

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

MILENA DANIELLE OLIVEIRA CORDEIRO

**Caracterização de  $\alpha$ -glicosidases de espécies de *Anopheles* spp. do Brasil com ênfase em sua capacidade de interação à toxina binária do *Lysinibacillus sphaericus***

RECIFE

2022

MILENA DANIELLE OLIVEIRA CORDEIRO

**Caracterização de  $\alpha$ -glicosidases de espécies de *Anopheles* spp. do Brasil  
com ênfase em sua capacidade de interação à toxina binária do  
*Lysinibacillus sphaericus***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo

Co-orientadoras: Dra. Crhisllane Rafaela dos Santos Vasconcelos

Dra. Constância Flávia Junqueira Alves Lopes

Dra. Elisama Helvécio

Recife

2022

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

---

Número Cordeiro, Milena Danielle Oliveira.  
Caracterização de  $\alpha$ -glicosidases de espécies de *Anopheles* spp. do Brasil com ênfase em sua capacidade de interação à toxina binária do *Lysinibacillus sphaericus*/ Milena Danielle Oliveira Cordeiro - Recife: [s.n.], 2022.  
124 p.: il., tab.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Tatiany Patricia Romão Pompílio de Melo; coorientadoras: Crhisllane Rafaela dos Santos Vasconcelos; Constância Flávia Junqueira Alves Lopes; Elisama Helvécio.

1. *Lysinibacillus sphaericus*. 2. Toxina Bin. 3. Receptores celulares. 4. *Anopheles*. 5. *Culex*. 7. *Docking* molecular. I. Melo, Tatiany Patrícia Romão Pompílio de. II. Vasconcelos, Crhisllane Rafaela dos Santos. III. Lopes, Constância Flávia Junqueira Alves. IV, Helvécio, Elisama. V. Título.

---

CDU 614.449

MILENA DANIELLE OLIVEIRA CORDEIRO

**Caracterização de  $\alpha$ -glicosidases de espécies de *Anopheles* spp. do Brasil  
com ênfase em sua capacidade de interação à toxina binária do  
*Lysinibacillus sphaericus***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 17/06/2022

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Dr. João Pacífico Bezerra Neto  
Centro de Ciências Biológicas/ UFPE

---

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

---

Dra. Juliana Lúcia de Albuquerque Vasconcelos  
Centro Universitário Tabosa de Almeida/ ASCES-UNITA

---

Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo  
Depto. Entomologia/IAM-FIOCRUZ

Aos meus avós, Severino e Helena.

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Heronildo e Patricia, por me amarem incondicionalmente, por me apoiarem, por cuidarem de mim e acreditarem no meu potencial desde que eu era uma bebê que rasgava cheques e colocava caroços de feijão no nariz. Nada do que eu fizer na vida será suficiente para agradecer a vocês. Aos meus irmãos, Pedro e Arthur, por serem o meu maior motivo para continuar e tentar ser uma pessoa melhor todos os dias. Sempre estarei aqui, vocês são meu maior orgulho.

Aos meus avós, Severino e Helena, os quais me despedi durante o desenvolvimento deste projeto. Obrigada por me ensinar sobre carinho e paciência, e que o amor não se sente apenas com a presença física. Foi por vocês que me mantive firme, e espero que quando a gente se encontrar novamente eu possa agradecer por tantas coisas que vocês abriram mão para que seus filhos e netos tivessem mais oportunidades. Amo vocês, voinha e vô Biu.

A todos os meus familiares, que direta e indiretamente auxiliaram durante minha jornada.

A Filipe pelo amor, cuidado, paciência e carinho, e por sempre me apoiar e me incentivar nos meus momentos mais difíceis. Não teria conseguido terminar este trabalho se não fosse você, e espero que possamos sempre nos apoiar nas próximas etapas da nossa vida.

À minha orientadora, Dra. Tatiany Romão, por todos os aprendizados durante o desenvolvimento do projeto, pela paciência, dedicação e apoio, e pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa.

Às minhas coorientadoras, Dra. Elisama, Dra. Crhisllane e Dra. Constância por todo o apoio durante o desenvolvimento do projeto, tanto em bancada quanto nas análises de bioinformática.

A Derciliano, que me cedeu as amostras utilizadas neste trabalho e sempre me auxiliou.

Aos amigos que fiz na Entomologia, Júnior, Tanaka, Larissa, Suzy e Luísa, que me ajudaram em vários momentos no dia-a-dia, e a todos que fazem parte do departamento.

À Eduarda e Marília pela amizade que me fortaleceu nos dias complicados, por nosso companheirismo, nossas risadas e nossos choros. Sempre estarei aqui por vocês, e sei que é recíproco.

Às minhas colegas de apartamento, Tayná e Izabely, que dividiram comigo muitos momentos desde a nossa graduação.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa pela avaliação e valiosas contribuições feitas ao trabalho.

À FACEPE, pela bolsa de mestrado.

Ao Instituto Aggeu Magalhães, pela infraestrutura.

A todos que de alguma forma contribuíram na minha trajetória.

*“Questões sobre ciência e progresso não falam tão alto quanto meu coração”*

*Chris Martin*



CORDEIRO, M. D. O. **Caracterização de  $\alpha$ -glicosidasas de espécies de *Anopheles* spp. do Brasil com ênfase em sua capacidade de interação à toxina binária do *Lysinibacillus sphaericus***, 2022. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

## RESUMO

O *Lysinibacillus sphaericus* é um agente eficaz no controle biológico de mosquitos. A ação inseticida desta bactéria é causada pela ação da toxina binária com receptores específicos presentes no microvilli intestinal de larvas de espécies de mosquitos suscetíveis. Este receptor foi caracterizado em *Culex quinquefasciatus* como uma  $\alpha$ -glicosidase denominada de Cqm1, e em *Anopheles gambiae* como Agm3. A investigação de proteínas ortólogas à Cqm1 e Agm3 em outras espécies de *Anopheles* spp. ainda é uma lacuna científica e poderá trazer novas perspectivas de uso do *L. sphaericus* no controle de vetores e aprofundar o conhecimento sobre o modo de ação do larvicida em espécies importantes. Dessa forma, o projeto tem como objetivo identificar  $\alpha$ -glicosidasas ortólogas à Cqm1 em espécies de *Anopheles* spp. e avaliar seu potencial de agir como receptores da toxina binária do *L. sphaericus*, através de uma análise *in silico* da sua potencial interação à toxina Bin. Para isso, DNAs de sete espécies de *Anopheles* spp. do Brasil, coletados de uma região onde houve um surto de malária fora da região endêmica, foram extraídos e os potenciais genes ortólogos ao gene *cqm1* foram amplificados e clonados em vetor pGEM T-easy. Os genes dos constructos foram sequenciados e analisados *in silico* quanto a presença de polimorfismos, glicosilações, epítipo de ligação à Bin e predição de estrutura das proteínas. A potencial interação das respectivas proteínas com a toxina binária foi avaliada *in silico* por meio de *docking* molecular, destacando possíveis regiões de interação em comparação com as  $\alpha$ -glicosidasas já descritas na literatura. Como resultados, obtivemos as sequências parciais dos genes e de suas respectivas proteínas ortólogas à Cqm1 de sete espécies de *Anopheles* spp. que apresentaram alta identidade com a Cqm1 (>70%) e com sua ortóloga Agm3 (>80%). A região S129-A312, descrita como uma região de ligação à toxina Bin em Cqm1, está parcialmente conservada entre as espécies de *Anopheles* spp. As estruturas proteicas foram preditas, para então ser realizada a avaliação da interação molecular com a toxina Bin. Os resultados de *docking* evidenciaram variações nos sítios e aminoácidos de potencial interação *in silico* de todas as sete proteínas de *Anopheles*, porém, todas as espécies (*An. aquasalis*, *An. braziliensis*, *An. albitarsis*, *An. minor*, *An. triannulatus*, *An. argyritarsis* e *An. sawyeri*) apresentaram modelos de interação à aminoácidos da toxina binária semelhantes àqueles que interagem com a Cqm1, evidenciando que, de acordo com os resultados obtidos, as espécies citadas poderiam apresentar interação à Bin. Dessa forma, o trabalho contribuirá na construção de conhecimentos acerca da caracterização de potenciais receptores da toxina Bin do *L. sphaericus* em espécies de *Anopheles* do Brasil, e os níveis de energia livre apresentadas no *docking* sugerem a capacidade de ligação entre as proteínas ortólogas à Cqm1 e a toxina Bin *in vivo*.

## Palavras-chave

Receptores celulares; Toxina binária; Alfa-glicosidasas; *Anopheles* spp.; *Docking* molecular.

CORDEIRO, M. D. O. **Characterization of  $\alpha$ -glycosidases in species of *Anopheles* spp. from Brazil with emphasis on its ability to interact with the binary toxin of *Lysinibacillus sphaericus***, 2022. Master's dissertation (Master's degree in Life Sciences and Biotechnology for Health) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2022.

## ABSTRACT

*Lysinibacillus sphaericus* is an effective agent in the biological control of mosquitoes. The insecticidal action of this bacterium is caused by the action of the binary toxin with specific receptors present in the intestinal *microvilli* of larvae of susceptible mosquito species. This receptor was characterized in *Culex quinquefasciatus* as an  $\alpha$ -glycosidase nominated Cqm1, and in *Anopheles gambiae* as Agm3. The investigation of orthologous proteins to Cqm1 and Agm3 in other species of *Anopheles* spp. is still a scientific gap and could bring new perspectives for the use of *L. sphaericus* in vector control and deepen the knowledge about the mode of action of the larvicide in important species. Thus, the project aims to identify  $\alpha$ -glycosidases orthologous to Cqm1 in *Anopheles* spp. and to evaluate their potential as *L. sphaericus* Binary toxin receptors, through the evaluating of their potential binding interaction to Bin toxin *in silico*. For this, DNAs from seven species of *Anopheles* spp. from Brazil, collected from a region where there was an outbreak of malaria outside the endemic region, were extracted and the potential genes orthologous to the *cqm1* gene were amplified and cloned in pGEM T-easy vector. The construct genes were sequenced and analyzed *in silico* for the presence of polymorphisms, glycosylations, Bin-binding epitope and protein structure prediction. The potential interaction of the respective proteins with the binary toxin was evaluated *in silico* by molecular docking, highlighting possible regions of interaction in comparison with the  $\alpha$ -glycosidases already described in the literature. As a result, we obtained the partial sequences of genes and their respective orthologous proteins to Cqm1 of seven species of *Anopheles* spp. which showed high identity with Cqm1 (>70%) and with its ortholog Agm3 (>80%). The S129-A312 region, described as a Bin toxin binding region in Cqm1, is partially conserved among *Anopheles* spp. The protein structures were predicted, and then the evaluation of the molecular interaction with the Bin toxin was carried out. The docking results showed variations in the sites and amino acids of potential *in silico* interaction of all seven *Anopheles* proteins, however, all species (*An. aquasalis*, *An. braziliensis*, *An. albitarsis*, *An. minor*, *An. triannulatus*, *An. argyritarsis* and *An. sawyeri*) showed models of interaction with binary toxin's amino acids similar to those that interact with Cqm1, showing that, according to the results obtained, the species mentioned could show interaction with Bin. In this way, the work will contribute to the construction of knowledge about the characterization of potential receptors of the Bin toxin of *L. sphaericus* in *Anopheles* species from Brazil, and the levels of free energy presented in the docking suggest the binding capacity between the orthologous proteins to Cqm1 and the Bin toxin *in vivo*.

## Keywords

Cell receptors; Binary Toxin; Alpha-glycosidase; *Anopheles* spp.; Molecular docking.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> -	Mapa mundial da malária.....	19
<b>Figura 2</b> -	Desenho esquemático do ciclo de infecção do parasita <i>Plasmodium falciparum</i> .....	21
<b>Figura 3</b> -	Distribuição global de algumas espécies de <i>Anopheles</i> vetoras da malária.....	24
<b>Figura 4</b> -	Ciclo de vida do mosquito <i>Anopheles</i> sp.....	25
<b>Figura 5</b> -	Mapa mundial de perfis de resistência aos inseticidas químicos em <i>Anopheles</i> por diferentes décadas.....	30
<b>Figura 6</b> -	Micrografia eletrônica do <i>Lysinibacillus sphaericus</i> em esporulação.	34
<b>Figura 7</b> -	Cristalização da Cqm1 por método de difusão de vapor ( <i>sitting-drop</i> ).	40
<b>Figura 8</b> -	Fluxograma experimental da metodologia.....	47
<b>Figura 9</b> -	DNAs de espécies de <i>Anopheles</i> utilizadas neste trabalho.....	48
<b>Figura 10</b> -	Eletroforese em gel de agarose a 1% dos amplicons gênicos que codificam para $\alpha$ -glicosidases ortólogas ao receptor Cqm1 de diferentes espécies de <i>Anopheles</i> spp.....	56
<b>Figura 11</b> -	Eletroforese em gel de agarose a 1% dos amplicon gênico da espécie <i>An. albimanus</i> .....	57
<b>Figura 12</b> -	Eletroforese em gel de agarose a 1% de minipreparações plasmidiais após digestão analítica com a enzima EcoRI para liberação da região de interesse clonada em pGEM®-T Easy.....	58
<b>Figura 13</b> -	Sequências gênicas parciais que codificam para as proteínas ortólogas à Cqm1 em espécies de <i>Anopheles</i> spp.....	59
<b>Figura 14</b> -	Diagrama esquemático da disposição e comparação das sequências de aminoácidos das $\alpha$ -glicosidases ortólogas à Cqm1 nas espécies.....	69
<b>Figura 15</b> -	Alinhamento múltiplo das proteínas ortólogas à Cqm1 em <i>Anopheles</i> spp com $\alpha$ -glicosidases de referência Cqm1, Aam1 e Agm3.....	70
<b>Figura 16</b> -	Esquema demonstrando a organização filogenética das espécies de <i>Anopheles</i> spp. utilizadas neste trabalho.....	75
<b>Figura 17</b> -	Árvore filogenética da relação entre as sequências de <i>Anopheles</i> spp. utilizadas neste trabalho e Cqm1, Aam1 e Agm3.....	76

