirá embasar as metodologias de combate já existentes para vetores e estimular o desenvolvimento de novas, fortalecendo as estratégias de vigilância e controle desse mosquito.

### 3 JUSTIFICATIVA

A espécie *Culex quinquefasciatus* é amplamente distribuída no estado de Pernambuco, assim como por todo o território brasileiro, estando envolvida na transmissão da filariose bancroftiana e mais recentemente, incriminada como vetora do vírus Zika. Assim como outros insetos, os indivíduos da espécie *C. quinquefasciatus* apresentam um sistema olfativo bem desenvolvido, que inclui receptores olfatórios (ORS) e proteínas de ligação a odorantes (OBPs) presentes nos seus principais órgãos sensoriais, as antenas. Apesar da grande importância médica de *C. quinquefasciatus*, o conhecimento sobre a diversidade genética nos genes que codificam para estas moléculas ainda é escasso. O presente estudo revelará o padrão de evolução destas moléculas através da avaliação dos genes a nível de sequência, identificará a preferência alimentar das fêmeas da espécie em locais pré-definidos no estado de Pernambuco, além de demonstrar o panorama de transcrição gênico do tecido antenal das fêmeas de *C. quinquefasciatus* no estado fisiológico pós-cópula. Os resultados obtidos neste trabalho ampliarão o conhecimento sobre aspectos biológicos básicos deste mosquito e poderão contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens de controle vetorial para *C. quinquefasciatus*.

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

Qual o perfil de transcrição e evolução molecular dos genes que codificam para os receptores olfatórios (*ORs*) e proteínas de ligação a odorantes (*OBPs*) na espécie *Culex quinquefasciatus*?

## **5 HIPÓTESE**

Genes quimiossensoriais *ORs* e *OBPs*, possuem especialização e expressão diferencial entre diferentes estados fisiológicos, e evoluem de forma não neutra entre as populações estudadas ao longo do tempo.



## 6 OBJETIVOS

### 6.1 GERAL

Caracterizar molecularmente genes de proteínas de ligação a odorantes (*OBPs*) e de receptores olfatórios (*ORs*) envolvidos com a atratividade odorante da espécie *Culex quinquefasciatus*.

### 6.2 ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar o perfil de expressão de genes quimiossensoriais *ORs* e *OBPs* selecionados em antenas de fêmeas de *C. quinquefasciatus* entre diferentes estados fisiológicos;
- b) Avaliar a expressão diferencial de *ORs* e *OBPs* ligados à atratividade odorante entre populações naturais de *C. quinquefasciatus* e a colônia de referência (CqSLab);
- c) Avaliar a diversidade genética e o padrão de evolução molecular nos genes que codificam para os *ORs* e *OBPs* selecionados em diferentes populações naturais;
- d) Investigar o perfil preferencial de fontes alimentares em populações naturais de *C. quinquefasciatus* provenientes de regiões pré-definidas do estado Pernambuco;

## 7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

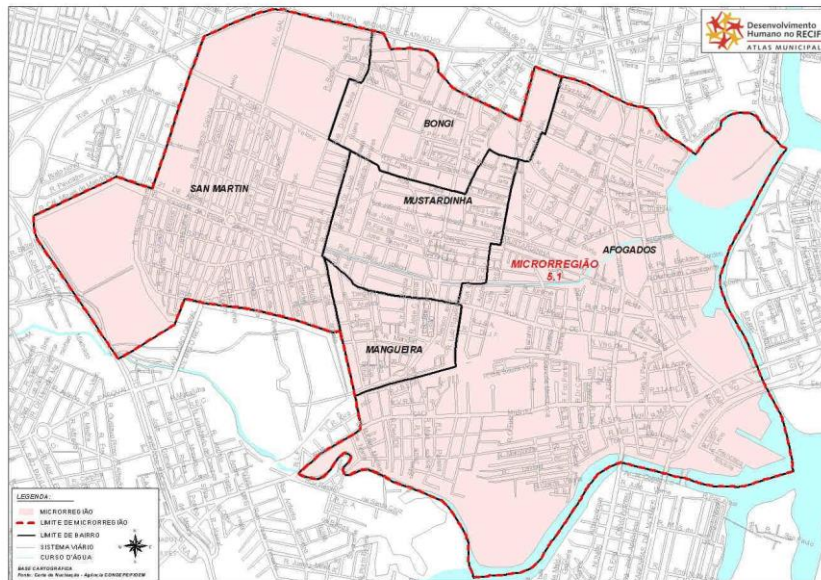
### 7.1 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES *ORS* E *OBPs* SELECIONADOS EM ANTENAS DE FÊMEAS DE *Culex quinquefasciatus* ENTRE DIFERENTES ESTADOS FISIOLÓGICOS

Esta seção traz a investigação do perfil de expressão de genes *ORs* e *OBPs*, pré-selecionados com base na literatura, através de ensaios de RT-qPCR em quantificação relativa utilizando o tecido específico de antenas de fêmeas da espécie *C. quinquefasciatus*. Para obtenção das antenas foram utilizadas fêmeas da colônia de referência (CqSLab) e fêmeas coletadas em campo, provenientes de diferentes localidades do estado de Pernambuco. A comparação entre indivíduos de campo e de laboratório teve como principal finalidade realizar a avaliação da expressão dos genes *ORs* e *OBPs* em populações com *backgrounds* genéticos distintos, permitindo a identificação de similaridades e diferenças no padrão de expressão destes genes olfatórios em três estados fisiológicos testados: pós-emergência, pós-cópula e pós-alimentação sanguínea.

### 7.2 ÁREA DE ESTUDO

Para execução deste tópico do estudo foram utilizados mosquitos de colônia de campo presente no insetário do departamento de entomologia (IAM), mantida temporariamente para o desenvolvimento de experimentos. A colônia de campo foi montada a partir de ovos coletados em dois bairros do município de Recife (S 8°03'36.6", W 34°53'21.1"): Mustardinha, pertencente a microrregião 5.1 (Figura 9) e Cidade Universitária, pertencente a microrregião 4.3 (Figura 10). As duas áreas de coleta apresentam características favoráveis ao desenvolvimento e proliferação dos mosquitos da espécie *C. quinquefasciatus*, a exemplo, possuem saneamento básico crítico.

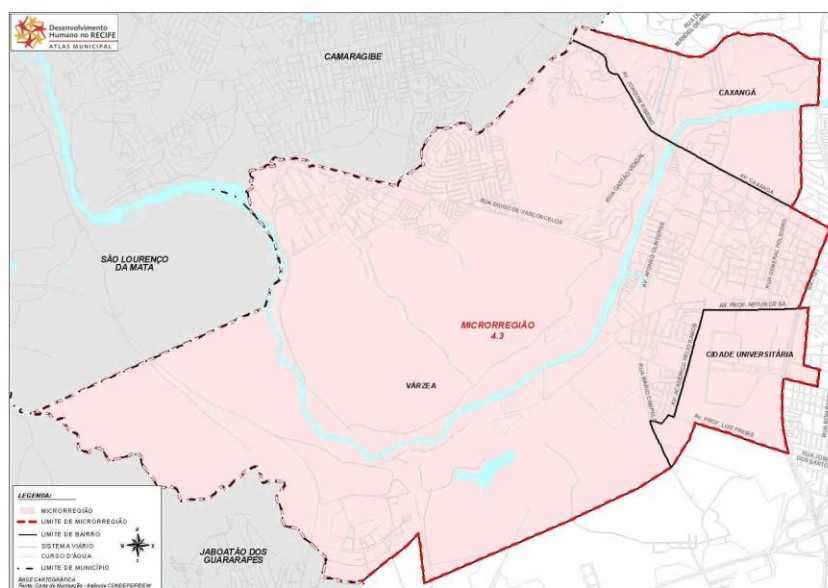
Figura 9 - Atlas Municipal da Prefeitura da cidade do Recife, desenvolvido pelo setor de Desenvolvimento Humano no Recife, destacando os bairros componentes da Microrregião 5.1.



Fonte: Prefeitura da cidade do Recife

Legenda: Atlas Municipal da Microrregião 5.1, onde está localizado o bairro da Mustardinha (centro do mapa).

Figura 10 - Atlas Municipal da Prefeitura da cidade do Recife, desenvolvido pelo setor de Desenvolvimento Humano no Recife, destacando os bairros componentes da Microrregião 4.3.



Fonte: Prefeitura da cidade do Recife

Legenda: Atlas Municipal da Microrregião 4.3, onde está localizado o bairro da Cidade Universitária (canto direito do mapa).

### 7.3 MOSQUITOS UTILIZADOS NO ESTUDO

As amostras de *C. quinquefasciatus* utilizadas na execução deste estudo foram obtidas de duas colônias: colônia de referência de *C. quinquefasciatus* do laboratório de Entomologia do IAM-FIOCRUZ/PE (CqSLab) originária nos municípios de Ipojuca, Olinda e Jaboatão (RMR), linhagem fundada em laboratório em 2011 e mantida no insetário do departamento de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM, FIOCRUZ-PE), em Recife, sob condições controladas de temperatura ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade ( $70\% \pm 20\%$ ), e fotoperíodo de 14h:10 h (C/E); e colônia de campo, estabelecida para a montagem dos experimentos a partir de ovos coletados em criadouros da espécie nos bairros citados anteriormente, também mantidas sob condições controladas. Foram utilizados mosquitos adultos da geração F1 proveniente dos ovos coletados em campo, com o objetivo de preservar as características biológicas e genéticas das populações de campo e com a possibilidade de escolher idade e quantitativo dos mosquitos a serem usados nos experimentos.

### 7.4 ORGANIZAÇÃO DOS MOSQUITOS PARA RT-PCR

Os ensaios de RT-PCR foram realizados para avaliar os genes alvos (Quadro 1) quanto a presença de transcritos em diferentes tecidos avaliados. Para tanto foram utilizadas larvas em estágio L4 e mosquitos adultos de *C. quinquefasciatus* da colônia de referência (CqSLab). Foram montados 5 tipos amostrais, em *pools*, compostos por diferentes tecidos: 1- Amostra constituída por 100 pares de antenas de fêmeas com 6 dias de emergência; 2- Amostra contendo 5 mosquitos machos íntegros com 6 dias de emergência; 3- Amostra constituída por 5 larvas da espécie *C. quinquefasciatus* em estágio L4; 4- Amostra composta por 5 corpos de fêmeas (sem cabeça e sem patas) com 6 dias após a emergência; e 5- Amostra formada por 60 patas de fêmeas (retiradas de 10 fêmeas com 6 dias após a emergência).

Quadro 1 – Genes candidatos de receptores olfatórios (*ORs*) e proteínas de ligação a odorantes (*OBP*s) e código de acesso do *Vectorbase* para obtenção da sequência gênica para desenho de *primers*.

Gene	Código de acesso
<i>CquiOR2</i>	CPIJ002479
<i>CquiOR37</i>	CPIJ004163
<i>CquiOR64</i>	CPIJ006216
<i>CquiOR93</i>	CPIJ039866
<i>CquiOR121</i>	CPIJ014392
<i>CquiOR125</i>	CPIJ015178
<i>CquiOR132</i>	CPIJ039859
<i>CquiOR151</i>	CPIJ017911
<i>CquiOBP2</i>	CPIJ007617
<i>CquiOBP3</i>	CPIJ007611
<i>CquiOBP5</i>	CPIJ007608
<i>CquiOBP7</i>	CPIJ001365
<i>CquiOBP10</i>	CPIJ013976
<i>CquiOBP11</i>	CPIJ006551
<i>CquiOBP16</i>	CPIJ012715
<i>CquiOBP23</i>	CPIJ001876
<i>CquiOBP43</i>	CPIJ017326
<i>CquiOBP46</i>	CPIJ010782

Fonte: A autora

## 7.5 ENSAIO QUALITATIVO DE EXPRESSÃO DE GENES *ORS* E *OBPS* POR RT-PCR

Foram realizadas extrações de RNA dos 5 tipos amostrais citados anteriormente, utilizando TRIzol™ (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante, em seguida as amostras foram tratadas com DNase™ (Ambion-Invitrogen), quantificadas em NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), e então foram obtidos os cDNAs com *primers* específicos (Quadro 2), seguindo o protocolo da SuperScript™ II RT (Invitrogen). Finalmente, as reações foram feitas com Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen) e conduzidas no termociclador Mastercycler nexus X2

gradient thermal cycler (Eppendorf). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% e TBE (Tris/Borato/EDTA) 0,5X, corado com brometo de etídeo (10 mg/ml).

Quadro 2 – Sequências dos *primers* desenhados a partir dos genes *ORs* e *OBPs*, tamanho dos

Genes	Sequência	Tamanho do gene completo (pb)	Amplicon	T°C de anelamento
<i>CquiOBP2</i>	F- 5' CATAAGGCCGGCGTGGTGAAT 3' R- 5' ACCGGGTCTCGCTCTTTC 3'	1816 pb	142pb	56°C
<i>CquiOBP3</i>	F- 5' GTATGGGGTTGCTAATTTTGGACT 3' R- 5' AAACGCCGGCCTTCACAA 3'	2984 pb	200pb	56°C
<i>CquiOBP5</i>	F- 5' GTGGCCACCTGGTTATCTTC 3' R- 5' CGTGTCCGGCTTGGTGA 3'	1728 pb	211pb	53°C
<i>CquiOBP7</i>	F- 5' CCATCGGCAAGGGTTCG 3' R- 5' GGTGCTCCAGTGCCTCCTT 3'	2155 pb	233pb	56°C
<i>CquiOBP10</i>	F- 5' CGTCGCCGATAGTGCATG 3' R- 5' ATTCTGTGCAGGCACTTG 3'	1717 pb	118pb	53°C
<i>CquiOBP11</i>	F- 5' AAAAAGGCAAACCTGAACATG 3' R- 5' GTAAGACGCCTCGCAGT 3'	8857 pb	103pb	53°C
<i>CquiOBP16</i>	F- 5' GGGAGAGTGTGTCGTTAAGAAG 3' R- 5' CCTCGTCTTCTAGTGCCCC 3'	1997 pb	183pb	53°C
<i>CquiOBP23</i>	F- 5' GGTCTGCCGGTGAACATC 3' R- 5' AACCGTTCCGCCCTTCTCC 3'	5211 pb	154pb	53°C
<i>CquiOBP43</i>	F- 5' ACCGCTGACTTTACCGTGAA 3' R- 5' ATCGGTCCGTTGTTATCGTC 3'	1868 pb	153pb	53°C
<i>CquiOBP46</i>	F- 5' CGATTTGGGCCGGGTTTACG 3' R- 5' AGGCCGTTCCCACTCCCAATC 3'	1711 pb	104pb	56°C
<i>CquiOR2</i>	F- 5' TTCATCCCCGGGTAAACAA 3' R- 5' CCAGCGCCCGGTTTTCCTT 3'	2571 pb	171pb	56°C
<i>CquiOR37</i>	F- 5' TCGTTCGAGCGGTTGGTC 3' R- 5' CCCAGATACAACACAACCAAAAC 3'	2469 pb	112pb	56°C
<i>CquiOR64</i>	F- 5' TTCTCGTGATGCCAAACC 3' R- 5' AGGCAAATCCAATCGTAACCA 3'	2554 pb	158pb	53°C
<i>CquiOR93</i>	F- 5' CAGAAGGAATCGATCGGGGAAAAC 3' R- 5' AGCATGTCCCCGCACCTG 3'	2433 pb	118pb	56°C
<i>CquiOR121</i>	F- 5' GTACGTCCCCGGGTCAACAT 3' R- 5' GGGCTCGGAACATAAAGTGGTGAAG 3'	2544 pb	153pb	56°C
<i>CquiOR125</i>	F- 5' GGTTGGGGCGATATTGGGGAGAT 3' R- 5' AACCAGAGCGCAGATCCAGAACAC 3'	3472 pb	195pb	56°C
<i>CquiOR132</i>	F- 5' ATTCTGGTCCCGATGTTGTCC 3' R- 5' AGAATGTTCCGCCGAGACTGC 3'	2421 pb	198pb	60°C
<i>CquiOR151</i>	F- 5' CAAATGATTATCGGACTGCTGGAC 3' R- 5' GTAGCTCATGAATGGCCTCGTAGT 3'	2667 pb	108pb	56°C

genes, *amplicons* gerados pela amplificação e temperatura de anelamento dos *primers*.

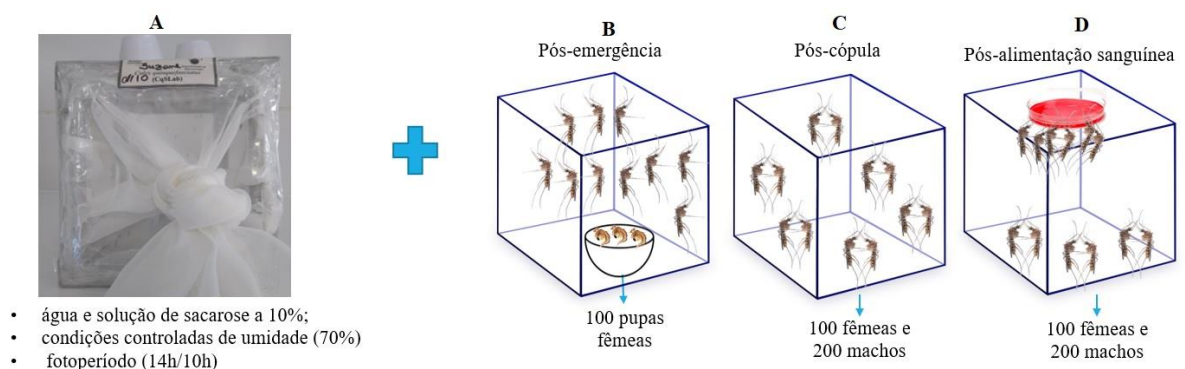
Fonte: A autora

## 7.6 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS EM TRÊS ESTADOS FISIOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DOS GENES *ORS* E *OBPs* QUANTO A EXPRESSÃO DIFERENCIAL ATRAVÉS DE RT-qPCR

Os experimentos de RT-qPCR foram conduzidos com antenas de fêmeas das populações CqSLab e de campo, a fim de avaliar a expressão diferencial de genes *ORS* e *OBPs* alvo entre diferentes estados fisiológicos. Mosquitos de ambiente natural estão em contato direto com moléculas odorantes, estimulantes de suas funções fisiológicas, enquanto mosquitos oriundos de colônias de laboratório não são expostos da mesma maneira, pois vivem em ambientes controlados. Desta forma, o estudo comparativo da expressão de genes quimiossensoriais em *C. quinquefasciatus* oriundos de ambientes distintos traz informações relevantes acerca do padrão de expressão deste importante grupo de genes olfatórios envolvidos em processos biológicos de extrema importância para a sobrevivência e desenvolvimento dos mosquitos.

Para tanto, foram avaliados 3 estados fisiológicos: pós-emergência, pós-cópula e pós-alimentação sanguínea (Figura 11), e a metodologia empregada para a obtenção de cada estado fisiológico segue explicada na ilustração. Os mosquitos foram colocados em gaiolas pequenas (20cm x 15,2 cm x e 16 cm), receberam suprimento de água e solução de sacarose a 10% e foram mantidos sob condições controladas de umidade (70%) e fotoperíodo (14h/10h) no insetário IAM-FIOCRUZ/PE até a obtenção do estado fisiológico e coleta das fêmeas.

Figura 11 – Organização das gaiolas para obtenção das fêmeas para experimento de RT-qPCR.



Fonte: A autora

Legenda: A) exemplo de gaiola utilizada para a montagem do experimento no Insetário do IAM-FIOCRUZ/PE; B) esquema da gaiola pós-emergência, composta por recipiente contendo água e 100 pupas fêmeas. A coleta foi realizada após a emergência dos adultos; C) esquema da gaiola pós-cópula, composta por 100 fêmeas e 200 machos; D) esquema da gaiola pós-alimentação sanguínea, composta por 100 fêmeas e 200 machos. Acima da gaiola, aparato de alimentação artificial.

Pós-emergência: Consistiu em 6 gaiolas pequenas (20cm x 15,2cm x 16cm), 3 com mosquitos de campo e 3 com mosquitos CqSLab, contendo 100 pupas fêmeas cada, para obtenção de fêmeas adultas recém-emergidas. A aspiração das gaiolas era realizada com aspirador manual, as fêmeas congeladas a -80 °C, após 20 minutos transferidas para placas de Petri a fim de evitar a perda das antenas. Com pinças entomológicas as antenas eram dissecadas e colocadas em microtubos de 1,5 ml, compondo amostras com 100 pares de antenas (200 antenas) e 100 µl de água ultra-pura. As amostras foram maceradas com pistilo plástico e por fim, os homogenatos armazenados a -80 °C.

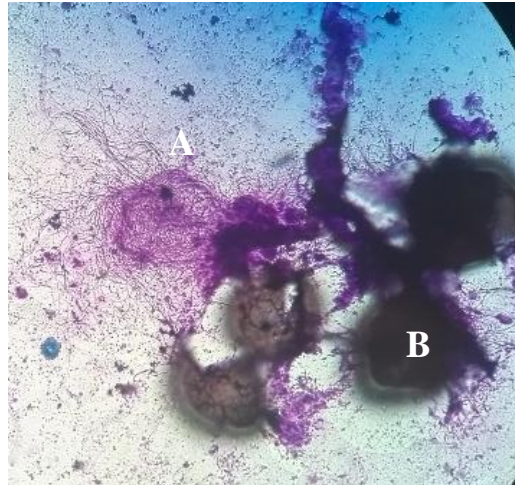
Pós-cópula: Consistiu em 6 gaiolas pequenas, 3 com mosquitos de campo e 3 com mosquitos CqSLab, contendo 100 fêmeas e 200 machos cada uma, em fase adulta. Após contato de 7 dias, os mosquitos foram capturados com aspirador manual, foram selecionadas apenas fêmeas e estas foram congeladas a -80 °C. Após 20 minutos, transferidas para placas de Petri. Os corpos das fêmeas foram dissecados com pinças entomológicas, para separar cabeças dos corpos, cada parte acondicionada em microtubos de 0,5 ml secos e então foram armazenados a -80 °C.

A dissecação foi realizada para posterior análise das espermatecas, estruturas presentes no abdômen das fêmeas e relacionadas ao *status* de inseminação, sem que houvesse degradação do RNA presente nas antenas. Então, para a avaliação do *status* de inseminação das fêmeas foi seguido o protocolo criado pela autora (Apêndice A).

As espermatecas foram avaliadas em microscópio óptico ZEISS West Germany Axiophot presente no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT-IAM) utilizando aumento de 20x a 40x. As espermatecas que apresentavam inseminação (positivas), eram registradas e as antenas correspondentes mantidas, as negativas eram descartadas juntamente as antenas. Os espermatozoides podiam ser vistos como muitos fios finos enovelados ou espalhados pela lâmina (Figura 12). Foram montados homogenatos com as antenas das fêmeas com inseminação confirmada, compostos por 100 pares de antenas (200 antenas) e 100µl de água ultra-pura. Os *pools* foram macerados e armazenados a -80 °C.



Figura 12 – Fotografia de lâmina contendo espermatecas de fêmeas inseminadas com espermatozoides de machos de *Culex quinquefasciatus*.

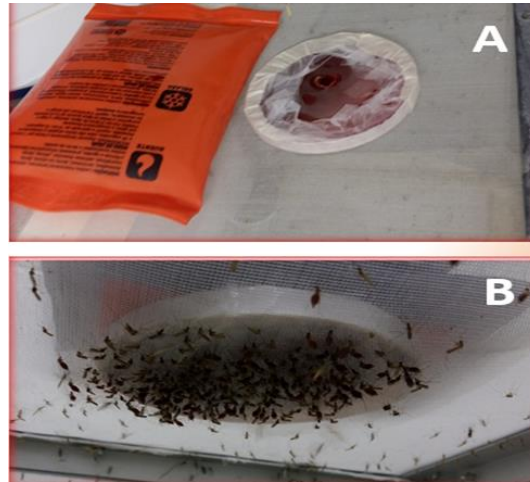


Fonte: A autora

Legenda: A) Espermatozoides de machos da espécie *C. quinquefasciatus* observados após rompimento de espermateca. Os espermatozoides podem ser vistos como estruturas finas e alongadas, que se apresentam enoveladas no interior das espermatecas. Quando avaliadas, as espermatecas são rompidas e os espermatozoides podem se espalhar pela lâmina. Pode-se observar os espermatozoides corados em lilás (corante Giemsa); B) Espermateca. Cada fêmea apresenta três espermatecas com forma ovóide, na imagem elas aparecem em tom natural, marrom claro. A observação das espermatecas foi realizada em microscópio óptico ZEISS West Germany Axiophot, presente no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT – IAM) utilizando aumento de 20x a 40x.

Pós-alimentação artificial sanguínea: Consistiu em 6 gaiolas pequenas, 3 com mosquitos de campo e 3 com mosquitos CqSLab, cada uma contendo 100 fêmeas e 200 machos. Após contato de 7 dias, receberam alimentação sanguínea em aparato artificial, composto por placa de Petri plástica revestida com membrana *micropore*, contendo sangue desfibrinado de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) (Figura 13), seguindo o protocolo de manutenção de mosquitos adultos do POP (Procedimento Operacional Padrão) do SRCCV (Serviço de Referência em Controle de Culicídeos Vetores) do insetário. As fêmeas ingurgitadas que apresentavam sangue visível em seu abdômen eram capturadas com aspirador manual, congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e transferidas para placas de Petri. As antenas foram dissecadas com auxílio de pinças entomológicas e os homogenatos montados com 100 pares de antenas (200 antenas), para cada gaiola utilizada, mais  $100\mu\text{l}$  de água ultra-pura. Todas as amostras foram submetidas a preparação de *pools* e a extração de RNA, utilizando TRIzol<sup>TM</sup> (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante.

Figura 13 - Alimentação artificial realizada nas gaiolas de criação.



Fonte: Fiocruz/PE - Departamento de Entomologia.

Legenda: A) bolsa térmica aquecida a 37 °C e placa de Petri revestida com *micropore* contendo sangue desfibrinado de coelho; B) fêmeas de *C. quinquefasciatus* realizando repasto sanguíneo em alimentador artificial.

## 7.7 ESCOLHA DOS GENES CANDIDATOS DE *ORS* E *OBPs* E DESENHO DOS *PRIMERS*

Foram selecionados genes candidatos dentro de duas famílias de genes quimiossensoriais: *Odorant Binding Protein (OBP)* e *Odorant Receptor (OR)*. Inicialmente foram escolhidos 8 *ORs* e 10 *OBPs*, elencados no artigo de (LEAL et al., 2013) entre os genes observados *upregulated* em antenas. Os genes escolhidos e seus respectivos códigos de acesso podem ser conferidos no Quadro 1. Também foi selecionado um gene endógeno, usado como controle interno das reações, o gene ribossomal 18S (F- 5'CGCGGTAATTCCAGCTCCACTA 3' R- 5' GCATCAAGCGCCACCATATAGG 3'). As sequências dos *primers* para 18S foram retiradas do artigo de Liu et al., 2011.

Os *primers* foram desenhados com auxílio do *software PrimerSelect*, pacote DNASTAR 7.0.0 e sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies*). Os pares de *primers* de cada gene de estudo foram avaliados *in silico* através da ferramenta online *Tm calculator (Thermo Fisher Scientific)* quanto ao seu conteúdo GC, temperatura de anelamento e temperatura de *melting (Tm)*, com intuito de otimizar as condições de amplificação. As sequências dos *primers*, tamanho do gene completo (*íntrons* e *éxons*), *amplicon* gerado e as temperaturas de anelamento, podem ser conferidas no Quadro 2.

## 7.8 EXTRAÇÃO DE DNA PARA PCRS CONVENCIONAIS: TESTE DE EFICIÊNCIA DOS PRIMERS

Para avaliação da qualidade de amplificação dos *primers* foram utilizadas amostras de DNA obtidas de fêmeas completas da colônia CqSLab. Foram utilizadas 2 fêmeas completas, de forma individual, e 2 *pools* com 100 pares de antenas cada, mais 100 µl de H<sub>2</sub>O ultra-pura. As amostras foram maceradas com pistilos de plástico autoclavados e as extrações foram realizadas seguindo o protocolo DNAzol® (Invitrogen). O volume de DNAzol® utilizado foi modificado, sendo 30 µl para *pool* de antenas e 50 µl para mosquito adulto. As amostras extraídas foram quantificadas em NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), obtendo-se DNA de qualidade acima de 20ng/µl, tanto para fêmea completa quanto para *pool* de antenas.

## 7.9 PCR CONVENCIONAL E SEQUENCIAMENTO CAPILAR DOS GENES DE ORS E OBPS

Para confirmação da amplificação específica dos genes de estudo pelos *primers* desenhados, foram realizadas PCRs convencionais. As reações foram produzidas em volume final de 25 µl, utilizando o Kit Taq PCR Master Mix (Qiagen) e DNA molde, seguindo o protocolo do fabricante. A ciclagem utilizada foi: 94 °C por 2 min, 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, 72 °C por 10 min e manutenção a 4 °C. A temperatura de anelamento variou de acordo com o gene utilizado (informação presente no Quadro 2). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% em TBE 0,5X, corado com brometo de etídeo (10 mg/ml) e fotografados em transiluminador ultravioleta.

Os produtos de PCR resultantes foram enviados ao sequenciamento capilar, realizado no NPT (Núcleo de Plataformas Tecnológicas), conduzido no equipamento ABI 3500xL Genetic Analyser (*Applied Biosystems*®) com o kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 Ready Reaction (*Applied Biosystems*®). Posteriormente, as sequências consenso para cada gene foram submetidas ao banco de dados de sequências biológicas BLASTn-NCBI, para avaliar a identidade destas e a similaridade entre as sequências amplificadas e aquelas depositadas no banco de dados.

## 7.10 ENSAIOS DE RT-PCR

Amostras de RNA dos cinco tipos de tecidos (100 pares de antenas de fêmeas, 5 mosquitos machos íntegros, 5 larvas em estágio L4, 5 corpos de fêmeas sem cabeça e sem patas e 60 patas de fêmea) foram utilizadas na síntese dos cDNAs para a realização dos ensaios de

RT-PCR, seguindo o protocolo do fabricante da SuperScript™ II RT (Invitrogen) com modificações. Para avaliar os genes alvos em relação a transcrição, regiões específicas dos éxons de 17 genes quimiossensoriais provenientes dos testes qualitativos por PCR convencional (*CquiOBP2*, *CquiOBP3*, *CquiOBP5*, *CquiOBP7*, *CquiOBP10*, *CquiOBP11*, *CquiOBP16*, *CquiOBP23*, *CquiOBP43*, *CquiOBP46*, *CquiOR2*, *CquiOR37*, *CquiOR64*, *CquiOR93*, *CquiOR121*, *CquiOR125* e *CquiOR151*) mais o gene 18S foram amplificadas.

As reações foram produzidas em volume final de 25 µl, utilizando o Kit Taq PCR Master Mix (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante, *primers* e cDNA. A ciclagem utilizada foi: 94 °C por 2 min, 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 55° C por 1 min e 72 °C por 2 min, 72 °C por 10 min e manutenção a 4 °C. A temperatura de anelamento variou de acordo com os genes utilizados. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 0,5X, corado com brometo de etídeo (10 mg/ml) e fotografados sob transiluminador de ultravioleta. Ao final dos ensaios, foi possível observar o panorama de transcrição tecido específico dos genes odorantes.

#### 7.11 OTIMIZAÇÃO DOS PRIMERS POR RT-qPCR

Para os experimentos de avaliação da eficiência dos *primers* por quantificação absoluta foram realizadas extrações de RNA com TRIZOL™ (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante. Foram montados 4 *pools* compostos por 100 pares de antenas de fêmeas CqSLab cada e 100 µl de H<sub>2</sub>O ultra-pura. O material extraído foi tratado com DNase TURBO (Ambion-Invitrogen) seguindo protocolo do fabricante e quantificado em NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Em seguida, as amostras extraídas foram submetidas a uma corrida em gel de agarose 2% em tampão TBE 0,5X, brometo de etídeo (10 mg/ml) e fotografia em transiluminador ultravioleta. Três das quatro amostras extraídas apresentaram bandas íntegras de RNA ribossomal (5S, 18S e 28S), e foram utilizadas para produção de cDNA através do protocolo do fabricante para a SuperScript™ II RT (Invitrogen), com modificações. Para avaliar a integridade das três amostras de cDNA realizou-se ensaio de RT-PCR utilizando o gene *18S*, Kit Taq PCR Master Mix (Qiagen) e os cDNAs.

Após as otimizações, para as reações de RT-qPCR foi montado um *subset* de 9 genes quimiossensoriais: *CquiOBP2*, *CquiOBP5*, *CquiOBP10*, *CquiOBP11*, *CquiOBP16*, *CquiOR2*, *CquiOR64*, *CquiOR93*, *CquiOR151* e mais o gene endógeno *18S*, escolhidos entre os 17 avaliados por RT-PCR, sendo cinco (*CquiOR2*, *CquiOR64*, *CquiOR93*, *CquiOBP11* e

*CquiOBP16*) com transcrição exclusiva em tecido antenal, e os outros quatro genes (*CquiOBP2*, *CquiOBP5*, *CquiOBP10* e *CquiOR151*) escolhidos de forma randômica, apresentaram transcritos em diferentes tecidos avaliados por RT-PCR, sendo incluídos com o objetivo de complementação do grupo gênico.

Estes genes foram submetidos à otimização através de ensaios de RT-qPCR em quantificação absoluta, com a finalidade de investigar se os *primers* tinham padrão de eficiência e especificidade equivalentes aos propostos pelo guia MIQE - Mínima informação para publicação de experimentos com PCR quantitativa (STEPHEN A. BUSTIN et al., 2009).

Os parâmetros foram avaliados por curva padrão em quantificação absoluta e para cada par de *primers* foram utilizadas concentrações entre 0,1  $\mu$ M e 0,4  $\mu$ M. O RNA utilizado foi diluído de forma seriada de 1:10 em cinco pontos consecutivos (10ng; 1ng; 0,1ng; 0,01ng e 0,001ng). Os mix para as reações em placa de 96 poços, foram produzidos com H<sub>2</sub>O ultra-pura, kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR (Qiagen), *primers*, RT-mix e o RNA molde. O equipamento utilizado foi o termociclador 7500 Real-Time PCR (*Applied Biosystems*), localizado no NPT-IAM.

#### 7.12 EXPRESSÃO DIFERENCIAL ENTRE ESTADOS FISIOLÓGICOS POR RT-qPCR

Após a quantificação absoluta, do grupo de nove genes testados quanto a eficiência seis apresentaram eficiência adequada, de acordo com o MIQE (Mínima informação para publicação de experimentos com PCR quantitativa), para avaliação da expressão diferencial por RT-qPCR, e foram eles: *CquiOBP2*, *CquiOBP5*, *CquiOBP10*, *CquiOBP11*, *CquiOR2*, *CquiOR93*.

Entre os genes supracitados, três são específicos de antena (*CquiOR2*, *CquiOR93* e *CquiOBP11*) e três apresentaram transcritos em diferentes tecidos (*CquiOBP2*, *CquiOBP5*, *CquiOBP10*). O RNA utilizado foi obtido de antenas de fêmeas submetidas a três estados fisiológicos e em duas populações, CqSLab e Campo, sendo ao todo 600 fêmeas pós-emergência, 600 fêmeas pós-cópula e 600 fêmeas pós-alimentação sanguínea. O experimento foi conduzido com replicata técnica e triplicata biológica através de quantificação relativa, para investigar a transcrição diferencial nas condições de concentração de RNA a 10ng e concentração de primer a 0,4  $\mu$ M. O equipamento utilizado foi o 7500 Real-Time PCR, *Applied Biosystems*, localizado no NPT do IAM/FIOCRUZ-PE.

Os resultados foram avaliados no software do próprio equipamento e os gráficos foram gerados com o software *GraphPad Prism 8*, baseados nos dados de RQ (Quantificação Relativa). Diferenças estatisticamente significativas na expressão gênica por RT-qPCR foram avaliadas com teste t *Unpaired*, usando o software *GraphPad Prism 8*.

## 8 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE ANTENAS DE FÊMEAS DE *Culex quinquefasciatus* APÓS A CÓPULA

Esta seção trata da caracterização do perfil transcriptômico de antenas de fêmeas da espécie *C. quinquefasciatus*. Para tanto, foram utilizadas antenas de fêmeas após a cópula de duas populações: fêmeas coletadas em campo, representando o teste, e fêmeas de laboratório (CqSLab), representando o controle. Através desta etapa do estudo foi possível observar o panorama de genes superexpressos e subexpressos no tecido antenal, sob o estado fisiológico pós-cópula. Este estado de avaliação foi escolhido para o transcriptoma com base nos resultados obtidos nos ensaios de RT-qPCR, onde foi observada a expressão aumentada de genes olfatórios neste estado fisiológico.

### 8.1 AMOSTRAS DE MOSQUITOS

Para a realização do ensaio de RNAseq foram utilizadas antenas de fêmeas adultas da espécie *C. quinquefasciatus* com sete dias de vida, após a cópula, provenientes de duas colônias distintas:

- 1) CqSLab;
- 2) Colônia de campo, estabelecida a partir de ovos coletados nos bairros da Mustardinha e Cidade Universitária durante o segundo semestre de 2020.

Todos os mosquitos foram mantidos no insetário IAM-FIOCRUZ/PE sob condições controladas de temperatura ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade ( $70\% \pm 20\%$ ), e fotoperíodo de 14h:10h (C/E).

### 8.2 PREPARO DAS AMOSTRAS DE RNA

As amostras de RNA total utilizadas na execução do sequenciamento foram obtidas a partir de *pools* de 100 pares de antenas de fêmeas de *C. quinquefasciatus*, coletadas por aspiração das gaiolas montadas para este experimento, anteriormente submetidas ao estado fisiológico pós-cópula, como descrito abaixo.

Foram montadas ao todo seis gaiolas com mosquitos das colônias CqSLab e campo, cada colônia com três réplicas biológicas experimentais. Cada gaiola continha 100 fêmeas e 200 machos, sendo utilizados no total 600 fêmeas e 1200 machos. Os mosquitos foram mantidos em contato por sete dias consecutivos e após esse período, foram capturados com auxílio de aspirador automático. Cada grupo de 300 fêmeas, ou seja, por colônia, foi avaliado em um mesmo momento, evitando possíveis variações entre as três réplicas biológicas.

Cada grupo de mosquitos representantes de uma gaiola foi adormecido a  $-20^{\circ}\text{C}$  por vez, as 100 fêmeas foram separadas dos machos e então levadas ao  $-80^{\circ}\text{C}$  para conservar o RNA presente nas antenas. As antenas foram dissecadas com auxílio de pinças entomológicas e acondicionadas em tubos de 1,5 ml contendo 100  $\mu\text{l}$  de água ultra-pura para a posterior produção dos homogenatos.

As antenas foram maceradas com pistilos plásticos e os homogenatos resultantes armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até a finalização desta etapa. A extração de RNA foi realizada utilizando o kit RNeasy (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. Após as extrações, os RNAs foram submetidos à corrida de eletroforese em gel de agarose 1%, com o intuito de avaliar a qualidade e integridade das amostras a partir da visualização das bandas de RNA ribossomal (28S, 18S e 5S). Para detectar a concentração das amostras, estas foram submetidas ao espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific®). No dia da realização do experimento do RNAseq, as amostras foram novamente testadas quanto a qualidade e concentração no equipamento Qubit™ 2000 (Thermo Scientific®).

### 8.3 PRODUÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE cDNA

Para a produção das bibliotecas de cDNA foi utilizado o TruSeq® Stranded RNA LT kit (Illumina). Foram seguidos os procedimentos descritos no protocolo, com as seguintes etapas: 1- Purificação e fragmentação do mRNA: As moléculas de mRNA, contendo cauda poli-A, passaram pelo processo de purificação com oligos poli-T ligados a *beads* magnéticas, através de duas rodadas de purificação. Durante a segunda eluição do RNA poli-A, o RNA é fragmentado e preparado para a síntese de cDNA; 2- Síntese da 1ª fita de cDNA: Nesta etapa ocorre a transcrição reversa dos fragmentos de mRNA, clivados na etapa anterior utilizando *primers* hexâmeros randômicos, desta vez utilizando SuperScript™ III e *primers* randômicos; 3- Síntese da 2ª fita de cDNA: Nesta etapa o RNA molde é removido e dUTP passa a ser incorporado no lugar de dTTP, com a finalidade de gerar cDNA dupla-fita. A incorporação de dUTP remove a segunda fita durante a amplificação, pois a polimerase não pode adicionar mais nucleotídeos após este. As esferas magnéticas AMPure XP (*Life Sciences*) são então usadas para separar o cDNA dupla-fita da segunda fita no mix da reação. Ao fim desse processo, é obtido um cDNA *blunt end*; 4- Adenilação da extremidade 3': uma Adenina (A) é adicionada nas extremidades 3', de cada fragmento *blunt*, evitando assim que haja ligação entre os fragmentos durante a etapa de inclusão dos adaptadores. Um nucleotídeo Timina (T) na extremidade 3' dos adaptadores fornece uma ponta complementar para ligação entre adaptador



e fragmento; 5- Ligação dos adaptadores: Adaptadores são incluídos na reação e passam a se ligar às extremidades adeniladas do cDNA dupla-fita, através da conexão do seu nucleotídeo complementar (T) com as adeninas presentes nas moléculas de cDNA, preparando os fragmentos para a hibridização na *flow-cell*; 6- Enriquecimento dos fragmentos de cDNA dupla-fita: Nesta etapa, um ensaio de PCR convencional é conduzido para enriquecer seletivamente os fragmentos de cDNA ligados a adaptadores em ambas as extremidades, com o objetivo de amplificar o número de fragmentos de cDNA na biblioteca; 7-Quantificação da biblioteca: a quantificação da biblioteca foi realizada por RT-qPCR utilizando o ProNex® NGS Library Quant Kit (Promega) e o produto da reação foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose 1%, para estimar o tamanho dos fragmentos de cDNA gerados. Após a quantificação, todas as amostras foram normalizadas e utilizadas a 18 pmol; 8- Sequenciamento: O sequenciamento das seis amostras, três referentes à cada colônia avaliada (CqSLab e Campo), foi realizado com o MiSeq® Reagent Kit v3 (Illumina) e cartucho com 150 ciclos, no equipamento MiSeq Sequencer® (Illumina), disponível no Núcleo de Plataforma Tecnológica (NPT) do IAM-Fiocruz-PE.

## 8.4 ANÁLISE DOS DADOS

### 8.4.1 Avaliação da qualidade das *reads*

Após o sequenciamento das amostras, os experimentos obtiveram 90,3% de qualidade. As *reads* resultantes passaram pela checagem de qualidade, através da ferramenta FastQC - versão 0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>), ferramenta que dispõe de um conjunto de análises que podem ser realizadas para cada biblioteca, possibilitando a avaliação da qualidade das sequências e a identificação de possíveis problemas em etapa como construção das bibliotecas ou execução do sequenciamento.

O *software*, por suas diferentes funções, permite fazer um diagnóstico completos sobre as *reads*, como por exemplo avaliar a qualidade das bases nitrogenadas adicionadas, quantidade de bases que não foram identificadas, o conteúdo GC, o comprimento das sequências identificadas, detecção de sequências duplicadas ou super expressas, entre outros parâmetros.

### 8.4.2 Trimagem das *reads*

Para garantir sequências de alta qualidade para execução da análise de expressão diferencial, foi realizada a trimagem das *reads* com o *software Trimmomatic* versão 0.36 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). O

*software Trimmomatic* permite a execução de uma grande variedade de funções úteis para editar dados *paired-end*, assim como também dados *single-end*. Algumas das funcionalidades disponíveis são a remoção da sequência dos adaptadores, remoção de sequências com qualidade inferior a um *threshold* de qualidade pré-definido, remoção de bases no fim das sequências com qualidade baixa, cortar sequências em tamanho escolhido para as análises, entre outras. Nos dados deste estudo foi realizada a trimagem para filtrar as sequências e remover os adaptadores, além disso, também foram removidas das bibliotecas as sequências com baixa qualidade, apresentando Phred < 20 e *reads* com tamanho inferior a 36 pb.

### 8.4.3 Mapeamento das *reads* contra o genoma de referência

Nesta etapa as *reads* trimadas anteriormente passaram pelo processo de mapeamento contra o genoma de referência, utilizando o genoma de *C. quinquefasciatus* (Johannesburg - CM027410.1) disponível no banco de dados online *VectorBase*. Para isso foi utilizada a ferramenta STAR (DOBIN et al., 2013) versão 2.7.7a, que possui funções como a geração de *genome indexes files* e mapeamento de *reads* contra o genoma de referência, funções executadas com os dados deste trabalho. Como arquivos de saída, o STAR fornece dados sobre alinhamentos (SAM/BAM), estatísticas de resumo de mapeamento, identificação de *splice junctions*, *reads* não mapeadas, entre outras.

### 8.4.4 Contagem das *reads*

Após o mapeamento, as *reads* passaram por contagem, utilizando o *software* HTSeq-count (ANDERS; PYL; HUBER, 2015) versão 0.13.5. O HTSeq apresenta dentre as funções disponibilizadas em seu pacote, a de contar quantas *reads* são mapeadas em relação aos genes presentes no genoma de referência, função esta que foi utilizada na análise dos dados deste trabalho.

### 8.4.5 Análise da expressão diferencial

Após o preparo das sequências, foi conduzida a análise de expressão diferencial, realizada no pacote R utilizando a ferramenta DEseq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014), através do script: *Differential\_expression\_analysis R*. Os genes com (Log2) FC (quantificação da expressão de um gene entre dois perfis diferentes utilizando o logaritmo de base 2 para fornecer uma simetria entre os dados)  $\geq 1,0$  e com p-valor ajustado  $\leq 0,05$  foram considerados superexpressos. Foi escolhido o *cutoff* de 1 com base nos resultados obtidos, permitindo assim recuperar maior número de genes do sequenciamento.

Foi realizada análise de enriquecimento funcional com StringDB (FRANCESCHINI et al., 2013) versão 11.5, ferramenta utilizada para atribuir ontologia dos genes (GO) (<http://www.geneontology.org/>).

Também foram construídas redes de interação proteína – proteína, a partir da lista de genes DE com o auxílio do *software Cytoscape* ([www.cytoscape.org](http://www.cytoscape.org)) versão 3.9.1, usado juntamente ao *stringApp plugin* versão 1.7.0. Por fim, as redes de interação foram clusterizadas utilizando *clusterMaker2 plugin*, baseando-se nos valores de GO obtidos no StringDB, com auxílio do algoritmo *Markov Cluster* (MCL). Os nós (*nodes*) foram coloridos de acordo com o valor de (Log2) FC para cada gene, utilizando a paleta de cores entre amarelo claro, passando pelo laranja e chegando até o roxo. Quanto mais próximo de zero, mais intenso o tom de amarelo se torna nos nós e quanto mais longe de zero os valores de (Log2) FC, mais intenso o roxo dos nós. O tamanho dos nós reflete o grau de centralidade (*Degree*) na rede. *Degree* é o número de interações que um nó faz em uma rede. Para melhor visualização, proteínas *singletons* (sem nenhuma interação) ou com apenas uma interação, foram removidas das redes. Os nomes das proteínas nas redes foram os mesmos da tabela DEG, para manter coesão com os demais dados.

## 9 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENES QUIMIOSSENSORIAIS EM FÊMEAS DE *Culex quinquefasciatus* PROVENIENTES DE POPULAÇÕES DE CAMPO DO ESTADO DE PERNAMBUCO

Esta seção trata do estudo da diversidade genética em genes quimiossensoriais, mais especificamente os genes expressos exclusivamente em antenas de fêmeas de *C. quinquefasciatus* (*CquiOBP11*, *CquiOBP16*, *CquiOR2*, *CquiOR64*, *CquiOR93*), confirmados através de ensaios de RT-PCR. Somando-se ao grupo, também foi investigado o gene *CquiOR136*, importante receptor odorante envolvido na detecção do repelente sintético DEET (XU et al., 2014). Fêmeas de *Culex* provenientes de populações de campo foram coletadas em 6 municípios do estado de Pernambuco (Olinda, Recife, Ipojuca, Santa Cruz do Capibaribe, Jaboatão dos Guararapes e Aliança) em dois diferentes momentos: em 2010, antes da epidemia de Zika, e 2018, após epidemia. Também foram utilizadas fêmeas representantes da colônia de referência de laboratório (CqSLab). A avaliação da diversidade genética foi conduzida através de ensaios de PCR convencional, sequenciamento capilar e análises genéticas, com a finalidade de identificar possíveis mutações surgidas no período de transição pré e pós epidemia de Zika.

### 9.1 POPULAÇÕES DE MOSQUITOS UTILIZADAS PARA INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM GENES QUIMIOSSENSORIAIS *ORS* E *OBPS*

Para avaliação da diversidade genética dos genes *CquiOBP11*, *CquiOBP16*, *CquiOR2*, *CquiOR64*, *CquiOR93* foram utilizadas fêmeas coletadas em campo nos anos de 2010 e 2018. A utilização de fêmeas de momentos diferentes permitiu avaliar possíveis mudanças nos índices de diversidade genética e presença/ausência de polimorfismos nas sequências dos genes. As amostras coletadas em 2010 foram provenientes de quatro municípios do estado de Pernambuco: Olinda (S 7° 59' 22.3", W 34° 50' 36.1"), Recife (S 8° 03' 36.6", W 34° 53' 21.1"), Ipojuca (S 8° 23' 53.2", W 35° 03' 36.5") e Santa Cruz do Capibaribe (S 7° 56' 52.8", W 36° 12' 27.0"). Já as amostras de 2018 foram provenientes dos municípios supracitados e mais dois seguintes: Jaboatão dos Guararapes (S 8° 09' 59.8", W 34° 55' 19.5") e Aliança (S 7° 36' 21", W 35° 14' 13"). Além dos mosquitos coletados em campo, também foram avaliadas fêmeas da colônia de laboratório (CqSLab), para fins de comparação, como controle. Importante observar que para esta etapa do estudo foram utilizadas fêmeas da geração parental, diretamente de campo.

## 9.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR ESPÉCIE-ESPECÍFICA DAS FÊMEAS DE CAMPO

Para a identificação molecular da espécie das fêmeas coletadas em campo foi realizada extração de DNA por DNAzol® (Invitrogen), utilizando fêmeas inteiras de forma individual, seguindo protocolo do fabricante. As amostras foram quantificadas em NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific) e submetidas a PCR convencional com Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen) no equipamento Mastercycler® nexus X2 gradient thermal cycler (Eppendorf). Foram utilizados *primers* do gene mitocondrial COI: F-5'GGAGGRTTTGGAAAYTGAYTAGTYCC3' e reverse R-5'GCWGAWGTAARTAAAGCTCGWGTATC3', amplamente empregados como *barcode* para identificação de espécies (PAIVA et al., 2018). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em TBE 0.5X e corado com brometo de etídeo (10 mg/ml). Em seguida, as amostras foram enviadas ao sequenciamento capilar, realizado no NPT-IAM, conduzido no equipamento ABI 3500xL Genetic Analyser (Applied Biosystems®) com kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®). Por fim, as sequências consenso de cada fêmea avaliada foram analisadas através de BLASTn-NCBI.

## 9.3 DESENHO DOS *PRIMERS* PARA ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES QUIMIOSSENSORIAIS SELECIONADOS

Foram desenhados *primers* específicos dos genes *CquiOBP11*, *CquiOBP16*, *CquiOR2*, *CquiOR64*, *CquiOR93* para o estudo do polimorfismo. Este grupo de genes foi escolhido após apresentar transcrição tecido-específica em antenas de fêmeas de *C. quinquefasciatus*, em experimentos de RT-PCR, realizado neste estudo, com 5 tipos de amostra (100 pares de antenas, patas de fêmeas, machos sem cabeça, corpo de fêmea sem cabeça e sem patas e larva em estágio L4). Foi incluído no estudo também o gene *CquiOR136*, importante receptor odorante para inseticidas como DEET, Picaridina e IR3535 (XU et al., 2014). Os *primers* foram desenhados para a amplificação de toda a região codificante dos genes. Para tanto, foram utilizados os *softwares* PrimerSelect 7.0 e EditSeq, parte do pacote DNASTAR 7.0.0. As sequências dos *primers*, evidenciadas na sequência dos genes, podem ser conferidas nas figuras 14 - 19.

Figura 14 – Sequências dos primers do gene *CquiOBP11*

A	B
1 AGATGTATTAAGTCTTGGGAATAAAATAAACAATACTGTAAACAAAATACTGTAAT 60	7561 TGTTAGTTTTCTGTCTTATTTGAGGTAAAAATAATACATAATACAAGAGGTAAAATTA 7620
61 ACTGTCGTTCAAATCAAATAAATACAAATACTTTCCTTAATTTTTGCTTTGAATATCATT 120	7621 CACCTTTAAATTTTATACATTTTCATCATACAAAAATAATTAATCTTTGCTTTTATTTTAT 7680
121 AGTAATAAATTTCTTACCAGATTGAATTAATACACAAGTCATTTAAAACACTTACAACCTCC 180	7681 CGTAATGGTTACAGAAAAATGCTAAAGAACGTTTCATTTAAAACACTATTGTAACATTCATTTT 7740
181 TTCCAAAAACCCACAACCTCACTCTCCGCCGGAAATCAGAAAGTCTTACAAGTGTAAACAGTC 240	7741 GAACGGTTCAATTAATAAAAAACATTTGATAATATTTTTCGCTATTTTCTAACTTCTT 7800
241 GTTAAACGTTTCCATTAACAGCACCATTCTACAATCGATACAGTCTACACGGTCTATA 300	7801 TATTTTCCCTAATTTTGGATTTGAGGTTGAGGACCACAGATCGAAACGATCTAAGCCTTTTATTAT 7860
301 ATTTAGTCATTTGCATACGCAGCTCTATCGCGCTCGAACACACACACACACACACACA 360	7861 CACCTCTTTTATGATGATGAATGTACAGAAAAATGTACCTCGGATTCTTGATCAGGGACC 7920
361 CACACACACACACTTTATGAATGCCAATATTATTCGTACCAGTCATCTTCAGTCTGGG 420	7921 AATATAATCCCTAAAATCAAAAAAATATCAAAGAGGGTCTGGGCTGTGAGAGTTTAA 7980
421 CCGATTCCACCAGCCAGTCAACCATCAGGCTCTATAAATCTCGCATGAATTTATTCATGA 480	7981 ATAGAATGGCCATATAGAATAATCCTTCAGAAAGTGAACAAAAGTTTAAAAACATAAC 8040
481 CCGCATTAGTGCCGATTGAGAGCTCCGCCGTGGATGCCGAAAAATTAAGCGTGAGGAAAA 540	8041 ACATTTCTCCTTTGTACAGATGAAAAAGGCCAACTGAAGTATGACGCAATGCTGAAGCA 8100
541 TTCTGAGGAAAAATTTGCCAGGAGCAGCAGCCTTAAAGAAACGAAACAAAATCAAAAAAAT 600	8101 GATCGATACCATCATGCCGGATGAGCTGGCGGAACCGATGAGGAATGCTGTCAACGTTGTG 8160
601 ATGGCCACTCGGGTGGAGCTGGCTTTACTCGTTGGATCGCGGTTTGGTCCACCGGCAAA 660	8161 CCGAAATAGTGTGATGGCATCAAGAACAACGCGAGGCGTCTTACGCGGTGGCCAAAGTG 8220
661 GTTGAGGGTGTAAAGAAACGATTTCGATGGCTAAAGAAAGTTGAAGCAGGTGCTTAACCGAGT 720	8221 TATTTCCAAGAACAACCCCAAGTTTGTGTTCCCTAGCACAAATCCAGCAATGCTGTGTA 8280
721 TTGTGTGACTTTGGGGGTTTTGTGCAATTCAGAAAGCCACCGTCGAGCAGATGATGAA 780	8281 CTTTATTGATGAGCAACACCCACTCATATGCACACACACACACACAGTGAATGTGA 8340
781 AACGGCGAGATGATTCGGAGTGTGTGCATCGGCAAGCGAAGGCTAGCGAGGAACTGGT 840	8341 AGGTAATAAATATTTATGTCCTGTGCGTCCGCCGCGCTATTTGTTGAAATGGATTGTT 8400
841 CAACCAACTGAAGGAGTCCCAAGTTTCCGACGCCATGGAGTCAAGTGTCTACGCAACTG 900	8401 ATTTTTTCTCCTTCCGAAATGACCTGTTGACATGTCCGGAATAGAAACAGATTGCT 8460
901 TGCCTGGAATGATCAGGCGGTGAGTTGTTTTTTTTAAGAAATCTTTTTAGGAGCTTT 960	8461 TGCCCGTCTCAATTTGAGCACAATATATATCACCTTAAAGCAGGACAGGCTGTGATGAC 8520
	8521 CAAATTTATTGAGGTAGAAATATTGCTGAGGGGAAACATTCGTCAAAAACAGAAAAATCA 8580
	8581 AAACCGAAATAACGATTCCAGAAACCCCTGAAACGTCAGCCGAAAAATTTCAACAAATTA 8640
	8641 TCCTTTAATTAATTTTTGTGGCAAAAGTGAAGTTTACGGGTGATGAATTTCCGGTAACCA 8700
	8701 AGCGGAAAGCTAGCTAGGCAGAAGCTATCAACTGCAATTTGGTTTTCCCTTTTGAATG 8760
	8761 GGTGAGAATGCAGAGCTTGCCGAAATGGAGAAATCCGATTGCATCGGTTACATACCA 8820
	8821 GTCAGGGGTGCTCTGAAATGGAAGTGCAGCGAAT 8887

Fonte: A autora.

Legenda: A) primers F e R do gene *CquiOBP11*; B) primers F INT e R INT do gene *CquiOBP11*; em verde estão representadas as sequências dos primers e as setas azuis indicam o sentido (F e R); sequências com fundo destacado em laranja representam os éxons e sequências com fundo branco representam os íntrons (ou regiões não traduzidas).

Figura 15 – Sequências dos primers do gene *CquiOBP1*

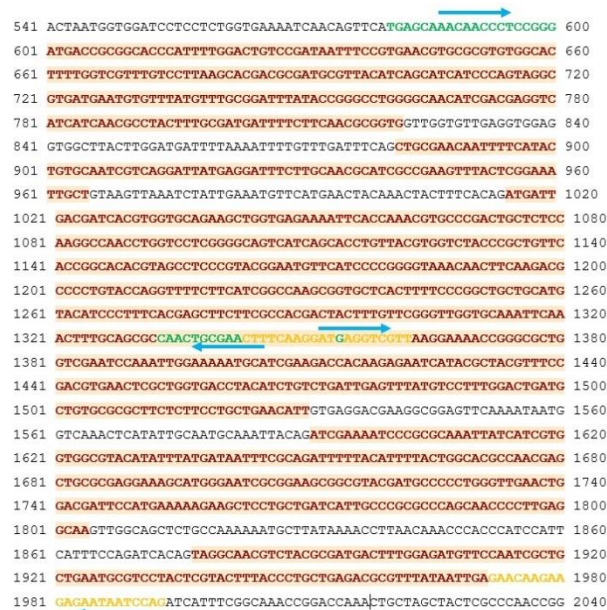
481 TGCACAGAATGCGTGGGGCTTCTGGATACGACGACGGTTTTTCCGGGTAGAGAGTTGGGG 540	
541 ACATAAACTAAGATCTTCCAAAACTATGGGGTCAGTCGGTGTGACAACGGCGCTCCAGG 600	
601 ATGGACAATCTGTGGTTTTGGTGGTTTTGGTGGCAGTTCTGGTGAAGCAATGTGTAAGC 660	
661 AGCTGTACTGATACAACCTCTGGTGAACCAAGTACTTTTTGGGACTAAACCGAAGAAATTT 720	
721 TGCTTTTGGCTTTTCTAGTTGGGACAAAACCTGTGGCGGCCTACAACAATGCGGGGCC 780	
781 GAGTACAATGCTGACCAGGAGACATTCACGCCATCAAGAACGGGACTTCTCGATACGA 840	
841 ACGCCATTGGTTGAGGTTAGTTACAGAGTGACATTTGGTTAAATGATTTGTCGTTGACT 900	
901 TGGTAGATTAATAAATACGAACAGTGTGAGTTTGGGATAAAGAAATGTTGCTTTCAAGTCA 960	
961 TATTGCTAAATGGCGTTCTTAACCTCAAATGGCCCAAAATGCGCGTACAATAAGATAGCA 1020	
1021 TGACAGCAACAATATGTTAATAATAACGTGGAATCAATTCAGAAATCACTAGCTCAAGA 1080	
1081 TTGTACATGATAAAACAAAAAAGATTAGGCCATAAAAAATCAGTATAAAAAAGTATCTA 1140	
1141 ATATTGATATTTACTATTTTCTAGTGCCTGGGAGAGTGTGCTGTTAAGAAGGTTGGCTTCA 1200	
1201 TGAACGATGATTTAAGCTTCAACAAGGACATCATCGTGAAGTTGCTGAGTCCGTTTCATCA 1260	
1261 AGCCGGAGCACTCGGAAGATTTTACACCAAGTGCACGCAAGATGTCGCTCCGGTGTGT 1320	
1321 GTGCTACGGCGTATGAGGTTTACCAGTGCATTTACGAGAACCGCTAGACAAGTGGGGCA 1380	
1381 CTAGAAACGAGGTTAACGGTTGAATAGTACAGGTAATATTTGTTTTGGTAAATAAAAA 1440	
1441 GTAACAAAAACAAAAAATAGAAAGAAACATTATTGTCCTCAAAATTCACCAATTTCTTAAT 1500	

Fonte: A autora.

Legenda: as sequências dos primers são mostradas em verde e as setas azuis indicam o sentido (F e R); sequências com fundo destacado em laranja representam os éxons e sequências com fundo branco representam os íntrons (ou regiões não traduzidas).



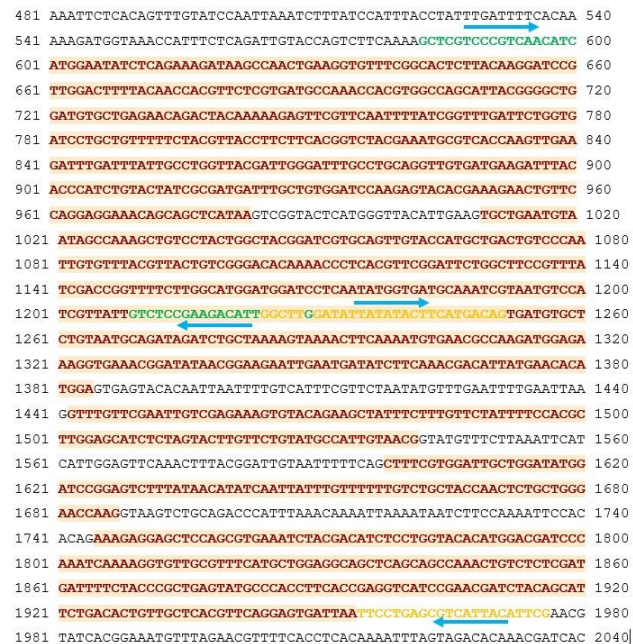
Figura 16 – Sequências dos primers do gene *CquiOR2*



Fonte: A autora.

Legenda: em verde, primers F e R do gene *CquiOR2*; em laranja, primers F INT e R INT do gene *CquiOR2*; as setas azuis indicam o sentido (F e R); seqüências com fundo destacado em laranja representam os éxons e seqüências com fundo branco representam os íntrons (ou regiões não traduzidas).

Figura 17 – Sequências dos primers do gene *CquiOR64*



Fonte: A autora.

Legenda: em verde, primers F e R do gene *CquiOR64*; em laranja, primers F INT e R INT do gene *CquiOR64*; as setas azuis indicam o sentido (F e R); seqüências com fundo destacado em laranja representam os éxons e seqüências com fundo branco representam os íntrons (ou regiões não traduzidas).

Figura 18 – Sequências dos *primers* do gene *CquiOR93*

```

481 CATTCTCTTTAACATATGATTAACCTTTTAATTAGCACTTCAGCAAAACCCCAACAAACG 540
482 ATACTATCTTCAACCAAGAGGTTCAACCCATCAGTTCCTTCGAGCTACCTGATCCAGC 600
601 ATGGTCAACTACCTAACCCGGCTCCGCTCGGCCTAGCCCGCTTCTGTAGACATCCGCAAC 660
661 GCCGACGACATCTTCAGCCACTACGCTCTGGGTTACGGCAACACGTCGGGAATCGGACTG 720
721 CACGCGCCGGTCAACGCTGGAAGCAAAACCATCTCCGGACCATTTCGTTCTGTTGGCC 780
781 CTGACGACGCTGGTCTGGTTCCGGGATGTCGGCCACGCCATGAGCGGCACCGACGATCTG 840
841 ACGATCCGGATCGGCATGTCCTGATCTACAGTACGCTGTCGATGTCGACGCTGGTATGC 900
901 ATGGACGTCGGTAGCACCTGTTCTCCGCGTGAAGGACTACTTCAACGGAAGACGGGAT 960
961 CGTTGCTGTGGAGACGGGACGGGATCAACAGAGCGGAGTCTTCAGACAATCCCGT 1020
1021 CGGAACCTGCTGGTGGCGGAGATCCCGTAACCATCATCTCGTGATCTGGGCTTTTTC 1080
1081 GCGCGGGAAGAGTACTTCCACTTGGTCTGAACGTTTCGGAAGAGCAGCAGTGGATCATC 1140
1141 GACATAATCGATCAGTTCACGGACTCCCGCTGGTACTTGGAAACAACFCGCTCTGGATC 1200
1201 ATCTCGCTGAGCATGCTGCCATGCTAGCAAAACGGCGTTCAGAGCTGAGCTTGTATCGCT 1260
1261 GAATCGTTCGCCACGGTCTTCGCCGAGCTTCACGCAAGTCCAAACACATCTCGATCCG 1320
1321 ACCGCCAAAGAAACCAATTTCCGACCACCTTCGACCAACTCTTCGGGAGTCCCTCAGA 1380
1381 GACTACGAAGAGTTCCTCGCCATGATCATCAGCTGCGCAAGCTCATCTCGCTCTTCTT 1440
1441 CTGCTCAAAGTCTTAACCGTCGAAAGCCTGTCGGCGTGACCTGTTACGACCTTCAAC 1500
1501 ATTACGTTCCAGGTGTTTACGGGCTAGCGTACGGGATCGTCTTCACCATGAGTGTTC 1560
1561 CTGCTGTGCAAAATGGTGGAGCAGCTCAACGATCAGAAGGAATCGATCGGGGAAACCTG 1620
1621 TACCACATGGCAGTGGCCGATTTGGTGGGTCACAGCTCGGAACGGCCACCCGGATCGGG 1680
1681 CAGATGAAGATCACCCAGATGATCACCCGCGAGCACTGTGAGAGAGCTTCGGGTTCCAG 1740
1741 TGCGGGGACATGCTGGACGTTTCGATGGAGATGTTCCAGATGGTGTGAACAGCTGCTAC 1800
1801 ACGCTGCTGACGTTCTCGAGGCTACGAACTAGAGTGGAGCGCAATTTTGAATAATAC 1860
1861 TTGAACTTAGTAGATGTTCTTGGTGAATGACAGCTTCAAAATGAGATGATGATGTCAC 1920

```

Fonte: A autora.

Legenda: em verde, *primers* F e R do gene *CquiOR93*; em laranja, *primers* F INT e R INT do gene *CquiOR93*; as setas azuis indicam o sentido (F e R); sequências com fundo destacado em laranja representam os *éxons* e sequências com fundo branco representam os *íntrons* (ou regiões não traduzidas).

Figura 19 – Sequências dos *primers* do gene *CquiOR136*

```

541 CAAATCAAACTTCTGGTGGCAAAATTTCCACAATCGAGTTGAACCACCGAGTCAAG 600
601 ATGACACAGTTTACTTCCCGTCCGCTCAACCGCTCAAAAAGTGGTGAAGGTGAAGT 660
661 AGTGAATGAAGCAAACTGCAAAAATCTTACTCCAAAGCGTTCGTTGGATCCCGAT 720
721 GGGGATCAATTTTTCAGTGGTTAAGAAAATGGAACAATTTTGGTAAAGTTTGGCAACTC 780
781 GGCAACGTAGATAAATTTGATAGGTTTTTTTAACTATTCAATCAAGTTTCCATGCAA 840
841 AATTTGAAACGACAAAAGCGCTATTTGTTGGGCTTTCGCTCCGCTTATCATACTCCGAC 900
901 ATTTTCTCAGATGATGGAAAATTCATTCTGACGTTTATCGAGGAAGATGACTTTGAGTA 960
961 CAAATTCCTAGTTCACACCGTCACGTACATGATGTTTACAATACACCAAGTCAATTT 1020
1021 GCTACGATTTCTCACCAGACCTGAGTTCATTCGAAAGTTTTTCAACGCTCGCAATA 1080
1081 TCTCAAACTGATCCGAGCTCATCGAATTCGTTCCGCGAGGTCACCGAAAACGAATG 1140
1141 GGTATACTTTGGACCGCTGCAATGTTGACATTTTGTGGATTTCCATGGTGTGACTGG 1200
1201 GGTCTAGAAAATGGCGAGTGTCAACATGGAACCAAAACGTTAGCCTCCTACCTATCCT 1260
1261 CGAGGCAATCATCATGATGTTTATCCGGTGCAAAATTAATTTATGCTGGATGTTACCA 1320
1321 GCTACCGGCTACTTATCAATTCGGTACTGCTCGGATTCGTAACAGAGCTTAAGATACT 1380
1381 CACAGATTTCTGTGATAAGATTAAGATAATGCTGAAATCGCAGTCAAAAAGAACGTTT 1440
1441 GGAATCAGAAATCAACAGATGCTGATGCTTTATTTTGGAGCATTTCAAAATCGAGCTGGA 1500
1501 CGTCTGTCAAAGCTCATATCACCGTCTTAGCAAACTTAATCAACCTTAGCAAAATCTT 1560
1561 GAAGCCATGCTTGTCTTGTACTACTACACGTTGCTGATGGTTAACGCTTTCATCATTTG 1620
1621 TTCCGTCAAAAATGGTACTTCAAGGACTTTGCTCATCGGCCATCATAATGGCCGTTTA 1680
1681 CTTTAATGTCGATTTTTTTCATCATTGCTACAACATGTCACAAGTGGAGATCTGGTAAT 1740
1741 AGCCCATACAAAATCACACCAAAATCTTCTCAACTTCATCCCGGATTTTTTACAGTGCT 1800
1801 CCAAAGTCGGCAACGCATCTACAACCTGCGGTGGCGTACAAGTTGACCAAGACGGAAC 1860
1861 GATTTGTGGCGAATATCGCAGCATCCGAAGCACCATGATGGTGTGATGATGATGCTGCC 1920
1921 AGGCTGGGATGGCAATTCAGCTGTGGCGTTTCTCGAAATGCAATGGGAAAATTCGCG 1980
1981 AACTAATGGATCGACTACAGATGTTGATGTTTTCGTTGCAATTCACGAAATAAGAG 2040
2041 AATCTTCAATTAATCATCCCGTATTCAACATGAGGAAAATTCACATAGCATGTCG 2100

```

Fonte: A autora.

Legenda: em verde, *primers* F e R do gene *CquiOR136*; em laranja, *primers* F INT e R INT do gene *CquiOR136*; as setas azuis indicam o sentido (F e R); sequências com fundo destacado em laranja representam os *éxons* e sequências com fundo branco representam os *íntrons* (ou regiões não traduzidas).

As sequências de cada gene usadas como base para o desenho dos *primers* foram obtidas na Plataforma do *VectorBase*. O código de acesso do *Vectorbase*, sequências dos *primers*, o



tamanho dos genes (contando apenas *éxons* e *íntrons* internos), *amplicons* gerados, tamanho da proteína gerada para cada gene, além da temperatura de anelamento, podem ser conferidas no quadro 3.

Quadro 3 – Informações das sequências dos *primers* para estudo do polimorfismo, desenhados

Genes	Sequência	Tamanho dos genes (pb)	Amplicon	Tamanho da proteína (AA)	T °C de anelamento
<i>CquiOBP11</i> (CPIJ006551)	F- 5' CGAACAAAATCAAAAAAAT 3' R- 5' GTGAGTTGTTTTTTTTTAAG 3'	7657	360 pb	144	52 °C
	F INT- 5' GTACAGATGAAAAAAGGCCAAACTG 3' R INT- 5' TTCCCTAGCACAAATCCAGC 3'		215 pb		62 °C
<i>CquiOBP16</i> (CPIJ012715)	F- 5' TGACAACGGCGCTCCAGG 3' R- 5' GACGAGGTTAACGGTTGAATAGTACAGG 3'	797	831 pb	134	67.5 °C
<i>CquiOR2</i> (CPIJ002479)	F- 5' TGAGCAAACAACCCCTCCGGG 3' R- 5' CAACTGCGAACTTTCAAGGATG 3'	1371	763 pb	376	63 °C
	F INT- 5' CTTTCAAGGATGAGGTCGTT 3' R INT- 5' GAACAAGAAGAGAATAATCCAG 3'		651 pb		57.5 °C
<i>CquiOR64</i> (CPIJ006216)	F- 5' GCTCGTCCCGTCAACATC 3' R- 5' GTCTCCGAAGACATTGGCTTG 3'	1354	646 pb	385	63 °C
	F INT- 5' GGCTTGGATATTATATACTTCATGACAG 3' R INT- 5' TTCCTGAGCGTCATTACATTTCG 3'		753 pb		62 °C
<i>CquiOR93</i> (CPIJ039866)	F- 5' CCTTCGAGCTACCTGATCCAGC 3' R- 5' CTCCCCTGGTGTACTGGAACAAC 3'	1233	609 pb	410	67 °C
	F INT- 5' CTGGAACAACCTCGTCTGGATC 3' R INT- 5' AGTGGAGCGAAATTTTGGAAATACG 3'		679 pb		63 °C
<i>CquiOR136</i> (CPIJ016426)	F- 5' CGAGTTTGAACCACCGAGTCAAG 3' R- 5' GCTGTAATCAATTCGGTACTGC 3'	1436	776 pb	436	64.5 °C
	F INT- 5' CAATTCGGTACTGCTCGGATTCA 3' R INT- 5' GTGTTGCATTTACAGGAATAAGAGGT 3'		702 pb		64.5 °C

a partir dos genes *ORs* e *OBPs*

Fonte: A autora.

#### 9.4 PCRS CONVENCIONAIS ESPECÍFICAS

Para a realização das PCRs convencionais foram utilizados os *primers* dos genes quimiossensoriais estudados e o DNA das fêmeas de *C. quinquefasciatus* de ambos os momentos investigados (2010 e 2018), além dos seguintes reagentes: Taq DNA Polymerase High Fidelity (5U/μl), MgSO<sub>4</sub> 1mM, dNTP 1X, tampão de PCR 10X. As reações de PCR foram conduzidas no equipamento Mastercycler® nexus X2 gradient thermal cycler (Eppendorf). Os produtos de PCR amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em TBE 0.5X e corado com brometo de etídeo (10 mg/ml). Em seguida, as amostras foram enviadas para sequenciamento capilar, realizado no NPT-IAM, conduzido no equipamento ABI 3500xL

Genetic Analyser (Applied Biosystems®) com kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®).

## 9.5 ANÁLISE DOS DADOS

As sequências resultantes do sequenciamento capilar foram checadas quanto a qualidade no *software Codon Code Aligner v. 3.7.1*. (CodonCode Corporation, Dedham, MA). Neste mesmo *software* foi realizada a edição das sequências, foram gerados os alinhamentos dos *contigs* utilizando o algoritmo Clustal W, e foram gerados arquivos no formato FASTA, contendo as sequências de cada indivíduo avaliado, para cada gene estudado, separados por ano.

### 9.5.1 Diversidade genética

Para inferir sobre a diversidade genética dos genes foram avaliados os seguintes parâmetros: número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd), número médio de diferenças nucleotídicas (k) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), calculados no *software DnaSP versão 5.10.01* (LIBRADO; ROZAS, 2009). Neste mesmo *software* foram avaliados os testes de neutralidade, usando as estatísticas dos testes D de Tajima e  $F_s$  de Fu. Os parâmetros genéticos foram estimados por gene e dentro de cada gene para cada população, além disso as análises foram realizadas por ano. Através do *software DNAsp* também foram gerados os *inputs* para as análises realizadas no Arlequin (.hap e .arp -  $F_{st}$  e AMOVA) e PopART (.nex - redes de haplótipos).

Para fins de compreensão dos índices de diversidade genética, seguem os conceitos: sítios polimórficos (S): índice que informa o número de sítios que apresentam variação em relação ao fragmento total analisado, ou seja o número de sítios segregantes, demonstrando quanto aquele fragmento do gene pode ser variável; número de haplótipos (h): índice que informa o número total de haplótipos registrado em determinada população; diversidade haplotípica (Hd): índice que permite estimar a probabilidade de dois haplótipos amostrados dentro do grupo total serem diferentes entre si, corresponde a heterozigosidade para marcadores codominantes. O resultado deste parâmetro genético pode variar entre 0 e 1, portanto valores maiores e próximos a 1 representam maior diversidade entre os haplótipos/populações analisadas; número médio de diferenças nucleotídicas (k): índice que informa a média de nucleotídeos que diferem entre o grupo de sequências analisadas para uma determinada

população; diversidade nucleotídica ( $\pi$ ): índice que representa o número médio de diferenças por sítio entre duas sequências escolhidas ao acaso da amostra populacional.

### 9.5.2 Testes de neutralidade

O teste D de Tajima se baseia na diferença entre o número de sítios segregantes (S) e o número de diferenças nucleotídicas (k) entre pares de sequências (TAJIMA, 1989). Sob seleção purificadora D tende a ser menor que 0, e sob seleção balanceadora  $D > 0$ . Entretanto D também pode divergir de 0 e desviar da expectativa de neutralidade sob condições diversas com diferentes cenários demográficos, como expansão ou retração populacional. Neste caso, o teste de neutralidade  $F_s$  de Fu é bastante empregado para identificar estas situações e diferenciar do processo de seleção. Esse teste toma como base para o resultado a comparação entre o número de alelos observados em uma população e o número de alelos esperados (caso a população se mantivesse constante) (FU, 1997). Resultados com valores negativos e significativos podem ser atribuídos à seleção purificadora (ou a expansão populacional recente), enquanto valores positivos podem ser ligados à seleção balanceadora (ou contração populacional).

### 9.5.3 Diferenciação genética

Com o *software* Arlequin v. 3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) foi realizada a análise do *Fst* para as populações analisadas para cada gene, parâmetro genético que permite estimar o grau de diferenciação entre populações, a partir da variância das frequências alélicas. Esta análise foi feita comparando-se as diferentes populações de um mesmo ano (análise espacial) e comparando-se a mesma população nos dois anos de estudo (2010 e 2018 - análise temporal) para identificar se houve variação nas frequências alélicas temporalmente.

### 9.5.4 Rede de haplótipos

Para avaliar as relações entre os diferentes haplótipos observados nas populações para cada gene, e visualizar a frequência e distribuição destes haplótipos, foram geradas redes haplotípicas com a abordagem Median-Joining Networks (MJN), utilizando o *software* PopART versão 1.7 (LEIGH; BRYANT, 2015).

## **10 IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL PREFERENCIAL DE FONTE ALIMENTAR SANGUÍNEA DE FÊMEAS DA ESPÉCIE *C. quinquefasciatus* COLETADAS EM CINCO MUNICÍPIOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Esta seção do estudo trata da identificação molecular do perfil de preferência alimentar sanguínea de fêmeas da espécie *C. quinquefasciatus* coletadas em cinco municípios do estado de Pernambuco (Ipojuca, Olinda, Jaboatão, Recife e Santa Cruz do Capibaribe). Para a identificação molecular da fonte da alimentação sanguínea das fêmeas de mosquitos coletados foram realizados ensaios de PCR convencional com o gene *Cytb* como alvo, em seguida foi realizado sequenciamento capilar dos produtos de PCR e por fim, com as sequências obtidas, foi realizada submissão destas contra o banco de dados BLASTn-NCBI, para encontrar similaridade entre a sequência amplificada, proveniente do sangue ingerido pelas fêmeas, e as espécies depositadas no banco de dados online. A metodologia detalhada, bem como os resultados obtidos podem ser conferidos abaixo.