<b>Figura 18</b> -	Gráficos dos Plots de Ramachandran das sequências de aminoácidos de $\alpha$ -glicosidases de <i>Anopheles</i> spp. ortólogas à Cqm1.....	78
<b>Figura 19</b> -	Predição de estruturas das proteínas de $\alpha$ -glicosidases Cqm1, Aam1 e Agm3.....	79
<b>Figura 20</b> -	Alinhamento das estruturas das proteínas Cqm1, Aam1 e Agm3 com foco com foco na região 155PATGGG160 importante para ligação a BinB já descrita em Cqm1 (Ferreira et al., 2014).....	80
<b>Figura 21</b> -	Predição de estruturas de $\alpha$ -glicosidases ortólogas à Cqm1 obtidas em <i>Anopheles</i> spp.....	81
<b>Figura 22</b> -	<i>Docking</i> molecular demonstrando interação entre Cqm1 e cristal BinAB.....	83
<b>Figura 23</b> -	A. Sequência de aminoácidos da toxina BinB, com destaque em regiões importantes de interação descritas pela literatura B. Sequência de aminoácidos da toxina BinA, com destaque em regiões importantes de interação.....	84
<b>Figura 24</b> -	Cristal BinAB, com destaque para as regiões importantes na BinB para ligação à Cqm1.....	86
<b>Figura 25</b> -	<i>Docking</i> molecular entre Aam1 e cristal BinAB.....	89
<b>Figura 26</b> -	<i>Docking</i> molecular entre Agm3 e cristal BinAB.....	91
<b>Figura 27</b> -	<i>Docking</i> molecular entre proteínas de <i>Anopheles</i> spp. e cristal BinAB.	92
<b>Figura 28</b> -	Desenho esquemático das possíveis regiões de interação evidenciadas nas análises de <i>docking</i> molecular de $\alpha$ -glicosidases de mosquitos com delimitação de regiões de interação para a BinB.....	97
<b>Figura 29</b> -	<i>Docking</i> molecular entre Agm3, proteínas de <i>Anopheles</i> spp. e cristal BinAB sem delimitação de regiões.....	101
<b>Figura 30</b> -	Frequência de interação dos aminoácidos do Cristal BinAB no <i>docking</i> sem delimitação.....	106

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Casos de resistência a inseticidas químicos em algumas espécies de <i>Anopheles</i> spp.....	29
<b>Quadro 2</b> - Controle biológico de <i>Anopheles</i> no mundo com larvicidas biológicos baseados em <i>L. sphaericus</i> .....	32
<b>Quadro 3</b> - Trabalhos evidenciando resíduos ou regiões importantes de interação da BinB ao receptor Cqm1.....	37
<b>Quadro 4</b> - Informações gerais presentes no banco de dados NCBI (National Center of Biotechnology Information) sobre algumas espécies de <i>Anopheles</i> spp. encontradas no Brasil.....	49
<b>Quadro 5</b> - Código de identificação de sequências gênicas e proteicas de $\alpha$ -glicosidases ortólogas à Cqm1.....	50
<b>Quadro 6</b> - Sequência de primers utilizados para amplificar, sequenciar e clonar os genes que codificam para proteínas ortólogas à Cqm1 em espécies de <i>Anopheles</i> spp.....	51
<b>Quadro 7</b> - Sequência de aminoácidos parciais de $\alpha$ -glicosidases ortólogas à Cqm1 presentes em espécies de <i>Anopheles</i> spp. e suas identidades/similaridades com as proteínas de referência Cqm1, Aam1 e Agm3.....	64
<b>Quadro 8</b> - Detecção de domínios conservados em proteínas ortólogas à Cqm1, Aam1 e Agm3 em espécie de <i>Anopheles</i> spp.....	68
<b>Quadro 9</b> - Informações disponíveis na literatura sobre regiões de aminoácidos de interação entre Cristal BinAB e $\alpha$ -glicosidases escolhidas para as análises proteicas.....	77
<b>Quadro 10</b> - Energia livre dos modelos de <i>docking</i> molecular e possíveis regiões de interação.....	87
<b>Quadro 11</b> - Energia livre dos modelos de <i>docking</i> molecular e possíveis regiões de interação sem delimitação de regiões.....	99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Quantificação de algumas minipreparações plasmidiais e produtos de PCRs purificados enviadas para sequenciamento através do equipamento NanoDrop® 2000.....	57
<b>Tabela 2</b> - Sítios de potenciais N-glicosilações em Cqm1, Aam1, Agm3 e $\alpha$ -glicosidases de <i>Anopheles</i> spp. geradas pela ferramenta NetNGlyc 1.0.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa - Aminoácidos

Aam1 – *Aedes aegypti* maltase 1

Agm3 – *Anopheles gambiae* maltase 3

Bin – Binária

Bti - *Bacillus thuringiensis* sorovar. *Israelenses*

CDD – Constraint Domains Database

Cpm1 – *Culex pipiens* maltase 1

Cqm1 – *Culex quinquefasciatus* maltase 1

Cry – Toxina do cristal

COI – Citocromo C Oxidase 1

DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

E.C. – *Enzyme Commission* - Código de enzimas

GPI – Glicosil-fosfatidilinositol

KDa - Kilodaltons

Kb – Kilobases

L1, L2, L3, L4 – Larvas dos 1º, 2º, 3º e 4º estádios

MIV – Manejo Integrado de Vetores

Mtx – *Mosquitocidal Toxins* – Toxinas Mosquitocidas

Mtx1, Mtx2 e Mtx3 – Toxinas mosquitocidas 1, 2 e 3

NCBI – *National Center of Biotechnology Information* – Centro Nacional de Informações Biotecnológicas

OMS – Organização Mundial de Saúde

O.N. – Overnight – durante a noite

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

PDB – *Protein Data Bank* – Banco de dados de Proteínas

RPM – Rotações por minuto

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio

Seq – Sequenciamento

VectorBase – *Bioinformatic Resources for Invertebrate Humans Pathogens* - Recursos em bioinformática para patógenos humanos invertebrados

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
2.1	Malária.....	19
2.2	O gênero <i>Anopheles</i> .....	22
2.3	Espécies de <i>Anopheles</i> importantes no âmbito da Saúde Pública.....	26
2.4	Controle populacional de mosquitos.....	27
2.5	Controle químico de <i>Anopheles</i> spp. e resistência.....	29
2.6	Larvicidas microbianos utilizados no contexto do MIV.....	31
2.7	Controle biológico de <i>Anopheles</i> spp. e resistência.....	32
2.8	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> .....	33
2.9	Toxina binária (Bin) do <i>L. sphaericus</i> .....	35
2.10	$\alpha$ -glicosidases de mosquitos.....	38
2.11	$\alpha$ -glicosidases e papel como receptores da toxina Bin.....	39
2.12	Modo de interação entre $\alpha$ -glicosidases e a toxina binária.....	41
2.13	Predição de estruturas e <i>docking</i> molecular em proteínas de mosquitos.....	41
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	43
<b>4</b>	<b>PERGUNTA CONDUTORA</b> .....	44
<b>5</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	45
<b>6</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	46
6.1	Objetivo geral.....	46
6.2	Objetivos específicos.....	46
<b>7</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	47
7.1	DNAs de espécies de <i>Anopheles</i> spp. utilizadas no estudo.....	47
7.2	Análise de sequências iniciais, desenho de primers degenerados e PCRs.....	49
7.3	Clonagem do DNA e sequenciamento.....	52
7.4	Caracterização e montagem das sequências parciais dos genes e de suas respectivas proteínas de <i>Anopheles</i> spp. ortólogas à Cqm1.....	52
7.5	Organização fenética das proteínas ortólogas.....	53



7.6	Caracterização das estruturas das proteínas ortólogas estudadas.....	54
7.7	<i>Docking</i> molecular.....	54
8	<b>RESULTADOS</b> .....	56
8.1	Amplificação e clonagem dos fragmentos gênicos que codificam para proteínas ortólogas ao receptor Cqm1 em <i>Anopheles</i> spp.....	56
8.2	Caracterização e montagem das sequências dos genes e das proteínas ortólogas ao receptor Cqm1.....	59
8.3	Estudo filogenético das espécies de <i>Anopheles</i> spp.....	74
8.4	Obtenção das estruturas das proteínas de referência Cqm1, Aam1 e Agm3 e das proteínas parciais ortólogas à Cqm1 em <i>Anopheles</i> spp.....	77
8.5	<i>Docking</i> molecular.....	82
9	<b>DISCUSSÃO</b> .....	107
10	<b>CONCLUSÕES</b> .....	112
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	113

## 1 INTRODUÇÃO

A malária é uma importante doença parasitária que acomete uma grande quantidade de indivíduos anualmente, sendo considerada um grave problema de saúde pública em vários países. É causada por protozoários do gênero *Plasmodium* spp., que são transmitidos ao ser humano por meio da picada das fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* spp., encontrados principalmente em regiões tropicais e subtropicais devido ao seu ciclo de vida. No Brasil, a Região Amazônica é considerada endêmica para a malária devido à inúmeros fatores, dentre eles, fatores ambientais que favorecem a proliferação do mosquito vetor e a manutenção da infecção local. Porém, em 2019 foram registrados casos de transmissão local em regiões não endêmicas no estado da Paraíba, evidenciando a necessidade mais estudos.

Devido ao uso indiscriminado de inseticidas químicos, muitas espécies de mosquitos, incluindo mosquitos do gênero *Anopheles*, apresentam seleção de resistência em campo, culminando em dificuldades no controle vetorial de determinadas espécies. Além disso, alguns inseticidas possuem ação residual e capacidade de atingir espécies não-alvo, sendo prejudiciais ao ambiente. Diante desta dificuldade, houve um aumento nos estudos que buscam novas alternativas de controle vetorial, e uma delas é o uso de larvicidas biológicos com base em bactérias entomopatógenas, do gênero *Bacillus* com ação seletiva sobre dípteros, que possuem perfil de ação específico.

As bactérias mais estudadas e utilizadas para o controle de mosquitos são *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) e *Lysinibacillus sphaericus*, devido, dentre outros atributos, à sua especificidade de ação, facilidades de produção e armazenamento. O *L. sphaericus* já vem sendo utilizado com êxito no combate ao *Culex quinquefasciatus* no Brasil, principalmente nos estados de São Paulo e Pernambuco, e ambas as bactérias são utilizadas contra *Anopheles* spp. em algumas regiões endêmicas da África Subsaariana e no Brasil. Tratam-se de bactérias Gram positivas, saprófitas e esporulantes, que possuem ação tóxica durante o estágio larval de alguns dípteros, por meio de cristais proteicos que contém protoxinas, que ao serem ingeridos pelas larvas de mosquitos, são solubilizados em pH intestinal alcalino e as protoxinas são ativadas por meio de ação proteolítica de enzimas digestivas. Uma vez ativada, as toxinas se ligam a receptores presentes no *microvilli* intestinal das larvas, causando vários efeitos citopatológicos.

O principal fator inseticida do *L. sphaericus* é a toxina binária (Bin). A protoxina Bin é um heterodímero composto por duas proteínas sintetizadas de forma equimolar e que atuam em sinergia, BinA e BinB, onde a primeira é responsável pela atividade tóxica, e a segunda pela

ligação aos receptores específicos no epitélio intestinal. A ligação aos receptores é uma etapa determinante, já que a toxicidade depende da interação e reconhecimento do receptor pela toxina Bin. Esses receptores foram identificados como  $\alpha$ -glicosidases (EC 3.2.1.20), proteínas de membrana responsáveis pela digestão de carboidratos, e já foram descritos em *Culex pipiens* (Cpm1), *Culex quinquefasciatus* (Cqm1) e *Anopheles gambiae* (Agm3), respectivamente, onde apresentam-se como proteínas de ~60 kDa ligadas à membrana por uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI).

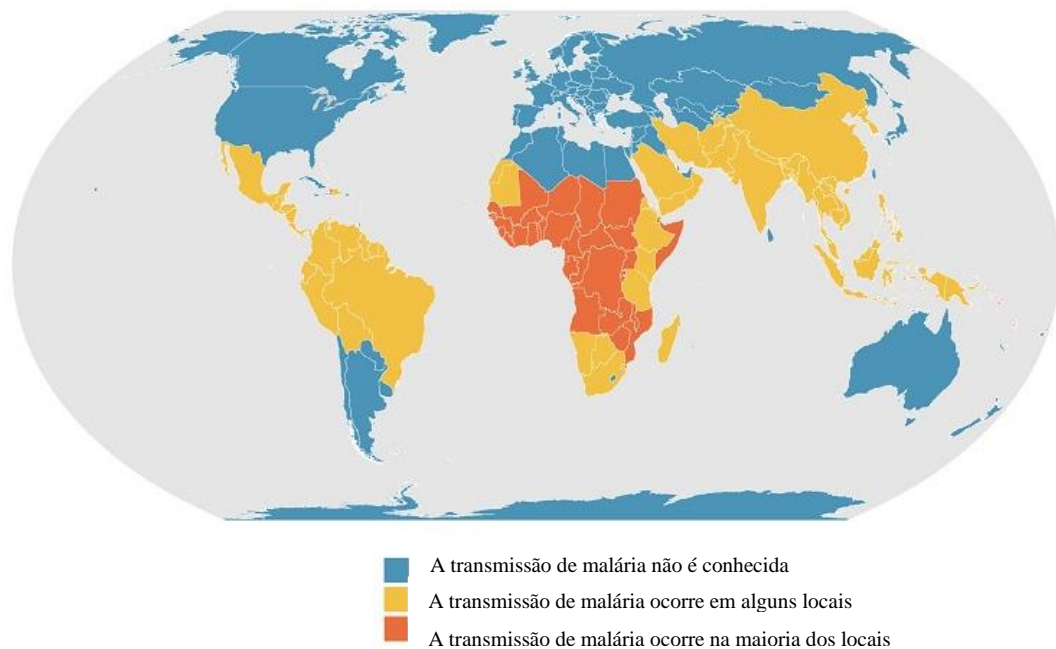
Análises *in silico* conduzidas com o genoma já disponível de *Anopheles darlingi*, pertencente ao mesmo subgênero das principais espécies de *Anopheles* brasileiras, possibilitaram a detecção de um gene que codifica para uma  $\alpha$ -glicosidase, ortóloga a já descrita em *Culex*, apresentando considerável similaridade e identidade. Diante do achado, o presente estudo teve como principal objetivo identificar e caracterizar outros genes de proteínas ortólogas ao receptor clássico da toxina Bin em *C. quinquefasciatus* (Cqm1) em sete espécies de *Anopheles* spp. do Brasil, e avaliar *in silico* possíveis perfis de ligação das sete proteínas à toxina binária do *L. sphaericus* por análise de *docking* molecular. Essas espécies foram coletadas em local onde ocorreu um surto extra-amazônico, e apesar de se saber a importância do uso do *L. sphaericus* para controle de espécies de anofelinos, pouco se sabe sobre essa interação, sendo fundamental aprofundar os estudos sobre a caracterização de possíveis receptores do larvicida.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Malária

Um dos grandes desafios atuais na saúde pública são os crescentes casos de malária, doença causada por protozoários pertencentes ao gênero *Plasmodium* e que tem como principais agravantes a alta morbidade e considerável mortalidade, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Trata-se de uma doença parasitária transmitida por vetor, com mais seis espécies de *Plasmodium* envolvidas na infecção humana, e entre elas as mais prevalentes são *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae* (ASHLEY et al., 2018). Aproximadamente 90 países são vulneráveis à transmissão da malária, principalmente em regiões tropicais e subtropicais devido ao ciclo de vida dos mosquitos do gênero *Anopheles*, os quais são os principais vetores envolvidos no ciclo de transmissão da doença (WHO, 2020).

**Figura 1** – Mapa mundial da malária.



**Fonte:** Center for Disease Control and Prevention, 2020, disponível em <https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>. Adaptado pela autora.

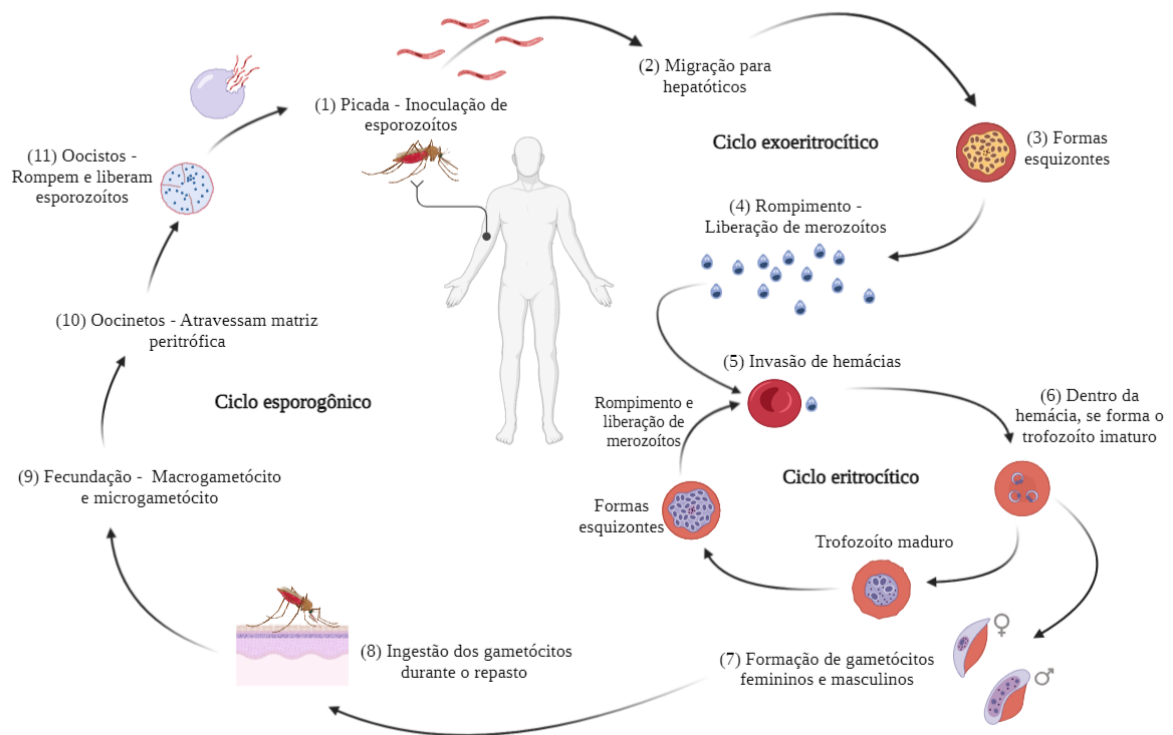
**Legenda:** Mapa mundial com perfil de ocorrência de casos de malária.

No ano de 2019, foram registrados 229 milhões de casos de malária ao redor do mundo, onde 409 mil destes evoluíram para óbito. Crianças com menos de 5 anos são o grupo mais

vulnerável, e apesar da distribuição mundial, mais de 90% dos casos se concentram no continente Africano (WHO, 2020). No Brasil, a principal área endêmica é a região Amazônica, que possui condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do vetor, agravadas pela escassez de acesso aos serviços de saúde para os indivíduos residentes no local (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Em 2019, foram registrados casos da doença fora da região Amazônica, sem transmissão residual, nos estados do Piauí, Paraná e em regiões de Mata Atlântica. Cerca de 20 casos de transmissão autóctone foram registrados no estado da Paraíba, onde confirmou-se a infecção por malária de indivíduos residentes no estado (SESPA, 2019).

O ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* que infectam humanos contam com uma fase sexual exógena que ocorre nos mosquitos fêmeas, denominada de esporogônica, e uma fase assexuada endógena, que ocorre nos hospedeiros vertebrados, denominada de esquizogônica, conforme mostrado na Figura 2 (ROSSATI et al, 2016). A fase exógena do ciclo se inicia com a ingestão de gametócitos durante o repasto sanguíneo da fêmea de anofelino, que ao chegarem no lúmen intestinal do mosquito diferenciam-se em microgametócito e macrogametócito, e após a fecundação formam zigotos diplóides, que evoluem para oocinetos móveis capazes de atravessar a matriz peritrófica e atingir a parede do epitélio intestinal, transformando-se em oocistos, responsáveis pela posterior liberação de esporozoítos, formas infectantes que serão inoculadas no hospedeiro vertebrado (GOSH et al, 2000).

A fase endógena se inicia após a picada do mosquito fêmea infectado inoculando juntamente com a saliva as formas infectantes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, que migram para hepatócitos e iniciam o ciclo exoeritrocítico. O parasita transforma-se na forma esquizonte, com posterior rompimento e liberação de centenas de merozoítos, que serão transportados para a corrente sanguínea, dando início ao ciclo eritrocítico (GOSH et al, 2000). Os merozoítos adentram os eritrócitos por meio de interação com proteínas de superfície, e após invadir evoluem para a forma de trofozoítos, que podem evoluir para a forma de esquizonte e liberar mais merozoítos, dando continuidade ao ciclo assexuado, ou se diferenciar nas formas sexuais, os gametócitos, que serão ingeridos durante o repasto sanguíneo do mosquito iniciando novamente o ciclo (ORFANÓ, 2016).

**Figura 2** – Desenho esquemático do ciclo de infecção do parasita *Plasmodium falciparum*.

**Fonte:** Elaborado pela autora, utilizando a ferramenta BioRender (<https://www.biorender.com>).

**Legenda:** Ciclo de infecção do *P. falciparum*, destacando os ciclos esporogônico, exoeritrocítico e eritrocítico.

A malária é uma doença sistêmica, que tem grande parte dos seus sintomas associados a anóxia de tecidos, causada devido a diminuição do transporte de oxigênio após a destruição eritrocítica que ocorre durante a esquizogonia, onde os merozoítos rompem as hemácias para dar continuidade ao ciclo (MILNER, 2018). O período de incubação varia para cada espécie de *Plasmodium*, podendo durar de 12 a 30 dias. Os casos irão se dividir em não-complicados e severos, onde os primeiros apresentam sintomas não-específicos, como febre com intervalos regulares, calafrios, dores no corpo, dores de cabeça e diarreia. Já os casos severos vão incluir acometimentos mais graves, geralmente provocados pelo *P. falciparum*, como malária cerebral, lesão pulmonar aguda, e lesão renal aguda causada por necrose tubular e acidose (ASHLEY et al, 2018; MILNER, 2018).

O diagnóstico laboratorial geralmente é solicitado após suspeita de exame clínico, principalmente em áreas endêmicas, e envolve a pesquisa da presença do *Plasmodium* no sangue do paciente. Pode ser feito por meio de diagnóstico através de microscópio convencional, como coloração de estiraços de sangue ou método da gota espessa, métodos

sorológicos rápidos que são desenvolvidos para detectar anticorpos no soro do paciente, como a imunofluorescência, que não substitui a confirmação por outro método, e o diagnóstico molecular, como o uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que possui alta sensibilidade e especificidade e garante maior fidelidade ao diagnóstico (TANGPUKDEE et al, 2009).

Em 2021 foi aprovada a utilização da primeira vacina contra malária em crianças da África Subsaariana. A RTS,S/AS01 (RTS,S) tem ação contra *P. falciparum*, e será uma importante ferramenta para o combate do parasita (WHO, 2021). Mesmo com as novas perspectivas de combate ao parasita, outros métodos precisam ser utilizados para controle e redução dos casos de malária, como correto tratamento de indivíduos infectados, e a diminuição da transmissão por meio de medidas de controle populacional de vetores, através da eliminação dos criadouros e da redução da população adulta de anofelinos. Os métodos mais utilizados consistem no uso de inseticidas químicos, porém, estes possuem ação inespecífica podendo agir em espécies não-alvo, além de problemas que envolvem seleção de resistência nos mosquitos, fazendo-se assim necessário o manejo de resistência com métodos alternativos de controle (OGUNAH et al., 2020).

## 2.2 O gênero *Anopheles*

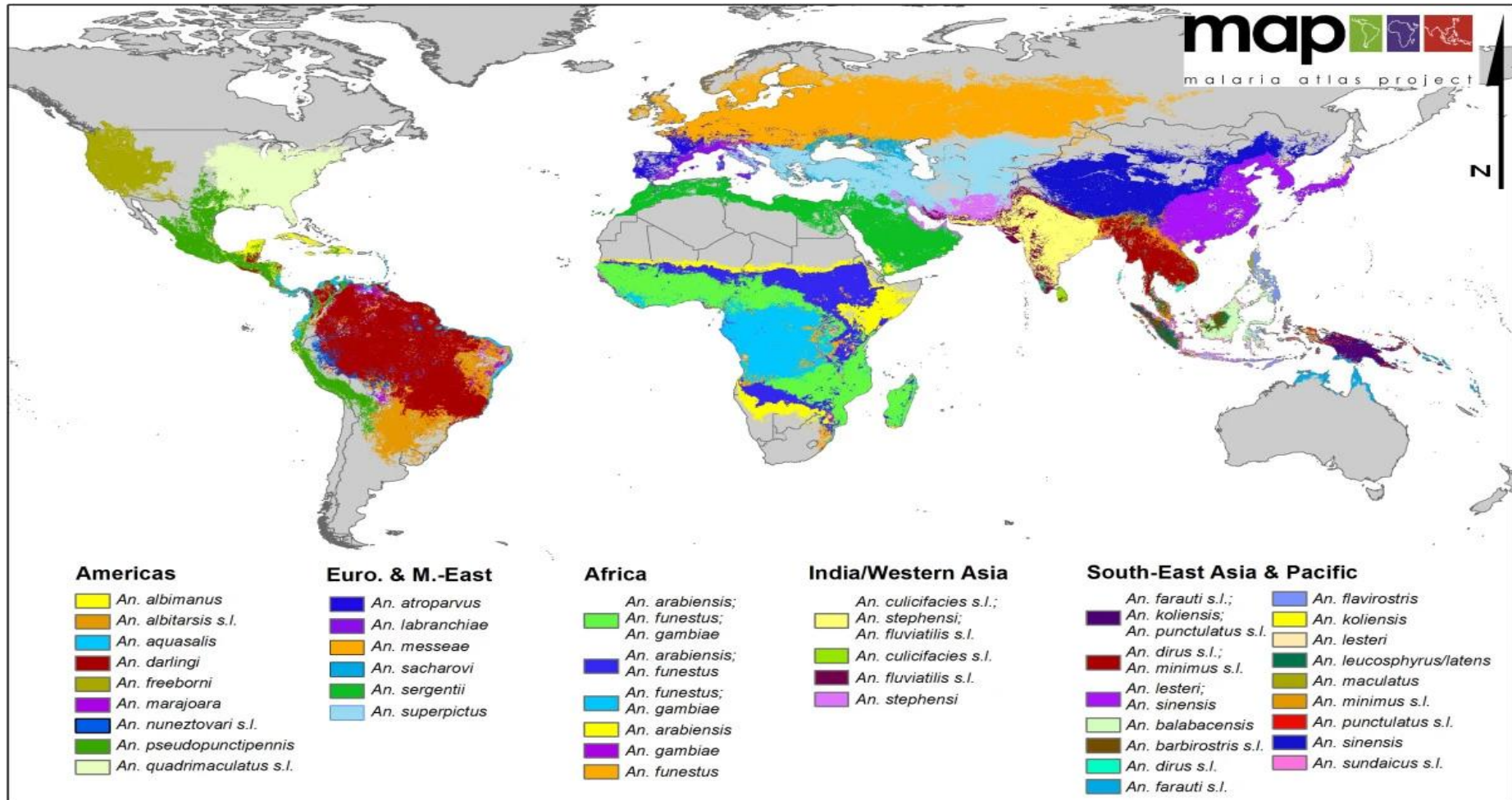
Os principais vetores da malária são mosquitos pertencentes a família Culicidae, subfamília Anophelinae e gênero *Anopheles*. O gênero envolve cerca de 480 espécies, e destas, aproximadamente 80 podem transmitir a malária humana, além daquelas que já foram descritas com ação vetorial de microfilárias (HARBACH, 2008; RAGHAVENDRA, K. et al, 2011; ORFANÓ, 2016). As espécies são divididas em oito subgêneros, onde os três principais são *Anopheles* (185 espécies), *Cellia* Theobald (1901) (224 espécies) *Nyssorhynchus* Blanchard (1902) (40 espécies), e estes se subdividem em Seções, Séries e Grupos (HARBACH, 2008). A organização das espécies se baseia em características taxonômicas básicas, além de características filogenéticas (HARBACH, 2013).