### **10.1 FÊMEAS DE *C. quinquefasciatus* UTILIZADAS NO ESTUDO DA PREFERÊNCIA ALIMENTAR**

As fêmeas foram coletadas em campo através de aspirações realizadas com auxílio de aspiradores entomológicos elétricos (Horst armadilhas), durante o desenvolvimento da pesquisa intitulada: “Avaliação de dois métodos de coleta para a vigilância de Arbovírus em mosquitos do gênero *Aedes* e *Culex*” (CAAE: 51012015.9.0000.5190 – anuência do CEP nos anexos), desenvolvida pela Dra. Rosângela Barbosa, que gentilmente cedeu os mosquitos para o desenvolvimento desta pesquisa.

As coletas foram realizadas no intradomicílio de casas pré-selecionadas, a partir de listagem de endereços coletados anteriormente, no ano de 2010, nos municípios supracitados e cedidos gentilmente pela Dra. Liliane Amorim, com o objetivo de avaliar comparativamente a preferência alimentar das fêmeas de *C. quinquefasciatus* ao longo do tempo. Juntamente as coletas de mosquito, também foram realizados levantamentos dos animais presentes nas casas, através de questionário apresentado pelo agente de coleta durante a visita. Os animais listados eram: gato, cachorro, cavalo, pato, ganso, porco, boi/vaca, galo/galinha, pássaro (gaiola), bode/cabra, cagado/tartaruga ou outros. O documento está nos anexos deste trabalho para apreciação.

Os bairros visitados em cada município estudado foram: Recife (Água Fria e Bomba do Hemetério), Olinda (Peixinhos, Vila Popular e Alto da Conquista), Ipojuca (Nossa Senhora do

Ó), Santa Cruz do Capibaribe (Cruz Alta), Jaboatão (Cavaleiro e Sucupira). Foram visitadas de 20 a 50 casas por município e as aspirações foram realizadas durante a manhã por período de 10 minutos por casa, em todos os cômodos. Em laboratório, as fêmeas ingurgitadas que apresentaram sangue visível em seu trato digestivo foram triadas e acondicionadas em microtubos secos identificados com informações das áreas de coleta, em *pools* de 5 indivíduos e armazenadas a -80°C.

## 10.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Foram selecionadas 25 fêmeas ingurgitadas de cada município, para cada ano de avaliação (2010 e 2018), apenas o município de Jaboatão não foi processado em 2010 por ausência de material armazenado. Ao todo foram processadas 225 fêmeas alimentadas, estas foram submetidas a extração de DNA individual utilizando o DNAzol® (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Após as extrações as amostras foram quantificadas em NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific) e armazenadas em freezer -20 C para posterior uso nas PCRs.

## 10.3 PCR DO GENE *cytb*

As PCRs foram feitas utilizando Taq DNA Polymerase High Fidelity (5U/μl), MgSO<sub>4</sub> 1mM, dNTP 1X, *primers* (F e R) e tampão de PCR 10X. Os *primers* do gene mitocondrial *Cytb* (L14841 5'AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGA-AA3' e H15149 5'AAACTGCAGCCCCTCAGAATG-ATATTTGTCCTCA3'), usados neste trabalho para identificação da preferência alimentar sanguínea amplificam um fragmento de 358 pb, e foram descritos por Kocher e colaboradores (T. D. KOCHER, W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. PAABO, F. X. VILLABLANCA, 1989). Os marcadores moleculares baseados em DNA mitocondrial apresentam herança apenas de origem materna, sendo bastante utilizados para solucionar questões taxonômicas, como a identificação de espécies utilizadas como fonte de alimentação sanguínea por fêmeas hematófagas.

A PCR foi conduzida no equipamento Mastercycler® nexus X2 gradient thermal cycler (Eppendorf), localizado no laboratório do departamento de Entomologia - IAM. Os produtos de PCR amplificados foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose 1%, corridos em TBE 0.5X e corado com brometo de etídeo (10 mg/ml). As amostras, após a diluição, foram enviadas ao sequenciamento capilar, realizado no NPT-IAM, conduzido no equipamento ABI 3500xL Genetic Analyser (Applied Biosystems®) com kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®).

#### 10.4 ANÁLISE DOS DADOS

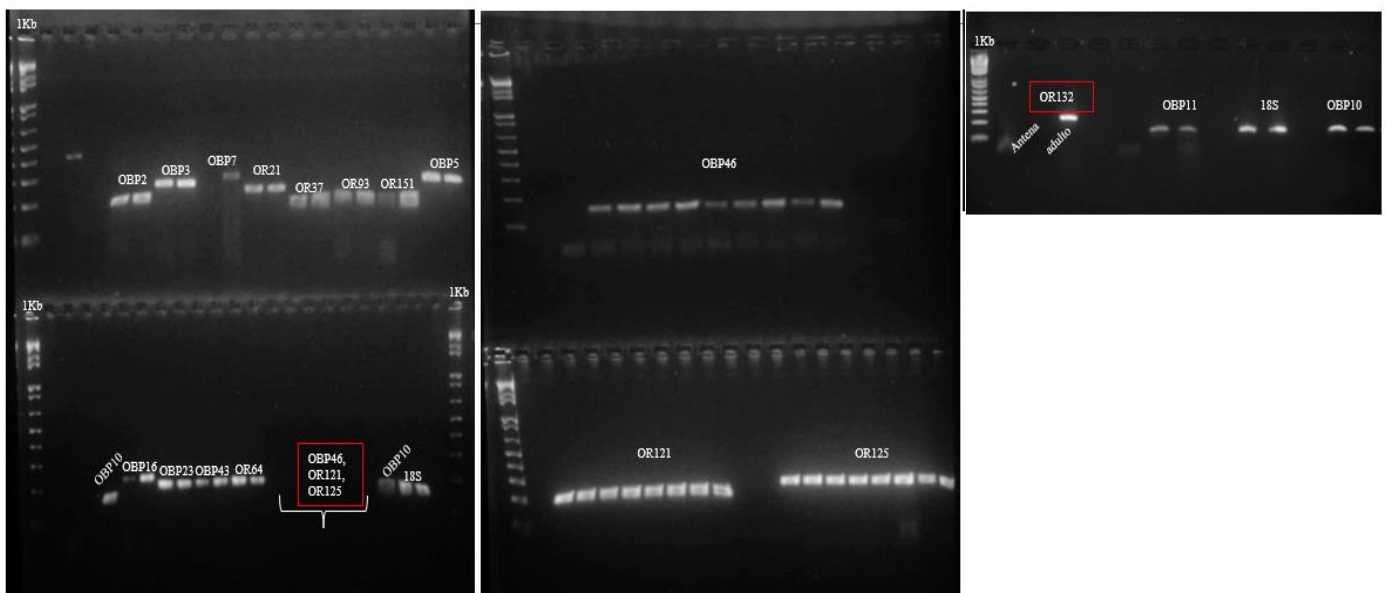
As sequências obtidas no sequenciamento capilar foram analisadas no *software CodonCode Aligner* v. 3.7.1. (CodonCode Corporation, Dedham, MA) para montagem das sequências consenso e submetidas ao banco de dados BLASTn-NCBI, para que a espécie correspondente ao sangue presente no abdômen das fêmeas avaliadas pudesse ser identificada. Para visualização da percentagem de fontes alimentares sanguíneas identificadas foi construído gráfico em forma de pizza através do *software GraphPad Prism* 8, aplicando a análise partes do todo (fração do total dos dados).

## 11 RESULTADOS

### 11.1 RESULTADOS DA PCR CONVENCIONAL E SEQUENCIAMENTO CAPILAR DOS GENES *ORS* E *OBPS*

A avaliação funcional dos *primers* por PCR convencional resultou em 16 *amplicons*, a partir dos 10 pares de *primers* de *OBPs* e 7 pares de *primers* dos *ORs* desenhados e testados com DNA de antenas de fêmeas. Os genes *CquiOBP46*, *CquiOR121* e *CquiOR125* não apresentaram amplificação em primeiro ensaio, então buscou-se realizar PCR convencional com gradiente de Temperatura (°C) e observou-se amplificação destes genes em todas as temperaturas testadas (*range* entre 55,1°C a 61,7°C). Foi observada amplificação tecido específica nas antenas para os 10 genes *OBPs* avaliados e 7 dos 8 genes *ORs*, com exceção do gene *CquiOR132* descartado nesta etapa. O gene *18S* apresentou amplificação esperada em todos os testes. A PCR convencional para todos os *primers* foi realizada sob as mesmas condições experimentais. (Figura 20).

Figura 20 – Amplificação dos *primers ORs* e *OBPs* alvos para avaliação funcional por PCR convencional



Fonte: A autora.

Legenda: Os 18 pares de *primers* foram avaliados por PCR convencional em dois tipos de amostra: *pools* de antenas de fêmeas (100 pares) e fêmeas inteiras individuais. Para cada *primer* foram observadas duas bandas, cada banda referente a um dos dois tipos de amostras avaliadas (antena e fêmea inteira). O marcador de peso molecular usado foi 1kb *plus DNA Ladder* (Invitrogen). O controle das reações foi o gene endógeno *18S*.

As sequências gênicas resultantes do sequenciamento capilar foram avaliadas através de *BLASTn*, havendo identidade compatível entre as sequências amplificadas e as sequências da espécie *C. quinquefasciatus* depositadas no banco de dados online, entre 94% e 100% (Quadro 4). Por fim, 17 genes quimiossensoriais seguiram para as análises por RT-PCR.

Quadro 4 – Genes alvos do estudo e porcentagem de identidade com as sequências do banco de dados do NCBI, através de *Blastn*

<b>Gene</b>	<b>Identidade <i>Blastn</i></b>
<i>CquiOR125</i>	95%
<i>CquiOR64</i>	99%
<i>CquiOR93</i>	94%
<i>CquiOR151</i>	97%
<i>CquiOR121</i>	97%
<i>CquiOR2</i>	96%
<i>CquiOR37</i>	99%
<i>CquiOBP10</i>	100%
<i>CquiOBP43</i>	97%
<i>CquiOBP16</i>	100%
<i>CquiOBP46</i>	98%
<i>CquiOBP23</i>	99%
<i>CquiOBP7</i>	98%
<i>CquiOBP3</i>	97%
<i>CquiOBP5</i>	100%
<i>CquiOBP2</i>	100%
<i>CquiOBP11</i>	98%

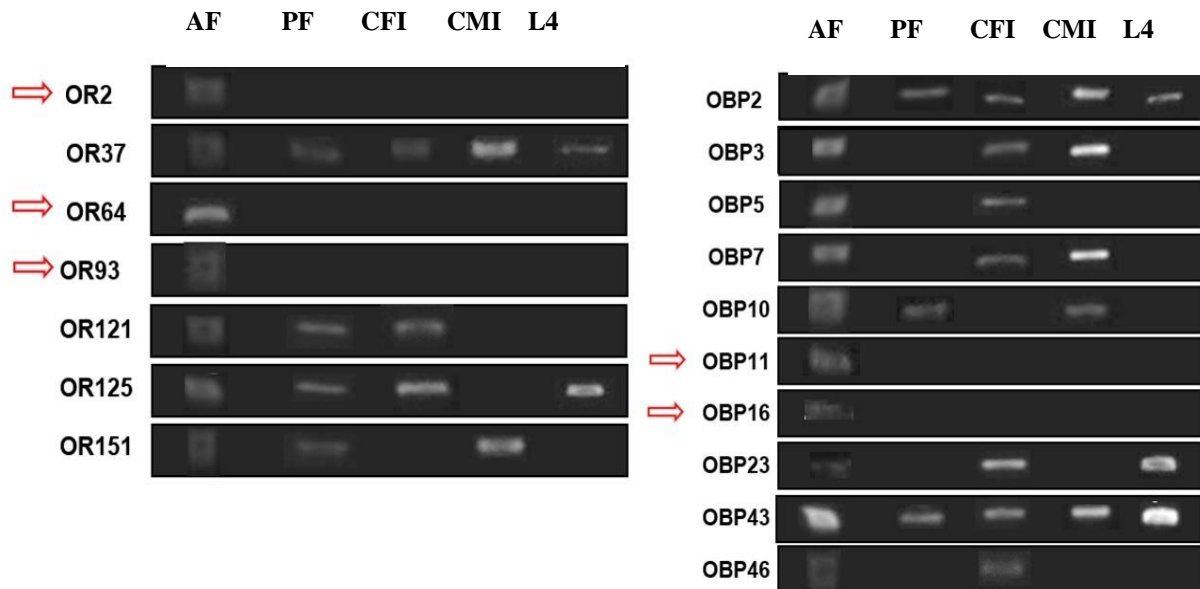
Fonte: A autora

## 11.2 RESULTADOS DOS ENSAIOS DE RT-PCR

Dezessete genes foram avaliados por RT-PCR, 7 *ORs* e 10 *OBPs*. Em antenas de fêmeas foram detectados transcritos de todos os genes alvos, dentre estes, cinco apresentaram transcrição específica em antenas: *CquiOR2*, *CquiOR64*, *CquiOR93*, *CquiOBP11*, *CquiOBP16* (Figura 21). Os demais genes foram detectados entre todas as amostras analisadas: *CquiOBP2*, *CquiOBP3*, *CquiOBP5*, *CquiOBP7*, *CquiOBP10*, *CquiOBP23*, *CquiOBP43*, *CquiOBP46*, *CquiOR37*, *CquiOR121*, *CquiOR125*, *CquiOR151*.



Figura 21 – Amplificação de transcritos dos genes *ORs* e *OBPs* entre os perfis amostrais por RT-PCR



Fonte: A autora.

Legenda: 17 genes foram avaliados por RT-PCR através de 5 tipos amostrais diferentes: AF: Antenas de fêmeas; PF: Patas de fêmeas; CFI: Corpo de fêmea incompleto; CMI: Corpo de macho inteiro; L4: larvas em estágio L4. Foi observada amplificação específica nas antenas para 5 dos 17 genes, evidenciados pelas setas vermelhas. Os demais 12 genes amplificaram de forma randômica entre as amostras avaliadas. A RT-PCR foi conduzida sob as mesmas condições experimentais para todos os genes. Imagem construída, apresentando as bandas referentes aos genes estudados, amplificadas em cada tecido avaliado por RT-PCR.

### 11.3 RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DOS *PRIMERS* DOS GENES ALVO POR RT-qPCR EM QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA

Foram avaliados nove genes por quantificação absoluta e como resultado foram obtidas as concentrações de RNA e *primer* a serem utilizadas nos experimentos de RT-qPCR em quantificação relativa, como pode ser conferido no Quadro 5. Após os testes, foram selecionados apenas os *primers* com eficiência acima de 95%, sendo por este motivo o grupo de genes alvos reduzido para seis, mais o *18S*.

Quadro 5 – Genes alvo do estudo após validação por RT-qPCR, concentração ideal de *primer*, RNA e eficiência dos *primers*.

Genes	Concentração ideal de <i>primer</i>	Concentração ideal de RNA	Eficiência
<i>18S</i>	0,4 $\mu$ M	10 ng	99,9%
<i>CquiOBP2</i>	0,4 $\mu$ M	10 ng	106%
<i>CquiOBP5</i>	0,4 $\mu$ M	10 ng	113%
<i>CquiOBP11</i>	0,4 $\mu$ M	10 ng	99,6%.
<i>CquiOBP10</i>	0,4 $\mu$ M	10 ng	103%
<i>CquiOR93</i>	0,4 $\mu$ M	10 ng	115%
<i>CquiOR2</i>	0,4 $\mu$ M	10 ng	115%

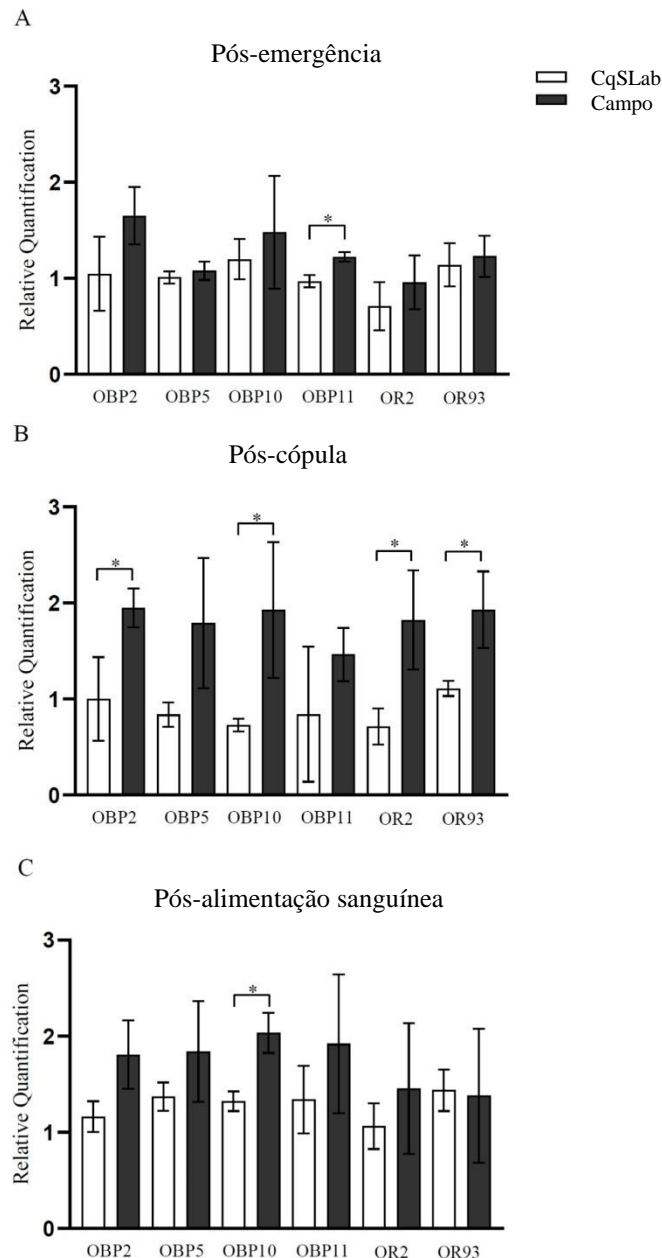
Fonte: A autora

#### 11.4 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES ALVO EM DIFERENTES ESTADOS FISIOLÓGICOS POR RT-qPCR

Os genes de estudo foram avaliados através de quantificação relativa, com a finalidade de observar a expressão diferencial destes em relação a três estados fisiológicos aos quais as fêmeas da espécie *C. quinquefasciatus* foram submetidas. A avaliação foi realizada também comparando a expressão destes genes entre duas populações da espécie: CqSLab e campo.

Entre os seis genes estudados, foi possível observar no estado fisiológico pós-emergência o aumento de expressão significativo para o gene *CquiOBP11* ( $p < 0.05$ ) em antenas de fêmeas de campo, comparadas a amostras de laboratório (Figura 22 A). Aumento de expressão significativo ( $p < 0.05$ ) também foi observado em amostras de antenas de fêmeas de campo comparadas as amostras de laboratório no estado fisiológico pós-cópula para quatro genes: *CquiOBP2*, *CquiOBP10*, *CquiOR2* e *CquiOR93* (Figura 22 B). Para as amostras coletadas de fêmeas após alimentação sanguínea, observou-se aumento de expressão significativo em amostras de campo, comparadas as amostras de laboratório, para o gene *CquiOBP10* ( $p < 0.05$ ) (Figura 22 C).

Figura 22 – Expressão diferencial dos genes de estudo em antenas de fêmeas de *C. quinquefasciatus* em diferentes estados fisiológicos



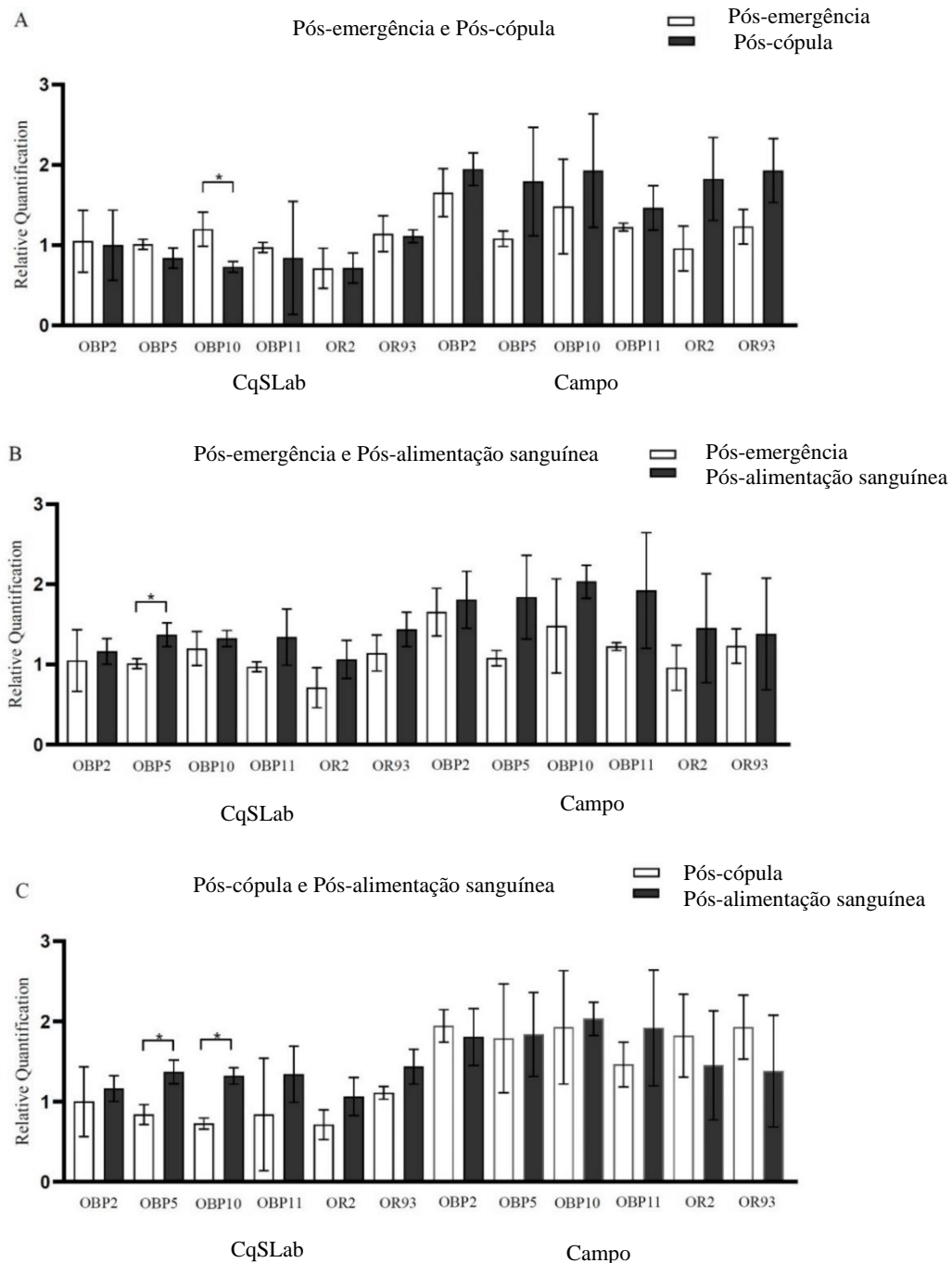
Fonte: A autora.

Legenda: Genes *CquiOBP2*, *CquiOBP5*, *CquiOBP10*, *CquiOBP11*, *CquiOR2* e *CquiOR93* avaliados por quantificação relativa através de RT-qPCR em amostras obtidas de antenas de fêmeas de *C. quinquefasciatus* em três estados fisiológicos: pós-emergência, pós-cópula e pós-alimentação sanguínea. Cada estado fisiológico está representado em um gráfico exclusivo. Em cada gráfico as barras brancas correspondem a CqSLab e as barras em preto correspondem a amostras de campo. A expressão dos genes foi normalizada com o gene de endógeno 18S. Genes que demonstraram expressão diferencial significativa entre as populações avaliadas estão sinalizadas por \* ( $p < 0.05$ ).

Quando realizada a avaliação comparativa entre os estados fisiológicos foi observado que dois genes (*CquiOBP5* e *CquiOBP10*) apresentaram resultados significativos ( $p < 0.05$ ). Entre amostras de CqSLab, avaliadas entre os estados fisiológicos pós-emergência e pós-cópula, o gene *CquiOBP10* foi observado com redução significativa de sua expressão ( $p < 0.05$ ) em amostras coletadas após a cópula (Figura 23 A). Avaliando a comparação entre os estados fisiológicos pós-emergência e pós-alimentação sanguínea, observou-se que o gene *CquiOBP5* apresentou aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de sua expressão em amostras de antenas de fêmeas após a alimentação sanguínea (Figura 23 B). Por fim, avaliando amostras após a cópula em comparação a amostras após a alimentação sanguínea foi possível observar para antenas de fêmeas de CqSLab o aumento significativo ( $p < 0.05$ ) da expressão dos genes *CquiOBP5* e *CquiOBP10* em amostras de fêmeas de laboratório após o repasto sanguíneo. (Figura 23 C).

Apesar de ser notável o aumento da expressão dos 6 genes em amostras de campo para a maioria das comparações entre estados fisiológicos, não houve resultados significativos para esta população (Figura 23 A-C).

Figura 23 – Gráficos gerados a partir de ensaios de RT-qPCR apresentando expressão diferencial para todos os genes estudados.



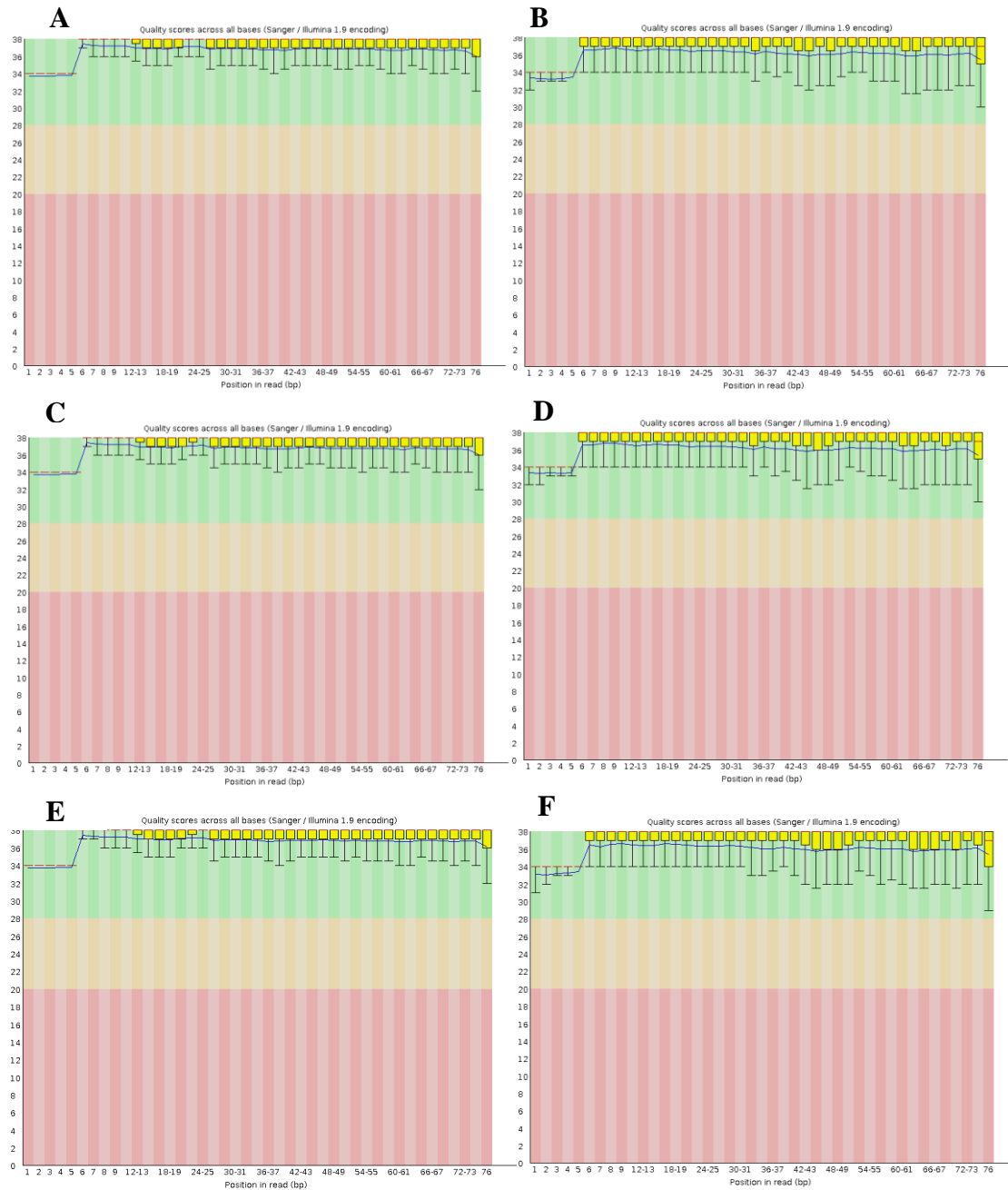
Fonte: A autora.

Legenda: A) *CquiOBP10* foi *downregulated* em amostras de antenas de fêmeas CqSLab pós-cópula, comparadas com amostras pós-emergência ( $p < 0,05$ ). B) *CquiOBP5* foi *upregulated* no estágio pós-alimentação sanguínea de antenas fêmeas CqSLab quando comparado com amostras coletadas pós-emergência ( $p < 0,05$ ). C) Ambos os genes foram expressos em níveis significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em antenas de fêmeas pós-alimentação sanguínea, em comparação com pós-cópula na colônia CqSLab. As barras indicam o desvio padrão. Resultados estatisticamente significativos: \* $p < 0,05$ .

### 11.5 RESULTADO DAS ANÁLISES TRANSCRIPTÔMICAS DE ANTENAS DE FÊMEAS DE *C. quinquefasciatus* APÓS A CÓPULA DAS COLÔNIAS CQSLAB E CAMPO, POR RNAseq

A análise do transcriptoma das antenas de fêmeas pós-cópula de *C. quinquefasciatus* permitiu avaliar a expressão diferencial de genes entre CqSLab e Campo. Através das ferramentas *FastQC* e *Trimmomatic* foram avaliados parâmetros de qualidade das sequências, os gráficos relativos à qualidade dos *reads* após a trimagem podem ser vistos na figura 24 para as amostras de campo e na figura 25 para as amostras CqSLab.

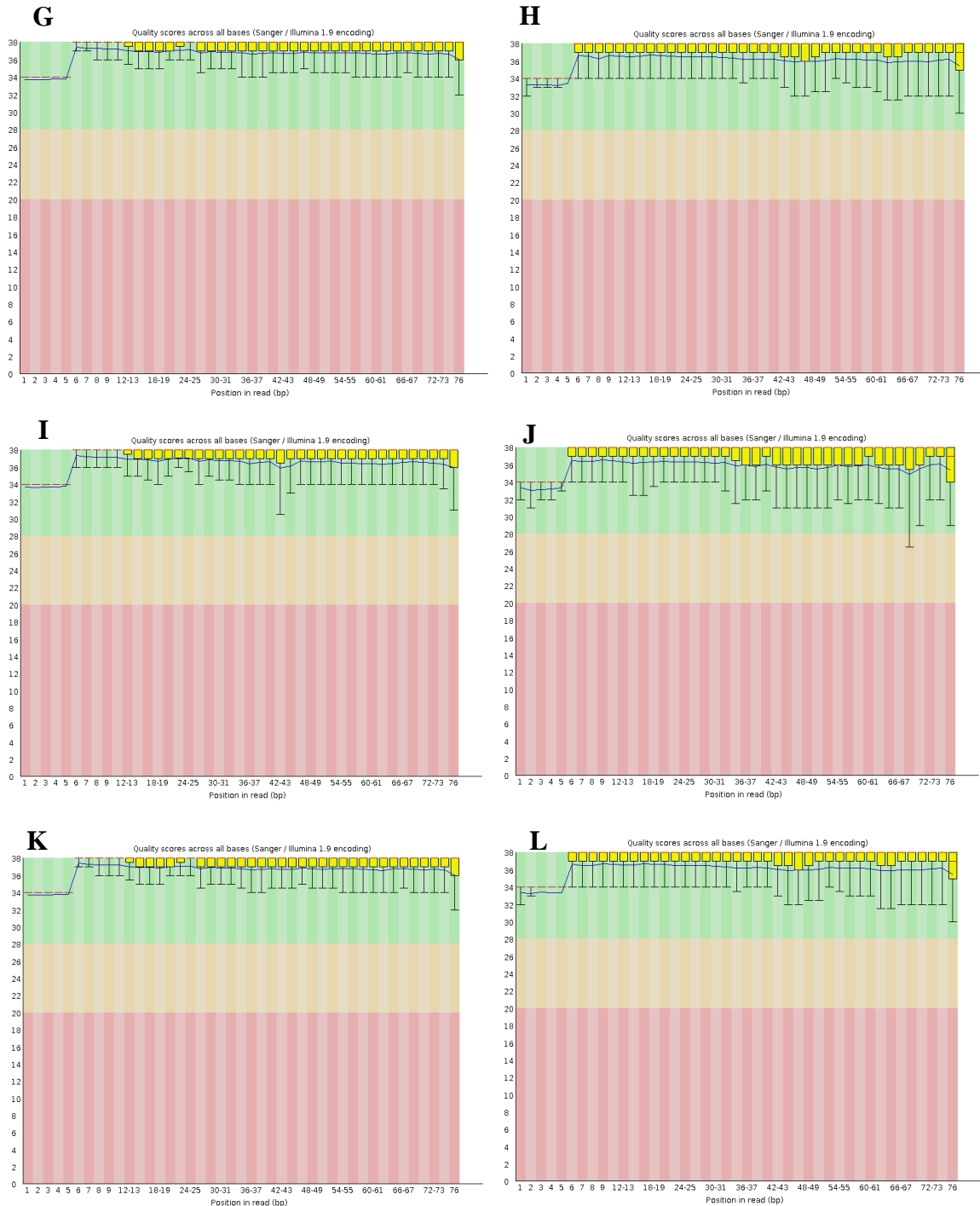
Figura 24 – Qualidade das *reads* após trimagem, obtida através do *FastQC*, das amostras de antenas de fêmeas de *C. quinquefasciatus* da população de campo.



Fonte: A autora.

Legenda: A) amostra 1 Campo *foward*; (B) amostra 1 Campo *reverse*; (C) amostra 2 Campo *foward*; (D) amostra 2 Campo *reverse*; (E) amostra 3 Campo *foward*; (F) amostra 3 Campo *reverse*. As cores presentes nos gráficos (verde, laranja e rosa) correspondem a um *range* de valor de *phred*, alcançado pelas sequências geradas através do RNAseq. Em verde são demonstradas sequências com *phred* >28, em laranja sequências com *phred* entre > 20 e < 28, e em rosa sequências com *phred* < 20.

Figura 25 – Qualidade das *reads* após trimagem, obtida através do *FastQC*, das amostras de antenas de fêmeas de *C. quinquefasciatus* da população CqSLab.



Fonte: A autora.

Legenda: G) amostra 4 Lab *foward*; H) amostra 4 Lab *reverse*; I) amostra 5 Lab *foward*; J) amostra 5 Lab *reverse*; K) amostra 6 Lab *foward*; L) amostra 6 Lab *reverse*. As cores presentes nos gráficos (verde, laranja e rosa) correspondem a um *range* de valor de *phred*, alcançado pelas sequências geradas através do RNAseq. Em verde são demonstradas sequências com *phred* >28, em laranja sequências com *phred* entre > 20 e < 28, e em rosa sequências com *phred* < 20.



### 11.6 RESULTADO DOS ALINHAMENTOS E CONTAGEM DE *reads*

O total de *reads* mapeadas contra o genoma de referência (*Culex quinquefasciatus* – Johannesburg) em amostras de campo foi de 6,6 milhões (59,3%). Em amostras de mosquitos da colônia CqSLab foram mapeadas cerca de 4,7 milhões de *reads* (79,2%). A taxa de mapeamento único das *reads* contra os transcritos totais de *C. quinquefasciatus* foi de 46,8% para mosquitos de campo e de 55,2% para os de laboratório. A taxa de mapeamento múltiplo foi de 12,5% para campo, para amostras de CqSLab foi de 23,9%. As *reads* não mapeadas tiveram valores de 8,9% para amostras de campo e 15,9% para as amostras de CqSLab (Tabela 1).

Tabela 1 - Mapeamento das bibliotecas de Campo e CqSLab

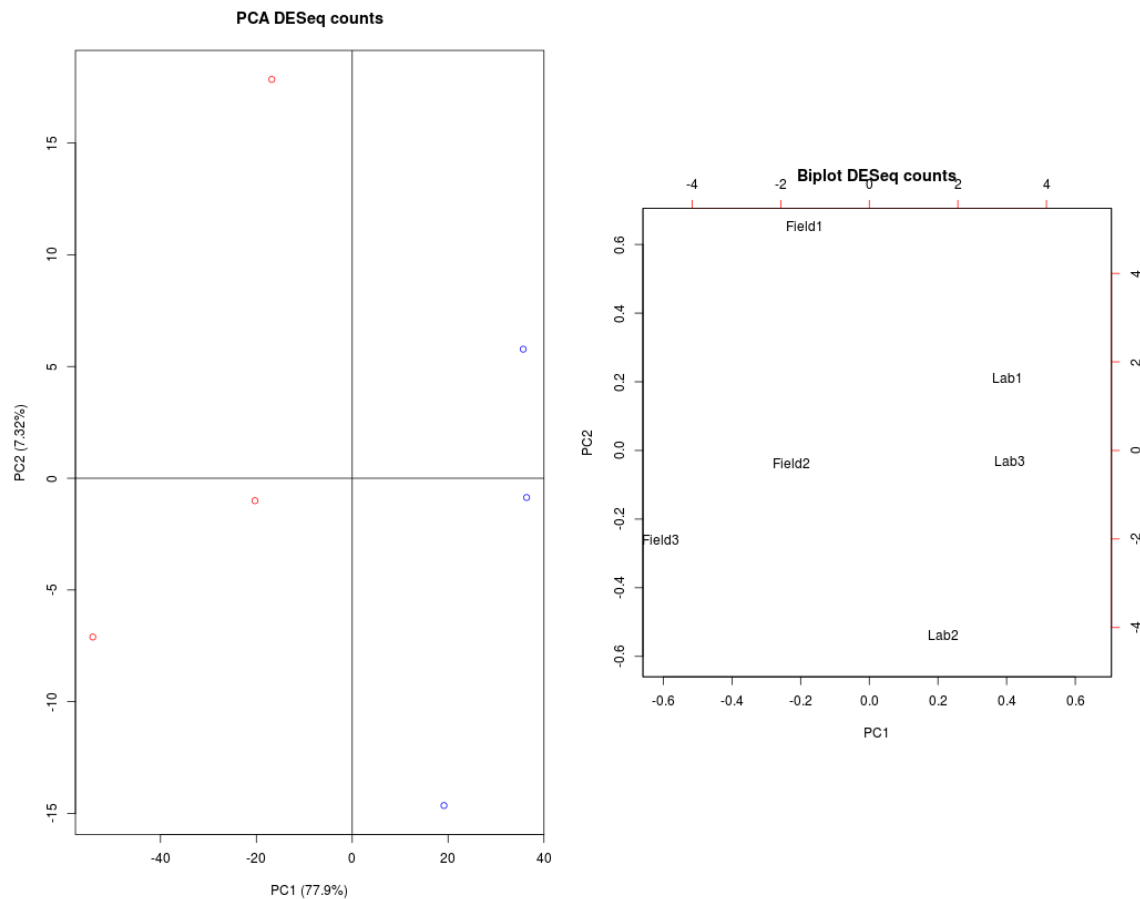
	Campo		CqSLab	
	N° de <i>reads</i>	%	N° de <i>reads</i>	%
<b>Total de <i>reads</i></b>	11.186.806		6.031.263	
<b>Total de <i>reads</i> mapeadas</b>	6.642.468	59,3%	4.779.580	79,2%
<b>Mapeamento único</b>	5.243.615	46,87%	3.334.114	55,2%
<b>Mapeamento múltiplo</b>	1.398.853	12,5%	1.445.466	23,9%
<b>Não mapeadas</b>	1.004.075	8,9%	962.597	15,9%

Fonte: A autora

### 11.7 RESULTADO DA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL

Para avaliar as semelhanças e possíveis diferenças entre as réplicas biológicas utilizadas para cada população estudada, além de determinar se estas poderiam ser agrupadas, foi gerado um gráfico de dispersão espontânea das amostras, através da análise de componentes principais (PCA). Observou-se a formação de dois grupos diferentes, compostos pelas três réplicas biológicas de cada população estudada (CqSLab e Campo), estando as réplicas de cada grupo próximas entre si e os grupos separados em lados opostos (Figura 26).