Na classificação taxonômica, as espécies podem ser subdivididas em complexos. A maior parte das espécies com importante ação vetorial pertencem aos complexos, que podem incluir espécies sem ação vetorial, facilitando o estudo do processo de evolução destas espécies, e o entendimento do papel de cada uma na transmissão do parasita (BARRÓN et al., 2019). Um dos principais é o Complexo *Anopheles gambiae sensu lato* (s.l.), que engloba três dos importantes vetores da malária, principalmente no Continente Africano, *Anopheles gambiae sensu strictu* (s.s.), *Anopheles arabiensis* e *Anopheles coluzzi* (FONTAINE et al., 2015).

O reconhecimento das diferentes espécies ou complexos também pode ser realizado por técnicas moleculares com ampliação de marcadores específicos, como por exemplo para DNA ribossômico ou mitocondrial, onde, principalmente o último, apresenta considerável compatibilidade com a classificação taxonômica convencional. Esse reconhecimento das espécies é importante para se compreender características comportamentais, como horários de atividade hematofágica ou características domiciliares, e traçar perfis de metodologia de controle específicas (CHOOCHOTE & SAEUNG, 2013; FOSTER, 2017).

O continente Africano, que apresenta o maior índice de casos de malária, apresenta uma grande variedade de espécies. A África Subsaariana, onde são registrados maiores níveis de transmissão, apresenta maior presença de vetores do Complexo *An. gambiae* (*s.l.*), como *An. gambiae* (*s.s.*), *Anopheles arabiensis* e *Anopheles merus*. Outro importante vetor do continente é o *An. funestus* (Figura 3) (SINKA, 2013). Com ênfase nas regiões de América Central e do Sul, o maior índice de transmissão localiza-se na bacia amazônica, do Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela (WHO, 2020). Entre os principais vetores dessa área encontram-se as espécies *Anopheles darlingi*, espécies do complexo *Anopheles albitarsis* (como *Anopheles albitarsis* *s.s.* e *Anopheles marajoara*), *Anopheles albimanus* e *Anopheles aquasalis* (CONN et al., 2013).



**Figura 3** – Distribuição global de algumas espécies de *Anopheles* vetoras da malária.

Fonte: Malária Atlas Project, 2010, disponível em <https://malariaatlas.org/>.

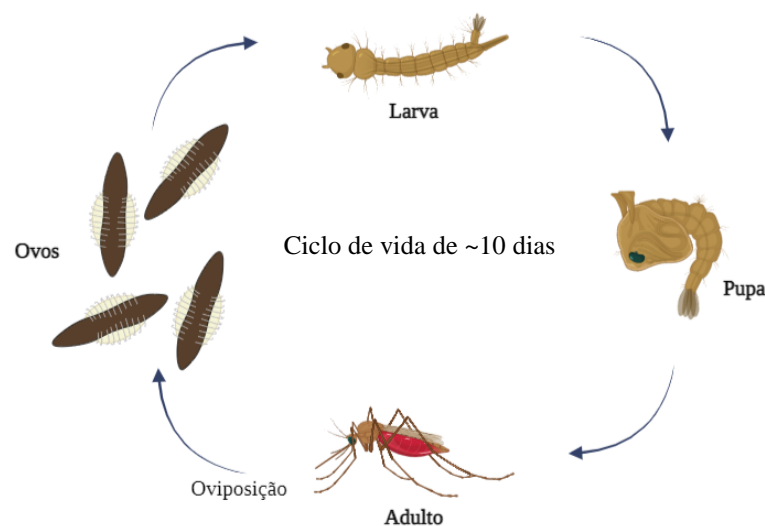
Legenda: Mapa com distribuição mundial de espécies de *Anopheles*, com divisão por continentes.

Os mosquitos do gênero *Anopheles* são preferencialmente zoofílicos e crepusculares, mas na ausência dos hospedeiros preferenciais ou quando estão em alta densidade as fêmeas realizam repasto sanguíneo em humanos (antropofílicos) com dada frequência. A alimentação durante a fase adulta depende da ingestão de carboidratos, principalmente de seivas, flores e frutos, e somente as fêmeas realizam hematofagia, necessária para o desenvolvimento dos ovos (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Os mosquitos são holometábolos, ou seja, possuem metamorfose completa, passando pelos estágios de ovo, larva (4 estádios: L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (BEATY & MARQUADART, 1996).

As fêmeas depositam seus ovos em superfície aquática, sendo postos de forma isolada apresentando flutuadores. Os mesmos eclodem após 48 horas e culminam no primeiro estágio larval, que é seguido dos demais (L2-L4), sendo o estágio totalmente finalizado após aproximadamente oito dias. As larvas se alimentam através de filtração de matéria orgânica disponível no ambiente aquático, e morfologicamente são desprovidos de sifão respiratório, característica presente na subfamília Anophelinae, nos quais existe um conjunto de placas esclerotizadas chamado aparato espiracular (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

O próximo estágio é o de pupa, que se apresenta em forma de vírgula e não se alimenta, podendo permanecer nesta fase até três dias até completar a metamorfose em mosquito adulto. A fase adulta dura aproximadamente 2 meses, e as fêmeas neste período podem realizar de 4 a 5 oviposições. A postura dos ovos das fêmeas de *Anopheles* é realizada em locais preferencialmente com água pouco agitada, onde o tipo de água para cada criadouro pode diferir entre as espécies, que pode ser gaseificada, salobra ou até mesmo acumulada em troncos de árvore (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; ROMÃO, 2006).

**Figura 4** – Ciclo de vida do mosquito *Anopheles* sp.



**Fonte:** Elaborado pela autora, utilizando a ferramenta BioRender (<https://www.biorender.com>).

**Legenda:** Ciclo do mosquito *Anopheles*, com ilustrações dos 4 estágios de vida.

### 2.3 Espécies de *Anopheles* importantes no âmbito da Saúde Pública

Em várias regiões do continente Africano, algumas espécies se mostram predominantes, principalmente as que integram o complexo *Anopheles gambiae* (s.l.), como é o caso do *An. arabiensis* (PATTON, 1905) e *An. gambiae* s.s. (GILES, 1902) (Diptera: Culicidae), onde ambos são pertencentes ao subgênero *Cellia*, e apesar de participarem do mesmo complexo, podem apresentar hábitos distintos. *An. arabiensis* é exofílico, tem preferência a ambientes externos (silvestre, semi-silvestre ou rural) mais secos, porém podem invadir ambientes internos, dependendo da disponibilidade de alimento. Já *An. gambiae* s.s é endofílico, com preferência por ambientes mais úmidos, perfil antropofílico, com possibilidade de atividade zoofílica (HEMMING-SCHRODER et al., 2020; WHO, 2020).

Os maiores níveis de transmissão de malária ocorrem principalmente em regiões temperadas, tropicais e subtropicais do mundo, e no Brasil, mais de 99% dos casos se concentram na região Amazônica. Encontram-se aproximadamente 55 espécies frequentes no país, entre elas *Anopheles darlingi*, *An. aquasalis*, *An. albitarsis* (s.l), *An. cruzii* e espécies secundárias como o *An. oswaldoi*, *An. triannulatus* e *An. braziliensis*, sendo os subgêneros mais prevalentes o *Nyssorhynchus* e o *Kerteszia* (HARBACH, 2008; PIMENTA et al., 2015).

*Anopheles darlingi* (ROOT, 1926) (Diptera: Culicidae) pertence ao gênero *Nyssorhynchus* e é encontrado predominantemente em regiões de baixa altitude, associadas a florestas e regiões com cursos d'água em diversos países da América do Sul, incluindo o Brasil, onde não será encontrado apenas em regiões secas do Nordeste e regiões no extremo Sul (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). É considerado o vetor mais efetivo da malária em sua região de predomínio, e possui uma alta adaptabilidade de reprodução em depressões artificiais de água, além de ter um comportamento de alimentação oportunista (CONN & RIBOLLA, 2016).

*Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) é um mosquito do gênero *Anopheles* e subgênero *Nyssorhynchus*, e foi descrito pela primeira vez no Panamá, América Central (CURRY, 1932). Tem preferência por ambientes aquáticos com considerável salinidade e por isso encontra-se predominantemente em faixas litorâneas, tendo apresentação nas Américas Central e do Sul. No Brasil pode ser encontrado distante do litoral quando o solo da região é rico em cloretos, como é o caso do sertão nordestino (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Apesar de ser predominantemente silvestre, pode ser encontrado em ambiente doméstico quando em alta

densidade. É considerado o terceiro vetor que mais transmite malária no Brasil, após *An. darlingi* e espécies do complexo *An. albitarsis*, além de ter sido descrito como vetor secundário do nematódeo *Wuchereria bancrofti* (CARLOS et al., 2019).

O complexo *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* conta com 5 espécies confirmadas, entre elas *An. albitarsis* s.s (LYNCH-ARRIBALZAGA, 1878) e *An. marajoara* (GALVÃO & DAMASCENO, 1942) (Diptera: Culicidae), e aparentemente o grupo está envolvido com a transmissão de malária na América do Sul (FOLEY, 2014). São espécies encontradas preferencialmente em regiões costeiras e florestas de várzea, principalmente em estações chuvosas, com características preferencialmente zoofílicas. A espécie *An. marajoara*, presente também no território brasileiro, já foi descrita infectada por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* (ZÚÑIGA et al., 2021).

Além das espécies citadas acima, muitas outras são descritas como vetores secundários da malária no país. Entre elas encontram-se *An. braziliensis* (CHAGAS, 1907) e *An. triannulatus* s.s (NEIVA & PINTO, 1922), ambos do subgênero *Nyssorhynchus*. O primeiro encontra-se principalmente em regiões mais distantes do litoral atlântico, sendo exofílico e zoofílico, e já foi descrito em atividade de repasto sanguíneo durante o dia. Já o segundo encontra-se em regiões centrais do país, com oviposição em lagoas com vegetação flutuante, com perfil zoofílico, mas podendo atacar o homem. Ambos não são considerados vetores principais, mas continuam sendo alvo de estudos sobre sua capacidade de transmissão do *Plasmodium* (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

## 2.4 Controle populacional de mosquitos

O controle populacional de mosquitos vetores é uma ferramenta importante para interromper o ciclo de transmissão de várias doenças, como exemplo a dengue e a malária, que são doenças que persistem por várias razões, entre elas temos limitação em vacinação ou falhas de tratamentos (WILSON, 2020). O aumento da globalização, mudanças climáticas e desmatamento contribuem para a disseminação dessas doenças. O foco principal dos métodos de controle é diminuir a população do vetor ou eliminar o contato dos mosquitos com o ser humano, apesar dos desafios enfrentados em relação aos aspectos biológicos dos mosquitos que são desfavoráveis para este controle como fácil adaptação ambiental, alta taxa reprodutiva e curto tempo de vida (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; JOSHI & MILLER, 2021).

Como consequência da presença das doenças transmitidas por vetores, ao longo dos anos foram utilizados os mais variados tipos de controle, e em meados dos anos 1900, iniciaram-

se algumas metodologias, principalmente envolvendo manejo ambiental. Na era pós-guerra, nos anos de 1950, iniciou-se o uso de inseticidas químicos com ação residual, os organoclorados dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), tornando a erradicação da malária uma possibilidade real. Desde seu surgimento, houve um grande impacto na diminuição de casos de malária, principalmente nas regiões endêmicas, como na África Subsaariana, mas teve seu uso banido devido seus efeitos ambientais adversos e seu potencial de risco à saúde humana (BHAAT, 2016; WILSON et al., 2020).

Atualmente, entre as ferramentas mais utilizadas dentro de uma divisão ampla, encontram-se aquelas baseadas em métodos químicos e não-químicos, que podem atingir formas imaturas, como larvicidas e manipulação de habitat, ou formas adultas, que são os adulticidas. Entre estes encontram-se metodologias para atingir diretamente o vetor, como pulverização residual interna (IRS – *Indoor residual spraying*) ou espacial, ou para evitar o contato do vetor ao ser humano, com o uso de repelentes e mosquiteiros impregnados com inseticidas (ITNs - *Insecticide-treated nets*) (WILSON et al., 2020).

Mesmo com o grande impacto do uso de pulverização residual de inseticidas de síntese e de mosquiteiros e redes tratadas com inseticidas, na última década foram registrados muitos casos de malária, em consequência de algumas limitações, como a resistência dos mosquitos aos inseticidas químicos, problemas na eficácia operacional, custo considerável e barreiras biológicas comportamentais, como exemplo, de mosquitos que realizam seu repasto sanguíneo ao ar livre (KILLEEN et al., 2017). Além disso, tais inseticidas podem apresentar efeitos residuais adversos em espécies não-alvo e como exemplo, o acúmulo em órgãos e tecidos de seres humanos, com probabilidade de acarretar consequências futuras aos indivíduos expostos (RAGHAVENDRA et al., 2011).

Considerando as limitações citadas, atualmente é recomendado o uso do Manejo Integrado de Vetores (MIV), onde são avaliadas evidências e utilizadas estratégias integradas selecionadas previamente de acordo com diversas variáveis, epidemiológicas e entomológicas, com a utilização de métodos de controle inseticidas e não-inseticidas (WILSON et al., 2020). É necessário que a aplicação seja baseada em evidências, que podem ser formadas progressivamente e alteradas ao longo da aplicação dos programas de controle. Essa alternativa é importante para controle de *Anopheles*, considerando que o uso de métodos únicos não se mostra mais eficaz (KILLEEN et al., 2017).

## 2.5 Controle químico de *Anopheles* spp. e resistência

Os inseticidas de síntese, desde o seu advento, tornaram-se o principal método de controle para mosquitos *Anopheles* no mundo, com utilização principal de mosquiteiros tratados com inseticidas e pulverização residual interna. Desde então, o uso prolongado destes inseticidas resultou na seleção de diversos mecanismos de resistência, principalmente em mosquitos de áreas endêmicas, como é o caso de países africanos (RANSSON & LISSENDEN, 2016), mas esses perfis podem ser encontrados em diferentes países ao redor do mundo, para diferentes espécies de *Anopheles*, conforme apresentado no Quadro 1.

Entre os anos de 2010 e 2017, mais de 85% dos países, com dados relatados para malária, constam de resistência vetorial a pelo menos uma classe de inseticidas, principalmente aos piretróides, bastante utilizados em ITNs em países africanos (WHO, 2018). Os principais mecanismos de resistência em mosquitos incluem mudanças nos alvos dos inseticidas, detoxificação mais rápida desses xenobióticos por ação de enzimas detoxificadoras e modificações na espessura da cutícula por penetração reduzida (MINETTI et al., 2020).

**Quadro 1** – Casos de resistência a inseticidas químicos em algumas espécies de *Anopheles* spp.

Inseticida Químico	Localidade	Espécies-alvo	Resistência	Referência
Piretróides/ Organoclorados	Benim	<i>An. gambiae</i> (s.l.)	Principalmente mutações <i>kdr</i> (gene de resistência <i>knockdown</i> )	Corbel et al. (2007)
Piretróides/ Organoclorados/ Carbamatos	Sudão	<i>An. arabiensis</i>	Mutações <i>kdr</i>	Matambo et al. (2007)
Piretróides	Nigéria	<i>Anopheles</i> <i>funestus</i>	Enzimas de detoxificação e mutações <i>kdr</i>	Ononamadu et al. (2020)
Piretróides/ Organoclorados	Tailândia	<i>Anopheles</i> <i>hyrcanus</i> (s.l.)	Enzimas de detoxificação	Sumarnrote et al. (2020)
Piretróides/ Organoclorados	Coréia do Sul	<i>Anopheles</i> <i>sinensis</i> (s.s.)	Mutações <i>kdr</i>	Kang et al. (2012)
Piretróides/ Organoclorados/ Malation	Índia	<i>Anopheles</i> <i>culicifacies</i> (s.l.)	Mutações <i>kdr</i> para piretróides e DDTs,	Singh et al. (2010), Karemi et al. (2021)

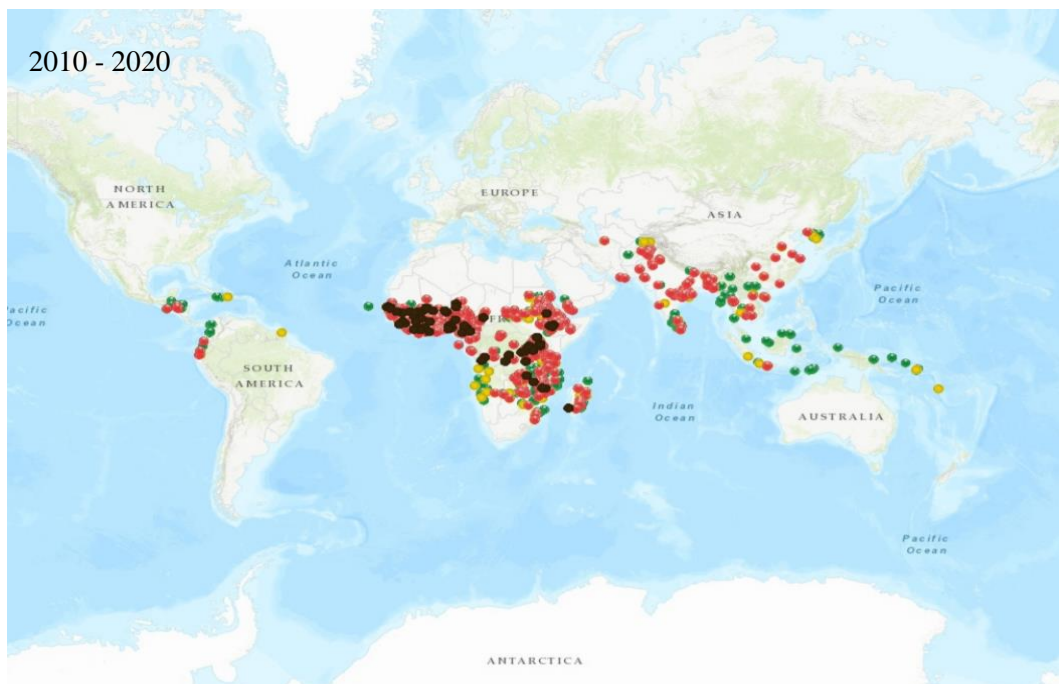
			enzimas conferindo resistência metabólica	
Malation/ Organoclorados	Sri-Lanka	<i>An. culicifacies</i> / <i>Anopheles subpictus</i>	Alteração no alvo do inseticida e enzimas de detoxificação	Kelly-Hope et al. (2005)
Piretróide/ Organoclorados/ Pirimifós- Metílico	México	<i>Anopheles albimanus</i>	Enzimas de detoxificação	Dzul et al. (2007)

**Fonte:** Elaborado pela autora.

Especificamente para o complexo *Anopheles gambiae* (s.l.), foram descritos uma série de casos associados à resistência a piretróides (INGHAM, 2018). Os casos de resistência a piretróides em *Anopheles funestus*, que antes se detinham a poucos países africanos, passaram a se apresentar em vários locais (RANSSON & LISSENDEN, 2016). Também houve crescimento de notificações em relação a outros inseticidas químicos, principalmente para espécies do complexo *Anopheles gambiae*, para carbamatos e organofosfatos, que são utilizados como alternativa em regiões endêmicas (Figura 5). Torna-se difícil de medir o real impacto dos perfis de resistência na transmissão da malária, mas com os dados disponíveis é possível observar a necessidade de métodos associados de controle (RANSSON & LISSENDEN, 2016).

**Figura 5** – Mapa mundial de perfis de resistência aos inseticidas químicos em *Anopheles* por diferentes décadas.





**Fonte:** Mapas gerados através da ferramenta disponível em <https://anopheles.irmapper.com/>.

**Legenda:** Perfis de resistência aos inseticidas químicos em espécies de *Anopheles*. Pontos em verde significam as espécies suscetíveis, em amarelo, as espécies com possível resistência, e em vermelho as espécies com comprovada resistência. Em preto encontram-se as espécies com altos níveis de resistência.

## 2.6 Larvicidas microbianos utilizados no contexto do MIV

Devido às limitações do uso de inseticidas químicos, fez-se necessário a busca por meios alternativos e mais sustentáveis de controle vetorial. Uma das opções consideradas importantes são agentes de controle biológico, como o uso de predadores, parasitas, patógenos, competidores e toxinas produzidas por estes agentes. Entre algumas dessas alternativas, encontram-se fungos entomopatógenos, com atuação na cutícula do inseto, agentes bacterianos com ação larvicida ou adulticida, uso de peixes predadores que se alimentam de larvas, entre outros (KAMAREDDINE, 2012).

As bactérias do gênero *Bacillus*, com ação seletiva sobre os dípteros, têm sido consideradas um dos agentes mais eficazes para o controle de culicídeos e simúlideos, pois possuem grande poder inseticida e especificidade contra larvas, além de apresentarem ação efetiva em baixas doses, facilidades para a produção em larga escala, armazenamento, transporte e aplicação, sendo considerada uma alternativa de controle sustentável, ou seja, ecologicamente correta (LACEY, 2007). As duas espécies de bactérias entomopatógenas mais



estudadas e utilizadas são o *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (DE BARJAC, 1978) e o *Lysinibacillus sphaericus* (KELLEN et al., 1965).

Ambas são bactérias Gram positivas, cosmopolitas e esporulantes, que possuem atividade larvicida seletiva e no mercado internacional existem diversas formulações comerciais. Atuam por meio da ação de toxinas de natureza proteica produzidas sob a forma de cristal durante a esporulação. Os cristais proteicos atuarão por meio de sua ingestão durante o estágio larval de alguns dípteros. As protoxinas com ação inseticida são liberadas por meio do pH alcalino do lúmen intestinal e ativadas por serina-proteases intestinais, ligando-se posteriormente à receptores específicos do epitélio e causando o efeito citopatológico (LACEY, 2007).

## 2.7 Controle biológico de *Anopheles* spp.

A fim de se manter os ganhos causados pela redução de casos de malária, é importante considerar métodos alternativos complementares para mitigar os processos de resistência e adaptação comportamental no âmbito do controle populacional do vetor. DERUA et al. (2019) demonstrou que o uso das bactérias entomopatógenas supracitadas mostrou ação significativa contra mosquitos do gênero *Anopheles* na África Subsaariana (SSA), região que possui o maior número de casos de malária no mundo, evidenciando efetividade no controle do vetor de forma sustentável. Muitos programas de controle obtiveram sucesso utilizando apenas formulações a base do *L. sphaericus*, como é possível visualizar no Quadro 2, mas atualmente é importante a utilização de programas associados para se evitar resistência (SILVA-FILHA et al., 2021).

**Quadro 2** – Controle biológico de *Anopheles* no mundo com larvicidas biológicos baseados em *L. sphaericus*

<b>Larvicida biológico</b>	<b>Espécies-alvo</b>	<b>Localidade</b>	<b>Tipo de ação</b>	<b>Referência</b>
<i>L. sphaericus</i> 2362	<i>Anopheles gambiae</i> (s.l.)	Burkina Faso	Avaliação em laboratório e campo controle em área urbana	Nicolas et al. (1987)
<i>L. sphaericus</i> 2362	<i>Anopheles gambiae</i> (s.l.) e <i>An. funestus</i>	Camarões	Aplicação em valas e poças de áreas urbanas	Barbazan et al. (1998)

<i>L. sphaericus</i> 2362	<i>Anopheles albimanus</i>	Honduras	Aplicação em 5 regiões afetadas pela transmissão de malária	Castro et al. (2002)
<i>L. sphaericus</i> 2362	<i>Anopheles darlingi</i>	Brasil	Avaliação de impacto em fontes larvais durante 1 ano	Galardo et al. (2013)
<i>L. sphaericus</i> 2362	<i>Anopheles gambiae (s.l.)</i>	Gana	Avaliação em laboratório e campo controle em área urbana	Nartey, et al. (2013)

**Fonte:** Elaborada pela autora.

Em relação aos possíveis perfis de resistência durante a utilização de biolarvicidas, uma das principais problemáticas é o uso prolongado. Por possuir um sítio de ação específico, o uso prolongado do *L. sphaericus* apresenta um risco considerável de seleção de resistência dos insetos à toxina Bin, principalmente relacionada com ausência ou modificação do seu receptor no mosquito (WIRTH, 2010).

Vários estudos com espécies de *Culex* demonstraram resistência ao *L. sphaericus* em amostras de campo e/ou laboratoriais, porém não existem relatos na literatura de seleção de resistência à toxina Bin em espécies de *Anopheles*. Um estudo desenvolvido no Quênia, demonstrou que espécies do Complexo *Anopheles gambiae (s.l.)* eram completamente suscetíveis ao Bti e *L. sphaericus* (DERUA et al., 2019). Para Bti, estudos demonstraram poucos relatos de resistência em população de *Anopheles*. Um importante aspecto a ser considerado é a falta de resistência cruzada à toxina Bin por outros agentes, evidenciando a necessidade de programas com mais de um agente de controle (SILVA-FILHA et al., 2021).

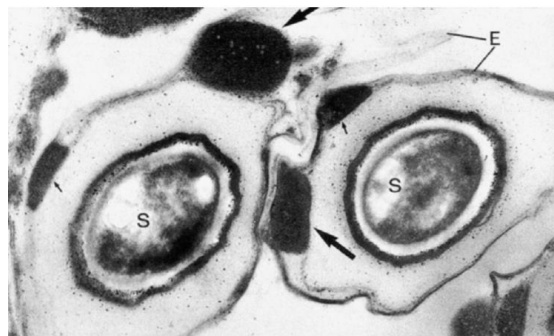
## 2.8 *Lysinibacillus sphaericus*

A bactéria entomopatogena *Lysinibacillus sphaericus*, foi descoberta por Neide (1904) e inicialmente foi denominada de *Bacillus sphaericus*. Posteriormente, passou a ser descrita taxonomicamente como *Lysinibacillus sphaericus* devido à presença de lisina e aspartato no peptidoglicano da parede celular (AHMED et al., 2007). É uma bactéria Gram-positiva, cosmopolita, saprófita e esporulante, geralmente encontrada em solos e ambientes aquáticos. Morfologicamente possui esporos terminais esféricos, e outra característica crucial é a inabilidade de crescer em condições anaeróbicas, além de não utilizar açúcares como fonte de energia, e sim compostos de carbono (WHITE & LOTAY, 1980).

A bactéria possui alta seletividade, fácil armazenamento e produção, além de longo tempo de vida em criadouros ricos em matéria orgânica (MITTAL, 2003). O *L. sphaericus* possui ação inseticida comprovada para espécies do gênero *Culex* e *Anopheles*, e é utilizada como biolarvicida desde a década de 1980 e no Brasil vêm sendo utilizada em programas de controle do *C. quinquefasciatus*, principalmente nos estados de Pernambuco e São Paulo (REGIS et al., 2001; SILVA-FILHA et al., 2021).

A alta atividade inseticida está associada à produção de inclusões cristalinas com toxinas durante a esporulação bacteriana, quando são sintetizados esporos arredondados no interior de um esporângio em forma de raquete juntamente com cristais que contém as proteínas inseticidas, a protoxina binária (Bin) (CHARLES et al, 1996). O *L. sphaericus* pode estar presente em ambientes adversos devido a mecanismos de resistência como a formação de esporos termorresistentes, não comprometendo sua ação entomopatogena, incluindo água com alto índice de salinidade e temperatura razoavelmente alta como a utilizada em criadouros para oviposição das fêmeas do mosquito *An. aquasalis* (REZENDE, 2013).