Figura 26 - Análise de componentes principais (PCA) das réplicas biológicas de amostras de Campo e CqSLab

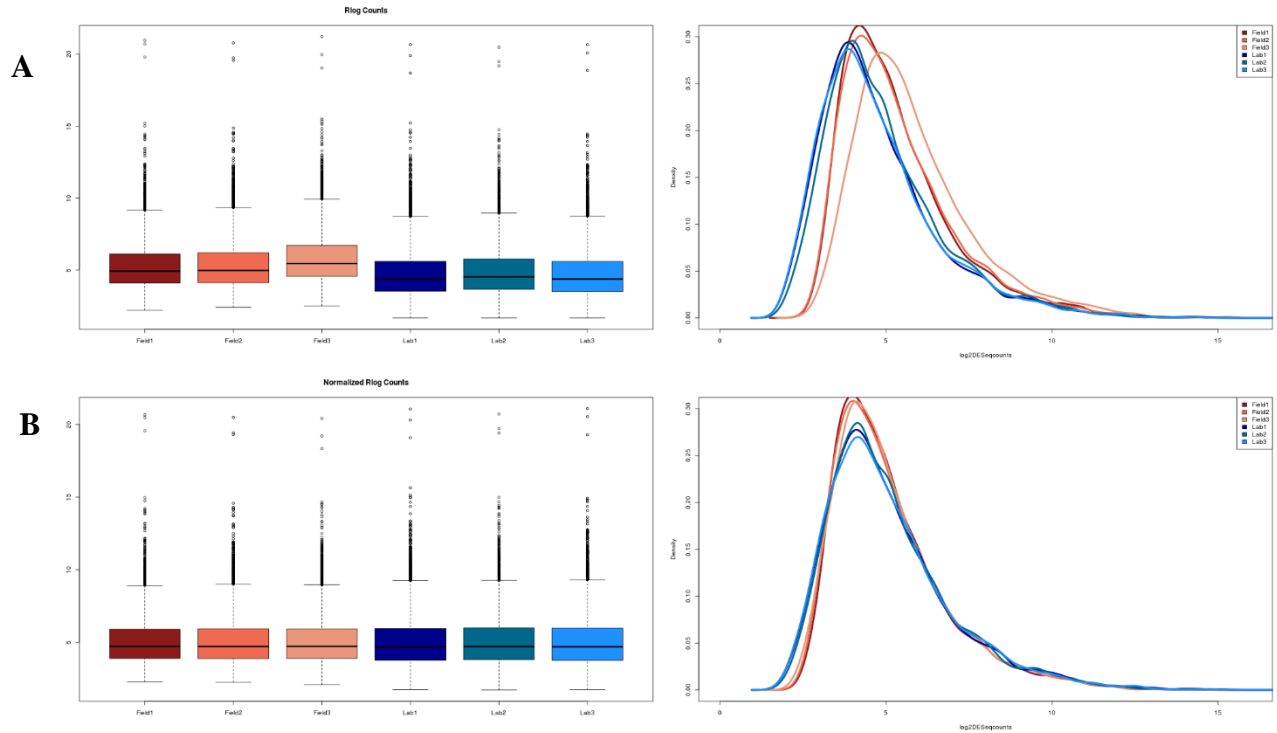


Fonte: A autora

Legenda: Em representação gráfica *PCA DESeq counts* as réplicas de campo são representadas por círculos vermelhos, quadrantes a esquerda, e as réplicas de CqSLab são representadas por círculos azuis, quadrantes a direita. Em representação *Biplot DESeq counts* as réplicas de campo são designadas como *Field* 1, 2 e 3. Enquanto as réplicas CqSLab são designadas como Lab 1, 2 e 3

Foi obtido o total de 5.914 genes, mapeados contra o genoma de *C. quinquefasciatus*. As bibliotecas foram normalizadas através do pacote DESeq2, com o intuito de realizar as análises de expressão diferencial. O resultado da normalização pode ser observado na figura 27.

Figura 27 - Normalização das bibliotecas de cDNA das populações CqSLab e Campo de *C. quinquefasciatus*



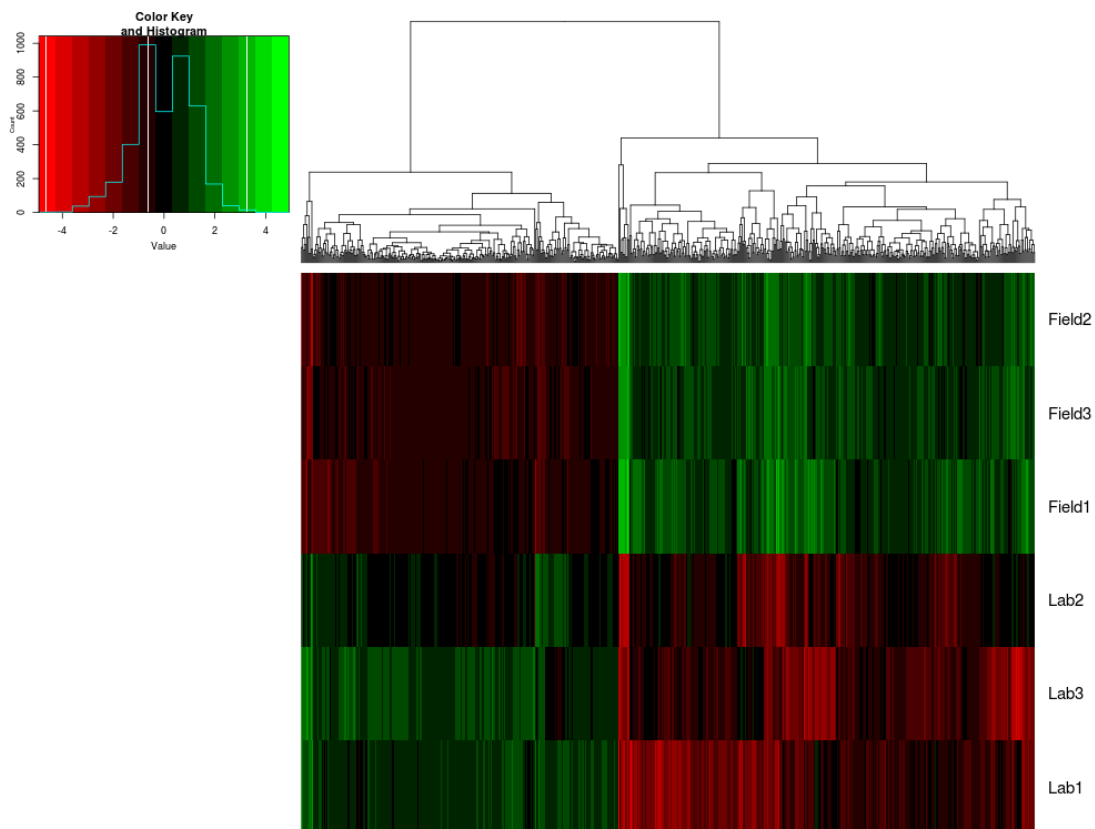
Fonte: A autora.

Legenda: A) Bibliotecas antes da normalização. B) Bibliotecas após a normalização

Quanto aos resultados de expressão gênica, observou-se através do *heatmap* um padrão exclusivo de expressão para cada uma das populações estudadas, Campo (Field 1, 2 e 3) e CqSLab (Lab 1, 2 e 3) (Figura 28).

Utilizando a população CqSLab como referência e a população de Campo como teste, foram mapeados 386 genes superexpressos em Campo, com valor absoluto de  $(\text{Log}_2) \text{FC} \geq 1$  e 294 genes subexpressos com  $(\text{Log}_2) \text{FC} \leq -1$ . No total, 5.234 genes não apresentaram diferenças de expressão entre as populações estudadas (entre -1 e 1) (Figura 29), com  $\text{padj} \leq 0.05$ .

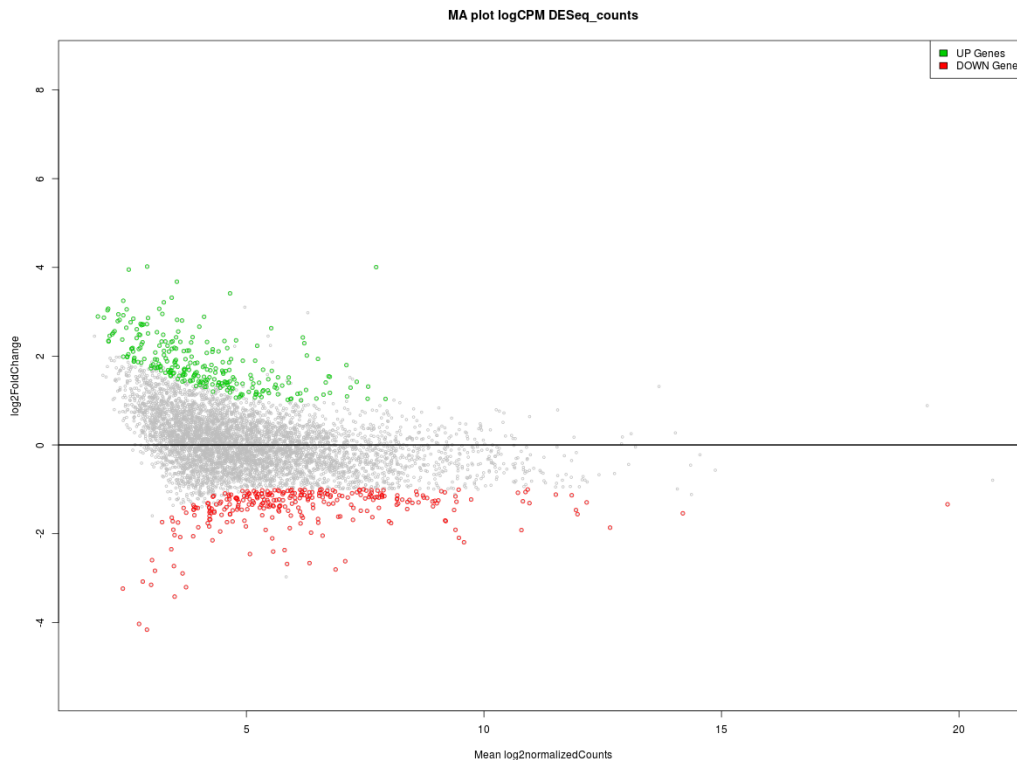
Figura 28 - *Heatmap* do perfil de expressão gênica das populações CqSLab e Campo de *C. quinquefasciatus*



Fonte: A autora

Legenda: Em vermelho são representados os genes reprimidos tanto em campo (Field 1, 2 e 3) quanto em CqSLab (Lab 1, 2 e 3). Em verde são representados os genes induzidos para as duas populações

Figura 29 - Representação gráfica em MA plot da distribuição dos genes expressos na população de Campo de *C. quinquefasciatus*



Fonte: A autora

Legenda: Nesta representação gráfica de distribuição de genes MA plot, cada pequeno círculo corresponde a um gene. Em verde são representados 386 genes superexpressos ( $cutoff > 1$ ); em cinza estão representados 5.234 genes sem diferença de expressão (entre -1 e 1), e em vermelho estão plotados 294 genes subexpressos ( $cutoff < -1$ )

## 11.8 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Muitos dos genes mapeados como diferencialmente expressos (DE) neste estudo, estão descritos na base de dados *online VectorBase* como não caracterizados. Para complementar a identificação destes genes foi realizada uma anotação manual, utilizando o código de acesso gênico em outros bancos de dados *online*, mencionados a seguir: UniProt, KEGG, NCBI-BLASTp, Pfam, InterPro e Phyre2. A partir desta busca ativa foi possível identificar dentre os nossos resultados mais de 90% dos genes que até o momento constam no *Vectorbase* como *hypothetical proteins*.

Após a complementação da identificação dos genes, foi realizada análise da lista de genes DE, encontrada na condição pós-cópula para população de campo em relação a população CqSLab, e obtida no ensaio de RNAseq. Foi possível observar um grupo de 34 genes com

(Log<sub>2</sub>) FC ≥ 4. Para melhor avaliação dos genes superexpressos foi construída uma tabela contendo a descrição do gene, seu valor de (Log<sub>2</sub>) FC, bem como o valor de p ajustado (padj), detalhes que podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 – Genes selecionados entre os superexpressos como os mais induzidos, encontrados em fêmeas de *C. quinquefasciatus*, após-cópula, em uma população de campo.

Nº	Gene	Descrição	(Log <sub>2</sub> ) FC	padj
1	CPIJ013879-RA	DNA polymerase theta	4.00	0.00
2	CPIJ007145-RA	Neurobeachin	4.04	0.00
3	CPIJ003470-RA	Cuticle protein	4.01	0.00
4	CPIJ011255-RA	metal binding protein	4.38	0.00
5	CPIJ003257-RA	oxidative stress-induced growth inhibitor 1	4.13	2.26
6	CPIJ002149-RA	Phenylalanine hydroxylase	4.18	0.00
7	CPIJ005194-RA	Laminin gamma-3 chain	4.26	0.00
8	CPIJ018356-RA	Guanylate-kinase-associated protein (GKAP) protein	4.41	0.01
9	CPIJ017763-RA	juvenile hormone esterase precursor	4.60	0.00
10	CPIJ014435-RA	Hydrolase	4.65	0.00
11	CPIJ012020-RA	Serine protease	4.73	0.00
12	CPIJ003615-RA	Salivary protein	4.91	0.00
13	CPIJ003030-RA	adult cuticle protein, putative	5.17	0.00
14	CPIJ015944-RA	d7 protein	5.22	0.00
15	CPIJ009101-RA	cuticle protein	5.34	0.00
16	CPIJ039823-RA	BTB domain-containing protein	5.48	0.00
17	CPIJ017875-RA	hypothetical protein	5.51	0.00
18	CPIJ003362-RA	Odd Oz protein	5.59	3.31
19	CPIJ016715-RA	Insect cuticle protein	5.64	0.00
20	CPIJ003476-RA	Cuticle protein	5.83	0.00
21	CPIJ013761-RA	Larval cuticle protein A3A	5.84	0.00
22	CPIJ004293-RA	cuticle protein, putative	5.92	0.00
23	CPIJ017620-RA	A-kinase anchor protein 14	6.06	0.00
24	CPIJ016655-RA	Cuticle protein CPCFC	6.16	1.95
25	CPIJ009098-RA	cuticle protein 16.5	6.23	1.66
26	CPIJ004288-RA	cuticle protein 7	6.27	5.01
27	CPIJ017876-RA	cuticle protein	6.38	5.02
28	CPIJ002799-RA	cuticle protein LPCP-23	6.41	2.89
29	CPIJ003477-RA	adult cuticle protein 1	6.95	2.68
30	CPIJ009207-RA	proline-rich protein 4	7.16	1.61
31	CPIJ008231-RA	Insect cuticle protein 8	7.22	1.01
32	CPIJ018582-RA	cuticle protein 8	7.52	5.93
33	CPIJ004287-RA	cuticle protein 21	7.62	1.30
34	CPIJ017874-RA	histidine-rich protein PFHRP-II	8.55	1.17

Fonte: A autora

Na tabela 2 de genes superexpressos com maiores valores de (Log<sub>2</sub>) FC em fêmeas de campo avaliadas após a cópula, foram observados 16 genes envolvidos no espessamento da cutícula dos insetos adultos, três estão entre os genes mais expressos (CPIJ008231 = *insect cuticle protein 8*, CPIJ018582 = *cuticle protein 8* e CPIJ004287 = *cuticle protein 21*).

Na lista completa de genes DE foram observados múltiplos genes P450 superexpressos (CPIJ009478= *cytochrome P450 4D42*, CPIJ011837= *cytochrome P450 325V2*, CPIJ008937= *cytochrome P450 4H36*, CPIJ017014= *cytochrome P450 6AG14*, CPIJ005954= *cytochrome P450 6CC2*, CPIJ004411= *cytochrome P450 6Z12*, CPIJ005955= *cytochrome P450 6P14*, CPIJ005959= *cytochrome P450 6AA7*). Estes genes estão relacionados a resistência a inseticidas químicos em mosquitos, por exemplo, os piretróides. De acordo com (YANG et al., 2021), a superexpressão destes genes confere altos níveis de resistência a inseticidas em populações de mosquitos. Com base nestes achados e junto a superexpressão de genes de espessamento cuticular, pode-se sugerir que as populações de *C. quinquefasciatus* de campo podem estar desenvolvendo algum nível de resistência a inseticidas.

O primeiro gene desta lista resumida (CPIJ013879= *DNA polymerase theta*) é caracterizado como precursor de uma proteína ligada diretamente a atividade da DNA polimerase *theta*, proteína que está envolvida no processo de replicação de DNA e necessária para a estabilidade do genoma (BRAMBATI; BARRY; SFEIR, 2020).

Dois genes precursores de proteínas pertencentes a família das proteínas salivares (CPIJ003615= *Salivary protein* e CPIJ015944= *D7 protein*) foram observados nesta lista. Estes genes apresentaram respectivamente os valores de (Log<sub>2</sub>) FC de 4.9 e 5.22 (*cutoff* = 1). As proteínas salivares são caracterizadas como os mais abundantes antígenos presentes nas glândulas salivares de fêmeas de mosquito de espécies hematófagas, como *C. quinquefasciatus*. A família D7 especificamente, é expressa apenas em fêmeas adultas de mosquito e os membros desta família demonstram um papel de grande importância em eventos inibitórios de resposta do organismo do hospedeiro vertebrado durante a hematofagia, tais como inibição da agregação plaquetária, da coagulação sanguínea e de respostas inflamatórias. Este achado foi bastante interessante, pois demonstra a superexpressão de genes envolvidos no processo de alimentação sanguínea, comportamento subsequente a cópula na espécie *C. quinquefasciatus*, sugerindo uma preparação do organismo destas fêmeas em relação a transcrição de genes ligados à sua próxima atividade comportamental.

Na lista completa de genes superexpressos em fêmeas de campo com  $(\text{Log}_2) \text{FC} \geq 1$ , foram observados genes precursores de proteínas quimiossensoriais, responsáveis pela identificação de moléculas odorantes (*ORs*) e carregamento destas moléculas (*OBPs*) através da linfa das sensilas. Os genes observados foram CPIJ016948= *OBP9*, CPIJ013976= *OBP10* e CPIJ004152= *OR30*.

O gene *OBP10* ( $\text{Log}_2 \text{FC} = 2.63$ ) foi observado nos ensaios de RT-qPCR mais expresso em antenas de fêmeas de campo, quando comparadas as amostras de CqSLab, com resultados significativos ( $p < 0.05$ ) para amostras avaliadas após a cópula e após alimentação sanguínea, sugerindo que este gene pode estar envolvido com o transporte de moléculas odorantes relacionadas a busca do hospedeiro vertebrado como fonte de alimentação sanguínea e/ou busca por locais de oviposição.

Quanto aos genes subexpressos, foram observados 29 genes com  $(\text{Log}_2) \text{FC} \leq -2$ , e para melhor avaliá-los foi construída tabela resumida contendo informações sobre descrição, valor de Log e valor de p ajustado ( $\text{padj} \leq 0.05$ ) (Tabela 3).

O gene mais reprimido da lista foi o *Synaptic vesicle protein* (CPIJ011542) com  $(\text{Log}_2) \text{FC} = -5.43$ , gene precursor de proteínas relacionadas ao transporte transmembrana, proteínas estas caracterizadas como componentes integrais de membrana. De acordo com informações presentes no banco de dados *online Pfam*, estas proteínas pertencem a família de proteínas transmembrana que auxiliam no transporte da glucose, fonte de energia para as células, participando ativamente do processo chamado de difusão facilitada.

Entre os genes subexpressos está o receptor odorante *OR53* (CPIJ005399),  $(\text{Log}_2) \text{FC} = -2.89$ , gene quimiossensorial pertencente à família dos receptores olfatórios, proteínas transmembrana localizadas na membrana dos Neurônios Receptores Olfatórios (*ORNs*) e envolvidas em processos de transdução de sinal e detecção de estímulos químicos relacionados a percepção sensorial de odores, de acordo com dados disponíveis no banco *online Uniprot*. O gene *Zinc finger C2H2-type* (CPIJ015578) foi o menos reprimido da lista com  $(\text{Log}_2) \text{FC} = -2.03$  e é classificado como um dos domínios mais comuns de ligação de DNA, geralmente ligado ao regulador transcricional BTB/POZ. O gene *cytochrome P450* (CPIJ002537) foi observado reprimido nesta lista com  $(\text{Log}_2) \text{FC} = -2.36$ . A família de genes P450 é composta por muitas variantes, e estes genes estão envolvidos com a resistência a inseticidas, como os



piretróides, sendo geralmente encontrados superexpressos em populações de mosquitos resistentes, como foram observados na lista completa de genes DE deste estudo.

Na lista completa de genes DE, entre os reprimidos foram observados genes quimiossensoriais (CPIJ004160= *odorant receptor 32 OR32*, CPIJ012718= *odorant binding protein OBP19*, CPIJ006216= *odorant receptor 64 OR64*, CPIJ020280= *odorant-binding protein OBP2*, CPIJ010855= *odorant receptor OR174*, CPIJ006217= *odorant receptor OR65*, CPIJ005399= *Odorant receptor OR53*). Entre estes, estão dois genes estudados neste trabalho sob outros aspectos: *OR64* e *OBP2*. O gene *OR64* foi avaliado quanto ao polimorfismo gênico e durante ensaios de RT-PCR, onde foram observados transcritos deste gene exclusivamente em antenas. O gene *OBP2* foi avaliado neste estudo por RT-qPCR utilizando antenas de fêmeas de *C. quinquefasciatus* sob três estados fisiológicos, e foi observado resultado significativo ( $p < 0.05$ ) para sua expressão em antenas de fêmeas de campo após a cópula.

Tabela 3 – Genes selecionados entre os subexpressos como os mais reprimidos na população de campo de fêmeas de *C. quinquefasciatus* pós-cópula

Nº	Gene	Descrição	(Log2) FC	padj
1	CPIJ011542-RA	Synaptic vesicle protein	-5.43	2.44
2	CPIJ015947-RA	purine nucleoside phosphorylase	-5.26	4.71
3	CPIJ017596-RA	Synaptic vesicle glycoprotein 2A	-4.16	1.32
4	CPIJ005462-RA	pancreatic triacylglycerol lipase precursor	-4.03	2.48
5	CPIJ004866-RA	Forkhead box protein	-3.41	2.98
6	CPIJ019479-RA	2OG-Fell_Oxy_2 domain-containing protein	-3.23	0.00
7	CPIJ019398-RA	Myosin light chain 2	-3.20	5.38
8	CPIJ018571-RA	Oligo-1,6-glucosidase	-3.15	1.11
9	CPIJ011827-RA	N-acetyltransferase domain- containing protein	-3.07	9.24
10	CPIJ005399-RA	Odorant receptor OR53	-2.89	2.96
11	CPIJ003590-RA	Ribonuclease P	-2.83	8.71
12	CPIJ003554-RA	Transmembrane protein 67	-2.80	4.24
13	CPIJ005802-RA	Ubiquitin binding region	-2.72	1.23
14	CPIJ016316-RA	pupal cuticle protein 78E, putative	-2.68	1.17
15	CPIJ008801-RA	Truncated ER mannose-binding lectin	-2.66	0.00
16	CPIJ017845-RA	hypothetical protein	-2.61	5.93
17	CPIJ000552-RA	Serrate protein	-2.59	8.67
18	CPIJ000085-RA	Chiting-binding type 2 domain-containing protein	-2.45	2.02
19	CPIJ007574-RA	Fibrinogen and fibronectin	-2.40	0.00
20	CPIJ002537-RA	cytochrome P450 6AG11	-2.36	0.00
21	CPIJ001087-RA	hypothetical protein	-2.35	0.00
22	CPIJ016176-RA	Truncated ER mannose-binding lectin	-2.19	9.37
23	CPIJ015946-RA	guanylate cyclase, putative	-2.14	7.15
24	CPIJ015125-RA	SCP2 sterol-binding domain	-2.10	0.00
25	CPIJ018366-RA	Calmodulin	-2.09	0.00
26	CPIJ014751-RA	TATA box-binding protein	-2.07	4.71
27	CPIJ004063-RA	Peroxisomal membrane protein PMP22	-2.05	0.00
28	CPIJ012594-RA	C2H2 zinc finger	-2.04	0.00
29	CPIJ015578-RA	Zinc finger C2H2-type	-2.03	0.00

Fonte: A autora

## 11.9 ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL GÊNICO POR ONTOLOGIA DO GENE

A ontologia do gene (*Gene Ontology* – GO; <http://www.geneontology.org>) foi atribuída à lista de genes DE, tanto para os genes super como para os subexpressos, com a finalidade de identificar categorias GO significativamente representadas entre os tais genes. Essa análise de enriquecimento funcional consistiu na identificação dos termos ligados ao processo biológico

(*Biological Process*), função molecular (*Molecular Function*) e componente celular (*Cellular Component*).

A anotação dos termos de ontologia gênica exibe uma mesma proteína associada à mais de uma categoria funcional, isso ocorre porque dentro dos organismos as proteínas podem desempenhar diferentes papéis, estando envolvidas muitas vezes em mais de um processo metabólico.

Os resultados mostraram um total de 137 termos de enriquecimento funcional atribuídos aos genes superexpressos em amostras de campo. Esses termos foram divididos em três categorias, sendo 116 termos atribuídos para processos biológicos, 5 termos atribuídos à função molecular e 16 termos atribuídos à componente celular.

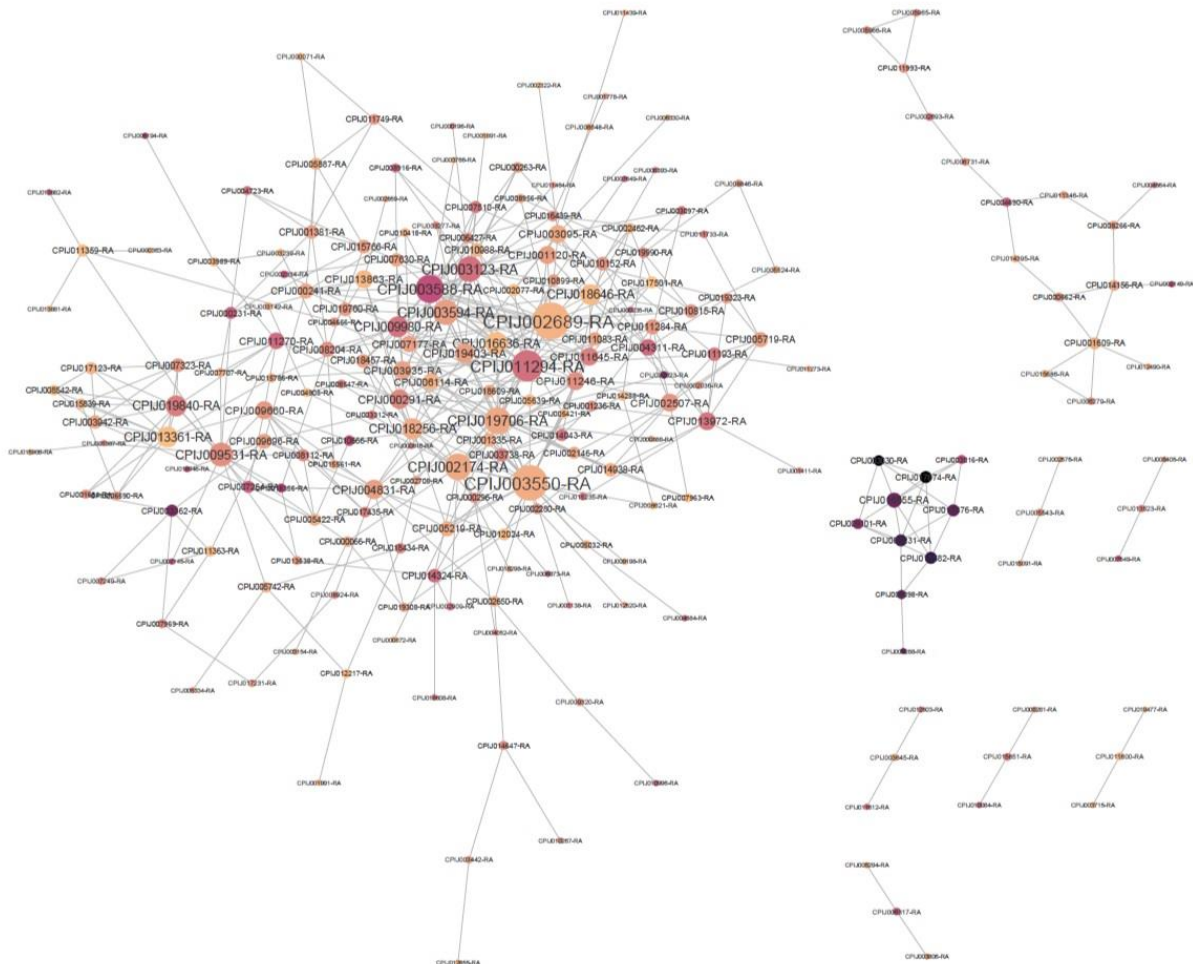
Quanto aos termos de processo biológico, aqueles com maior contagem de genes foram relacionados à desenvolvimento de estrutura anatômica, desenvolvimento multicelular, resposta a estímulos, regulação biológica, processo celular, organização de componentes celulares, regulação da expressão gênica. A categoria função molecular apresentou apenas 5 termos, e estes estavam relacionados à ligação de proteínas, atividade de ligação geral, constituinte estrutural de cutícula, ligação de proteínas do citoesqueleto e ligação de actina. Para a categoria de componentes celulares foram atribuídos 16 termos, sendo os mais representados na contagem de genes: entidade anatômica celular, componentes intracelulares, citoplasma, membrana, organelas e membrana plasmática. Para os genes subexpressos não foram gerados dados significativos de enriquecimento funcional.

#### 11.10 REDES DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA

Para entender a interação entre as proteínas dos genes DE, identificadas no ensaio de RNAseq, foram construídas redes de interação proteína-proteína. Os nós foram coloridos entre amarelo e roxo, amarelo para valores de (Log<sub>2</sub>) FC menores, mais próximos a zero e roxo para valores de (Log<sub>2</sub>) FC maiores, mais distantes de zero. O tamanho dos nós reflete diretamente o número de interações que ele faz na rede. Para melhor visualização proteínas *singletons* (sem nenhuma interação) ou com apenas uma interação, foram removidas das redes. Os códigos de acesso dos genes nas redes foram mantidos os mesmos da tabela de genes DE.

As proteínas dos genes superexpressos foram agrupados em 9 *clusters* (Figura 30), formados cada um por números diferentes de proteínas.

Figura 30 - Rede de interação proteína - proteína de genes superexpressos na população de campo de *C. quinquefasciatus*



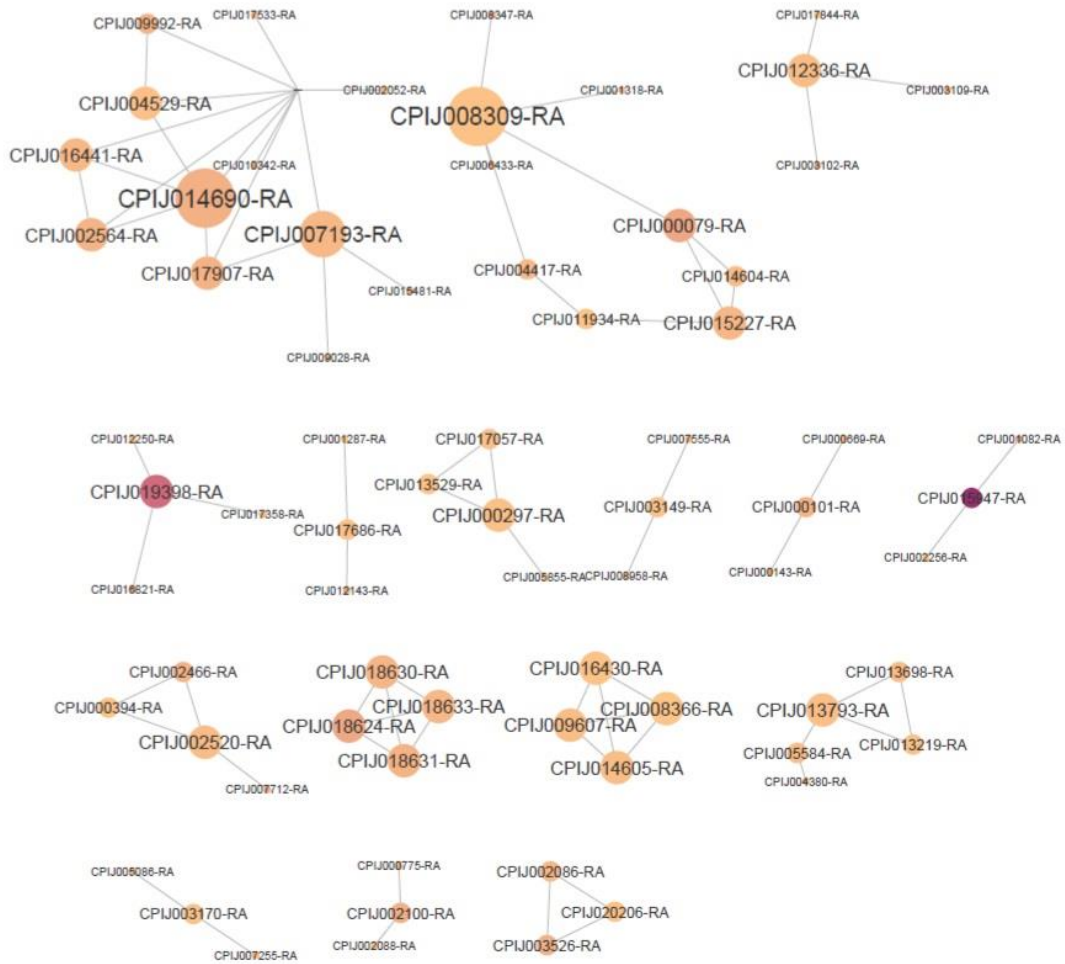
Fonte: A autora

O maior *cluster* formado contém inúmeras proteínas apresentando intenso fluxo de interações. As proteínas presentes no primeiro *cluster* apresentam valores intermediários de (Log<sub>2</sub>) FC, demonstrado pela cor alaranjada e arroxeadada dos nós. Em destaque pelo grande número de interações são vistos CPIJ002689= *survivin putative*, CPIJ011294= *hect E3 ubiquitin ligase*, CPIJ019706= *26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2*, CPIJ002174= *mitogen-activated protein kinase 14B*, CPIJ003550= *78 kDa glucose-regulated protein precursor*, CPIJ003594= *Megator*, CPIJ003588= *Ubiquitin*, CPIJ003123= *DNA-directed RNA polymerase I 40 kDa polypeptide*, CPIJ009980= *Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma*, CPIJ009531= *Guanylate\_kin/ PDZ /SH3*. A maioria destas proteínas está envolvida em processos de ligação de quitina, regulação de ligação da glicose e eventos de

transcrição gênica. O terceiro maior *cluster* foi formado por genes com alto valor de (Log2) FC, revelado pela coloração roxa intensa dos nós. São observados ao todo 10 proteínas de genes superexpressos neste *cluster*, alguns deles: CPIJ003030= *adult cuticle protein, putative*, CPIJ003016= *Insect cuticle protein*, CPIJ017874= *histidine-rich protein PFHRP-II*, CPIJ016655= *Cuticle protein CPCFC*, CPIJ017876= *cuticle protein*, CPIJ009101= *cuticle protein*, CPIJ008231= *cuticle protein 8*, CPIJ018582= *cuticle protein 8*, CPIJ009098= *cuticle protein 16.5*, CPIJ004288= *cuticle protein 7*. Todos os genes deste *cluster* estão relacionados a proteínas da cutícula dos insetos.

Quanto a rede de interações para os genes subexpressos, foram agrupados 16 *clusters* menores (Figura 31), em comparação aos genes superexpressos. O maior *cluster* conta com 12 genes, havendo dois deles (CPIJ014690 e CPIJ007193) em destaque pelo maior número de interações com os demais genes. A maioria dos genes reprimidos na rede apresenta valores baixos de (Log2) FC, representados pela cor alaranjada em praticamente todos os nós, com exceção de apenas 2 genes (CPIJ015947 e CPIJ019398) que se apresentam em nós com tom de roxo.

Figura 31 - Rede de interação proteína - proteína de genes subexpressos na população de campo de *C. quinquefasciatus*.



Fonte: A autora

## 12 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS GENES QUIMIOSSENSORIAIS

A diversidade genética dos genes *CquiOBP11*, *CquiOBP16*, *CquiOR2*, *CquiOR64*, *CquiOR93* e *CquiOR136* foi avaliada através do *software* DnaSP, nas populações naturais de *C. quinquefasciatus*, provenientes das diferentes localidades do estado de Pernambuco. Os *primers* desenhados possibilitaram estudar as regiões codificadoras (*éxons*) e não codificadoras (*íntrons*) dos genes supracitados. Após a avaliação da qualidade das sequências no *Codoncode Aligner*, foram consideradas para as análises apenas bases com *prhed* > 20, portanto, devido à exclusão de bases com baixa qualidade das sequências, os resultados são baseados em CDS parciais (Quadro 6).

Quadro 6 - Sumário de informações sobre as sequências dos genes olfatórios. O tamanho das sequências está apresentado em pares de bases (pb)

Genes olfatórios	Tamanho (pb)	Éxons	Tamanho da proteína (AA)	Amplicon (mRNA)	Tamanho do fragmento analisado
<i>CquiOBP11</i>	7657	3	144	435	435
<i>CquiOBP16</i>	797	3	134	405	294
<i>CquiOR2</i>	1371	5	376	1131	967
<i>CquiOR64</i>	1354	5	385	1158	1070
<i>CquiOR93</i>	1233	1	410	1233	1173
<i>CquiOR136</i>	1436	3	436	1311	1078

Fonte: A autora

Foram observados polimorfismos do tipo *indel* (inserções e deleções) nas regiões dos *íntrons* dos seguintes genes: inserção de 3 nucleotídeos na posição 85 do gene *CquiOBP11*, situada no *íntron* 1, presente em apenas 3 indivíduos da população coletada em 2010, e em 10 indivíduos da população de 2018; deleção de 11 nucleotídeos na posição 331 do gene *CquiOBP16*, localizada dentro do segundo *íntron*; deleção na região do último *íntron*, na posição 1125 do gene *CquiOR2*; inserção de 4 nucleotídeos no segundo *íntron*, na posição 1118 do gene *CquiOR64* presente em todos os indivíduos coletados. O gene *CquiOR64*, como única exceção entre os avaliados, apresentou uma inserção/deleção na posição 1018 do gene, situado no *éxon*

5. Este *indel* apareceu exclusivamente em indivíduos coletados em 2010, como inserção de uma base (C ou G). Os indivíduos coletados em 2018 não apresentam este nucleotídeo.

Os polimorfismos observados em cada gene estão mostrados nas figuras 32 a 37. De uma maneira geral todos os genes foram muito polimórficos, com exceção do gene *CquiOBP16*, o qual apresentou apenas quatro polimorfismos.

As mutações observadas para as *OBPs* foram do tipo sinônima, não interferem na estrutura da proteína, mostrando que os genes avaliados para esta família são conservados. Já as *ORs* apresentam mutações não-sinônimas, gerando substituição de aminoácidos na proteína. As sequências de todos os genes estudados quanto ao polimorfismo foram depositadas no GenBank e os códigos de acesso serão descritos ao longo do texto.

Figura 32 – Sequência de DNA do gene *CquiOBP11* (CPIJ006551) exibindo em rosa os polimorfismos observados na região codificadora nas populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas em Pernambuco

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
ATGGCCACTCGGGTGGAGCTGGCTTTACTCGTTTGGATCGCGGTTTGGTCACCGCCAAAGTTGAGGGTgtaagaaacgattcgatggct

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
aaagaagtgaagcaggtgcttaaccaggtttgtgtgtactttgggggtttgtgcaattgcagAAAGCCACCGTCGAGCAGATGATGAA

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
AACGGCGCAGATGATTCGGAGTGTGTCATCGGCAAGCGAAGGCAGCGAGGARCTGGTCAACCACTGAAGGARCTCCAAGTTTCGGGA

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
CGCCATGGAGGTCAAGTGCTACGTCAACTGTGCGCTGGAAATGATGCAGCGGgtgagttgtttttttaagaatcttttagagacttt

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
...

      7300     7310     7320     7330     7340     7350     7360     7370     7380
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
aatgtacctcgggatcttctgatcagggaccaataataatcctaaaaatacaaaaaaatacaagaagggtctgggctgtgagagtttaaa

      7390     7400     7410     7420     7430     7440     7450     7460     7470
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
tagaatggcccatatagaaataatccttcagaaagtgaacaaaagtttaaaaaacataacacattttctcctgttacagATGAAAAAAGGC

      7480     7490     7500     7510     7520     7530     7540     7550     7560
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
AAACTGAACTATGACGCATGCTGAAGCAGATCGATACCATCATGCCGGATGAGCTGGCGGAACCGATGAGCAATGCTGTCAACGTGTGC

      7570     7580     7590     7600     7610     7620     7630     7640     7650
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
CGAAATAGTGCATGATGGCATCAAGAACTGCGAGGCGCTTACGCGGTGGCCAAGTGTATTCCAAGAACAACCCCAAGTTTGTGTTT

...|.
CCCTAG

```

Fonte: A autora.

Legenda: Os *éxons* estão representados em letra maiúscula e os *íntrons* em letra minúscula. Os *singletons* não estão representados aqui. K: G ou T; R: A ou G; S: C ou G; Y: C ou T



Figura 33 – Sequência de DNA do gene *CquiOBP16* (CPIJ012715) exibindo em rosa os polimorfismos observados na região codificadora nas populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas em Pernambuco

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATGGACAAATCTGTGGTTTTGGTGGTTTTGGTGGCAGTTCTGGTGAAGCA TGTgtaagcagctgctactgatacaactctggtgaacca
      100      110      120      130      140      150      160      170      180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gtgacttttgggactaaaccgaagaattttgcttttggcttttctagTTGGGACAAAACCTGCTGGCGGCCTACAACAATTGCCGGGCC
      190      200      210      220      230      240      250      260      270
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GAGTACAATGCTGACCAGGAGAC TTCAACGCCATCAAGAACGGGGACTTCTCGATACGAACGCCATTGGTTGAGgtttagttacagagt
      280      290      300      310      320      330      340      350      360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
acaattgtggttaaatgatttgcgcttgacttggtagattaaaaattacgaacagtgctcagtttgcgataagaattggttcttcaagtca
      370      380      390      400      410      420      430      440      450
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tattgctaaaatggcgcttcttaactcaaatggcccaaaaatgcccgtacaataagatagcatgacagcaacaatagttaataataacgtg
      460      470      480      490      500      510      520      530      540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gaatcaattcaagaatcactagctcaagattgtacatgataaaacaaaaaagattaggccataaaaatcagataaaaaaagtatcta
      550      560      570      580      590      600      610      620      630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
atattgatatttactatcttcagTGCCTGGGAGAGTGTGTCGTTAAGAAGTTGGCTTCATGAACGATGATTT AGCTTCAACAAGGACA
      640      650      660      670      680      690      700      710      720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCATCGTGAAGTTCGTGAGTCGGTTCATCAAGCCGGAGCACTCGGAAGATATTTACACCAAGTGCACGCAAGATGTCGC CCGGTG TGT
      730      740      750      760      770      780      790
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTGCTACGGCGTATGAGGTTACCAAGTGCATTTACGAGAACGCCGTAGACAAGTGGGGCACTAGAAGACGAGGTTAA

```

Fonte: A autora.

Legenda: Os *éxons* estão representados em letra maiúscula e os *íntrons* em letra minúscula. Os *singletons* não estão representados aqui. K: G ou T; R: A ou G; S: C ou G; Y: C ou T



Figura 35 – Sequência de DNA do gene *CquiOR64* (CPIJ006216) exibindo em rosa os polimorfismos observados na região codificadora nas populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas em Pernambuco

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATGGAATATCTCAGAAAGATAAGCCAACTAAGGTGTTTCGYCACTCTTACAAGGATCCGTTGGACTTTTACAACCACGTCTCGTGATG
      100     110     120     130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCAAACCACGTGGCCAGCATTACGGGGCTGGATGCTGAGAACAGACTACAAAAGAGTTCGGTCAATTTTATCGGTTTGATTCTGGTG
      190     200     210     220     230     240     250     260     270
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCCTGCTGTTTTCTACGTTACCTTCTTACGGTCTACGAAATGCGTCACCAAGTTGAAGATTGATTTATTGCTCGTTACGATTGGG
      280     290     300     310     320     330     340     350     360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATTGCTCGAGGTTTGATGAAGATTACACCCATCTGTACTATCGCGATGATTGCTGTGGATCCAASAGTACACGAAAGAACTGTTC
      370     380     390     400     410     420     430     440     450
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CAGGAGGAAACAGCAGCTCATAAgtcggtactcatgggttacattgaaTCTGAATGTAATAGCCAAAGCTGTCTACTGGCTACGGAT
      460     470     480     490     500     510     520     530     540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGTGCAGTTGTACCATGCTGACGGTCCCAATTGTGTTACGTTACTGTCCGGACACAAAACCTCAGTTCGGATTCTGGCTCCGTTTA
      550     560     570     580     590     600     610     620     630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCGACCGTTTTCTTGGCATGGATGGATCCTCAATATGGTATGCAAAATCGTAATGTCCATCGTTATTGTCTCCGAAGACATGGCTTGG
      640     650     660     670     680     690     700     710     720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATATTATACTTCATGACAGTGATGTGCTCTGTAATGCAGATAGATCTGCTAAAAGTAAAACTTCAAATGTGAACGCCAAGATGGAGA
      730     740     750     760     770     780     790     800     810
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAGGTGAAACGGATATAACGGAGAATTGAATGATATCTTCAAACGACATTATGAACACATGGAGtgagtacacaattaattttgtcatt
      820     830     840     850     860     870     880     890     900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tcggttctaatatgtttgaattttgaattaagGTTTGTTCGAATTGTCGAGAAAGTGTACAAAGCTATTTCTTTGTTCTATTTCCACGC
      910     920     930     940     950     960     970     980     990
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTGGAGCATCTCTAGTACTTGTCTGTATGCCATTGTAACGgtatgtttcttaaattcatcattggagttcaaactttacggtatgtaat
      1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ttttcagCTTTCGTGGATTGCTGGATATGGATCCGGAGTCTTTATAACATATCAATTTATTTGTTTTGTCTGCTACCAACTCTGCTGGG
      1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AACCAAGgtaagtctgcagaccatttaacaaaattaaaataatcttccaaaattccacacagAAAGAGGAGCTCCAGCGTGAATCTA
      1180    1190    1200    1210    1220    1230    1240    1250    1260
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGACATCTCCTGGTACACATGGACGATCCCAAATCAAAGGTGTGCGTTTCATGCTGGAGGCAGCTCAGCAGCCAACTGTCTCTCGAT
      1270    1280    1290    1300    1310    1320    1330    1340    1350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GATTTTCTACCCGCTGAGTATGCCACCTTCACCGAGGTCATCCGAACGATCTACAGCATTCTGACACTGTTGCTCACGTTCAGGAGTGA
.....
TTAA

```

Fonte: A autora.

Legenda: Os *éxons* estão representados em letra maiúscula e os *íntrons* em letra minúscula. Os *singletons* não estão representados aqui. K: G ou T; R: A ou G; S: C ou G; Y: C ou T



Figura 36 – Sequência de DNA do gene *CquiOR93* (CPIJ039866) exibindo em rosa os polimorfismos observados na região codificadora nas populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas em Pernambuco

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATGGTCAACTACCTAACCCGGCTCCGCTCGGCATACGCCCGCTTCGTGACATCCGCAACGCCGACGACATCTTCAGCCACTACGCTCTGG
      100     110     120     130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTTACGGCAACACGTCGGGAATCGGACTGCACGCGCCCGGTCAACGCTGGAAGCAAACCTCTTCCGGAATATTTCATTCGTGTTTGCC
      190     200     210     220     230     240     250     260     270
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGCAGCAGCTGGTCTGGTTCGGGATGTGGCCACGCCATGAGCGCACCCGACGATCTGACGATCCGGATCGGCATGTGCCTGATCTAC
      280     290     300     310     320     330     340     350     360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGTACCTGTCTATGCTCAGCTGGTTCGATGGACGTCGGGTACGACCTGTTCTCCGCGTGAAGGACTACTTCAACGGAAGACGCGAT
      370     380     390     400     410     420     430     440     450
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGTTGCTGTGGAGGACGGGACCGGATCAAACAGAGCGGAGTCTTCAGACAATCCCGCGGAACCTGCTGGTGGCGGAGATTCCCGTA
      460     470     480     490     500     510     520     530     540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACCATCATGTCGCTGATCTGGCCCTTTTTCGCGGGAAGATACTTCCACTTGGTTCGAACTTTCGAAGACACCAGTGGATCATC
      550     560     570     580     590     600     610     620     630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GACATAATGATCAGTTTACGGACTCCCGTGGTGTACTGGAACAACCTCGTCTGGATCATCTCGCTGAGCATGCTGTCCATGCTACGA
      640     650     660     670     680     690     700     710     720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AACCCGTTTACGAGCTGAGCTTGATCGCTGAATCGTTCGCCACGGTCTTCGCCGAGCTTACGACAAGTCCAACACATCGTCGATCCG
      730     740     750     760     770     780     790     800     810
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACCCGAAAGAAACCCAATTTCTGGACCCTTCGACCAACTCTTCGCCGAGTCCCTCAAGACTACGAAGAGTTCCTCGCCATGATCATC
      820     830     840     850     860     870     880     890     900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACGCTGCGCAAGCTCATGTCGCTTCTTTCTGCTCAAAGTCTAACCGTCGAAAGCCTGCTGGCGGTGACCTGCTTACGACCTTCAAC
      910     920     930     940     950     960     970     980     990
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATTACGTTCCAGGTGTTTACGGCGTAGCGTACGGATCGTCTTACCATCGAGTGTTCCTGCTGTGCAAATGGTGGAGCAGCTCAAC
     1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GACAGAAAGGATCGATCGGAAAACCTGTACCACTGGCAGTGCCGGAATGGTTGGGTCACACGCGGAACGGGCCACCGGATGCGG
     1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CAGATGAAGATCACCACGATGATCACCGCCGAGCACTGTCAGAAGACGTTCCGGTTCAGGTGCGGGACATGCTGGACGTTTCGATGGAG
     1180    1190    1200    1210    1220    1230
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATGTTCCAGATGGTGTGAACACGTGCTACAGCTGCTGACTTCTTCTGACGGCTACGAACTAG

```

Fonte: A autora.

Legenda: Os *éxons* estão representados em letra maiúscula e os *íntrons* em letra minúscula. Os *singletons* não estão representados aqui. K: G ou T; R: A ou G; S: C ou G; Y: C ou T

Figura 37 – Sequência de DNA do gene CquiOR136 (CPIJ016426) exibindo em rosa os polimorfismos observados na região codificadora nas populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas em Pernambuco