**Figura 6** – Micrografia eletrônica do *Lysinibacillus sphaericus* em esporulação.



**Fonte:** Berry, C., 2012.

**Legenda:** Esporângio (E) contendo seus esporos (S), e inclusões de cristais proteicos (indicadas pelas setas).

A primeira cepa do *L. sphaericus* foi isolada por Kellen et. al (1965) em larvas de *Culiseta incidens*, porém o potencial inseticida da bactéria foi evidenciado apenas após o isolamento de cepas com alta atividade larvicida, como a 1593 na Indonésia (SINGER, 1974), 2297 do Sri-Lanka (WICKREMESINGHE & MENDIS, 1980) e 2362 na Nigéria (WEISER, 1984). Os sorotipos de cada cepa de *L. sphaericus* foram classificados por meio da técnica de aglutinação flagelar (DE BARJAC; VÉRON; COSMAO DUMANOIR, 1980), sendo os principais sorotipos: H5a5b, com as cepas 1593, 2362, 2317, 1691 e C3-41, o H25 com a cepa 2297 e o H6 com a cepa IAB59 (CHARLES, NIELSEN-LEROUX; DELECLUSE, 1996). As

principais cepas utilizadas comercialmente como larvicidas são a 2263 e 1593, e são consideradas excelentes agentes de controle para espécies de mosquitos (LACEY, 2007).

As principais proteínas inseticidas produzidas pelo *L. sphaericus* são a toxina binária (Bin), que é o principal fator tóxico presente em todas as cepas de *L. sphaericus* com alta atividade larvicida, além das Mtx (*Mosquitocidal toxins*), toxinas Cry (Cry48Aa/Cry49Aa), sphaericolisina e proteínas S-layer (SILVA-FILHA et al., 2021). As toxinas Mtx são produzidas durante a fase vegetativa, e foram denominadas de Mtx1 (100kDa), Mtx2 (32 kDa) e Mtx3 (36kDa), e ao serem secretadas no meio sofrem degradação proteolítica, sendo assim consideradas de baixo poder inseticida (CHARLES, NIELSEN-LEROUX; DELECLUSE, 1996), porém quando as Mtx1 e Mtx2 são expressas em cepas de *Escherichia coli* podem apresentar alto poder larvicida para culicídeos (WEI; CAI; YUAN, 2006; WIRTH et al., 2007).

Duas proteínas da família Cry, denominadas Cry48Aa (135 kDa) e Cry49Aa (53 kDa), foram isoladas em *L. sphaericus* cepa IAB59, e assim como a toxina binária, Cry48Aa/Cry49Aa agem em sinergia e possuem ação sob culicídeos (JONES et al., 2007, SILVA-FILHA et al., 2021). Quando purificadas e concentradas de forma equimolar, considerando que a Cry48Aa possui baixo nível de acúmulo, apresentam atividade larvicida considerável para *C. quinquefasciatus*, podendo ser utilizadas em linhagens de *Culex* já resistentes à toxina Bin, e não apresentou ação tóxica para *A. aegypti* (JONES et al., 2007).

A toxina sphaericolisina (53 kDa) foi descoberta em no subgrupo IIAL de cepas A3-2, o qual não apresenta genes para as toxinas Bin ou Mtxs. Não apresenta ação contra dípteros, porém demonstra ação tóxica quando injetada em insetos do gênero Blattodea, *Blattella germanica*, e *Spodoptera litura* (Lepidoptera) (NISHIWAKI et al., 2007). As proteínas S-layer (120-130kDa) foram isoladas de algumas cepas de *L. sphaericus*, e são produzidas durante o estágio vegetativo de crescimento das bactérias, podendo apresentar atividade larvicida contra *Culex quinquefasciatus* (LOZANO et al., 2011).

## **2.9 Toxina binária (Bin) do *Lysinibacillus sphaericus***

A toxina binária (Bin), é o principal fator tóxico presente em cepas de *L. sphaericus* com alta atividade larvicida, e por isso tem sido o alvo da maioria dos estudos sobre o modo de ação desta bactéria e vem sendo utilizada em formulações comerciais. A protoxina Bin é um heterodímero composto por duas proteínas sintetizadas de forma equimolar e massa molecular de 42 e 51 kDa, que foram denominadas de BinA e BinB, respectivamente, sendo ambas co-transcritas de um mesmo operon antes do crescimento exponencial da bactéria (BERRY, 2012).

A toxina Bin possui suas sequências proteicas altamente conservadas, com seis variantes da BinA e quatro variantes da BinB (PRIEST et al., 1997; HUMPREYS & BERRY, 1998; HIRE et al., 2009).

Após a ingestão pelas larvas, o cristal é solubilizado em pH intestinal alcalino (~10) e a protoxina liberada no lúmen é clivada por serina-proteases para atingir a forma de toxina ativa, e esse processo ocorrerá em ambos os insetos suscetíveis ou não suscetíveis (BROADWELL & BAUMANN, 1987). Após a clivagem, os polipeptídeos de 42 e 51 kDa originam fragmentos de 39 e 43 kDa, BinA e BinB, respectivamente, constituindo as formas ativas (BAUMANN et al., 1985). Foi demonstrado em larvas de *C. pipiens* que o componente BinB é responsável pela ligação com receptores específicos presentes no epitélio intestinal enquanto o componente BinA é responsável pela atividade tóxica (NICOLAS, et al., 1993).

Estudos por dicroísmo celular sugerem que ambas as subunidades proteicas se apresentam predominantemente como folhas beta, embora a BinB selvagem apresente regiões de alfa-hélices (KALE et al., 2013). A subunidade BinA possui 370 aminoácidos e estudos apontam que ambas as regiões C-terminal e N-terminal são importantes à sua interação com a BinB (OEI; HINDLEY; BERRY, 1992), sendo possivelmente o domínio C-terminal relacionado à atividade tóxica com a formação de poros no epitélio intestinal (ELANGO VAN et al., 2000).

Na BinA, foi demonstrado por meio de estudos de mutagênese que a substituição de alguns resíduos por alanina pode prejudicar sua ação. Substituindo os aminoácidos E98A, R101A e E114A existe redução na atividade, e substituindo R97A existe perda da atividade, mas em nenhum dos casos existe a perda da habilidade de interação com a BinB (SANITT et al., 2008). Outro ensaio demonstrou que a substituição do resíduo R312 na porção C-terminal faz com que haja a perda da atividade biológica (ELANGO VAN et al., 2000). A substituição de três resíduos de cisteína por alanina apresentou redução na atividade (C195A) ou perda da toxicidade (C31A e C47A) (PROMDONKOY et al., 2008).

Já a subunidade BinB possui 448 aminoácidos, e sua região N-terminal parece ser responsável pela ligação aos receptores presentes no epitélio intestinal, onde foram descritos como importantes para a ligação com Cqm1 a região entre os resíduos N33 e L158, enquanto a região C-terminal é responsável pela ligação à toxina BinA, conforme presente no Quadro 3 (OEI; HINDLEY; BERRY, 1992; SINGKHAMANAN et al., 2010; ROMÃO, et al., 2011, SINGKHAMANAN et al., 2013). O domínio N-terminal possui características similares a outras proteínas com função de ligação a carboidratos, o que reforça o seu papel de interação

aos receptores, além de possuir resíduos de cisteína, que contribuem na conformação funcional da toxina BinB (SRISUCHARITPANIT et al., 2014).

**Quadro 3** – Trabalhos evidenciando resíduos ou regiões importantes de interação da BinB ao receptor Cqm1.

<b>Resíduos ou regiões da BinB estudados</b>	<b>Tipo de alteração realizada no estudo</b>	<b>Função afetada após alteração</b>	<b>Referência</b>
147FQFY150 (F149A e Y150A)	Mutagênese/ Substituição por Alanina	Perda de toxicidade para larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> e em ensaios <i>in vitro</i> BinB-Cqm1	Singkhamanan et al. (2010)
C67A e C161A	Mutagênese/ Substituição por Alanina ou Serina	As mutações diminuíram a interação com a BinA e eliminaram a toxicidade	Boonyos et al. (2010)
Região entre N33-L158	Mutagênese/ Proteínas truncadas	Mostraram-se importantes para ligação à Cqm1 <i>in vitro</i>	Romão et al. (2011)
85IRF87 e 147FQF149	Mutagênese/ Substituição por Alanina	Mutante não apresentou ligação <i>in vitro</i> ao receptor Cqm1	Romão et al. (2011)
35PEI37 e 41FYN43	Mutagênese/ Substituição por Alanina	As mutações causaram perda da toxicidade <i>in vivo</i> para larvas	Singkhamanan et al. (2013)
P35A, E36A, F41A e Y42A	Mutagênese/ Substituição por Alanina	Atividade larvicida foi reduzida, mas não perdeu a capacidade de interação à BinA <i>in vitro</i>	Singkhamanan et al. (2013)

**Fonte:** Elaborada pela autora.

A toxina BinB liga-se a uma simples classe de proteínas de membrana, que atuam como receptores, presentes na superfície das células intestinais de culicídeos possibilitando assim os efeitos citopatológicos causados pela BinA (CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELECLUSE, 1996; CHARLES et al., 1997; SILVA-FILHA et al, 1997). A presença de receptores específicos no *microvilli* intestinal de larvas têm um papel essencial no modo de ação da toxina Bin, e já foram descritos em *Culex quinquefasciatus*, *C. pipens*, *An. gambiae*, e apesar de também ter sido descrita uma proteína ortóloga em *Aedes aegypti*, demonstrou-se que esta espécie é refratária e conseqüentemente não sofre os efeitos citotóxicos da Bin (CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELECLUSE, 1996; FERREIRA et al., 2010).

## 2.10 $\alpha$ -glicosidases de mosquitos

As enzimas  $\alpha$ -glicosidases são membros da grande família das  $\alpha$ -amilases *sensu lato*, e apresentam diferenças em relação aos seus substratos e distribuição em tecidos.  $\alpha$ -glicosidases (EC 3.2.1.20) são exoenzimas, ou seja, possuem capacidade de degradar moléculas orgânicas complexas em moléculas absorvíveis pelo organismo. Estão presentes em grande parte nos organismos que hidrolisam terminais glicosídeos, e liberam  $\alpha$ -glicose de extremidades não-redutoras da cadeia do substrato (CHIBA, 1997; TOMASIK & HORTON, 2012). Em insetos, são fundamentais no processo de clivagem de oligossacarídeos essenciais, possuindo importante papel na digestão de carboidratos, além de apresentarem sítios de ligação à toxina binária do *L. sphaericus* (KRASIKOV; KARLOV; FIRSOV, 2001).

A classificação das hidrolases glicosídicas é feita de acordo com a similaridade de sua sequência de aminoácidos, e estão agrupadas em mais de 167 famílias de acordo com a classificação de Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes ou CAZy), onde as  $\alpha$ -glicosidases são encontradas principalmente nas famílias 13 e 31, (LOVERING et al., 2007, CANTAREL, et al., 2009). A identificação das  $\alpha$ -glicosidases se baseia na presença de quatro domínios conservados ao longo da sequência proteica, que a diferencia de outras amilases (KRASIKOV et al., 2001).

As  $\alpha$ -glicosidases são responsáveis pela digestão da sacarose, presente na maioria dos açúcares ingeridos por mosquitos, que auxilia em vários processos metabólicos além de aumentar a longevidade e fertilidade dos insetos (FOSTER, 1995). Foram caracterizadas em espécies de *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*, cuja expressão de genes e atividade de glicosidase foram detectadas em glândulas salivares de adultos (MARINOTTI & JAMES, 1990; SOUZA-NETO et al., 2007), e em intestino médio ligadas à membrana celular por uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (SILVA-FILHA et al., 1999; DARBOUX et al., 2001; OPOTA et al., 2008).

Em espécies de *Anopheles* spp., como em *An. darlingi*, *An. aquasalis*, e *An. dirus*,  $\alpha$ -glicosidases foram anteriormente descritas em glândulas salivares de adultos (MOREIRA-FERRO; MARINOTTI; BIJOVSKY, 1999; JARIYAPAN et al., 2007; SOUZA-NETO et al., 2007). Na espécie *An. gambiae*, foram encontrados dois genes responsáveis por codificar  $\alpha$ -glicosidases no intestino do inseto (*agm1* e *agm2*), e posteriormente foi descrita a *Agm3* e caracterizada como receptora da toxina Bin nesta espécie, com 66,4% de identidade quando comparada à *Cqm1* (ZHENG, et al., 1995; OPOTA et al., 2008). Foi demonstrado que  $\alpha$ -glicosidases possuem papel de receptores da toxina binária no *microvilli* intestinal de larvas,

sendo esta interação uma etapa fundamental para a ação do *L. sphaericus*, e a afinidade entre as proteínas está diretamente relacionada à susceptibilidade da larva (SILVA-FILHA et al., 1997).

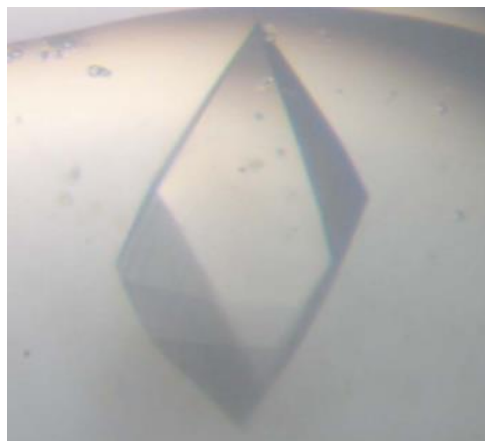
### 2.11 $\alpha$ -glicosidases e papel como receptores da toxina Bin

Os receptores intestinais da toxina Bin nas espécies *Culex pipiens*, *C. quinquefasciatus* e *An. gambiae* são  $\alpha$ -glicosidases de aproximadamente 66 kDa denominadas respectivamente de *C. pipiens* maltase 1 (Cpm1), *C. quinquefasciatus* maltase 1 (Cqm1) e *An. gambiae* maltase 3 (Agm3) (SILVA-FILHA et al., 1999; DARBOUX et al., 2001; OPOTA et al., 2008). A espécie *Ae. aegypti* possui uma proteína ortóloga ao receptor Cqm1, denominada *Ae. aegypti* maltase 1 (Aam1), porém não tem capacidade de ligar-se a Bin sendo esta espécie considerada refratária ao modo de ação do *L. sphaericus* (FERREIRA et al., 2010). Os genes *cpm1*, *cqm1* e *agm3* codificam proteínas de 580 a 588 aminoácidos, e possuem quatro domínios conservados que caracterizam estas  $\alpha$ -glicosidases, com sítios de glicosilação e sinalização de inserção de âncora GPI na porção C-terminal (SILVA-FILHA et al., 1999; DARBOUX et al., 2001; OPOTA et al., 2008).