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATGACACAGTTTACTTCCCGTGCCGTTCAAACGGTCAAAAGTGGTTGAAGTGAAGTGTAGTGAAATGAAGCAAAATGCAAAATCTC
      100     110     120     130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TACTCCAAACGTTCGTGTGGATCCCGATGGGGATCATTTTTCAGTGGTTAAGAAAATGGAACAATTTTGTGgtaagtttgcgaaactc
      190     200     210     220     230     240     250     260     270
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggcaacgtagataattttgataggtttttttaactattcaatcaagGTTCAGCAAAATTGAAACGAAAAGGCGCTATTTGTTG
      280     290     300     310     320     330     340     350     360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGCTTGCTCCGCCTTATCATACTGCCAGATTTCTCACATGATTGGAAAATCATTTGACGTTCATCGAGGAAGATGACTTTGATA
      370     380     390     400     410     420     430     440     450
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CAAATTCCTAGTTCACACGTCACGTACATGATGTTCTACAATTACCCAAGTCATTTTGCTACGATTCTCCTACCAAGACCTGAGTTC
      460     470     480     490     500     510     520     530     540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TATTCGAAAGTTTTTCAACGCTCGCAAATATCTCAAAACTGATCCCGAAGCTCATCGAATTCGTTCCGGCAGCGTACCGGAAAACAATTG
      550     560     570     580     590     600     610     620     630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGCTATACTTGGACCGCTGCCAATGTGCATTTTTGTGGATTTCCATGGTGTGACTGGGGTCTACAAATGGCGAGTGCTCAACATTGA
      640     650     660     670     680     690     700     710     720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACCCAAAAGCTTAGCGTCTACCCTATCTCGAGGCAATCATCATGTATGGTTATCCGGTGCAAAATTAAATTATGCTGGATGTACCA
      730     740     750     760     770     780     790     800     810
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCTACCGGCTGTACTTATCAATCGGTACTGCTCGGATTCATAACAGAGCTTAAGATACTCACAGATTCTTGTGATAAGATTATAGATAA
      820     830     840     850     860     870     880     890     900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGCTGAAATCGCAGTCGAAAAGAAGCTTTGGAATCAGAATCAACAGATGCTGATGCTTTATTTGGAAGCATTCAAAATCGAGCTG
      910     920     930     940     950     960     970     980     990
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGCTCGTGTAAGCTCATATACCGTTCTAGAAACTTAATCAACCTTAGACAAATCTGAAGCCATGCTTGCTCTTGTATACTACAC
      1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTTGCTGATGTTAACGCTTTCATCATTTGTTCCTCAAAAATGGGTACTTCAAGGACTTTGCCTCATCGGCCATCATAATGGCCGTTTA
      1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CTTTAATGTCGATTTTTCATCATTTGCTACAACATGTCAAAGTGGACGATCTGgtaatagccatacaaaatcacacaaaatcttcc
      1180    1190    1200    1210    1220    1230    1240    1250    1260
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tcaacttcatccccgattttttacagGCTCCAAGTCGGCAAACGCATCTACAACCTGCCGTGGCCGTACAAGTTGACCAAGACGGAAC
      1270    1280    1290    1300    1310    1320    1330    1340    1350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GATTTGTCGCAATATCGCAGCATCCGAAGCACCATGATGGTGATGATGATGCGTGCCAGGCTGGGATGGCATTCAGCTGTGGCGGTT
      1360    1370    1380    1390    1400    1410    1420    1430
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCTTCGAAATGCAATGGGAAAATTCGCCGAACTAATGGATCTGACGTACACGATGGTGATGTTTGTGTTGCATTTACAGGAATAA

```

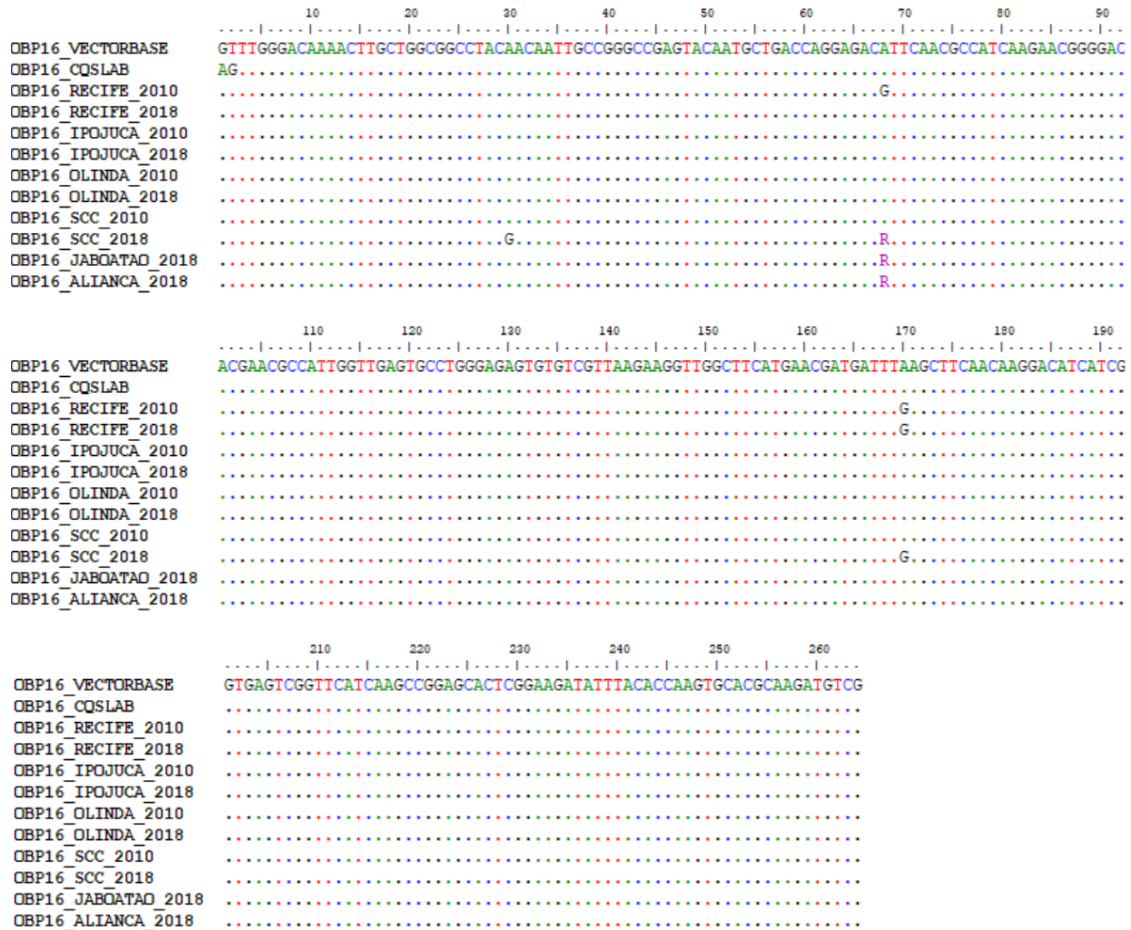
Fonte: A autora.

Legenda: Os *éxons* estão representados em letra maiúscula e os *íntrons* em letra minúscula. Os *singletons* não estão representados aqui. K: G ou T; R: A ou G; S: C ou G; Y: C ou T

Para fins de observação da constituição nucleotídica das sequências gênicas dos indivíduos das populações de campo em comparação a indivíduos da colônia de referência CqSLab, foi realizado o alinhamento no software BioEdit versão 7.2.5 (HALL, 1999) entre as sequências de cada um dos genes olfatórios estudados quanto ao polimorfismo, depositadas no *Vectorbase*, e sequências representantes de cada área de estudo para os anos de 2010 e 2018. Também foi incluída no alinhamento sequência da colônia de referência de laboratório (CqSLab). Os alinhamentos por gene podem ser conferidos nas figuras 38 a 43.



Figura 39 – Alinhamento entre sequências de *Culex quinquefasciatus* do gene *CquiOBP16*

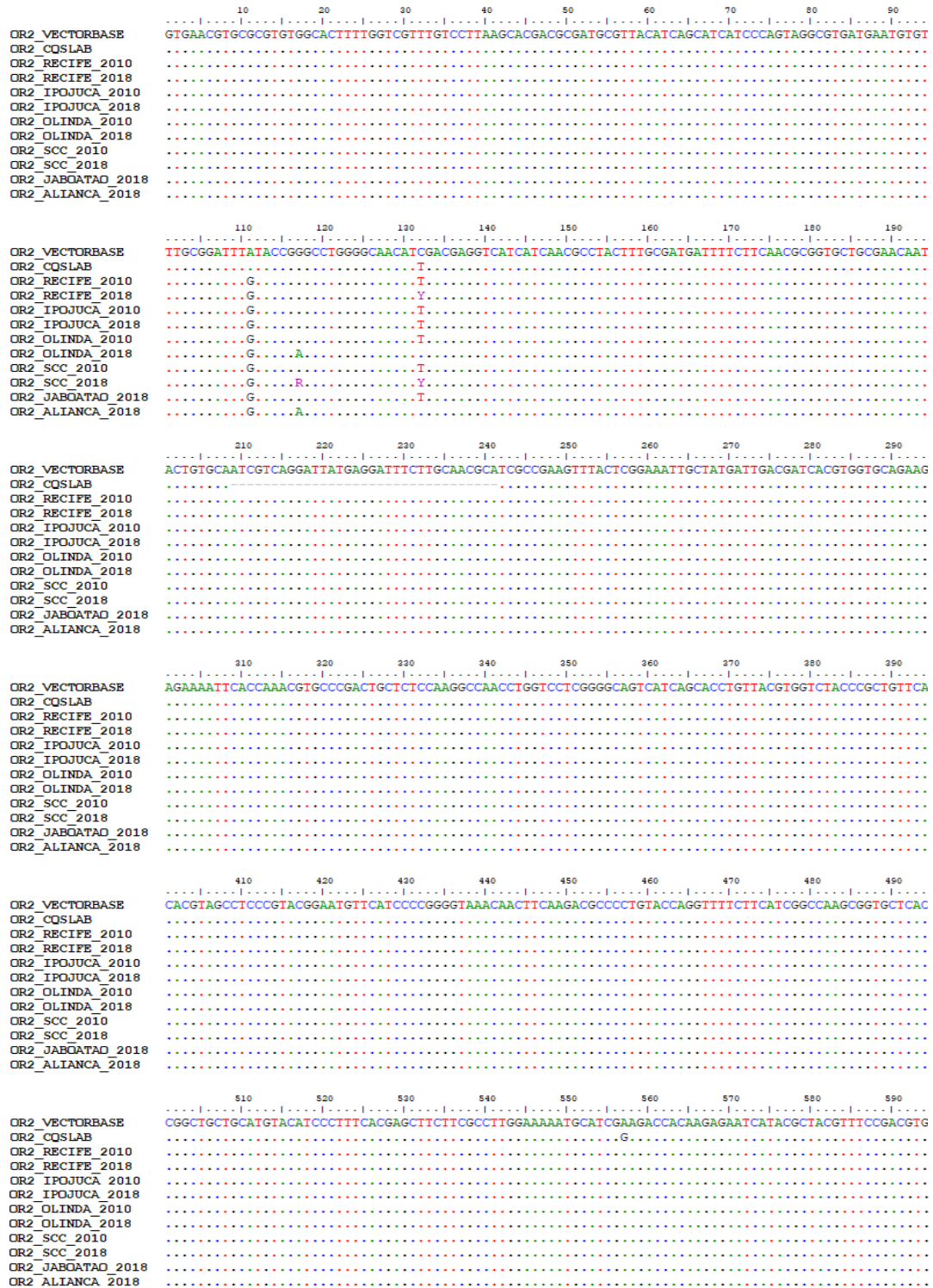


Fonte: A autora.

Legenda: O alinhamento foi realizado entre a sequência do gene *CquiOBP16* depositada no *Vectorbase*, sequência da colônia de referência CqSLab e sequências representantes das áreas de estudo



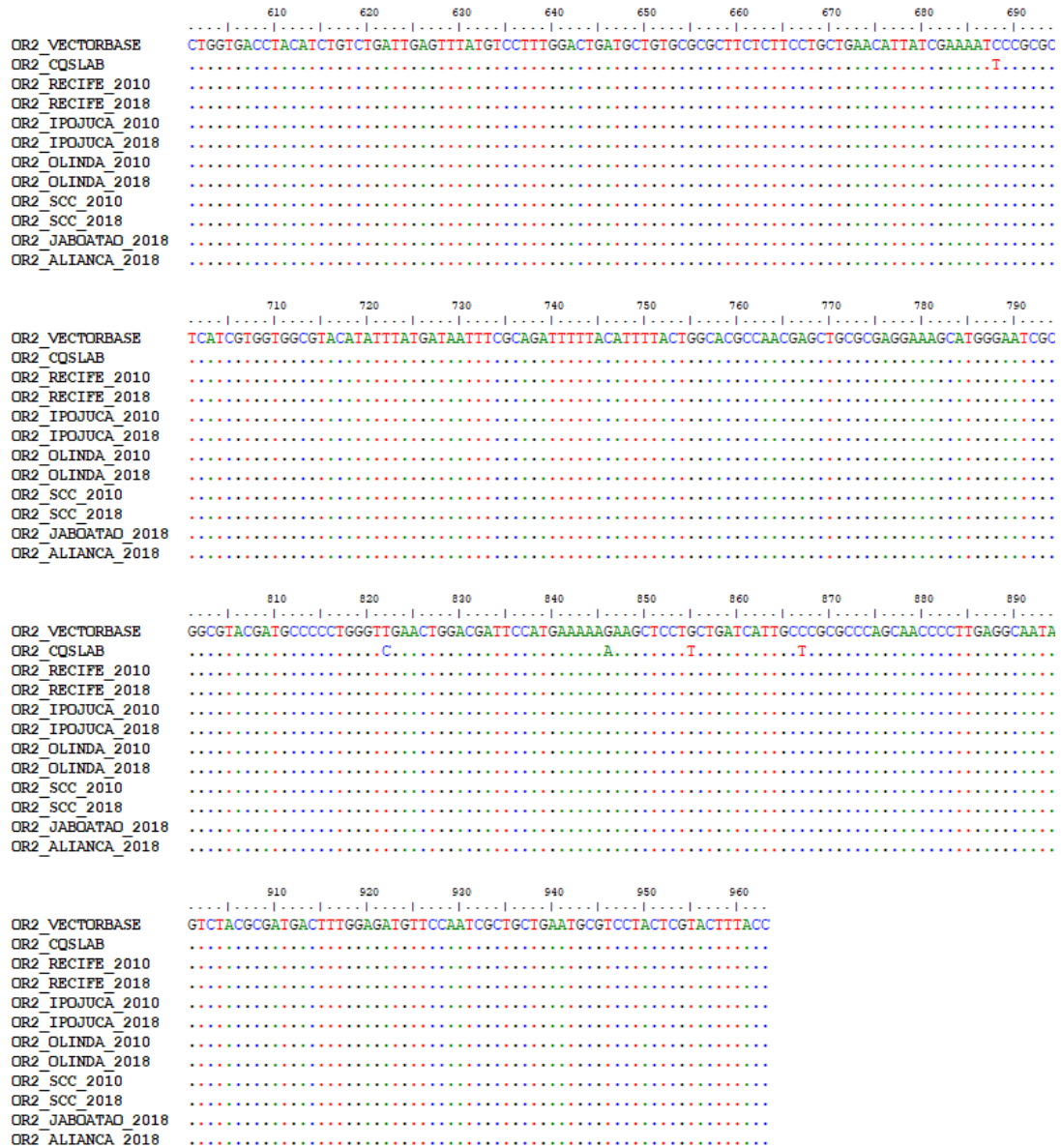
Figura 40 – Alinhamento entre sequências de *Culex quinquefasciatus* do gene *CquiOR2* (parte 1)



Fonte: A autora.

Legenda: O alinhamento foi realizado entre a sequência do gene *CquiOR2* depositada no *Vectorbase*, sequência da colônia de referência CqSLab e sequências representantes das áreas de estudo

Figura 40 – Alinhamento entre sequências de *Culex quinquefasciatus* do gene *CquiOR2* (parte 2)

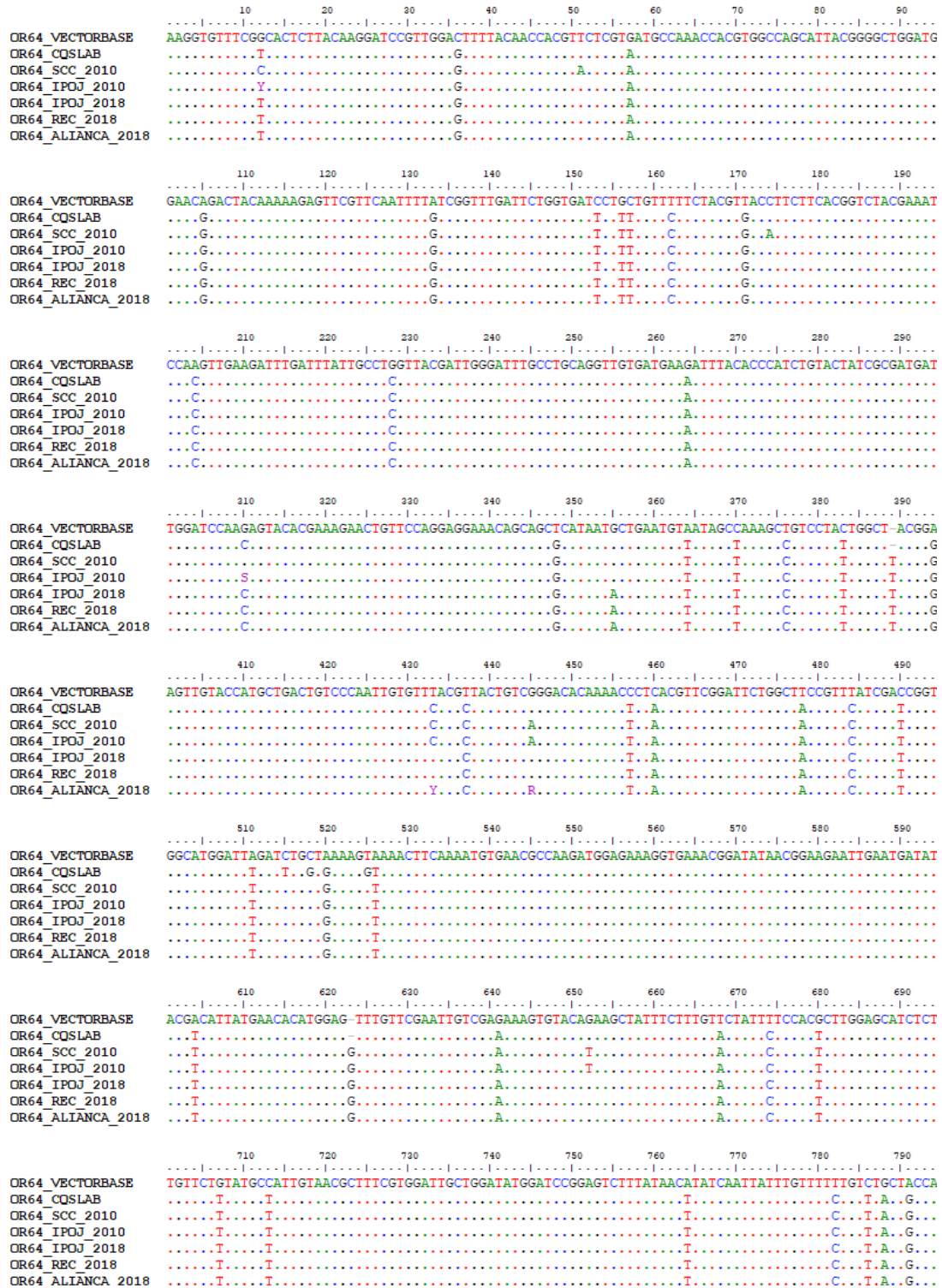


Fonte: A autora.

Legenda: O alinhamento foi realizado entre a sequência do gene *CquiOR2* depositada no *Vectorbase*, sequência da colônia de referência CqSLab e sequências representantes das áreas de estudo

Figura 41 – Alinhamento entre seqüências de *Culex quinquefasciatus* do gene *CquiOR64*

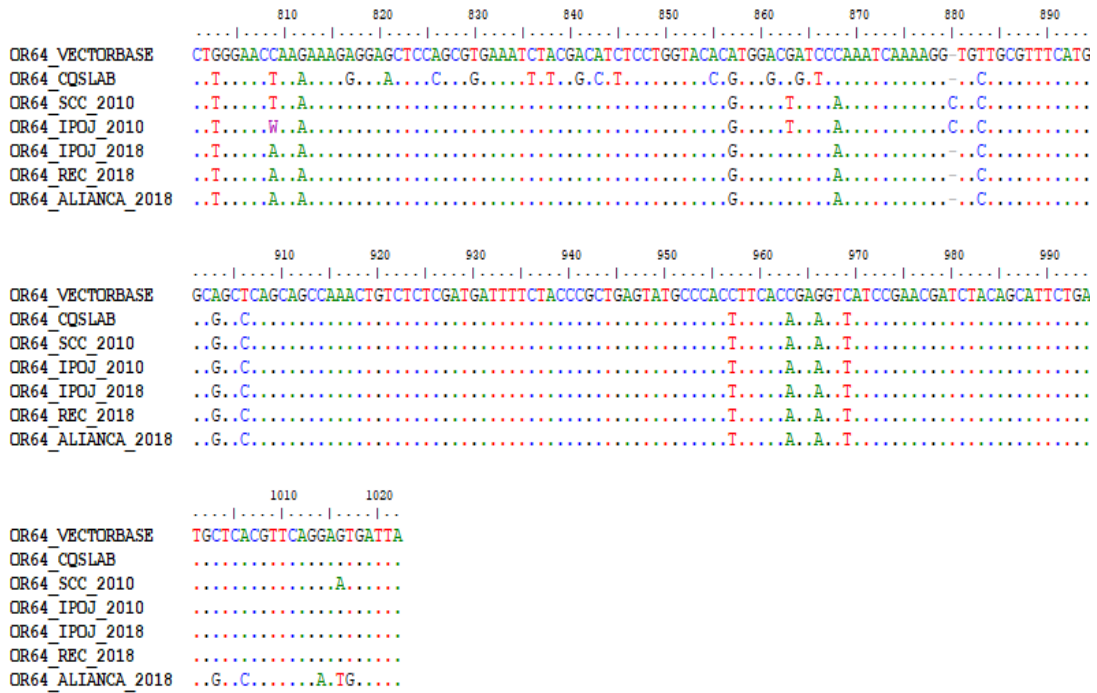
(parte 1)



Fonte: A autora.

Legenda: O alinhamento foi realizado entre a seqüência do gene *CquiOR64* depositada no *Vectorbase*, seqüência da colônia de referência CqSLab e seqüências representantes das áreas de estudo

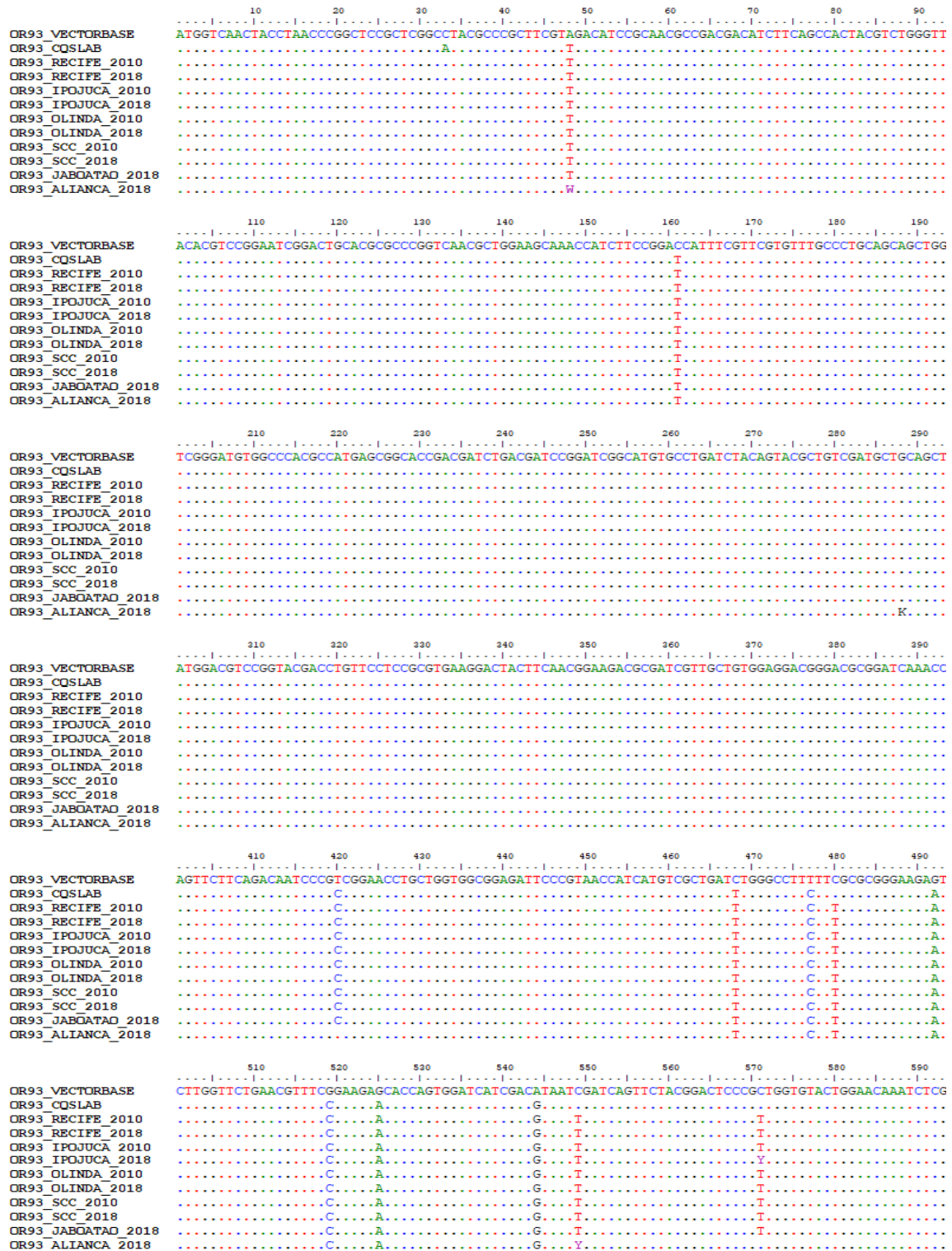
Figura 41 – Alinhamento entre seqüências de *Culex quinquefasciatus* do gene *CquiOR64* (parte 2)



Fonte: A autora.

Legenda: O alinhamento foi realizado entre a seqüência do gene *CquiOR64* depositada no *Vectorbase*, seqüência da colônia de referência CqSLab e seqüências representantes das áreas de estudo

Figura 42 – Alinhamento entre seqüências de *Culex quinquefasciatus* do gene *CquiOR93* (parte 1)

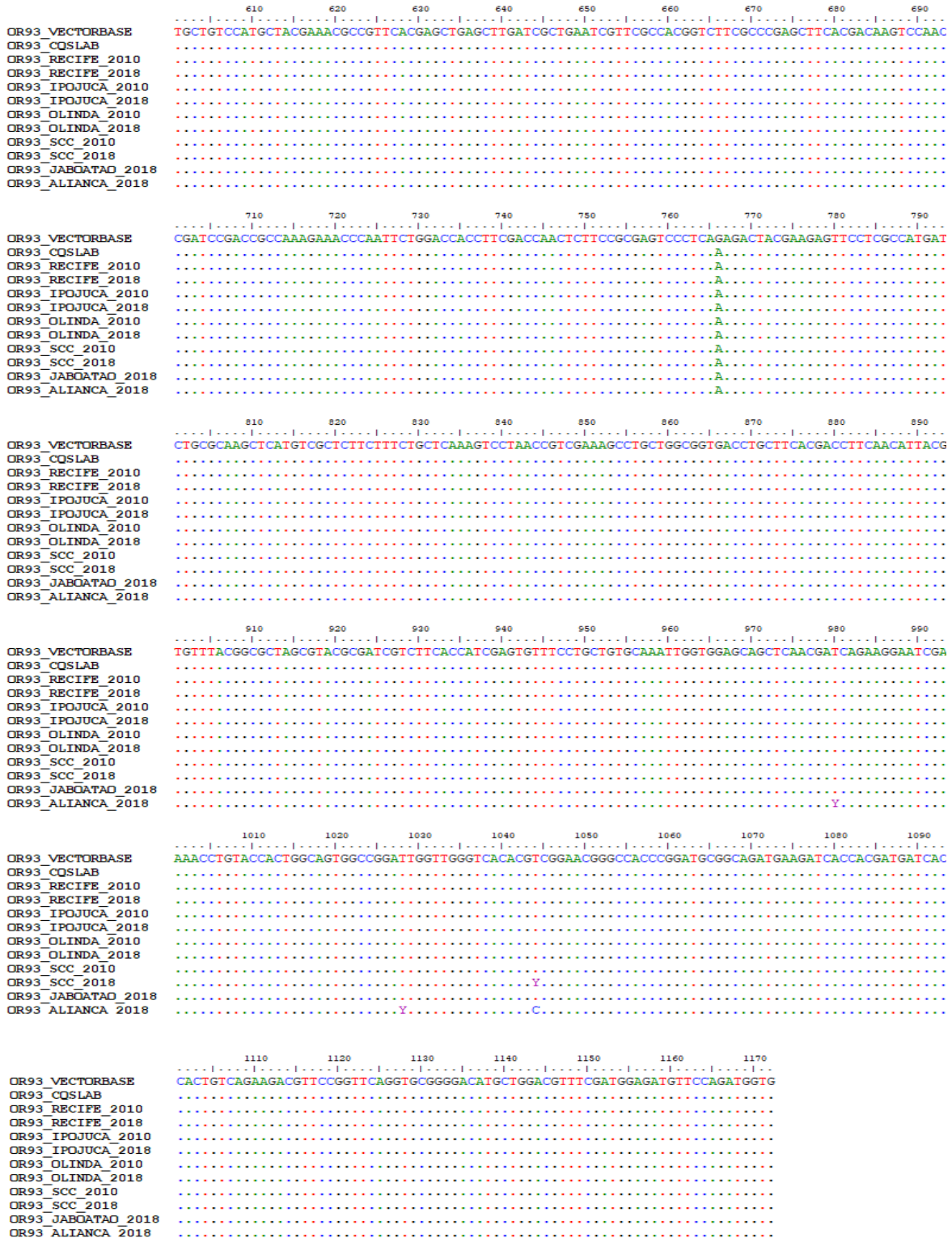


Fonte: A autora.

Legenda: O alinhamento foi realizado entre a seqüência do gene *CquiOR93* depositada no *Vectorbase*, seqüência da colônia de referência CqSLab e seqüências representantes das áreas de estudo



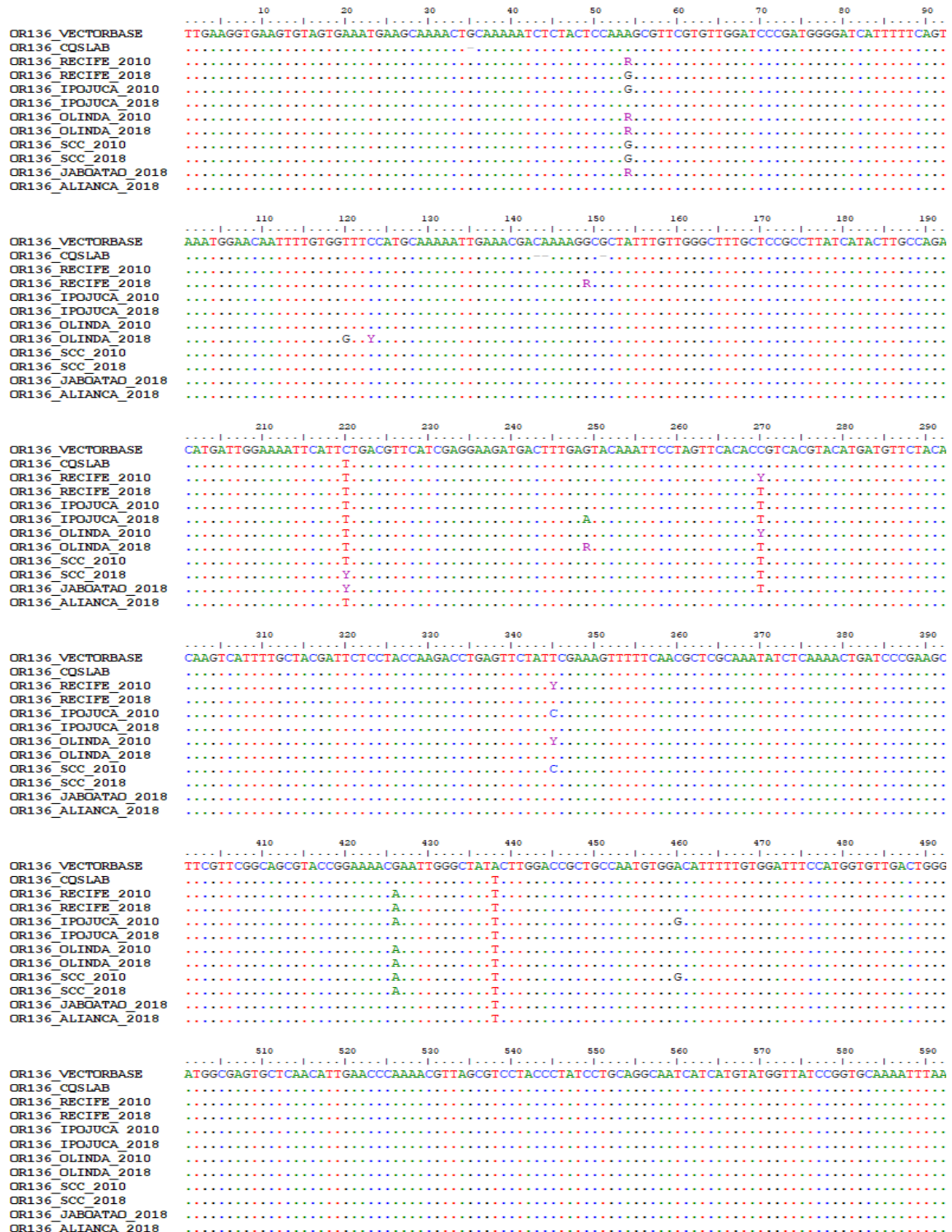
Figura 42 – Alinhamento entre seqüências de *Culex quinquefasciatus* do gene *CquiOR93* (parte 2)



Fonte: A autora.

Legenda: O alinhamento foi realizado entre a seqüência do gene *CquiOR93* depositada no *Vectorbase*, seqüência da colônia de referência CqSLab e seqüências representantes das áreas de estudo

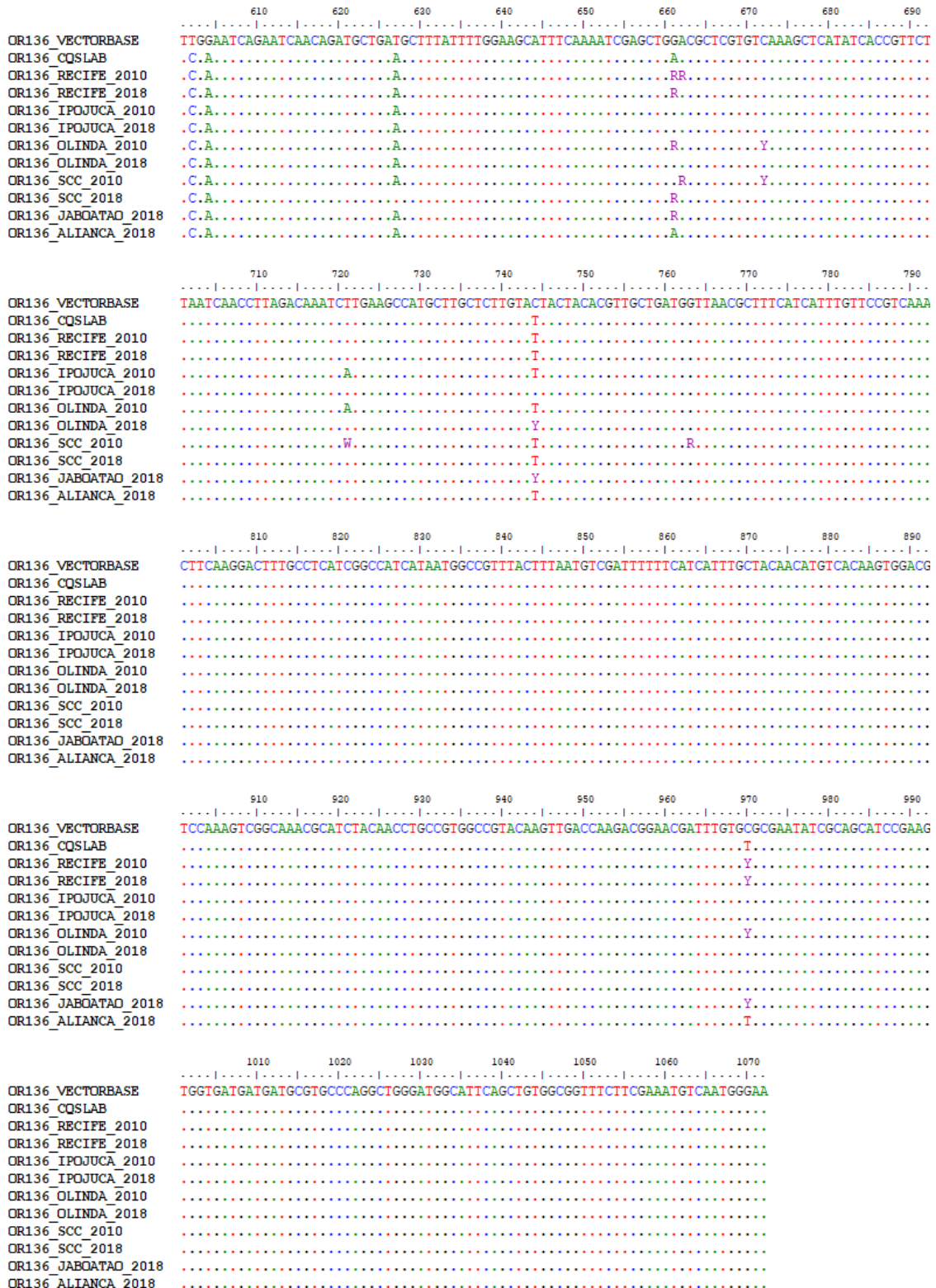
Figura 43 – Alinhamento entre sequências de *Culex quinquefasciatus* do gene *CquiOR136* (parte 1)



Fonte: A autora.

Legenda: O alinhamento foi realizado entre a sequência do gene *CquiOR136* depositada no *Vectorbase*, sequência da colônia de referência CqSLab e sequências representantes das áreas de estudo

Figura 43 – Alinhamento entre sequências de *Culex quinquefasciatus* do gene *CquiOR136* (parte 2)



Fonte: A autora.

Legenda: O alinhamento foi realizado entre a sequência do gene *CquiOR136* depositada no *Vectorbase*, sequência da colônia de referência CqSLab e sequências representantes das áreas de estudo



O gene *CquiOBP11* foi estudado em 414 sequências (2n) distribuídas entre as áreas de estudo. Foram observados 15 sítios segregantes na região codificadora de 435 pb. O número total de haplótipos registrado, considerando todas as populações nas análises, foi de 73. Entretanto, foi observado um elevado número de haplótipos exclusivos (alelos raros) em cada população. O número de haplótipos por população variou de 15 a 22. Observando as populações de forma individual, de uma maneira geral, foi possível notar redução no número de haplótipos entre os anos de avaliação para as populações de Olinda e Santa Cruz do Capibarbe (SCC), e aumento para a população de Ipojuca (15 - 2010 para 19 - 2018). A diversidade haplotípica total observada foi alta (0,907), variando entre as áreas estudadas através dos anos de 0,846 em Jaboatão a 0,938 em Aliança. O número médio de diferenças nucleotídicas (k) observado foi moderado e se mostrou também semelhante entre as áreas nos dois momentos de avaliação. A diversidade nucleotídica observada para o *CquiOBP11* foi baixa (0,009) e relativamente uniforme, variando de 0,008 a 0,010.

Para o gene *CquiOBP16* foram analisadas 228 sequências (2n). Este foi o gene que apresentou a menor diversidade genética, apenas 4 sítios segregantes na região codificadora amplificada de 294 pb. Devido ao baixo número de mutações encontradas nas sequências deste gene, foram observados apenas 8 haplótipos, a diversidade haplotípica total registrada foi baixa, como esperado dado o pequeno número de haplótipos encontrados, baixo valor de k (0,415) e diversidade nucleotídica de 0,001.

Foram avaliadas 198 sequências (2n) para *CquiOR2*, com fragmento de 967 pb. Foram encontrados no total 32 sítios segregantes, índice que entre a maioria das populações através dos anos não apresentou grande variação, com exceção dos municípios de Ipojuca e Olinda que apresentaram aumento notável de 2010 para 2018. Ao todo foram encontrados para este gene 44 haplótipos e alta diversidade haplotípica (0,883). A diversidade nucleotídica total observada para este gene foi baixa (0,007), entre as populações o  $\pi$  variou entre 0,003 e 0,009 (Tabela 4).

Para o gene *CquiOR64* foram avaliadas 108 sequências (2n) em 4 populações de campo. No total foram detectados 50 sítios segregantes, 47 haplótipos e alta diversidade haplotípica, variando entre as populações nos momentos de avaliação de 0,627 a 0,944.

O valor de  $k$  registrado foi alto, porém provavelmente influenciado pelo pequeno número de indivíduos analisados para este gene. A diversidade nucleotídica geral foi de 0,008.

O gene *CquiOR93* foi estudado em 418 sequências (2n), com fragmento amplificado de 1173 pb. Foram encontrados no total 49 sítios segregantes, não houve entre as populações através dos anos grande variação, exceto no município de Ipojuca onde foi observado aumento de 10 sítios segregantes de 2010 para 2018. Ao todo foram encontrados para este gene 119 haplótipos e, conseqüentemente, alta diversidade haplotípica (0,909). A diversidade nucleotídica total observada foi baixa, porém, a maior registrada entre os genes avaliados (0,010). Entre as populações o  $\pi$  variou de 0,008 e 0,010.

O gene *CquiOR136* foi avaliado em 270 sequências (2n), com fragmento de 1078 pb. Foram registrados no total 28 sítios segregantes, entre as populações através dos anos não houve grande variação, com exceção dos municípios de SCC que reduziu em 7 o número de 2010 para 2018. Foram registrados 140 haplótipos e alta diversidade haplotípica (0,987). A diversidade nucleotídica total observada para este gene foi baixa (0,006) e entre as populações o  $\pi$  variou entre 0,004 e 0,006 (Tabela 4). Um sumário dos índices de diversidade genética pode ser conferido no quadro 7.

Tabela 4 - Índices de diversidade genética observados em populações de *C. quinquefasciatus* do estado de Pernambuco

(Continua)

Genes	Populações	Número de sequências (2n)		S		h		Hd		K		$\pi$	
		2010	2018	2010	2018	2010	2018	2010	2018	2010	2018	2010	2018
<i>CquiOBP11</i>	Recife	40	44	12	11	17	17	0,888	0,886	4,275	3,632	0,009	0,008
	Olinda	48	32	11	12	20	18	0,910	0,931	4,106	4,372	0,009	0,010
	Ipojuca	50	42	10	11	15	19	0,848	0,874	3,488	4,235	0,008	0,009
	Jaboatão	-	42	-	11	-	17	-	0,846	-	3,745	-	0,008
	S. Cruz	45	35	11	11	20	19	0,920	0,910	3,620	3,875	0,008	0,008
	Aliança	-	36	-	10	-	22	-	0,938	-	3,987	-	0,009
	<b>Total (2010+2018)</b>	<b>414</b>		<b>15</b>		<b>73</b>		<b>0,907</b>		<b>4,017</b>		<b>0,009</b>	
<i>CquiOBP16</i>	Recife	32	28	3	3	3	4	0,330	0,476	0,766	0,814	0,002	0,003
	Olinda	34	18	2	1	3	2	0,169	0,111	0,279	0,111	0,001	0,0004
	Ipojuca	20	22	1	3	2	2	0,100	0,173	0,100	0,519	0,0003	0,001
	Jaboatão	-	20	-	1	-	2	-	0,100	-	0,100	-	0,0003
	S. Cruz	24	8	0	3	1	5	0	0,785	0	1,428	0	0,005
	Aliança	-	22	-	1	-	2	-	0,090	-	0,090	-	0,0003
	<b>Total (2010+2018)</b>	<b>228</b>		<b>4</b>		<b>8</b>		<b>0,220</b>		<b>0,415</b>		<b>0,001</b>	
<i>CquiOR2</i>	Recife	30	20	21	20	9	11	0,763	0,894	6,036	6,589	0,006	0,006
	Olinda	30	20	15	21	11	10	0,868	0,894	4,131	8,852	0,004	0,009
	Ipojuca	26	14	10	22	7	10	0,843	0,923	3,267	7,593	0,003	0,007
	Jaboatão	-	14	-	17	-	8	-	0,868	-	7,747	-	0,008
	S. Cruz	20	18	18	19	9	8	0,852	0,751	8,247	5,352	0,008	0,005
	Aliança	-	6	-	20	-	4	-	0,866	-	9,466	-	0,009
	<b>Total (2010+2018)</b>	<b>198</b>		<b>32</b>		<b>44</b>		<b>0,883</b>		<b>6,907</b>		<b>0,007</b>	
<i>CquiOR64</i>	Recife	-	22	-	22	-	11	-	0,861	-	6,194	-	0,005
	Ipojuca	26	18	25	19	10	8	0,627	0,797	7,569	6,424	0,007	0,006
	S. Cruz	38	-	30	-	23	-	0,944	-	9,416	-	0,008	-
	Aliança	-	4	-	2	-	2	-	0,500	-	1,000	-	0,0009
	<b>Total (2010+2018)</b>	<b>108</b>		<b>50</b>		<b>47</b>		<b>0,857</b>		<b>8,683</b>		<b>0,008</b>	

(Conclusão)

Genes	Populações	Número de sequências (2n)		S		h		Hd		K		π	
		2010	2018	2010	2018	2010	2018	2010	2018	2010	2018	2010	2018
<i>CquiOR93</i>	Recife	46	40	31	31	14	20	0,813	0,882	10,661	11,307	0,009	0,009
	Olinda	50	44	31	31	26	19	0,940	0,877	11,222	11,243	0,009	0,009
	Ipojuca	48	50	24	34	17	28	0,807	0,934	9,406	12,342	0,008	0,010
	Jaboatão	-	46	-	31	-	17	-	0,875	-	10,115	-	0,008
	S. Cruz	50	28	28	30	7	14	0,675	0,896	9,663	12,764	0,008	0,010
	Aliança	-	16	-	32	-	15	-	0,991	-	11,941	-	0,010
	<b>Total (2010+2018)</b>		<b>418</b>		<b>49</b>		<b>119</b>		<b>0,909</b>		<b>12,223</b>		<b>0,010</b>
<i>CquiOR136</i>	Recife	26	32	14	15	17	23	0,960	0,979	5,350	5,112	0,004	0,004
	Olinda	42	16	15	18	17	15	0,915	0,991	5,026	6,558	0,004	0,006
	Ipojuca	36	34	14	16	24	21	0,946	0,939	5,511	4,819	0,005	0,004
	Jaboatão	-	28	-	20	-	25	-	0,989	-	5,589	-	0,005
	S. Cruz	44	10	18	11	31	9	0,984	0,977	5,469	4,555	0,005	0,004
	Aliança	-	2	-	0	-	1	-	0	-	0	-	0
	<b>Total (2010+2018)</b>		<b>270</b>		<b>28</b>		<b>140</b>		<b>0,987</b>		<b>6,826</b>		<b>0,006</b>

Fonte: A autora.

Legenda: S: número de sítios polimórficos; h: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; K: número médio de diferenças nucleotídicas; π: diversidade nucleotídica;

Quadro 7 - Sumário da diversidade genética global dos genes olfatórios (2010 e 2018)

Genes olfatórios	Número de haplótipos (h)	Diversidade haplotípica global (Hd -Média)	Diversidade nucleotídica global (Média) ( $\pi * 10^{-3}$ )	Número de sítios polimórficos (S)	Número de sequências (2n) *
<i>CquiOBP11</i>	73	0,907	9	15	414
<i>CquiOBP16</i>	8	0,220	1	4	228
<i>CquiOR2</i>	44	0,883	7	32	198
<i>CquiOR64</i>	47	0,857	8	50	108
<i>CquiOR93</i>	119	0,909	10	49	418
<i>CquiOR136</i>	140	0,987	6	28	270

Nota:\* Tamanho amostral diferente entre os genes olfatórios devido às filtrações de qualidade adicionais, com base no gene individual.

Quanto aos testes de neutralidade, os resultados mostraram que em geral os valores de D de Tajima foram positivos, com exceção do gene *CquiOBP16* que mostrou valores negativos para duas populações (Olinda e Ipojuca) em 2010 e quatro populações em 2018 (Olinda, Ipojuca, Jaboatão e Aliança), e do gene *CquiOR2* em SCC (Santa Cruz do Capibaribe) em 2018, mas nenhuma destes valores foram significativos (Tabela 5). Valores positivos de D de Tajima foram significativos em: Ipojuca (2010 e 2018) e Santa Cruz (2018) para o gene *CquiOR93*; e em Ipojuca (2010) para o gene *CquiOR136*. Valores positivos de D de Tajima são indícios de seleção balanceadora ou de súbita contração populacional, onde há perda tanto dos polimorfismos de baixa quanto de alta frequência. Já os valores negativos de D de Tajima significam expansão populacional após um gargalo de garrafa, ou excesso de polimorfismos de baixa frequência em relação à expectativa (ECKSHTAIN-LEVI; WEISBERG; VINATZER, 2018; TAJIMA, 1989).

Com relação ao  $F_S$  de Fu, valores negativos sugerem um excesso de mutações recentes no *locus*, ou seja, um excesso de alelos raros. Isto foi o que observamos neste estudo. A Tabela 5 mostra que dos 54 testes realizados de  $F_S$  de Fu, 36 (67%) foram negativos, em alguns casos valores negativos muito altos. Entre os 36 resultados negativos de  $F_S$  de Fu, 18 foram significativos, sendo a maioria destes observados nos genes *CquiOBP11* e *CquiOR136*.

Tabela 5 – Testes de neutralidade nas populações de *Culex quinquefasciatus* avaliadas no estado de Pernambuco

Populações	2010						2018					
	D						Fs					
	<i>CquiOBP11</i>	<i>CquiOBP16</i>	<i>CquiOR2</i>	<i>CquiOR64</i>	<i>CquiOR93</i>	<i>CquiOR136</i>	<i>CquiOBP11</i>	<i>CquiOBP16</i>	<i>CquiOR2</i>	<i>CquiOR64</i>	<i>CquiOR93</i>	<i>CquiOR136</i>
<b>Recife</b>	1,587	0,065	0,486	-	1,727	1,577	- 4,645*	1,016	1,946	-	2,837	- 6,257*
<b>Olinda</b>	1,926	- 0,844	0,306	-	1,755	1,396	- 7,021*	- 0,955	- 0,986	-	- 3,539	- 3,309
<b>Ipojuca</b>	1,608	-1,164	0,808	0,606	2,422*	2,035*	- 3,160	- 0,879	0,859	1,765	0,478	-12,547*
<b>Jaboatão</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>S. Cruz</b>	1,303	-	2,353	1,186	1,805	1,033	- 8,777*	-	1,644	- 4,567	10,824	- 21,907*
<b>Aliança</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: A autora.

Legenda: D: teste D de Tajima; Fs: teste Fs de Fu; \* p&lt;0.05

## 12.1 DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA

Através do *software* arlequin foram gerados os índices de diferenciação genética entre as populações ( $F_{ST}$ ) e realizada a análise da variância molecular (AMOVA) para todos os genes. A diferenciação genética foi estudada entre as populações em dois momentos no tempo, com o objetivo de avaliar variação nas frequências dos haplótipos no espaço e no tempo, comparando-se a mesma população de anos diferentes.

Os resultados obtidos a partir da estatística F ( $F_{ST}$ ) mostraram que, em geral, a diferenciação genética entre as populações variou bastante. Foram observados desde valores negativos, valores de 0 representando ausência de diferenciação genética, até valores moderados (Quadros 8 a 13). Com exceção do gene *CquiORI36*, que teve valores de  $F_{ST}$  muito altos (Quadro 13). Com relação à comparação das mesmas localidades ao longo dos anos de 2010 e 2018, no geral também foi observada baixa diferenciação genética, com exceção de *CquiOBP16* para a população de SCC que mostrou alta diferenciação (Quadro 9). Os resultados em conjunto sugerem que as populações de *Culex quinquefasciatus* das diferentes localidades mantêm um grau de diferenciação genética entre elas, apesar de ser baixo.

Quadro 8 –  $F_{ST}$  entre populações para o gene *CquiOBP11*

<i>CquiOBP11</i>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.000									
2	0.001	0.000								
3	0.137*	0.070*	0.000							
4	0.056*	0.011	0.025	0.000						
5	0.030*	0.010	0.056*	0.009	0.000					
6	0.083*	0.038	0.019	0.010	0.016	0.000				
7	0.104*	0.054*	0.012	0.012	0.018	-0.020	0.000			
8	0.050*	0.004	0.016	-0.001	0.008	0.001	0.003	0.000		
9	0.093*	0.038*	0.000	-0.005	0.029	-0.011	-0.010	-0.007	0.000	
10	0.100*	0.044*	0.038*	-0.004	0.028	0.021	0.015	0.008	0.001	0.000

Fonte: A autora.

Legenda: 1- SCC\_2010; 2- Recife\_2010; 3- Ipojuca\_2010; 4- Olinda\_2010; 5- Recife\_2018; 6- SCC\_2018; 7- Jaboatão\_2018; 8- Ipojuca\_2018; 9- Aliança\_2018; 10- Olinda\_2018. \*p<0.05

Quadro 9 –  $F_{ST}$  entre populações para o gene *CquiOBP16*

<i>CquiOBP16</i>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.000									
2	0.026	0.000								
3	-0.016	0.054	0.000							
4	0.031	0.102*	0.009	0.000						
5	-0.011	0.061	-0.049	0.004	0.000					
6	-0.012	-0.021	0.009	0.053	0.015	0.000				
7	0.388*	0.147*	0.406*	0.510*	0.428*	0.210*	0.000			
8	-0.016	0.054	-0.052	0.009	-0.049	0.009	0.406*	0.000		
9	0.115*	0.005	0.123*	0.170*	0.132*	0.018	0.050	0.123*	0.000	
10	-0.022	0.045	-0.055	0.016	-0.052	0.002	0.381*	-0.055	0.113*	0.000

Fonte: A autora.

Legenda: 1- Olinda\_2010; 2- Recife\_2010; 3- Ipojuca\_2010; 4- SCC\_2010; 5- Aliança\_2018; 6- Ipojuca\_2018; 7- SCC\_2018; 8- Jaboatão\_2018; 9- Recife\_2018; 10- Olinda\_2018. \* $p < 0.05$

Quadro 10 –  $F_{ST}$  entre populações para o gene *CquiOR2*

<i>CquiOR2</i>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.000									
2	-0.001	0.000								
3	0.028	0.071*	0.000							
4	0.123*	0.152*	0.016	0.000						
5	0.118*	0.151*	0.035	0.060	0.000					
6	0.035	0.026	0.050	0.045	0.127*	0.000				
7	0.175*	0.208*	0.048	-0.012	0.011	0.115*	0.000			
8	0.223*	0.275*	0.145*	0.097	0.088	0.118	0.071	0.000		
9	0.247*	0.284*	0.121*	0.091	0.018	0.198*	0.018	0.057	0.000	
10	0.384*	0.426*	0.211*	0.089	0.119*	0.296*	0.007	0.177*	0.059	0.000

Fonte: A autora.

Legenda: 1- Olinda\_2010; 2- Ipojuca\_2010; 3- Recife\_2010; 4- SCC\_2010; 5- Recife\_2018; 6- SCC\_2018; 7- Olinda\_2018; 8- Aliança\_2018; 9- Ipojuca\_2018; 10- Jaboatão\_2018. \* $p < 0.05$

Quadro 11 –  $F_{ST}$  entre populações para o gene *CquiOR64*

<i>CquiOR64</i>					
	1	2	3	4	5
1	0.000				
2	0.143*	0.000			
3	0.060*	0.069*	0.000		
4	0.083*	0.088*	0.013	0.000	
5	0.397*	0.552*	0.573*	0.578*	0.000

Fonte: A autora.

Legenda: 1- SCC\_2010; 2- Ipojuca\_2010; 3- Recife\_2018; 4- Ipojuca\_2018; 5- Aliança\_2018; \* $p < 0.05$



Quadro 12 –  $F_{ST}$  entre populações para o gene *CquiOR93*

<i>CquiOR93</i>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.000									
2	0.048*	0.000								
3	0.133*	0.017	0.000							
4	0.304*	0.292*	0.340*	0.000						
5	0.038	0.088*	0.159*	0.212*	0.000					
6	-0.010	0.039*	0.114*	0.257*	0.014	0.000				
7	0.021	0.053*	0.121*	0.167*	0.022	-0.0003	0.000			
8	0.117*	0.183*	0.254*	0.235*	0.002	0.083*	0.083*	0.000		
9	0.060*	0.081*	0.149*	0.095*	0.024	0.028	-0.011	0.077*	0.000	
10	0.004	0.018	0.088*	0.242*	0.019	-0.009	-0.007	0.103*	0.013	0.0000

Fonte: A autora.

Legenda: 1- Recife\_2010; 2- Olinda\_2010; 3- Ipojuca\_2010; 4- SCC\_2010; 5- Recife\_2018; 6- Olinda\_2018; 7- Ipojuca\_2018; 8- Jaboatão\_2018; 9- SCC\_2018; 10- Aliança\_2018. \* $p < 0.05$

Quadro 13–  $F_{ST}$  entre populações para o gene *CquiOR136*

<i>CquiOR136</i>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.000									
2	0.097*	0.000								
3	0.156*	0.241*	0.000							
4	0.047*	0.132*	0.108*	0.000						
5	0.281*	0.318*	0.348*	0.291*	0.000					
6	0.282*	0.312*	0.308*	0.281*	0.011	0.000				
7	0.268*	0.343*	0.328*	0.287*	0.136*	0.105*	0.000			
8	0.456*	0.557*	0.354*	0.348*	0.332*	0.267*	0.290*	0.000		
9	0.271*	0.323*	0.386*	0.310*	0.030	0.060*	0.143*	0.431*	0.000	
10	0.362*	0.430*	0.298*	0.317*	0.103*	0.058	0.170*	0.199	0.200*	0.000

Fonte: A autora.

Legenda: 1- Recife\_2010; 2- Olinda\_2010; 3- SCC\_2010; 4- Ipojuca\_2010; 5- Recife\_2018; 6- Jaboatão\_2018; 7- Olinda\_2018; 8- Aliança\_2018; 9- Ipojuca\_2018; 10- SCC\_2018. \* $p < 0.05$

Baseado nos dados da AMOVA, nós observamos que, de um modo geral, não há diferença significativa entre os grupos dos anos de 2010 e 2018, com exceção do gene *CquiOR136*, que mostrou um percentual de variação de 22,69% na comparação entre os anos. Entretanto, no geral, foi observada baixa diferenciação genética entre as populações.

O gene que mostrou o maior grau de diferenciação entre as populações foi *CquiOR64*, com um percentual de quase 20% da variação total encontrado entre as populações. Adicionalmente, a maior diversidade genética foi concentrada dentro das populações (Quadro 14). O alto número de heterozigotos observados dentro das populações corrobora estes resultados. Estes dados mostram que não há panmixia entre as populações.

Quadro 14 – Análise da variância molecular (AMOVA) entre as populações avaliadas de *Culex quinquefasciatus* do estado de Pernambuco nos anos de 2010 e 2018

Genes olfatórios	Variância estimada entre os grupos	Variância estimada entre populações	Variância estimada intra população
<i>CquiOBP11</i>	0.01002 (0.49)	0.05357 (2.63)	1.97240 (96.88)
<i>CquiOBP16</i>	-0.00229 (-1.09)	0.01973 (9.39)	0.19258 (91.70)
<i>CquiOR2</i>	0.20168 (5.58)	0.29113 (8.06)	3.12105 (86.36)
<i>CquiOR64</i>	-0.28772 (-6.30)	0.90777 (19.88)	3.94592 (86.42)
<i>CquiOR93</i>	0.04643 (0.74)	0.71207 (11.36)	5.50695 (87.89)
<i>CquiORI36</i>	0.89019 (22.69)	0.37612 (9.59)	2.65676 (67.72)

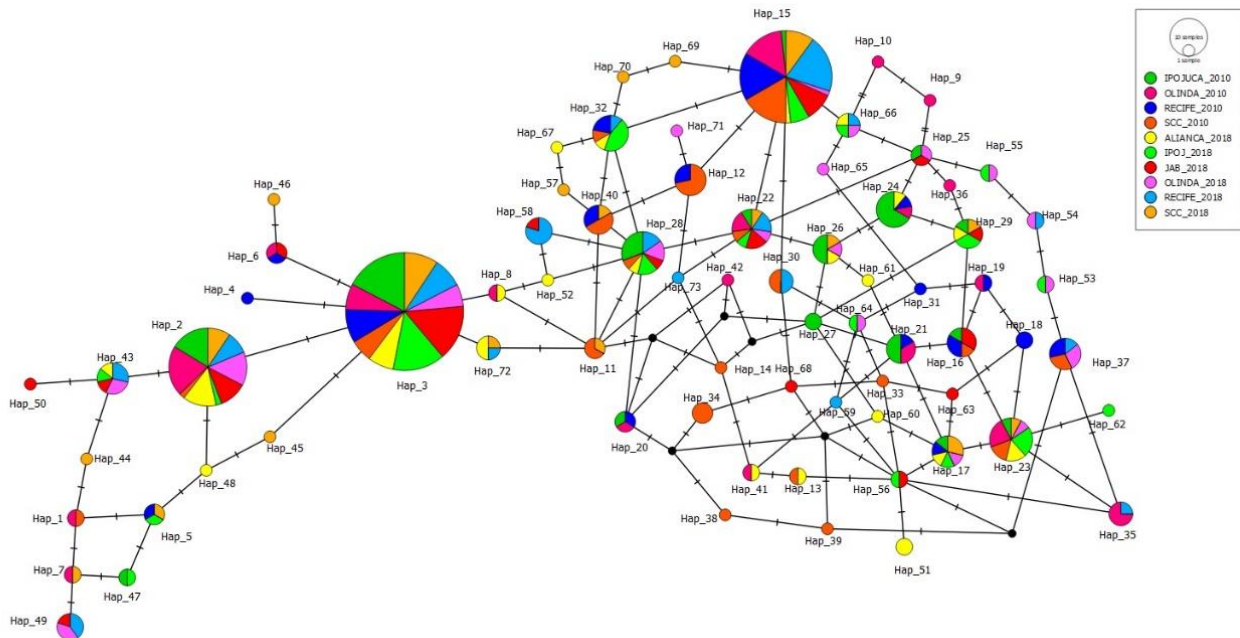
Fonte: A autora.

Legenda: A variância entre grupos representa a comparação dos anos de 2010 (grupo 1) e 2018 (grupo 2). Entre parênteses estão os valores da porcentagem da variância total

## 12.2 REDES DE HAPLÓTIPOS

De uma maneira geral, a rede de haplótipos exibe o que os dados de polimorfismo já revelaram, que os genes *OBPs* são bem mais conservados que os genes *ORs*. Para o gene *CquiOBP11*, de um modo geral, os haplótipos estão altamente relacionados, variando em apenas uma única mutação de um haplótipo para o outro. É possível visualizar a formação de dois grupos de haplótipos em lados opostos, conectados pelo Hap\_3, localizado no meio da rede e composto por todas as 10 populações estudadas, sendo o haplótipo mais frequente nas populações para ambos os anos de avaliação. No ano de 2010 foram estudadas 4 populações, já em 2018 foram 6. Entre os 73 haplótipos registrados, nota-se a presença de 30 haplótipos exclusivos, as populações de Recife, Olinda e SCC (Santa Cruz do Capibaribe) foram as que apresentaram maior número de haplótipos exclusivos observados.

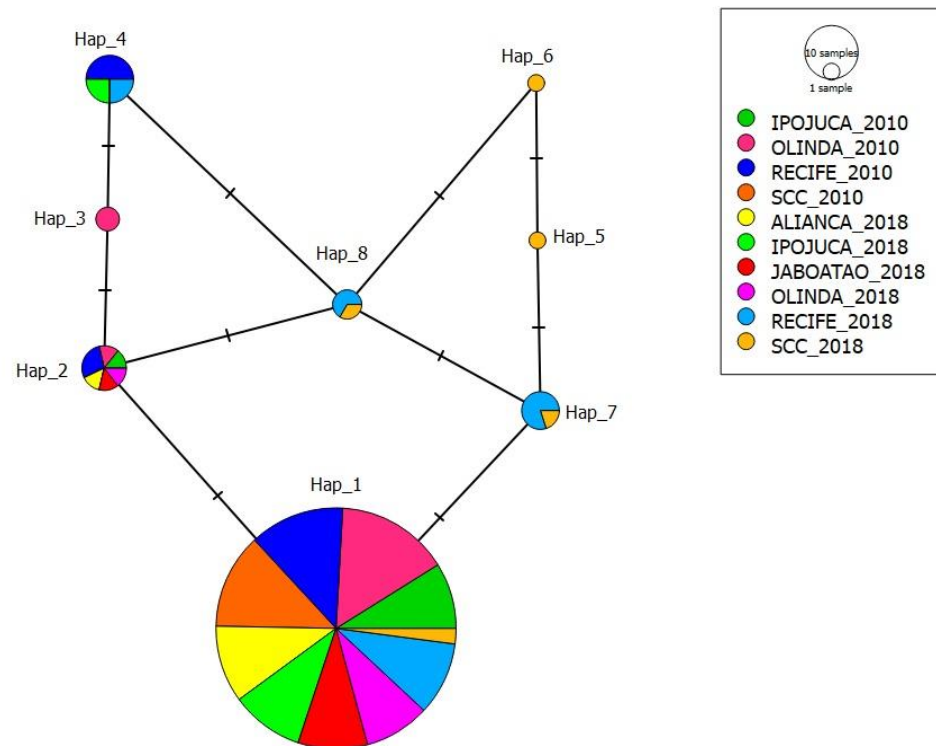
É possível notar que as mesmas populações coletadas em anos diferentes compartilham haplótipos, como os municípios de Ipojuca 2010/2018 nos Hap\_23, Hap\_47, Hap\_17 e Hap\_28; Recife 2010/2018 nos Hap\_32 e Hap\_37; SCC 2010/2018 nos Hap\_11 e Hap\_40. Também podem ser vistos na rede haplótipos presentes nas populações apenas de um dos anos de avaliação, como o Hap\_66, presente em Aliança, Recife, Ipojuca e Olinda do ano de 2018; Hap\_21 presente nas populações de Ipojuca, Recife e Olinda do ano de 2010 (Figura 44).

Figura 44 – Redes de haplótipos para o gene *CquiOBP11* 2010/2018

Fonte: A autora.

Legenda: Na rede de haplótipos o tamanho do gráfico de pizza corresponde à frequência do haplótipo; as linhas transversais representam diferenças de uma única base, e os círculos pretos significam os haplótipos que faltam na conexão dos diferentes haplótipos. SCC: Santa Cruz do Capibaribe, IPOJ: Ipojuca, JAB: Jaboatão

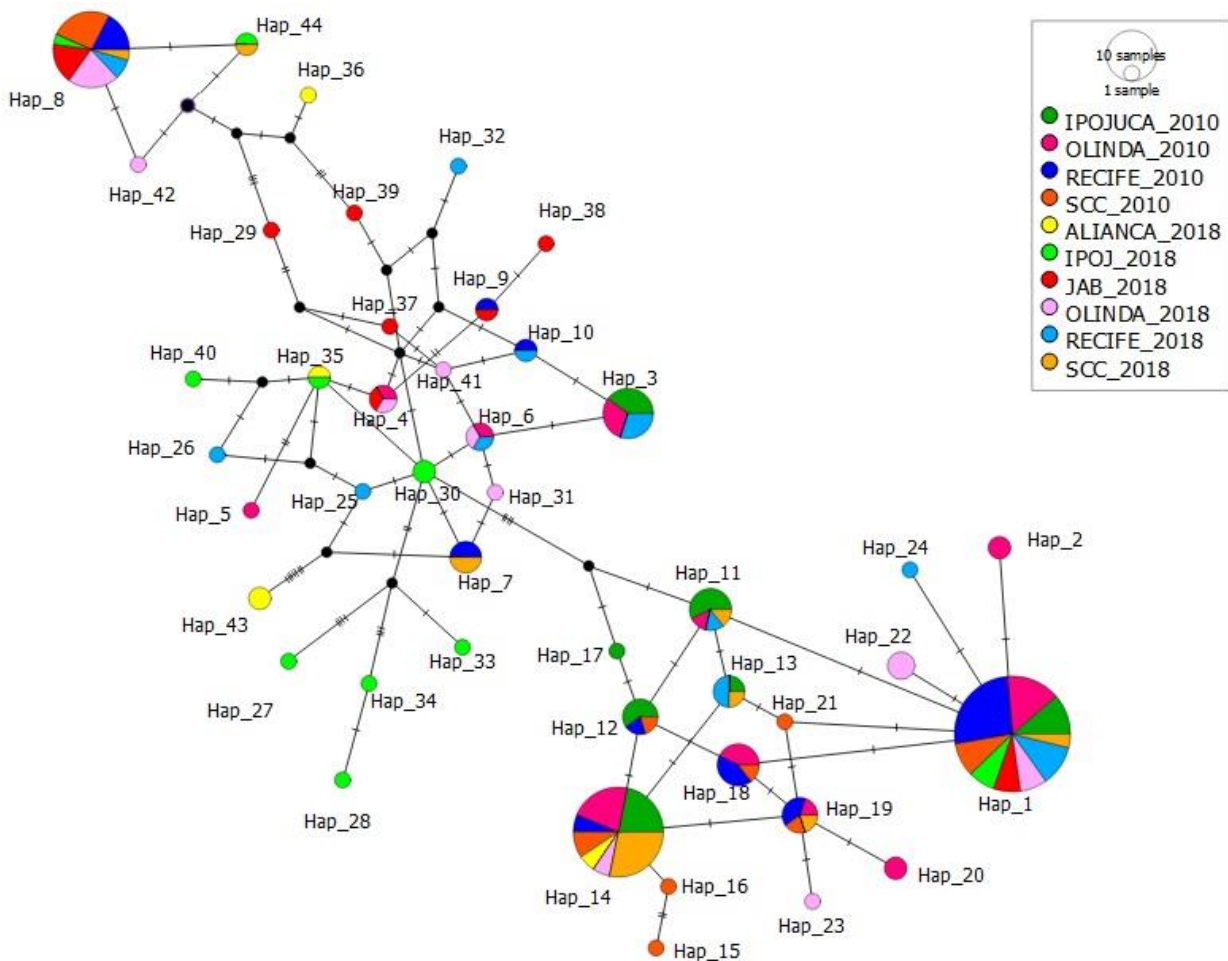
A rede contendo as seqüências de ambos os anos de avaliação do gene *CquiOBP16* mostra 8 haplótipos. O Hap\_1 foi o mais prevalente entre as 10 populações estudadas, o Hap\_2 é o segundo mais distribuído entre as populações, sendo encontrado em 6 populações. Os Hap\_7 e Hap\_8 estão presentes em apenas 2 populações do ano de 2018, SCC e Recife. Hap\_4 é observado para a população de Recife nos dois momentos de avaliação (2010/2018) e em amostras de Ipojuca de 2018. São observados para o *CquiOBP16* 3 haplótipos exclusivos, Hap\_3 em Olinda\_2010 e Hap\_5 e Hap\_6 em SCC\_2018. Entre todos os haplótipos é encontrado um passo mutacional (Figura 45).

Figura 45 – Redes de haplótipos para o gene *CquiOBP16* 2010/2018

Fonte: A autora

Legenda: Na rede de haplótipos o tamanho do gráfico de pizza corresponde à frequência do haplótipo; as linhas transversais representam diferenças de uma única base, e os círculos pretos significam os haplótipos que faltam na conexão dos diferentes haplótipos. SCC: Santa Cruz do Capibaribe

A rede de haplótipos do gene *CquiOR2* mostra a formação de dois grupos em lados opostos, assim como observado no gene *OBP11* para estas populações. Ao todo para *CquiOR2* foram encontrados 44 haplótipos, entre estes, 23 exclusivos, representando alelos raros na população. Os haplótipos únicos foram observados com mais frequência nas populações de Ipojuca (7) e Olinda (8). O haplótipo mais frequente foi o Hap\_1, seguido pelos Hap\_8 e Hap\_14, nenhum deles esteve presente em 100% das populações. Entre a maioria dos haplótipos há a presença de apenas uma mutação, porém para alguns como o Hap\_43, presente exclusivamente em Aliança, há 8 passos mutacionais entre ele e os demais com os quais está relacionado (Figura 46).

Figura 46 – Redes de haplótipos para o gene *CquiOR2* 2010/2018

Fonte: A autora

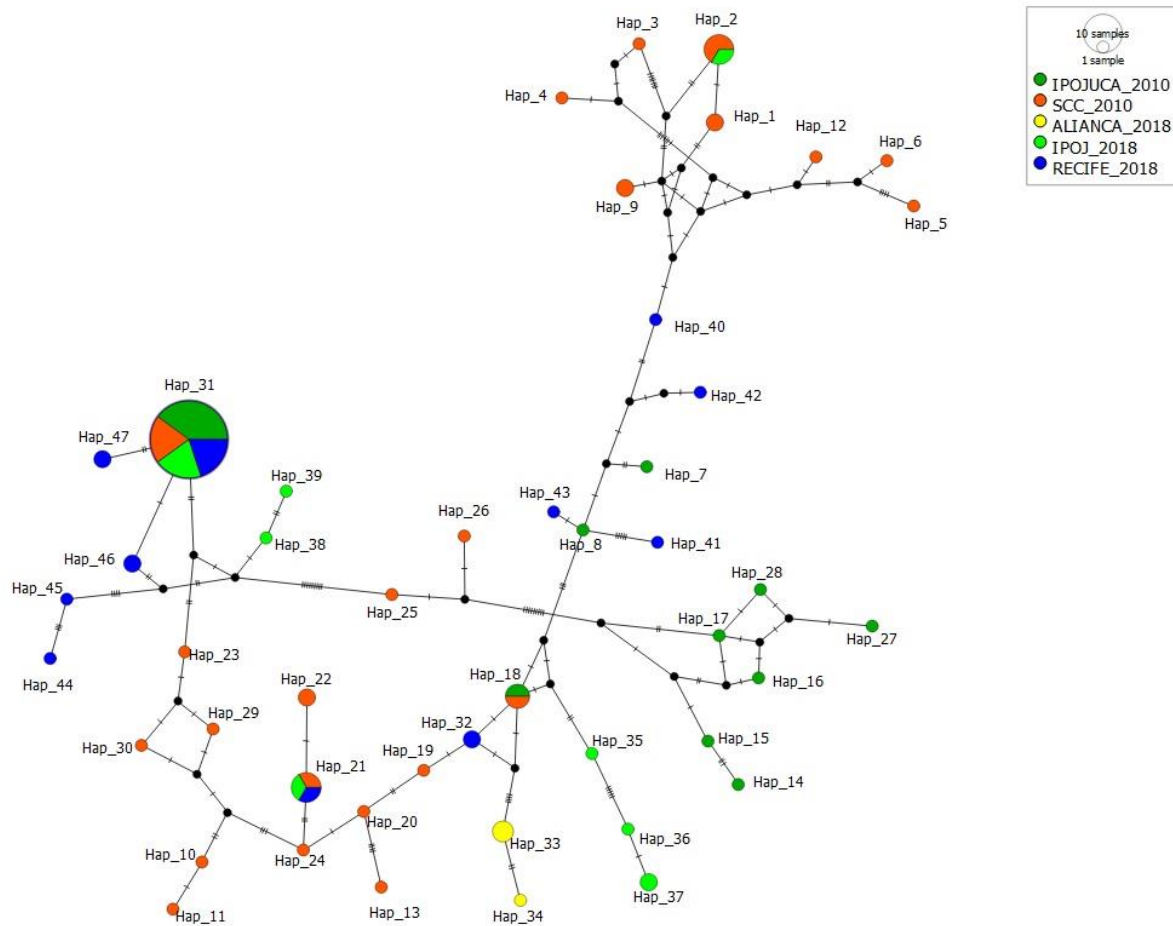
Legenda: Na rede de haplótipos o tamanho do gráfico de pizza corresponde à frequência do haplótipo; as linhas transversais representam diferenças de uma única base, e os círculos pretos significam os haplótipos que faltam na conexão dos diferentes haplótipos. SCC: Santa Cruz do Capibaribe, IPOJ: Ipojuca, JAB: Jaboatão

A rede desenhada entre 2010/2018 para o gene *CquiOR64* mostra 47 haplótipos, nenhum deles esteve presente em 100% das populações, o haplótipo mais prevalente, presente em 4 de 5 populações foi o Hap\_31, encontrado em Ipojuca 2010/2018, SCC\_2010 e Recife\_2018.

Para este gene são vistos muitos haplótipos únicos, representados por 35 dos 47 registrados. SCC foi o município com mais haplótipos únicos, foram 19, seguido por Ipojuca (13), Recife (9), e Aliança (2). Entre os haplótipos são observados, na maioria dos casos, entre 1 e 2 passos mutacionais, porém entre os haplótipos de SCC esse número cresce, chegando a

11 mutações de diferença. Esta observação pode ser feita principalmente entre os haplótipos únicos desta população (Figura 47).

Figura 47 – Redes de haplótipos para o gene *CquiOR64* 2010/2018



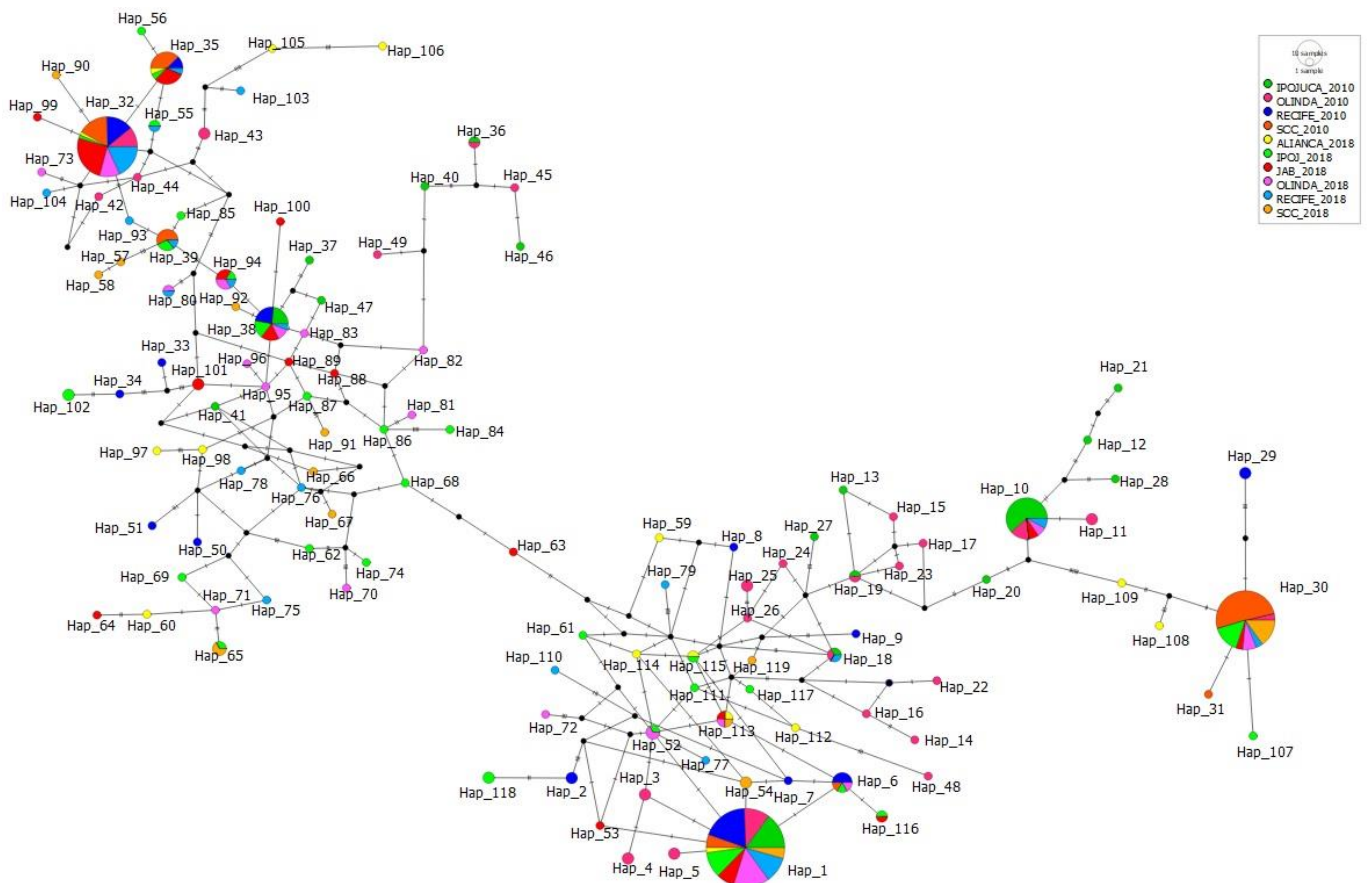
Fonte: A autora.

Legenda: Na rede de haplótipos o tamanho do gráfico de pizza corresponde à frequência do haplótipo; as linhas transversais representam diferenças de uma única base, e os círculos pretos significam os haplótipos que faltam na conexão dos diferentes haplótipos. SCC: Santa Cruz do Capibaribe, IPOJ: Ipojuca

Gerando uma rede de haplótipos com todas as sequências do gene *CquiOR93* 2010/2018 foram registrados 119 haplótipos. É possível observar a formação de um grande emaranhado entre os diferentes haplótipos, estando todos relacionados, com poucas exceções de haplótipos exclusivos localizados em extremidades da rede. É possível notar de forma clara a construção de dois grupos bem separados em lados opostos e interligados por único vértice contendo o haplótipo exclusivo Hap\_63, presente em Jaboatão. Há a predominância de haplótipos exclusivos na rede, 87 dos 119 haplótipos registrados. O haplótipo mais prevalente foi o Hap\_1,

presente em todas as 10 populações entre 2010 e 2018, composto por 94 seqüências. São notados de a 5 passos mutacionais entre os haplótipos (Figura 48).

Figura 48 – Redes de haplótipos para o gene *CquiOR93* 2010/2018

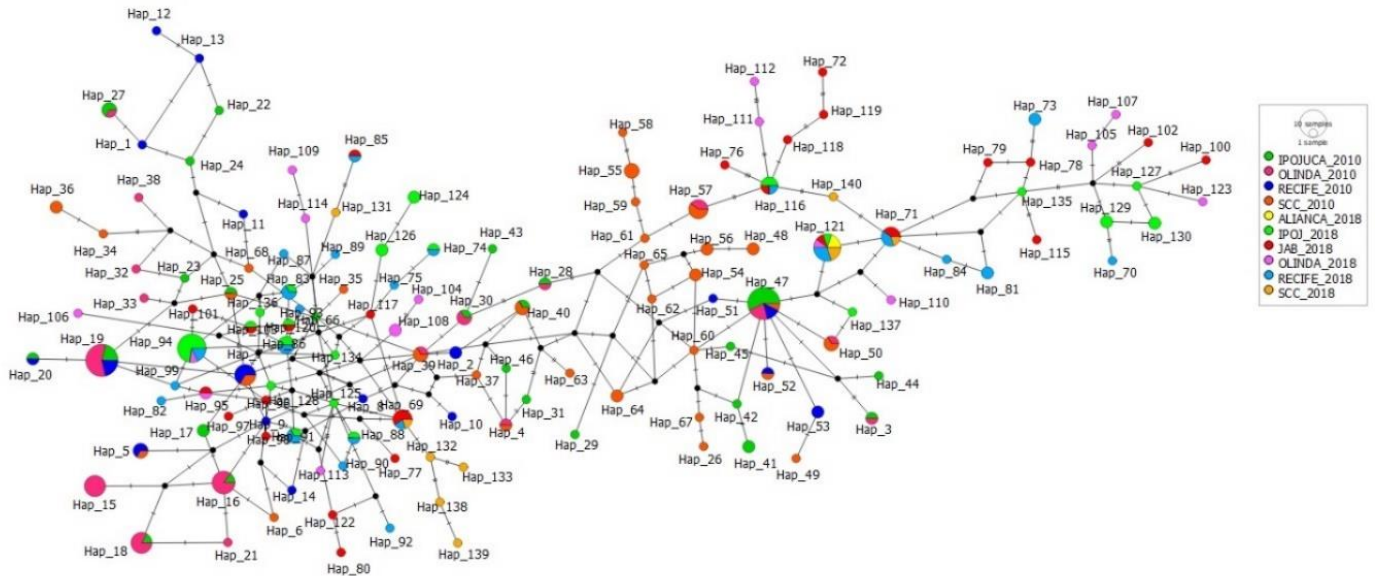


Fonte: A autora

Legenda: Na rede de haplótipos o tamanho do gráfico de pizza corresponde à frequência do haplótipo; as linhas transversais representam diferenças de uma única base, e os círculos pretos significam os haplótipos que faltam na conexão dos diferentes haplótipos. SCC: Santa Cruz do Capibaribe, IPOJ: Ipojuca, JAB: Jaboatão

A rede de haplótipos do gene *CquiOR136* 2010/2018 é formada por um total de 140 haplótipos, distribuídos em 10 populações. Pode ser observada a conexão entre todos os haplótipos da rede, além da formação discreta de dois grupos. Do lado esquerdo a relação entre os muitos haplótipos exclusivos observados nesta rede forma um grande emaranhado. O haplótipo mais prevalente foi o Hap\_121, presente em 6 populações. Dos 140 haplótipos registrados, 90 são exclusivos. Para o *CquiOR136* são vistos no máximo 3 passos mutacionais (Figura 49).