A toxina presente em *An. gambiae*, apesar de se ligar a toxina binária, parece apresentar diferenças na ligação. Para *Culex*, apenas a BinB tem papel importante na ligação ao receptor, enquanto em *Anopheles* ambas as subunidades da toxina parecem ser cruciais (CHARLES et al., 1997). Além disso, foi observado que em *An. gambiae* e *An. stephensi* existe uma ligação mais fraca à toxina Bin, o oposto do que ocorre para Cqm1, mostrando que existe uma diferença de perfil de ligação e afinidade (SILVA-FILHA et al., 1997).

Em Cqm1, foi descrito que a região N-terminal é importante para a ligação à Bin, mais especificamente a região composta pelos resíduos S129-A312, e apesar da conservação de aminoácidos nessa região entre Cqm1 e Aam1, em Cqm1 os resíduos 159GG160 foram cruciais para ligação à BinB. Já em Aam1 existe a possibilidade que outros resíduos ou fatores sejam críticos nesta proteína para uma possível ligação à Bin (FERREIRA et al., 2014). A obtenção das estruturas destas proteínas é uma etapa importante para se compreender melhor possíveis interações, principalmente para posteriores estudos *in silico*. A proteína Cqm1 foi o primeiro membro da família GH13\_17 a ter sua estrutura relatada por meio de cristalização, demonstrada na Figura 7 (SHARMA et al., 2018), e apresenta um sítio de ligação ao íon Ca(II) essencial para a atividade enzimática, possivelmente um sítio exclusivo da família GH13\_17 (SHARMA & KUMAR, 2019).



**Figura 7** – Cristalização da Cqm1 por método de difusão de vapor (*sitting-drop*).

**Fonte:** Sharma et al., 2018.

**Legenda:** Núcleo ativo da Cqm1 (entre os resíduos 23-560), cristalizado pelo método de difusão de vapor *sitting-drop*, e identificado usando análise de fluorimetria de varredura diferencial.

Em Agm3, foi demonstrado *in vitro* a ligação da proteína recombinante à toxina binária, apesar de não se ter maiores informações sobre os possíveis resíduos envolvidos (OPOTA et al., 2008). Muitas outras espécies de *Anopheles* já foram descritas como suscetíveis, abrindo possibilidades para o uso do *L. sphaericus* em programas de controle, como o exemplo de *An. stephensis*, *An. sinensis* e *An. darlingi* (KUMAR et al., 1994; THIERY et al., 1996; GALARDO et al., 2013). A análise *in silico* do genoma da *An. darlingi* mostra uma proteína ortóloga à Cqm1/Aam1/Agm3 de ~585 aminoácidos apresentando 66% de identidade e 79% de similaridade em relação à Cqm1, 70% de identidade e 81% de similaridade à Aam1 e 77% de identidade e 86% de similaridade quando comparada à Agm3, fornecendo indícios de que possam existir outras proteínas ortólogas em outras espécies de *Anopheles* transmissoras da malária no Brasil.

O interesse em investigar a presença de  $\alpha$ -glicosidases ortólogas ao receptor Cqm1 da toxina Bin em outras espécies de *Anopheles* spp. teve início a partir do surto de casos extra-amazônicos de malária na cidade do Conde/PA, onde foram coletados espécimes de anofelinos no local (GOMES et al., 2020). Diante da ausência de estudos sobre a ação e possível susceptibilidade dessas espécies à toxina Bin, é importante investigar possíveis sequências gênicas de  $\alpha$ -glicosidases que possam atuar como receptores e realizar análises *in silico*, considerando a dificuldade de se realizar estudos de susceptibilidade *in vivo* com anofelinos.

## 2.12 Modo de interação entre $\alpha$ -glicosidases e a toxina binária

A interação tem início após a protoxina binária passar pelo processo de ativação proteolítica no lúmen intestinal. Depois disso, a toxina ativa reconhece proteínas específicas que se encontram ancoradas à membrana no epitélio intestinal da larva, servindo como receptores (NIELSEN-LEROUX & CHARLES, 1992). Esse processo é bem definido no que diz respeito ao local de ligação no intestino de larvas de *Culex pipiens* (Cpm1), que ocorre na região do ceco gástrico e intestino médio posterior, porém o mesmo não foi detectado para *Anopheles*, que é considerado menos suscetível a ação da toxina. Em relação aos receptores, Cpm1, Cqm1 e Agm3, a sua expressão como proteínas ancoradas à membrana do *microvilli* intestinal é determinante para o modo de ação do *L. sphaericus* (SILVA-FILHA et al., 2021).

Foi demonstrado por Ferreira et al. (2014), através de ensaios de mutagênese de sítio dirigida que a região N-terminal em Cqm1 é importante para a ligação à toxina. As proteínas encontradas na família GH13, como é o caso da Cqm1, apresentam três subdomínios: A, B e C, onde o domínio B abriga o sítio ativo central e apresenta dobras ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> em forma de barril. Dois *loops* saem do domínio central e constituem o domínio A, enquanto o domínio C é constituído por resíduos da região C-terminal (SHARMA & KUMAR, 2019). A região importante para interação se localiza nos *loops* do domínio A, com presença de alguns resíduos do domínio B, região onde se encontram os aminoácidos S129 e A312 (FERREIRA et al, 2014; SHARMA & KUMAR, 2019).

A ligação de BinB ao receptor Cqm1, é uma etapa crucial para a internalização das duas subunidades (LEKAKARN et al., 2015). A ação tóxica, causada pela BinA depende desta primeira etapa, e entre os danos celulares causados por essa ligação encontram-se destruição do *microvilli* intestinal, danos às mitocôndrias, vacuolização citoplasmática e quebra do retículo endoplasmático. Além disso, foi descrito que as duas subunidades da Bin possuem capacidade de formar poros na membrana celular, e induzir autofagia (OPOTA et al., 2011).

## 2.13 Predição de estruturas e *docking* molecular de proteínas de mosquitos

A compreensão acerca de estruturas proteicas é fundamental para elucidar questões entre sequência de aminoácidos e a estrutura final da proteína, além de esclarecer sobre pontos importantes de suas funcionalidades. No entanto, a obtenção de estruturas proteicas por meio de métodos experimentais, como cristalografia, é financeiramente custosa e laboriosa, sendo muitas vezes inviável em determinados projetos (MCPHERSON & GAVIRA, 2014). Dessa

forma, ferramentas preditivas de modelagem computacional protéica se apresentam como uma alternativa para obtenção de modelos estruturais, utilizando como base uma série de dados consolidados em repositórios de proteínas, como é o caso do *Protein Data Bank* (PDB), e, tendo sua acuraria dependente do número de sequências homólogas presentes nos bancos de dados. A predição de estruturas tridimensionais proteicas possui grande importância para biotecnologia, sendo utilizada em diversas áreas, como no design de fármacos e na compreensão sobre interações proteína-proteína (JISNA & JAYARAJ, 2021).

O *docking molecular* é outra metodologia importante da bioinformática associada à modelagem molecular, e tem como princípio a análise do acoplamento entre proteínas ou ligante-proteína, buscando modos de interação predominantes. O objetivo é entender e prever o reconhecimento molecular, estruturalmente, encontrando possíveis formas de ligação, e energeticamente, prevendo a afinidade de ligação. Dessa forma, no encaixe molecular, considerando a estrutura das proteínas envolvidas, são gerados diversos modelos de interação possíveis, que são avaliadas de acordo com uma função de pontuação classificando-os como potenciais interações ou não (LI; FU; ZHANG, 2019).

O parâmetro de energia livre de ligação gerado por ferramentas de *docking* é utilizado para prever afinidades de ligação entre as proteínas, através de simulações moleculares e mecânica estatística, e ao realizar as possíveis interações entre as moléculas, dentre vários parâmetros avaliados, é avaliada a energia livre de cada conformação espacial do ligante, onde as menores energias livres geradas são consideradas para justificar a conformação do ligante (KITCHEN et al., 2004).

Ambas as metodologias de bioinformática citadas anteriormente estão sendo utilizadas para estudos envolvendo proteínas de mosquitos, como para obtenção de métodos alternativos de controle. Mesquita et al. (2020), avaliou novos inseticidas neonicotinóides, onde suas interações foram estimadas com o sítio de ligação do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) por estudos de *docking* para avaliação de atividade larvicida contra *An. darlingi*. Selvaraj et al. (2021), investigou a atividade larvicida de novas antraquinonas contra larvas de *Culex quinquefasciatus* por meio de *docking* molecular, comparando aos valores de energia de ligação com a permetrina. Brito et al. (2021), fez um levantamento de possíveis compostos presentes em óleos essenciais com ação repelente para *Aedes aegypti*, e o *docking* foi aplicado para entender o modo de ligação e a afinidade do conjunto de dados de óleos essenciais ao sítio de ligação presente no mosquito.

### 3 JUSTIFICATIVA

O *Lysinibacillus sphaericus* é usado mundialmente como uma ferramenta eficaz no controle biológico de mosquitos de interesse médico. As formulações comerciais à base de *L. sphaericus*, cujo principal fator tóxico é a toxina Bin, possui efetiva atividade no controle populacional de culicídeos vetores de patógenos humanos, refletindo em grande impacto na saúde pública. A ação inseticida desta bactéria é mediada pela interação da toxina Bin com receptores específicos presentes no *microvilli* intestinal de larvas de espécies de mosquitos suscetíveis. A detecção da presença de possíveis receptores intestinais e de seus genes em importantes espécies de *Anopheles* spp., com ocorrência semi-rural e urbana, de característica invasiva e que podem estar envolvidas com a transmissão do *Plasmodium* no Brasil e serem alvos de programas de controle, ainda é uma lacuna científica nos estudos de caracterização do modo de ação do *L. sphaericus* nestas espécies. A descrição de proteínas ortólogas à Cqm1, potenciais receptores à toxina binária em diferentes espécies de *Anopheles* spp., é importante para caracterizar possíveis modos de ação molecular da toxina Bin nas larvas destas espécies, o que gera conhecimento e contribui para o uso dessa ferramenta no controle de *Anopheles* no Brasil.

#### 4 PERGUNTA CONDUTORA

Espécies de *Anopheles* spp. envolvidas em um surto extra-amazônico de malária no Brasil possuem genes que codificam para  $\alpha$ -glicosidases ortólogas à Cqm1 que possam atuar como receptores da toxina binária do *Lysinibacillus sphaericus*?

## 5 HIPÓTESE

Espécies de anofelinos envolvidas em um surto extra-amazônico de malária codificam genes ortólogos ao gene *cqm1*, indicando susceptibilidade à toxina Bin do *L. sphaericus*, abrindo novas possibilidades de investigação de ampliação de uso do larvicida para essas espécies.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo Geral

Caracterizar  $\alpha$ -glicosidases de espécies de *Anopheles* spp., potenciais vetores de *Plasmodium* no Brasil, com ênfase na sua capacidade de interação à toxina Bin do *L. sphaericus* cepa 2362.

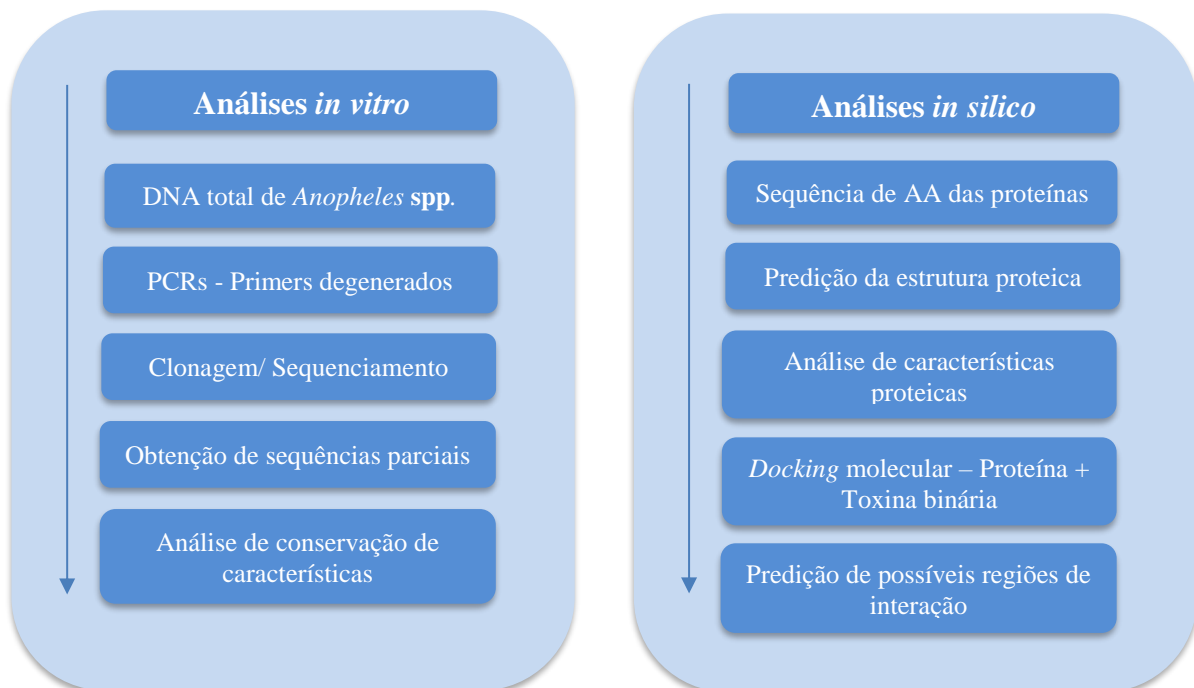
### 6.2 Objetivos específicos

- a) Identificar os genes que codificam para  $\alpha$ -glicosidases ortólogas à Cqm1 em espécies de *Anopheles* spp.;
- b) Avaliar as características dos genes das  $\alpha$ -glicosidases de *Anopheles* spp. em relação aos ortólogos que são receptores da toxina binária;
- c) Realizar uma análise fenética entre as  $\alpha$ -glicosidases de *Anopheles* spp., comparando com a organização filogenética das respectivas espécies;
- d) Predizer a estrutura proteica das  $\alpha$ -glicosidases em *Anopheles* spp. comparando-as com as proteínas já descritas Cqm1, Aam1 e Agm3;
- e) Comparar *in silico* a interação das  $\alpha$ -glicosidases de *Anopheles* spp. com a toxina binária através de *docking* molecular;

## 7 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho tem como metodologia principal inicialmente uma análise *in vitro*, onde as sequências nucleotídicas foram amplificadas do DNA total de mosquitos da espécie *Anopheles* spp., e a partir da obtenção das sequências por meio de sequenciamento iniciou-se a segunda etapa, que envolve a análise *in silico*. Nessa abordagem, foi realizada a predição das estruturas proteicas das possíveis  $\alpha$ -glicosidases de cada espécie, e *docking* molecular com descrição de possíveis regiões de interação à toxina binária (Figura 8).