Figura 49 – Redes de haplótipos para o gene *CquiOR136* 2010/2018

Fonte: A autora

Legenda: Na rede de haplótipos o tamanho do gráfico de pizza corresponde à frequência do haplótipo; as linhas transversais representam diferenças de uma única base, e os círculos pretos significam os haplótipos que faltam na conexão dos diferentes haplótipos. SCC: Santa Cruz do Capibaribe, IPOJ: Ipojuca, JAB: Jaboatão



### 13 RESULTADOS DO LEVANTAMENTO DE ANIMAIS PRESENTES NAS CASAS SELECIONADAS PARA COLETA DE MOSQUITOS

Durante as coletas de mosquitos nas casas selecionadas para o estudo foram realizados levantamentos dos animais presentes nas residências, aplicados pelos agentes aos moradores. Em todos os municípios foram observados gatos, cachorros e pássaros (criados em gaiolas) nas casas visitadas. Em 3 municípios (Recife, Olinda e Jaboatão) foram registrados Galos/galinhas. Apenas em Recife e Olinda foram observados patos e tartarugas. Em Recife foi visto Bode/cabra em apenas uma das casas aspiradas. Em Olinda foi observado Ganso em uma das residências visitadas. E em Jaboatão foi observada a presença de cavalo nas residências (quadro 15).

Quadro 15 – Registro de animais presentes nas residências visitadas para a coleta de mosquitos

Registro de animais nas residências					
Animais	Municípios				
	Recife	Olinda	Jaboatão	Ipojuca	SCC
Gato	X	X	X	X	X
Cachorro	X	X	X	X	X
Cavalo			X		
Pato	X	X			
Ganso		X			
Porco					
Boi/vaca					
Galo/galinha	X	X	X		X
Pássaro (gaiola)	X	X	X	X	X
Bobé/cabra	X				
tartaruga	X	X			

Fonte: A autora

Legenda: Lista de animais utilizados como fonte de alimentação sanguínea por fêmeas de *C. quinquefasciatus* em cinco municípios do estado de Pernambuco

#### 13.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA PREFERÊNCIA ALIMENTAR SANGUÍNEA DE FÊMEAS DE *C. quinquefasciatus* COLETADAS EM CINCO MUNICÍPIOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO

Após as PCRs e checagem de amplificação por corrida em gel de agarose, das 225 fêmeas processadas, 113 apresentaram amplificação para serem enviadas ao sequenciamento. Neste grupo, apenas fêmeas coletadas em 2018 apresentaram amplificação de fragmento do gene *Cytb*, por este motivo não foi possível realizar a comparação entre os anos sobre a preferência alimentar das fêmeas de *C. quinquefasciatus* nestes municípios no estado de Pernambuco. Portanto, passou-se a considerar os dados aqui descritos como caracterização da preferência alimentar sanguínea da espécie. Através da análise *in silico* das sequências consenso

de 113 fêmeas ingurgitadas, distribuídas entre as cinco áreas de coleta, foi observada a seguinte proporção de fontes alimentares sanguíneas identificadas: no município de Ipojuca foram investigadas 19 fêmeas ingurgitadas, destas, 13 fêmeas alimentadas com sangue humano (*Homo sapiens*), cinco alimentadas com sangue de galináceo (*Gallus gallus*) e uma alimentada com sangue de coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*); em Jaboatão um total de 21 fêmeas foram investigadas quanto a alimentação sanguínea, 100% estavam alimentadas com sangue humano (*Homo sapiens*); No município de Olinda foram avaliadas 23 fêmeas ingurgitadas, a maior parte delas (20) estava alimentada com sangue humano, duas apresentaram sangue de cachorro (*Canis lupus familiaris*) e uma apresentou sangue de rato-castanho (*Rattus norvegicus*); Em Recife foram avaliadas 23 fêmeas, 100% delas estavam alimentadas com sangue humano (*Homo sapiens*); por fim, no município de Santa Cruz do Capibaribe foram investigadas 27 fêmeas, destas 10 estavam alimentadas com sangue humano (*Homo sapiens*), 16 estavam alimentadas com sangue de galináceo (*Gallus Gallus*) e apenas uma estava alimentada com sangue de coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) (quadro 16).

Quadro 16 – Quantitativo de fêmeas avaliadas por área de coleta e espécies identificadas como fonte de alimentação sanguínea

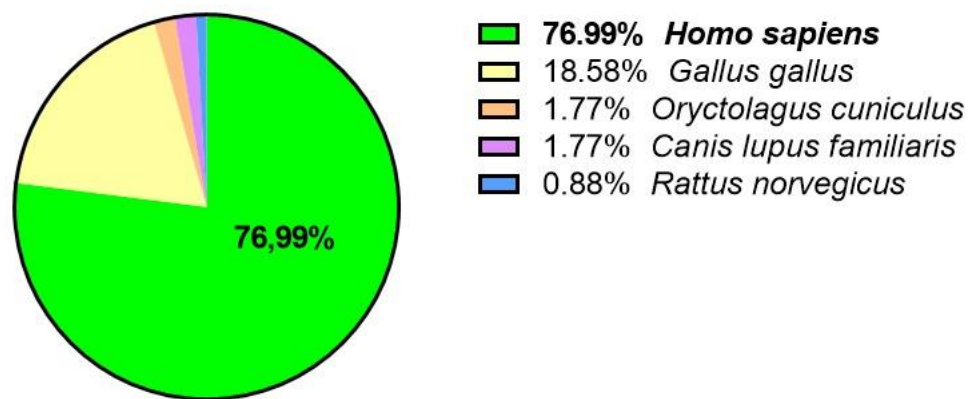
Identificação de fontes alimentares - Cytb		
Municípios	Fêmeas avaliadas	Fontes de alimentação sanguínea
Ipojuca	19	<i>Homo sapiens</i> = 13 <i>Gallus Gallus</i> = 5 <i>Oryctolagus cuniculus</i> = 1
Jaboatão	21	<i>Homo sapiens</i> = 21
Olinda	23	<i>Homo sapiens</i> = 20 <i>Canis lupus familiaris</i> = 2 <i>Rattus norvegicus</i> = 1
Recife	23	<i>Homo sapiens</i> = 23
SCC	27	<i>Homo sapiens</i> = 10 <i>Gallus Gallus</i> = 16 <i>Oryctolagus cuniculus</i> = 1

Fonte: A autora

Avaliando o total de fontes alimentares sanguíneas identificadas por espécie, foi observado que das 113 fêmeas, 87 estavam alimentadas com sangue humano, representando 76,99%; 21 fêmeas apresentaram sangue de galináceo como alimentação (18,58%); duas

fêmeas estavam alimentadas com sangue de coelho doméstico (1,77%) e duas estavam alimentadas com sangue de cachorro (1,77%). Por fim, apenas uma fêmea apresentou sangue de rato-castanho (0,88%) (figura 50). Importante salientar que não houve registro de fêmeas com dupla alimentação neste estudo.

Figura 50 – Percentagem de espécies identificadas como fonte alimentar sanguínea em fêmeas de *C. quinquefasciatus*, coletadas em cinco municípios do estado de Pernambuco.



Fonte: A autora

Legenda: Gráfico do tipo pizza demonstrando a distribuição das fontes alimentares identificadas em fêmeas de *C. quinquefasciatus*, coletadas em cinco municípios do estado de Pernambuco. Evidencia-se o maior número de fêmeas alimentadas com sangue humano (76,99%)

## 14 DISCUSSÃO

Os genes *ORs* e *OBPs* pertencem a famílias de genes olfatórios que evoluem por eventos de duplicação gênica. O acúmulo de mutações nas cópias duplicadas pode levar ao surgimento de novos genes, ou novas funções ou a perda delas, por meio da pseudogenização (AMBROSE et al., 2022; HEKMAT-SCAFE et al., 2002; ROLLMANN et al., 2010). Com o intuito de iniciar uma caracterização funcional dos genes *ORs* e *OBPs* em *C. quinquefasciatus*, investigamos o padrão de expressão de alguns destes genes.

Nossos resultados mostram claramente um padrão de especialização dos genes, com padrões distintos de expressão. O perfil de transcrição dos genes quimiossensoriais estudados foi caracterizado através de ensaios de RT-PCR, onde foi possível observar a amplificação tecido específica para alguns genes, mas todos os 17 genes avaliados foram expressos em antenas. Este resultado corrobora o observado por LEAL et al., 2013, no estudo os autores observaram grande número de receptores odorantes (*OR*) e proteínas de ligação a odorantes (*OBP*) enriquecidos nas antenas de fêmeas de *C. quinquefasciatus*.

Os genes avaliados por RT-qPCR (*CquiOBP2*, *CquiOBP5*, *CquiOBP10*, *CquiOBP11*, *CquiOR2* e *CquiOR93*) apresentaram aumento de expressão em antenas de fêmeas de campo, comparadas as de laboratório, nos três estados fisiológicos avaliados, com exceção do *CquiOR93* em fêmeas após alimentação sanguínea, com discreta redução de expressão em fêmeas de campo. Esta diferença no padrão de expressão em amostras de campo e laboratório tem sérias implicações, pois a maioria dos estudos comportamentais e de biologia molecular para caracterização dos genes odorantes é baseada em análise de colônias de laboratório, e os dados portanto, podem não refletir o que ocorre na natureza. O processo de fundação de uma colônia em laboratório reduz drasticamente a diversidade genética e pode fixar genes que não tem representatividade no campo, ou ao longo do processo de colonização no laboratório, as variantes que são importantes para busca de hospedeiro, por exemplo, podem perder o efeito da seleção natural, já que o alimento é ofertado sem que haja necessidade da busca pelo hospedeiro. Desta forma, os dados devem ser interpretados com cautela.

Quatro dos seis genes estudados quanto a expressão diferencial (*CquiOBP2*, *CquiOBP10*, *CquiOR2* e *CquiOR93*) demonstraram aumento significativo de expressão em antenas de fêmeas de campo após a cópula, momento em que as fêmeas da espécie *C. quinquefasciatus* buscam hospedeiros para a hematofagia (TAPARIA; IGNELL; HILL, 2017a).

O gene *CquiOBP2* mostrou expressão em todos os cinco tipos de tecido avaliados por RT-PCR. Adicionalmente, comparando-se antenas de fêmeas de laboratório com antenas de fêmeas de campo por RT-qPCR, *CquiOBP2* apresentou aumento de expressão significativo ( $p < 0.05$ ) em campo sob estado fisiológico pós-cópula. Em estudo publicado por HOFFMAN; ARAVIND; VELMURUGAN, 2012 o gene *CquiOBP2* também foi observado com aumento de expressão em antenas de fêmeas da espécie *A. gambiae* em comparação com antenas de machos, através de ensaio de RT-qPCR. Os autores ressaltam através de seus achados que o gene *CquiOBP2*, membro de uma grande superfamília de *OBPs* de insetos, pode desempenhar um importante papel no comportamento alimentar das fêmeas de mosquito.

*CquiOBP10* mostrou aumento de expressão significativo ( $p < 0.05$ ) em antenas de fêmeas de campo de *C. quinquefasciatus* pós-cópula, durante experimento de RT-qPCR em comparação com antenas de fêmeas de laboratório. Analisando o gráfico pode-se observar que entre os genes com aumento significativo, foi *CquiOBP10* que mostrou maior expressão diferencial entre amostras de laboratório e campo. DONG et al., 2021 demonstraram em seus estudos que o *knockdown* do gene *CquiOBP10* afeta significativamente o comportamento de busca por hospedeiro em fêmeas de *Aedes aegypti* avaliadas, sugerindo a provável relação deste gene com a atratividade odorante.

O gene *CquiOR2* é descrito na literatura como receptor odorante envolvido na detecção do Indol (IUPAC - 1H-indole), composto volátil produzido principalmente por bactérias e plantas. Em mosquitos adultos a detecção deste composto volátil está relacionada a identificação de locais para oviposição, como também comportamentos de localização de hospedeiros para alimentação sanguínea (RUEL; YAKIR; BOHBOT, 2019). De acordo com SCIALÒ et al., 2012 o Indol é parte da constituição dos voláteis do suor humano, correspondendo a cerca de 30%. Além disso os autores consideram o Indol um composto volátil ambíguo, pois assim como afirmado por outros autores, está associado tanto a busca por hospedeiros como a locais de oviposição.

A literatura disponível sobre o gene *CquiOR2* mostra a caracterização molecular e funcional deste gene em *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. gambiae* e *An. sinensis*. Em nosso estudo iniciamos a caracterização molecular do *CquiOR2* em *C. quinquefasciatus*, trazendo dados sobre transcrição específica em antenas de fêmeas da espécie, além de mostrar aumento de expressão significativo ( $p < 0.05$ ) do gene *CquiOR2* em antenas de fêmeas de campo comparadas a antenas de fêmeas CqSLab após a cópula, estado fisiológico onde, em geral, as

fêmeas da espécie buscam hospedeiros para realizar a alimentação sanguínea, necessária para a complementação de seu ciclo gonadotrófico (SUBRA, 1981; TAPARIA; IGNEILL; HILL, 2017b).

O gene *CquiOR93* foi estudado por RT-PCR de forma qualitativa em cinco tipos teciduais, mostrando expressão específica em tecido de antenas de fêmeas. Em RT-qPCR, através de quantificação relativa, *CquiOR93* mostrou aumento de expressão significativo ( $p < 0.05$ ) em antenas de fêmeas de campo comparadas a antenas de fêmeas de laboratório após a cópula, sugerindo seu possível envolvimento na detecção de voláteis odorantes emitidos por hospedeiro. Este gene foi descrito no estudo de Leal e colaboradores (LEAL et al., 2013) como pertencente ao grupo descrito como “*top OR genes most enriched in antennae*”, com  $\text{mod\_lfc}$  de 7.84 ( $\text{threshold } 0 < \text{mod\_lfc} < 2$ ), demonstrando-se superexpresso em antenas de fêmeas de *C. quinquefasciatus*. Sua função biológica como receptor odorante ainda não está bem esclarecida na literatura. Os estudos moleculares disponíveis indicam que este gene está relacionado a identificação de voláteis odorantes emitidos por hospedeiros, sugerindo sua influência no comportamento alimentar de fêmeas de mosquitos.

Como ocorre em outras espécies de mosquito, as fêmeas de *C. quinquefasciatus* realizam repasto sanguíneo após a cópula, e este comportamento está diretamente relacionado à variação da expressão gênica do seu sistema olfatório, entre um estado fisiológico e outro, estimulando o comportamento de busca de hospedeiro para completar seu ciclo gonadotrófico (CAMARGO et al., 2020; GADENNE; BARROZO; ANTON, 2016; TAPARIA; IGNEILL; HILL, 2017). Estudar as diferenças no perfil de expressão gênica ao longo do desenvolvimento da vida adulta é importante para melhor compreender a capacidade vetorial em populações de mosquitos. Análises de microarray em *Anopheles gambiae* revelou que genes específicos são diferencialmente expressos, demonstrando nível transcricional dependente da idade, que poderia ser usado para determinar a idade dos mosquitos (COOK; SINKINS, 2010). Estas mudanças na vida adulta das fêmeas de mosquito podem interferir no padrão de alimentação sanguínea ou na interação com produtos repelentes. De fato, demonstramos anteriormente que a idade das fêmeas de *Aedes aegypti* afeta as respostas do mosquito ao repelente DEET (LEAL et al., 2017). Observamos em nossos experimentos que a transcrição dos genes *CquiOBP5* e *CquiOBP10* foi regulada positivamente pós-alimentação sanguínea, quando comparada ao estado pós-cópula em mosquitos CqSLab. No entanto, para *CquiOBP10* níveis semelhantes de transcrito foram observados entre os estados pós-emergência e pós-alimentação sanguínea.

Estudo anterior mostrou que *CquiOBP5* estava envolvida com o transporte de um atrativo derivado de humanos, o nonal, também do repelente de insetos picaridina, sugerindo a ligação desta *OBP* com a detecção de hospedeiro para alimentação sanguínea. Também houve afinidade entre *CquiOBP5* e o feromônio de oviposição MOP (YIN et al., 2015).

A maioria dos estudos com os genes *OR* e *OBP* em espécies de mosquitos limita-se à identificação e caracterização genômica (MANOHARAN et al., 2013; MATTHEWS et al., 2016; PITTS, R.J., RINKER, D.C., JONES, P.L., ROKAS, A., ZWIEBEL, 2011; ZHOU et al., 2008). Recentemente, alguns estudos passaram a focar em caracterizar sua função na biologia do mosquito. TAPARIA; IGNELL; HILL, 2017 demonstraram que os membros da subfamília do gene *OR8* são regulados em resposta à alimentação sanguínea e possivelmente estão envolvidos com o comportamento de busca de hospedeiro na espécie *C. quinquefasciatus*. Da mesma forma, WU et al., 2020 encontraram uma correlação positiva entre a expressão dos dois genes *CquiOR114/117* e o comportamento hematófago. Eles encontraram variação do nível de expressão de ambos os genes em dias diferentes após a emergência dos mosquitos, a correlação foi demonstrada pelo silenciamento dos genes usando a técnica de RNA de interferência (RNAi). De maneira semelhante, um estudo utilizou CRISPR/Cas9 para o silenciamento de dois genes em *A. aegypti* (*OBP10* e *OBP22*) e mostrou seu envolvimento no comportamento de busca de hospedeiro (DONG et al., 2021). Interessantemente, os autores também demonstraram que estas *OBPs* têm um efeito pleiotrópico em muitos processos importantes para a capacidade vetorial do mosquito, como reprodução e transmissão de arbovírus.

Recentemente, um estudo demonstrou através de experimentos com populações de laboratório susceptíveis e resistentes a deltametrina, com verificação dos resultados utilizando quatro populações de campo, que o aumento de expressão do gene *OBP28* em mosquitos da espécie *C. quinquefasciatus* tem relação significativa com a resistência a este inseticida (SHEN et al., 2022). Isso sugere um novo mecanismo de resistência a inseticidas e, portanto, mais estudos devem ser realizados para identificar o papel das *OBPs* no desenvolvimento da resistência. No presente estudo, identificamos oito *OBPs* que são expressas em patas ou corpos de fêmeas e podem ser mais investigadas quanto à sua possível interação com inseticidas.

*C. quinquefasciatus* possui 109 *OBPs* e 180 *ORs* anotados (LEAL et al., 2013; MANOHARAN et al., 2013), representando uma expansão em relação aos 131 *ORs* em outra espécie de mosquito doméstico, *A. aegypti* (NENE et al., 2007). Em relação aos genes *OBPs*, 111 foram encontrados em *A. aegypti*, no entanto, apenas 19 ortólogos diretos foram observados

entre essas duas espécies (MANOHARAN et al., 2013). Embora ambas as espécies sejam mosquitos domésticos, *C. quinquefasciatus* possui características especiais que provavelmente estão associadas à sua grande diversidade de genes olfatórios, tais como: depositar ovos em ampla variedade de habitats larvais poluídos e não poluídos, e poder se alimentar de diversas espécies animais, incluindo humanos e pássaros (REDDY et al. 2012). Considerando sua grande capacidade vetorial para transmitir diversos patógenos como nematóides, vírus e protozoários, e o fato de ser uma espécie cosmopolita, em contraste com a distribuição do *A. aegypti* (presente apenas em áreas tropicais e subtropicais), estudar a caracterização funcional de genes olfativos é um grande desafio.

Divergência no padrão de expressão gênica para genes olfatórios tem sido observada mesmo para subespécies. Em um artigo muito recente, GU et al., 2022 identificaram genes (*OR5* e *OR65*) que foram expressos de forma específica para subespécies e demonstraram por meio de RNA de interferência que dois genes olfatórios poderiam inibir o comportamento hematófago de *C. quinquefasciatus*. Nossos dados mostram que estudos para caracterização funcional de genes olfatórios utilizando mosquitos de colônias de laboratório devem ser analisados com cuidado, pois os resultados encontrados para populações naturais podem diferir consideravelmente. Além disso, o padrão de expressão do repertório dos genes *OR* e *OBP* pode variar de acordo com cada nicho ecológico.

A partir dos resultados obtidos em ensaios de RT-qPCR sobre a expressão dos genes olfatórios entre estados fisiológicos de fêmeas de *C. quinquefasciatus*, escolhemos estudar o transcriptoma das antenas das fêmeas de *C. quinquefasciatus* pós-cópula, utilizando amostras de campo (teste) *versus* amostras de laboratório (controle). De acordo com GU et al., 2022 o comportamento de mosquitos hematófagos está intimamente relacionado a expressão de genes olfatórios presentes em seu sistema sensorial, assim como a composição do repertório olfativo destes organismos.

Em nosso estudo utilizamos o sequenciador Miseq, através do qual foram obtidos 5.914 genes, mapeados contra o genoma de referência. Destes, foram observados 386 genes superexpressos e 294 genes subexpressos em campo. 5.234 genes não apresentaram diferença de expressão entre as populações de campo e laboratório no estado fisiológico pós-cópula, podendo estar diferencialmente expressos em outras condições de avaliação.



Em comparação aos 180 *ORs* e 109 *OBPs* anotados no genoma de *C. quinquefasciatus*, em nosso estudo foi observado número reduzido de genes destas duas famílias, fato que pode estar relacionado ao estado fisiológico avaliado (pós-cópula) e ao número de genes destas famílias expressos nas antenas. Algo semelhante foi observado em estudo recente, onde foi avaliado o transcriptoma de antenas de fêmeas de *C. quinquefasciatus* e *C. molestus*, não alimentadas contra alimentadas com sangue, e que resultou em sequenciamento de apenas 2/3 dos genes anotados. Os autores afirmaram que o resultado, assim como visto em nossos dados, está ligado a restrição de um estado fisiológico, ao uso de três replicatas biológicas, o que comprometer o poder de detecção dos genes diferencialmente expressos e ao fato principal de que nem todos os genes anotados destas famílias estão expressos nas antenas (GU et al., 2022).

Vale destacar que curiosamente entre os genes superexpressos por RNASeq, foram observados 16 genes envolvidos no espessamento da cutícula dos insetos adultos. O espessamento da cutícula tem relação direta com a resistência a inseticidas por penetração reduzida, como os piretróides (LILLY et al., 2016). Também foram observados múltiplos genes P450 superexpressos, genes que também possuem relação com a resistência a inseticidas (ISHAK et al., 2016). De acordo com YANG et al., 2021 a superexpressão de genes da família P450 confere altos níveis de resistência a inseticidas em populações de mosquitos. Estes são indícios de que as populações de mosquitos da espécie *C. quinquefasciatus* de campo coletadas para este estudo podem apresentar marcas de resistência em seu transcriptoma de antenas, porém, são necessárias investigações com mais detalhes no futuro.

Os mosquitos de campo utilizados para o experimento de RNAseq foram coletados nos bairros de Cidade Universitária e Mustardinha, pertencentes ao município de Recife/PE. De acordo com DE ARAÚJO et al., 2019, uma das principais estratégias de controle vetorial utilizadas no Brasil pelo PNCD (Programa Nacional de Controle da Dengue), com o claro objetivo de conter a dispersão desta arbovirose, é o uso de inseticidas químicos. Ainda de acordo com os autores, durante 14 anos consecutivos foram aplicados adulticidas, como o piretróide, em áreas consideradas como foco de transmissão, a cada 15 dias em pontos estratégicos. Estes inseticidas químicos foram utilizados por muito tempo, até o surgimento da resistência e consequente falha no controle populacional da espécie *A. aegypti*. Este fato justifica a observação de genes ligados a resistência nas amostras de campo de *C. quinquefasciatus*, pois apesar de não ser a espécie alvo do programa PNCD, coabita os mesmos ambientes e naturalmente também foi afetada pela exposição prolongada a estes compostos

químicos. AMORIM et al., 2013, demonstraram em populações de *C. quinquefasciatus* do estado de Pernambuco, mais especificamente no município de Santa Cruz do Capibaribe, a presença de resistência a inseticidas químicos.

Foram observados entre os genes superexpressos três genes quimiossensoriais (*ORs* e *OBP*s): *CquiOBP9*, *CquiOBP10* e *CquiOR30*. O gene *CquiOBP10*, mostrou aumento significativo de expressão em antenas de fêmeas de campo após a cópula por RT-qPCR. É importante chamar a atenção para o fato de que o gene *CquiOBP10* foi encontrado superexpresso no tecido antenal de fêmeas após a cópula, e este fato o torna gene candidato para estudos comportamentais futuros. Entre os genes subexpressos foi observado o gene quimiossensorial *CquiOR53*, gene precursor de proteína transmembrana localizada na membrana de ORNs e envolvida em processos de transdução de sinal e detecção de estímulos químicos relacionados a percepção sensorial de odores.

Entre os subexpressos foram vistos outros genes quimiossensoriais: CPIJ006216 = *odorant receptor 64 OR64* e CPIJ020280 = *odorant-binding protein OBP2*. O gene *CquiOR64* apresentou transcritos exclusivamente nas antenas em ensaio de RT-PCR. O gene *CquiOBP2* como descrito anteriormente apresentou expressão aumentada significativa em antenas de fêmeas de campo, pós-cópula.

Para identificar se estes genes evoluem de forma neutra ou seletiva e se apresentam o mesmo padrão de evolução, escolhemos investigar a diversidade genética nos genes exclusivamente expressos no tecido antenal (*CquiOBP11*, *CquiOBP16*, *CquiOR2*, *CquiOR64* e *CquiOR93*) e mais o gene *CquiOR136*, importante na detecção do DEET.

Em nosso estudo, o objetivo ao estudar a diversidade genética nos genes quimiossensoriais foi avaliar as mudanças nestes ao longo do tempo, entender de que forma eventos como a epidemia de Zika poderiam influenciar a nível de sequência estes genes olfatórios. De forma geral, observamos a presença de muitos haplótipos únicos nas populações avaliadas para todos os genes, representando a inserção de novos alelos nas populações. Como consequência foi registrada alta diversidade haplotípica geral, como observado por Arnal et al., 2014 em seu estudo sobre polimorfismo genético no gene *OR39* em mosquitos do complexo *Anopheles gambiae* no Oeste da África. Observou-se baixa diversidade nucleotídica em todas as populações estudadas para todos os genes.

Quanto aos testes de neutralidade foram observados, em grande maioria, valores de D de Tajima positivos, indicando processo de seleção balanceadora ou de súbita contração populacional, havendo também a possibilidade do valor de D de Tajima divergir de 0 e desviar da expectativa de neutralidade com base em alterações do cenário demográfico, como expansão populacional. Para confirmar o resultado observado foram gerados dados de  $F_S$  de Fu, que foram valores negativos em grande parte dos resultados, 36 dos 54 testes realizados (67%), em alguns casos valores negativos muito altos. Entre os 36 resultados negativos, 18 foram significativos ( $p < 0.05$ ). Resultados do teste de neutralidade  $F_S$  de FU negativos e significativos podem ser atribuídos à seleção purificadora (ou a expansão populacional recente). Estes resultados reunidos sugerem um excesso de mutações recentes no *locus*, ou seja, excesso de alelos raros.

O teste AMOVA se mostrou semelhante para todos os genes, com maior porcentagem de variação observada dentro das populações que entre as populações, confirmando o observado nos testes de neutralidade, que indica um processo de expansão populacional recente e, entre as áreas, alto fluxo gênico.

Já foi demonstrado que polimorfismos genéticos encontrados em genes de receptores de odorantes alteram a percepção de odores em humanos (KELLER et al., 2007), assim como em *Drosophila sp.* (RICHGELS; ROLLMANN, 2012). Pellegrino et al., 2011 observaram em seu estudo que uma mutação não sinônima resultou em polimorfismo de aminoácido, presente no segundo domínio transmembranar do receptor *OR59B* na espécie *Drosophila melanogaster*, tornou este gene insensível à inibição por ligante odorante e modulação por DEET. Importante ressaltar que o estudo do sistema olfatório dos mosquitos traz conhecimentos importantes para o desenvolvimento de armadilhas baseadas em odores específicos, bem como repelentes capazes de bloquear a emissão de moléculas odorantes dos hospedeiros, consequentemente, reduzindo o contato dos vetores com o ser humano (WHEELWRIGHT; WHITTLE; RIABININA, 2021).

Para complementar nosso estudo de caracterização de genes olfatórios relacionados a atratividade odorante, avaliamos fêmeas de *C. quinquefasciatus* coletadas em campo quanto à preferência alimentar sanguínea.

Houve a identificação de fêmeas alimentadas com sangue de rato-castanho e coelho doméstico. O rato não é considerado animal de criação, porém é bastante comum em áreas urbanizadas e com problemas de saneamento básico, sendo eventualmente encontrados no intradomicílio nestes ambientes. Já o coelho doméstico é comumente encontrado como animal

de estimação de muitas famílias, porém não foi descrito no levantamento de animais presentes nas residências. Esse fato mostra que mesmo com sua marcada preferência alimentar sanguínea pelo hospedeiro humano (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; SUBRA, 1981), esta espécie pode ter um perfil de alimentação diverso.

Em Santa Cruz do Capibaribe foi possível observar maior número de fêmeas alimentadas com sangue de galináceo, diferente do observado nas demais áreas onde predominam fêmeas ingurgitadas com sangue humano. Esse dado pode estar associado ao fato de o município estar localizado no interior do estado de Pernambuco, onde o hábito da criação de animais para alimentação ou comercialização nas casas é comum, facilitando o acesso das fêmeas de *C. quinquefasciatus* a diferentes fontes de alimentação sanguínea.

A grande abundância da espécie e sua alta antropofilia no município de Recife favorecem o ciclo de transmissão da *Wuchereria bancrofti* no ambiente, dificultando a eliminação da filariose na área. A natureza antropofílica de *C. quinquefasciatus* também é observada em outras cidades, onde a espécie também é caracterizada como vetora da filariose, caso da cidade de Digba, Índia (AZMI; DAS; CHATTERJEE, 2015).

Com base nos ensaios de identificação molecular e confirmação *in silico*, em nosso estudo foi observada marcada preferência alimentar da espécie pelo ser humano como fonte de alimentação sanguínea (antropofilia), mais de 70% das fêmeas avaliadas se alimentaram exclusivamente de sangue humano. Nossos dados são concordantes com o observado na cidade de Raipur/Índia, onde a espécie *C. quinquefasciatus* é descrita como predominantemente antropofílica, os autores observaram índices entre 60% e 90% de alimentação sanguínea em seres humanos (DIXIT et al., 2001). Por outro lado, estes dados contrastam com os resultados observados em regiões temperadas, onde *C. quinquefasciatus* é vetor de arbovírus como *West Nile vírus*. No Novo México/EUA, por exemplo, *C. quinquefasciatus* demonstrou preferência alimentar por aves (GREENBERG et al., 2013), no Quênia apenas 0,04% das amostras de *C. quinquefasciatus* avaliadas se alimentaram em humanos (MUTURI et al., 2008), na Europa *Culex pipens* teve uma clara preferência alimentar por aves (RIZZOLI et al., 2015). Em Porto Rico também foi observada preferência da espécie *C. quinquefasciatus* pela alimentação sanguínea em aves, representando 81,2% da identificação molecular realizada pelos autores, contra apenas 3,4% de alimentação em humanos (HOPKEN et al., 2021).

Achados de estudo brasileiro são discordantes dos nossos, os autores descreveram a ausência de preferência alimentar sanguínea de fêmeas de *C. quinquefasciatus* pelo ser humano no estado de Santa Catarina (ALENCAR et al., 2012). Tais resultados estão diretamente

relacionados ao local das coletas, realizadas em área de Mata Atlântica (mata secundária) com a casa mais próxima localizada a 400 m de distância. O tipo de armadilha utilizada (CDC) também tem influência direta sobre o resultado observado pelo grupo.

Importante salientar que a coleta dos mosquitos de nosso estudo foi realizada no intradomicílio das residências através de aspiração, método que permite a captura de fêmeas que estejam em alimentação ativa ou em repouso nos cômodos da habitação. Estes achados levantam a séria questão do risco de introdução de vírus zoonóticos, que podem ser mantidos por *C. quinquefasciatus* e terem maior impacto na incidência dessas doenças no Brasil, devido à alta antropofilia registrada e grande densidade populacional da espécie no país.

Os dados desta tese demonstram uma evolução independente do grupo de genes olfatórios avaliados, através do registro de excesso de variantes raras e diversificação na sua função, como pudemos observar por ensaios de RT-qPCR, que, juntamente a alta antropofilia observada em fêmeas de campo, nos permite concluir que estes genes olfatórios podem ser excelentes candidatos para compreender melhor o processo de reconhecimento, busca e preferência por hospedeiros, ou sítios de oviposição, e desenvolver melhores estratégias de controle deste vetor.

O melhor entendimento do papel da diversidade global, frequência e distribuição das variantes dos genes olfatórios observados em Pernambuco na espécie *C. quinquefasciatus* pode impactar no desenvolvimento de novos repelentes ou atraentes de armadilhas de mosquitos, contribuindo para selecionar variantes importantes que interajam com odorantes e assim, maximizar a eficácia destes produtos.

## 15 CONCLUSÕES

- 1) O padrão de expressão dos genes olfatórios aqui estudados varia de forma significativa entre populações de campo e a colônia de laboratório;
- 2) Os resultados do padrão de expressão e diversidade genética indicam que estes genes possuem provavelmente função diversificada, e que estão evoluindo de forma distinta, apesar de serem resultado de duplicação gênica;
- 3) Os testes de neutralidade sugerem que a maioria dos genes está evoluindo por seleção balanceadora.;
- 4) Com base nos resultados dos testes de neutralidade, Análise da Variância Molecular (AMOVA) e redes de haplótipos, as populações de *C. quinquefasciatus* estudadas no estado de Pernambuco mostraram estar sob seleção purificadora (expansão populacional recente);
- 5) O gene *CquiOR93* apresentou mutações não sinônimas o que pode sugerir um processo de seleção positiva para estas mutações;
- 6) A detecção de genes ligados à resistência a inseticidas (DEET, piretróides) superexpressos no transcriptoma de antenas de fêmeas de *C. quinquefasciatus*, em nosso estudo alerta para a necessidade de futuras investigações sobre os níveis de resistência das populações dos municípios visitados;
- 7) A população de *Culex quinquefasciatus* do estado de Pernambuco se mostrou altamente antropofílica, revelando um padrão comportamental diferente daquele registrado para populações da mesma espécie no hemisfério norte.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, J. *et al.* Feeding patterns of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Eastern Santa Catarina State, Brazil. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 49, n. 4, p. 952–954, 2012.
- AMBROSE, L. *et al.* Comparisons of chemosensory gene repertoires in human and non-human feeding *Anopheles* mosquitoes link olfactory genes to anthropophily. iScience, Cambridge, v. 25, n. 7, p. 1-27, 2022.
- AMORIM, L. B. *et al.* Susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) populations to the chemical insecticide temephos in Pernambuco, Brazil. Pest Management Science, West Sussex, v. 69, n. 12, p. 1307–1314, 2013.
- ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics, Oxford, v. 31, n. 2, p. 166–169, 2015.
- ARNAL, A. *et al.* Genetic polymorphism at an odorant receptor gene (OR39) among mosquitoes of the *Anopheles gambiae* complex in Senegal (West Africa). BMC Research Notes, London, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2014.
- AYRES, C. *et al.* Response to: ‘Lack of evidence for Zika virus transmission by *Culex* mosquitoes’. Emerging Microbes and Infections, London, v. 6, n. 1, p. 1–2, 2017.
- AZMI, S. A.; DAS, S.; CHATTERJEE, S. Seasonal prevalence and blood meal analysis of filarial vector *Culex quinquefasciatus* in coastal areas of Digha, West Bengal, India. Journal of Vector Borne Diseases, Delhi, v. 52, n. 3, p. 252–256, 2015.
- BENTON, R. *et al.* Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. PLoS Biology, San Francisco, v. 4, n. 2, p. 240–257, 2006.
- BHATTACHARYA, S.; BASU, P.; SAJAL BHATTACHARYA, C. The Southern House Mosquito, *Culex quinquefasciatus*: profile of a smart vector. Journal of Entomology and Zoology Studies JEZS, Delhi, v. 73, n. 42, p. 73–81, 2016.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, Oxford, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- BRAMBATI, A.; BARRY, R. M.; SFEIR, A. DNA polymerase theta (Polθ) – an error-prone polymerase necessary for genome stability. Current Opinion in Genetics and Development, London, v. 60, p. 119–126, 2020.
- BRANDA, M. F. *et al.* Gonoactivity of *Culex (Culex)* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes during Winter in Temperate Argentina. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 58, n. 3, p. 1454–1458, 2021.
- BRITO, N. F.; MOREIRA, M. F.; MELO, A. C. A. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception. Journal of Insect Physiology, Oxford, v. 95, p. 51–65, 2016.

- CAMARGO, C. *et al.* Mating and blood-feeding induce transcriptome changes in the spermathecae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Scientific Reports, London, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- CAREY, A. F. *et al.* Odorant reception in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Nature, London, v. 464, n. 7285, p. 66–71, 2010.
- CAREY, A. F.; CARLSON, J. R. Insect olfaction from model systems to disease control. Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington, v. 108, n. 32, p. 12987–12995, 2011.
- CARRAHER, C. *et al.* Towards an understanding of the structural basis for insect olfaction by odorant receptors. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 66, p. 31–41, 2015.
- CLARK, J. T.; RAY, A. Olfactory Mechanisms for Discovery of Odorants to Reduce Insect-Host Contact. Journal of Chemical Ecology, New York, v. 42, n. 9, p. 919–930, 2016.
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- COOK, P. E.; SINKINS, S. P. Transcriptional profiling of *Anopheles gambiae* mosquitoes for adult age estimation. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 19, n. 6, p. 745–751, 2010.
- DA SILVA JUNIOR, E. F. *et al.* *Wuchereria bancrofti* infection in Haitian immigrants and the risk of re-emergence of lymphatic filariasis in the Brazilian Amazon. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 50, n. 2, p. 256–259, 2017.
- DE ARAÚJO, A. P. *et al.* Screening *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations from Pernambuco, Brazil for Resistance to Temephos, Diflubenzuron, and Cypermethrin and Characterization of Potential Resistance Mechanisms. Journal of Insect Science, Tucson, v. 19, n. 16, p. 1-15, 2019.
- DE, T. DAS *et al.* A synergistic transcriptional regulation of olfactory genes drives blood-feeding associated complex behavioral responses in the mosquito *Anopheles culicifacies*. Frontiers in Physiology, Lausanne, v. 9, n. 577, p. 1–15, 2018.
- DEL MÁRMOL, J.; YEDLIN, M. A.; RUTA, V. The structural basis of odorant recognition in insect olfactory receptors. Nature, London, v. 597, n. 7874, p. 126–131, 2021.
- DIAZ, L. A. *et al.* Transmission of endemic St. louis encephalitis virus strains by local *Culex quinquefasciatus* populations in córdoba, Argentina. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 107, n. 5, p. 332–334, 2013.
- DIXIT, V. *et al.* Host Preference of *Culex quinquefasciatus* in Raipur city of Chattisgarh State. Journal of Communicable Diseases, Delhi, v. 33, n. 1, p. 17–22, 2001.



- DOBIN, A. *et al.* STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics, Oxford, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013.
- DONG, S. *et al.* Pleiotropic Odorant-Binding Proteins Promote *Aedes aegypti* Reproduction and Flavivirus Transmission. mBio, Washington, v. 12, n. 5, p. 1–18, 2021.
- ECKSHAIN-LEVI, N.; WEISBERG, A. J.; VINATZER, B. A. The population genetic test Tajima's D identifies genes encoding pathogen-associated molecular patterns and other virulence-related genes in *Ralstonia solanacearum*. Molecular Plant Pathology, Oxford, v. 19, n. 9, p. 2187–2192, 2018.
- EPELBOIN, Y. *et al.* Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 11, n. 11, p. 1–22, 2017.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources, London, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.
- FAN, J. *et al.* An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception. Genetics and Molecular Research, Ribeirão Preto, v. 10, n. 4, p. 3056–3069, 2011.
- FARAJOLLAHI, A. *et al.* “Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. Infection, Genetics and Evolution, Amsterdam, v. 11, n. 7, p. 1577–1585, 2011.
- FRANCESCHINI, A. *et al.* STRING v9.1: Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. Nucleic Acids Research, London, v. 41, n. D1, p. 808–815, 2013.
- FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics, Austin, v. 147, n. 2, p. 915–925, 1997.
- GADENNE, C.; BARROZO, R. B.; ANTON, S. Plasticity in Insect Olfaction: To Smell or Not to Smell? Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 61, p. 317–333, 2016.
- GETAHUN, M. N. *et al.* Temporal response dynamics of *Drosophila* olfactory sensory neurons depends on receptor type and response polarity. Frontiers in Cellular Neuroscience, Lausanne, v. 6, n. 54, p. 1–11, 2012.
- GHAVAMI, M. B.; KHOEINI, S.; DJADID, N. D. Molecular characteristics of odorant-binding protein 1 in *Anopheles maculipennis*. Malaria Journal, London, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2020.
- GREENBERG, J. A. *et al.* Identification of Blood Meal Sources in *Aedes vexans* and *Culex quinquefasciatus* in Bernalillo County, New Mexico. Journal of Insect Science, Tucson, v. 13, n. 75, p. 1–12, 2013.

GU, Z. Y. *et al.* Screening of olfactory genes related to bloodfeeding behaviors in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Culex pipiens molestus* by transcriptome analysis. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 16, n. 2, p. 1–15, 2022.

GUEDES, D. R. D. *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. Emerging Microbes and Infections, London, v. 6, n. 8, 2017.

GUO, X. X. *et al.* *Culex pipiens quinquefasciatus*: A potential vector to transmit Zika virus. Emerging Microbes and Infections, London, v. 5, n. 9, p. 1-5, 2016.

HALL, T. A. BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, London, n. 41, p. 95–98, 1999.

HEKMAT-SCAFE, D. S. *et al.* Genome-Wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. Genome Research, New York, v. 12, n. 9, p. 1357–1369, 2002.

HILL, S.; CONNELLY, R. **Southern house mosquito – *Culex quinquefasciatus* Say.** Disponível em: <[http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/southern\\_house\\_mosquito.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/southern_house_mosquito.htm)>. Acesso em: 18 fev. 2019.

HILL, S. R.; IGNELL, R. Modulation of odour-guided behaviour in mosquitoes. Cell and Tissue Research, Berlin, v. 383, n. 1, p. 195–206, 2021.

HOFFMAN, S. A.; ARAVIND, L.; VELMURUGAN, S. Female *Anopheles gambiae* antennae: increased transcript accumulation of the mosquito-specific odorant-binding-protein OBP2. Parasites & Vectors, London, v. 5, n. 1, p. 1-27, 2012.

HOPKEN, M. W. *et al.* Temporal and spatial blood feeding patterns of urban mosquitoes in the san juan metropolitan area, Puerto Rico. Insects, Basel, v. 12, n. 2, p. 1–21, 2021.

ISHAK, I. H. *et al.* The Cytochrome P450 gene CYP6P12 confers pyrethroid resistance in kdr-free Malaysian populations of the dengue vector *Aedes albopictus*. Scientific Reports, London, v. 6, n. 24707, p. 1–13, 2016.

KELLER, A. *et al.* Genetic variation in a human odorant receptor alters odour perception. Nature, London, v. 449, n. 7161, p. 468–472, 2007.

KENNEY, J. L. *et al.* Transmission incompetence of *Culex quinquefasciatus* and *Culex pipiens pipiens* from North America for zika virus. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 96, n. 5, p. 1235–1240, 2017.

KYTHREOTI, G. *et al.* Volatile allosteric antagonists of mosquito odorant receptors inhibit human-host attraction. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 296, n. 100172, p. 1-14, 2021.

- LEAL, W. S. Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 58, n. 1, p. 373–391, 2013.
- LEAL, W. S. *et al.* Differential expression of olfactory genes in the southern house mosquito and insights into unique odorant receptor gene isoforms. Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington, v. 110, n. 46, p. 18704–18709, 2013.
- LEAL, W. S. *et al.* Does Zika virus infection affect mosquito response to repellents? Scientific Reports, London, v. 7, n. 42826, p. 1–9, 2017.
- LEIGH, J. W.; BRYANT, D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. Methods in Ecology and Evolution, London, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.
- LILLY, D. G. *et al.* Cuticle thickening in a pyrethroid-resistant strain of the common bed bug, *Cimex lectularius* L. (hemiptera: Cimicidae). PLoS ONE, San Francisco, v. 11, n. 4, p. 6–16, 2016.
- LIU, N. *et al.* Multiple cytochrome P450 genes: Their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. PLoS ONE, v. 6, n. 8, p. 6–13, 2011.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology, London, v. 15, n. 12, p. 1–21, 2014.
- LUNDIN, C. *et al.* Membrane topology of the *Drosophila* OR83b odorant receptor. FEBS Letters, Amsterdam, v. 581, n. 29, p. 5601–5604, 2007.
- MANIMEGALAI, K.; SUKANYA, S. Biology of the filarial vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, Tamilnadu, v. 3, n. 4, p. 718–724, 2014.
- MANOHARAN, M. *et al.* Comparative genomics of odorant binding proteins in *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus*. Genome Biology and Evolution, London, v. 5, n. 1, p. 163–180, 2013.
- MARTINEZ, J. *et al.* Differential attraction in mosquito-human interactions and implications for disease control. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, London, v. 376, n. 20190811, p. 1–11, 2021.
- MATTHEWS, B. J. *et al.* The neurotranscriptome of the *Aedes aegypti* mosquito. BMC Genomics, London, v. 17, n. 1, p. 1–20, 2016.
- MCBRIDE, C. S. *et al.* Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. Nature, London, v. 515, n. 7526, p. 222–227, 2014.

- MITRA, S. *et al.* Olfaction-Related Gene Expression in the Antennae of Female Mosquitoes From Common *Aedes aegypti* Laboratory Strains. Frontiers in Physiology, Lausanne, v. 12, n. 668236, p. 1–12, 2021.
- MOLAEI, G. *et al.* Host feeding pattern of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and Its Role in Transmission of West Nile Virus in Harris County, Texas. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 77, n. 1, p. 73–81, 2007.
- MUTURI, E. J. *et al.* Blood-feeding patterns of *Culex quinquefasciatus* and other culicines and implications for disease transmission in Mwea rice scheme, Kenya. Parasitology Research, Berlin, v. 102, n. 6, p. 1329–1335, 2008.
- NENE, V. *et al.* Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. Science, Washington, v. 316, n. 5832, p. 1718–1723, 2007.
- PAIVA, M. H. S. *et al.* An unsettling explanation for the failure of skatole-baited ovitraps to capture *Culex* mosquitoes. Insect Science, Tucson, v. 00, p. 1–8, 2018.
- PELLEGRINO, M. *et al.* A natural polymorphism alters odour and DEET sensitivity in an insect odorant receptor. Nature, London, v. 478, n. 7370, p. 511–514, 2011.
- PELOSI, P. *et al.* Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. Biological Reviews, Cambridge, v. 93, n. 1, p. 184–200, 2018.
- PITTS, R.J., RINKER, D.C., JONES, P.L., ROKAS, A., ZWIEBEL, L. J. Transcriptome profiling of chemosensory appendages in the malaria vector *Anopheles gambiae* reveals tissue- and sex-specific signatures of odor coding. BMC, London, v. 12, n. 271, p. 1-17, 2011.
- PORTILLA-PULIDO, J. S. *et al.* Design of a Repellent Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Using in silico Simulations with AaegOBP1 Protein. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 57, n. 2, p. 463–476, 2020.
- RAMESH, A. *et al.* Development of an urban molecular xenomonitoring system for lymphatic filariasis in the Recife Metropolitan Region, Brazil. PLoS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 12, n. 10, p. 1-24, 2018.
- 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 and Vectors, London, v. 12, n. 1, p. 1–17, 2019.
- RIABININA, O. *et al.* Organization of olfactory centres in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Nature Communications, London, v. 7, n. 13010, p.1-12, 2016.
- RICHGELS, P. K.; ROLLMANN, S. M. Genetic variation in odorant receptors contributes to variation in olfactory behavior in a natural population of *Drosophila melanogaster*. Chemical Senses, Oxford, v. 37, n. 3, p. 229–240, 2012.

- RIZZOLI, A. *et al.* Understanding West Nile virus ecology in Europe: *Culex pipiens* host feeding preference in a hotspot of virus emergence. Parasites and Vectors, London, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2015.
- ROLLMANN, S. M. *et al.* Odorant receptor polymorphisms and natural variation in olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. Genetics, Austin, v. 186, n. 2, p. 687–697, 2010.
- ROUNDY, C. M. *et al.* Lack of evidence for Zika virus transmission by *Culex* mosquitoes. Emerging Microbes and Infections, London, v. 6, n. 1, p. 1–2, 2017.
- RUEL, D. M.; YAKIR, E.; BOHBOT, J. D. Supersensitive Odorant Receptor Underscores Pleiotropic Roles of Indoles in Mosquito Ecology. Frontiers in Cellular Neuroscience, Lausanne, v. 12, n. 533, p. 1–8, jan. 2019.
- SCIALÒ, F. *et al.* Molecular and Functional Characterization of the Odorant Receptor2 (OR2) in the Tiger Mosquito *Aedes albopictus*. PLoS ONE, San Francisco, v. 7, n. 5, p. 1-11, 2012.
- SHEN, R. XIN *et al.* Deltamethrin interacts with *Culex quinquefasciatus* odorant-binding protein: a novel potential resistance mechanism. Parasites and Vectors, London, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2022.
- SHIAO, M. S. *et al.* Expression Divergence of Chemosensory Genes between *Drosophila sechellia* and Its Sibling Species and Its Implications for Host Shift. Genome biology and evolution, London, v. 7, n. 10, p. 2843–2858, 2015.
- SIM, S.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. Dengue virus infection of the *Aedes aegypti* salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior. PLoS Pathogens, San Francisco, v. 8, n. 3, p. 1-15, 2012.
- STEPHEN A. BUSTIN, V. B. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clinical Chemistry, New York, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- SUBRA, R. Biology and control of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera, Culicidae) with special reference to Africa. International Journal of Tropical Insect Science, London, v. 1, n. 04, p. 319–338, 1981.
- SUH, E.; BOHBOT, J. D.; ZWIEBEL, L. J. Peripheral olfactory signaling in insects. Current Opinion in Insect Science, Amsterdam, v. 6, p. 86–92, 2014.
- T. D. KOCHER, W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. PAABO, F. X. VILLABLANCA, A. A. C. W. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings National Academy of Sciences, Washington, v. 86, n. 16, p. 6196–6200, 1989.

TAJIMA, F. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. Genetics, Austin, v. 123, n. 3, p. 585–595, 1989.

TAPARIA, T.; IGNELL, R.; HILL, S. R. Blood meal induced regulation of the chemosensory gene repertoire in the southern house mosquito. BMC Genomics, London, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2017.

TIAN, W. *et al.* OBP14 (Odorant-binding protein) sensing in *Adelphocoris lineolatus* based on peptide nucleic acid and graphene oxide. Insects, Basel, v. 12, n. 5, p. 1–18, 2021.

WANG, G. *et al.* Molecular basis of odor coding in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington, v. 107, n. 9, p. 4418–4423, 2010.

WHEELWRIGHT, M.; WHITTLE, C. R.; RIABININA, O. Olfactory systems across mosquito species. Cell and Tissue Research, Berlin, v. 383, n. 1, p. 75–90, 2021.

WICHER, D.; MIAZZI, F. Functional properties of insect olfactory receptors: ionotropic receptors and odorant receptors. Cell and Tissue Research, Berlin, v. 383, n. 1, p. 7–19, 2021.

WILKE, A. B. B. *et al.* Population genetics of neotropical *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasites and Vectors, London, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2014.

WILKE, A. B. B.; DE CARVALHO, G. C.; MARRELLI, M. T. Microgeographic Population Structuring of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) From São Paulo, Brazil. Journal of medical entomology, Honolulu, v. 54, n. 6, p. 1582–1588, 2017.

WOLFF, G. H.; RIFFELL, J. A. WOLFF, G. H.; RIFFELL, J. A. Olfaction, experience and neural mechanisms underlying mosquito host preference. The Journal of Experimental Biology, Cambridge, v. 221, n. 4, p. 1-13, 2018.

WU, Q. *et al.* RNA interference of odorant receptor CquiOR114/117 affects blood-feeding behavior in *Culex quinquefasciatus*. Acta Tropica, Basel, v. 204, n. 105343, p. 1-6, 2020.

XU, P. *et al.* Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 111, n. 46, p. 16592–16597, 2014.

YADOULÉTON, A. *et al.* Insecticide resistance status in *Culex quinquefasciatus* in Benin. Parasites and Vectors, London, v. 8, n. 1, p. 4–9, 2015.

YANG, T. *et al.* Multiple cytochrome P450 genes: conferring high levels of permethrin resistance in mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. Scientific Reports, London, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2021.

YE, Z.; LIU, F.; LIU, N. Olfactory responses of southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus*, to human odorants. Chemical Senses, Oxford v. 41, n. 5, p. 441–447, 2016.

YIN, J. et al. Selectivity of odorant-binding proteins from the southern house mosquito tested against physiologically relevant ligands. Frontiers in Physiology, Lausanne, v. 6, n. 56, p. 1–8, 2015.

ZHOU, J. J. et al. Identification of odorant-binding proteins of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: Genome annotation and comparative analyses. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 17, n. 2, p. 147–163, 2008.

**ANEXO A - QUESTIONÁRIOS DE AVALIAÇÃO DAS RESIDÊNCIAS**

Avaliador: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

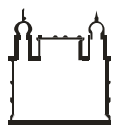
Nome Proprietário: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

Nº	Tipos de agravos	Classes	Marque (X)
1	Tipo de construção	Tijolo	
		Alvenaria	
		Outros materiais	
		Quintal sem vegetação	
		Jardim com vegetação	
		Jardim sem vegetação	
3	Nº de residentes	1 a 3	
		4	
		5	
		> 5	
4	Abastecimento de água	Sempre	
		Não fornecida por rede geral	
		2 ou 3 vezes na semana	
5	Armazenamento de água	Cisterna	
		Caixa d'água	
		Ambos	
		Outros recipientes	
6	Escoamento de esgoto	Fossa	
		Rede geral de esgoto	
		A céu aberto	
		Canaletas	
		Outros	
7	Escoamento de água	Para rua	
		Para fossa/ esgoto	
		Empoçada quintal/ jardim	
8		Diariamente	



	<b>Coleta de lixo</b>	1x/ 2x por semana	
		Quinzenalmente	
		Mensalmente/Nunca	
9	<b>Presença de criadouros</b>	Positivo	
		Negativo	
10	<b>Escolaridade chefe da família</b>	1º completo	
		2º completo	
		3º completo	
		Sem escolaridade	
11	<b>Renda Chefe de Família</b>	1 salário mínimo	
		2 a 4 salários mínimos	
		>5 salários mínimos	
		Sem renda fixa	
12	<b>Conhecimento sobre mosquito-doença</b>	Sim	
		Não	
13	<b>Teve alguma dessas doenças:</b>	Dengue	
		Zika	
		Chikungunya	
		Filariose	
14	<b>Que tipo de animais Possui em casa ou comum na vizinhança</b>	Gato	
		Cachorro	
		Cavalo	
		Pato	
		Ganso	
		Porco	
		Boi/vaca	
		Galo/galinha	
		Pássaro (gaiola)	
		*Pássaro (presença)	
		Bode/cabra	
		Cágado/Tartaruga	
		Outros: Quais? _____	



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

**ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado Sr. (a),

Estamos lhe convidando a participar da pesquisa intitulada “**Avaliação de dois Métodos de Coleta para Vigilância de Arbovírus em Mosquitos do Gênero *Aedes* e *Culex***”, que tem como objetivo comparar duas formas de coletar mosquitos do gênero *Aedes* (mosquito da dengue), *Culex* (muriçoca) e outros, para verificar se estão contaminados com os vírus da dengue, chikungunya, Zika ou outros.

Sua participação consistirá em autorizar a entrada de pesquisadores e Agentes de Endemias que irão instalar armadilhas ou utilizar aspiradores manuais para coleta dos mosquitos dentro de sua residência. As armadilhas permanecerão instaladas por um período de sete dias, e as aspirações serão realizadas antes da colocação das armadilhas e após sua retirada. Todo o procedimento com as armadilhas e os aspiradores será realizado no período da manhã. A atividade de aspiração levará aproximadamente 15 minutos, em locais de repouso dos mosquitos, ou seja, quartos, cozinha, banheiros e salas. Estas coletas serão realizadas em locais onde tenham pessoas com suspeita ou não de viroses transmitidas por mosquitos, informadas pelo departamento de Epidemiologia da Secretária Estadual de Saúde. Asseguro que os métodos de coleta de mosquitos por armadilha ou aspiração não oferecem riscos aos moradores, adultos, crianças ou mesmo animais domésticos, tendo apenas como risco de constrangimento a entrada dos pesquisadores nos diferentes cômodos de suas residências.

Informamos que este estudo trará como benefício imediato à retirada de mosquitos do ambiente da sua residência, diminuindo a presença de fêmeas destes insetos que além de causarem um grande incômodo pelas picadas, durante a alimentação de sangue no homem, podem transmitir vírus e vermes causadores de doenças como, dengue, Zika, chikungunya e Filariose. Além disso, caso sejam encontrados mosquitos infectados esta informação será repassada ao Centro de Vigilância Ambiental do município para que sejam reforçadas as ações de controle dos mosquitos.

O Senhor (a) poderá recusar ou retirar seu consentimento de participação em qualquer fase da pesquisa, sem constrangimentos. Garantimos também, que toda e qualquer informação a respeito de sua pessoa, familiares, bem como de seus pertences serão mantidos em sigilo durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

Informamos por fim, que qualquer dúvida sobre o projeto poderá ser esclarecida pela pesquisadora responsável, Dra. Rosângela Barbosa, pelo telefone (81) 2101-2550 (CPqAM – Depto. de Entomologia). Recursos ou reclamações em relação à pesquisa o Senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CEP/CPqAM), através do telefone (81) 2102-2639, no horário comercial, o qual tomará as medidas cabíveis.

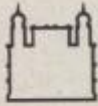
Este documento será emitido e assinado em duas vias, uma ficará sob a sua guarda e a outra com a coordenadora do projeto.

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018.

Eu \_\_\_\_\_, morador do imóvel nº \_\_\_\_\_ situado na rua \_\_\_\_\_ no bairro de \_\_\_\_\_, concordo em participar da referida pesquisa e fico de posse de uma via desse documento.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do morador

\_\_\_\_\_  
Coordenadora da Pesquisa

**ANEXO C – CARTA À SECRETARIA ACADÊMICA SOBRE ANUÊNCIA CEP**

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

**Ofício Nº 01 / 2019/ Departamento de Entomologia****Recife, 19 de fevereiro de 2019.****À Secretaria Acadêmica****Assunto: Anuência do Comitê de Ética em Pesquisa**

Prezado (a),

Venho através deste, informar à Secretária Acadêmica, que o projeto intitulado "Caracterização de genes dos Receptores Olfatórios (ORS) e proteínas de ligação a odorantes (OBPs) relacionados à atratividade odorante em *Culex quinquefasciatus* no estado de Pernambuco" desenvolvido pela doutoranda Suzane Alves dos Santos, não necessitará passar pelo Comitê de Ética em Pesquisa, pelo motivo que todo o material que irá utilizar para o desenvolvimento do seu projeto faz parte do material coletado no projeto intitulado "Avaliação de dois Métodos de Coleta para Vigilância de Arbovírus em Mosquitos do Gênero *Aedes* e *Culex*", sob minha coordenação. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães (CAAE: 51012015.9.0000.5190/ Parecer PlatBr 1.547.598) Segue em anexo o parecer.

Atenciosamente,

Rosângela Maria Rodrigues Barbosa  
Pesquisadora em Saúde Pública  
IAM/Fiocruz PE

Rosângela Maria Rodrigues Barbosa  
Chefe do Dept. de Entomologia  
Matrícula Sispex 1604918  
IAM / FioCruz



## ANEXO D – CARTA DE ANUÊNCIA CEP



**Título do Projeto:** "Avaliação de dois Métodos de Coleta para Vigilância de Arbovírus em Mosquitos do Gênero Aedes e Culex".

**Pesquisador responsável:** Rosângela Maria Rodrigues Barbosa

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 17/11/2015

**Registro no CAAE:** 51012015.9.0000.5190

**Número do Parecer PlatBr:** : 1.547.598

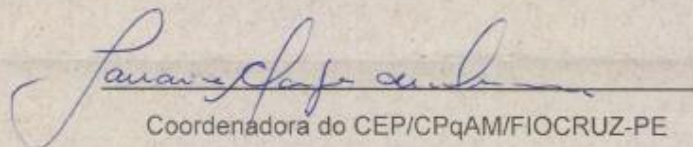
### PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 13 de junho de 2016.

  
Coordenadora do CEP/CPqAM/FIOCRUZ-PE

Janaina Campos de Miranda,  
Pesquisadora em Saúde Pública  
Coordenadora  
Mat. SIAPE 454777  
CEP / CPqAM / FIOCRUZ

## APÊNDICE A – PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE ESPERMATECA

### 1° parte:

- Aspirar fêmeas das gaiolas de criação e matar por congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  para preservar o RNA;

- Acondicionar fêmeas em placas de *petri*, a fim de evitar perda de antenas. Manter a  $-80^{\circ}\text{C}$ ;

Preparação para a dissecação:

- Separar as cabeças dos corpos de cada fêmea e acondicionar em tubos de 0,5 ml identificados, como a seguir: 1 cbç – 1 corpo; 2 cbç – 2 corpo;

- Manter os tubos com as cabeças em caixa identificada no *deep freezer* para montagem dos homogenatos. Os corpos, a partir dos quais serão avaliadas as espermatecas, devem ser mantidos em tubos com a mesma identificação das cabeças.

### 2° parte:

Material necessário:

Isopor com gelo (acondicionar os tubos com os corpos e o PBS), acetona, Giemsa (corante), pipeta *pasteur* pequena para aplicar os volumes na lâmina, duas pinças entomológicas de ponta fina, alfinete, placa de *petri*, lupa de laboratório.

### Dissecação e montagem das lâminas:

- 1- Colocar corpo de fêmea de forma individual em placa de *petri* com o abdômen para cima;
- 2- Remover asas e patas, facilita a manipulação e diminui a presença de cerdas na lâmina;
- 3- Adicionar gota de PBS para facilitar a remoção dos órgãos internos e a manipulação;
- 4- Com pinça de ponta fina puxar o VIII segmento do corpo da fêmea, removendo dessa forma as espermatecas e parte do intestino;
- 5- Separar as espermatecas de outras estruturas;
- 6- Em lâmina demarcada e impregnada com silano, adicionar gota de PBS em cada um dos espaços demarcados;
- 7- Com auxílio do alfinete transferir as espermatecas sem estourar para os espaços demarcados. Cada espaço da lâmina deve ser identificado no verso com caneta marcadora, com o número da amostra que irá naquele espaço;

- 8-** Espera o PBS secar naturalmente. Estoura as espermatecas com o alfinete (espera o PBS secar para facilitar a manipulação das espermatecas). Adicionar gota de acetona em cada espaço com as espermatecas para a fixação;
- 9-** Após a secagem da acetona adicionar gota de giemsa em cada espaço demarcado e aguardar 30 min para corar;
- 10-** Enxaguar a lâmina em água comum, colocar na estufa 5 min para secar;
- 11-** Avaliar no microscópio óptico. Observar as espermatecas em tom de roxo escuro ou mesmo marrons na cor natural. Os espermatozoides estarão difusos na lâmina, como muitos fios finos enovelados ou espalhados. O tom dos espermatozoides será lilás