**Figura 8** – Fluxograma experimental da metodologia.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

### 7.1. DNAs de espécies de *Anopheles* spp. utilizadas no estudo

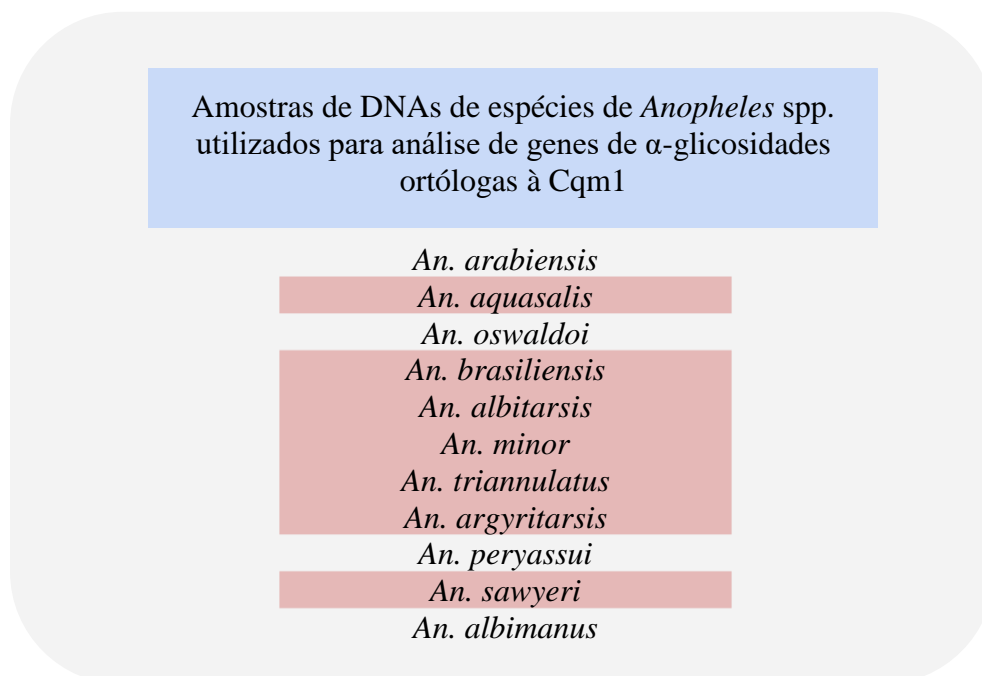
Amostras de adultos de *Anopheles* spp foram obtidas a partir de coleta ativa realizada na cidade do Conde/PB por colaboradores, que realizaram a classificação taxonômica das espécies através de análise dos aspectos morfológicos observados de acordo com a chave de identificação descrita em Consoli et al. (1994) e através de análises moleculares do gene Citocromo C Oxidase I (GOMES et al., 2020). A extração de DNA foi realizada a partir de amostras teciduais da região torácica dos mosquitos (incluindo patas e asas), segundo Ayres et



al. (2002), e após a ressuspensão as amostras foram submetidas à PCR com primers específicos para a região de subunidade 1 do gene Citocromo C oxidase (COI) (GOMES et al., 2020). Os produtos de PCR foram enviados para sequenciamento em equipamento *Applied Biosystems 3500 L genetic analyzer* disponível na plataforma tecnológica da FIOCRUZ (NPT) do Instituto Aggeu Magalhães, e todas as sequências individuais foram analisadas e editadas no programa *CodonCode Aligner*.

As sequências foram comparadas com as sequências presentes em base de dados como *Bold System* e *GenBank*, confirmando a identidade de cada espécie, e só após as criteriosas etapas de identificação, os DNAs de cada espécie de *Anopheles* spp. foram cordialmente cedidos para as análises descritas a seguir (Figura 9) (GOMES et al., 2020). Foram cedidas pelo mesmo grupo, amostras de *An. arabiensis* e *An. gambiae*, coletadas no país africano Cabo Verde. Amostras da primeira espécie apresentaram qualidade para amplificação, enquanto *An. gambiae* teve seu material degradado e desta forma não foi utilizada.

**Figura 9** – DNAs de espécies de *Anopheles* utilizadas neste trabalho.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** DNAs de espécies de *Anopheles* spp. utilizados para a amplificação inicial com primers degenerados, e as espécies que obtiveram os genes parciais amplificados e clonados encontram-se em rosa.

Uma grande parte das espécies de *Anopheles* spp. encontradas no Brasil possuem poucas informações em bancos de dados, que em sua maioria se concentram em sequências mitocondriais, como é o caso das sequências de COI utilizadas para confirmação das espécies

utilizadas neste trabalho (GOMES et al., 2020). Essa escassez de informações evidencia a importância de aprofundar os estudos para *Anopheles* no país, como mostrado no Quadro 4.

**Quadro 4** – Informações gerais presentes no banco de dados NCBI (National Center of Biotechnology Information) sobre algumas espécies de *Anopheles* spp. encontradas no Brasil.

<b>Espécie</b>	<b>ID taxonômico</b>	<b>Locais de registro</b>	<b>Informações</b>
<i>An. darlingi</i>	43151	Países da América Central e do Sul	Representação de genoma completo - GCA_000211455.3
<i>An. aquasalis</i>	42839	Países da América Central e do Sul	Representação de genoma completo - GCA_002846955.1;
<i>An. braziliensis</i>	58242	Países da América do Sul	92 sequências nucleotídicas e 121 sequências proteicas, majoritariamente mitocondriais
<i>An. albitarsis</i>	58236	Países da América do Sul	360 sequências nucleotídicas e 649 sequências proteicas, majoritariamente mitocondriais
<i>An. minor</i>	596826	Guiana Francesa e Brasil	6 sequências nucleotídicas e 41 sequências proteicas, majoritariamente mitocondriais
<i>An. triannulatus</i>	58253	Países da América Central e do Sul	866 sequências nucleotídicas e 852 sequências proteicas, majoritariamente mitocondriais, ribossomais e referente a enzimas funcionais
<i>An. argyritarsis</i>	58241	Países da América Central e do Sul	43 sequências nucleotídicas e 93 sequências proteicas, majoritariamente mitocondriais
<i>An. sawyeri</i>	1552952	Brasil	24 sequências nucleotídicas e 72 sequências proteicas, majoritariamente mitocondriais e referente a enzimas funcionais

**Fonte:** Elaborado pela autora.

## 7.2 Análise de sequências iniciais, desenho de primers degenerados e PCRs

Inicialmente foram realizadas análises *in silico* das sequências gênicas e proteicas das  $\alpha$ -glicosidases ortólogas à Cqm1 das espécies de mosquitos cujos genomas já se encontram disponíveis, conforme o Quadro 5. Nesta etapa foram avaliadas as características básicas dos genes como conservação, presença e tamanho de éxons e íntrons, sítios de glicosilação,

avaliação de presença de domínios de famílias protéicas conservados e predição de âncora GPI. As ferramentas utilizadas para as análises *in silico* foram *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para análise de sequências gênicas e proteicas; *Bioedit 7.2 sequence alignment editor* (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>) para alinhamento e análise de sequências gênicas e protéicas; *NetNGlyc 1.0 server predicts N-Glycosylation sites in human proteins* (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>) para predição de sítios de glicosilação; *Conseverd domains database - CDD* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) para identificação de domínios conservados de famílias protéicas; *NetGPI 1.1 GPI Anchor predictions* (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetGPI>) para predição de âncora GPI. Os primers degenerados foram desenhados com base em trechos mais conservados comparando as sequências gênicas e proteicas das  $\alpha$ -glicosidases ortólogas à Cqm1 já descritas anteriormente.

**Quadro 5** – Código de identificação de sequências gênicas e proteicas de  $\alpha$ -glicosidases ortólogas à Cqm1.

<b>Espécie</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Protein ID</b>
<i>C. quinquefasciatus</i>	DQ333335	ABC59609.1
<i>Ae. albopictus</i>	XM_019692551.2	XP_019548096.2
<i>Ae. aegypti</i>	CH477670.1	EAT37485.1
<i>An. gambiae</i>	EU165335.1 (AGAP008961-RA)	ABW98683.1
<i>An. darlingi</i>	ADMH02000566.1 (ADAC002351-RA)	ETN65875.1
<i>An. aquasalis</i>	GAMD01001051	JAB00540.1
<i>An. arabiensis</i>	APCN01003405	(AARA009525-RA) AARA009525

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** ID de sequências gênicas (ou de mRNA) e proteicas  $\alpha$ -glicosidases ortólogas à Cqm1 disponíveis nos bancos de dados VectorBase e NCBI.

As amostras de DNAs de *Anopheles* spp. foram submetidas a reações de PCR (Reação em cadeia da Polimerase) com objetivo de amplificar as regiões dos genes que codificam para proteínas ortólogas à Cqm1 nas espécies de interesse, utilizando primers degenerados universais (Quadro 6). As PCRs foram realizadas com o kit Platinum® Taq DNA Polymerase High

Fidelity (ThermoFisher Scientific™) seguindo as recomendações do fabricante. Utilizamos inicialmente apenas o DNA de *An. arabiensis* para testar a eficiência dos primers degenerados usando um gradiente de temperaturas de anelamento (51°C - 57°C), e todas as temperaturas testadas possibilitaram a amplificação do inserto (~1.6 kb), dessa forma elencamos a temperatura de anelamento de 55°C como uma temperatura ideal para as demais amostras de DNAs. As PCRs seguintes foram realizadas com DNA total e após as reações, as amostras foram submetidas à corrida eletroforética em gel de agarose a 1%. Os fragmentos amplificados foram excisados do gel de agarose e purificados utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega). Das onze espécies de *Anopheles* estudadas apenas sete apresentaram amplificação específica e seguiram para as próximas etapas de clonagem, sequenciamento e decodificação das sequências gênicas e proteicas das proteínas ortólogas à Cqml (Figura 9).

**Quadro 6** – Sequência de primers utilizados para amplificar, sequenciar e clonar os genes que codificam para proteínas ortólogas à Cqml em espécies de *Anopheles* spp.

	<b>Descrição</b>	<b>5'-Sequência-3'</b>
1	<i>Anopheles</i> Universal Degenerado F	TTCTAYCAGATCTATCCRCGCTCS
2	<i>Anopheles</i> Universal Degenerado R	<b>KGGTAGRTTSACAAAGTCYCC</b>
3	<i>Anopheles</i> spp. 1F Seq	ATGACGGAGGCGTACG
4	<i>Anopheles</i> spp. 1R Seq	CGTACGCCTCCGTCAT
5	<i>Anopheles</i> spp. 2F Seq	GCTGATGCTGGACTTT
6	<i>Anopheles</i> spp. 2R Seq	AAAGTCCAGCATCAGC
7	Aquasalis 1F Seq	GGTGATACTGGACTTT
8	Aquasalis 1R Seq	AAAGTCCAGTATCACC
9	Aquasalis 2F Seq	ATGACGGAAGCGTACG
10	Aquasalis 2R Seq	CGTACGCTTCCGTCAT

**Legenda:** F- Forward; R- Reverse; Seq – primers internos para sequenciamento; *Anopheles* Universal degenerado – primers universais para todas as sequências de *Anopheles* cujas degenerações estão sinalizadas em negrito.

### 7.3 Clonagem do DNA e sequenciamento

Os fragmentos gênicos purificados, foram clonados inicialmente em vetor pGEM®-T Easy (Promega), conforme instruções do fabricante. Seguindo o protocolo, os produtos das ligações (inserto + vetor) foram utilizados para a transformação de células de *Escherichia coli* TOP10 quimiocompetentes (Invitrogen), com posterior plaqueamento em Luria-Bertani (LB) ágar + antibiótico ampicilina + Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) + 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (X-GAL), para seleção de colônias que continham os específicos constructos. Mediante o crescimento bacteriano, foram realizados pré-inóculos, onde colônias foram selecionadas e cultivadas em meio LB líquido + antibiótico ampicilina O.N. 37°C 200RPM.

Com o crescimento bacteriano do pré-inóculo, foram obtidas preparações plasmidiais de vários clones através do kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). O material foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific), e posteriormente à clonagem foi confirmada a presença do inserto por digestão analítica com a enzima EcoRI-HF®. Após confirmação por digestão analítica, as amostras foram enviadas para sequenciamento automático, utilizando os primers específicos para o vetor (M13F e M13R) e os primers degenerados e internos para sequenciamento de cada amplicon (Quadro 6). A posterior análise das sequências foi feita utilizando o programa *DNAstar* (Lasergene). Uma vez confirmada a integridade e a identidade de cada amostra sequenciada, seguimos para as análises *in silico* que serão descritas a seguir.

### 7.4 Caracterização e montagem das sequências parciais dos genes e de suas respectivas proteínas de *Anopheles* spp. ortólogos à *Cqm1*

As análises *in silico* se iniciaram após o sequenciamento das construções plasmidiais, com a montagem das sequências de nucleotídeos pela ferramenta *SeqMan* do *DNAstar*, e foi possível obter todas as sequências consensos parciais de cada gene clonado. Os alinhamentos múltiplos das sequências gênicas foram realizados através das ferramentas *MegAlign*® (*DNAstar* Lasergene) e *Bioedit* (HALL, 1999) a fim de identificar as regiões de exons e introns com base nas sequências já caracterizadas de *cqm1* ([DQ333335](#)), *agm3* (EU165335.1) e *An. darlingi* (ADMH02000566.1). A edição das sequências gênicas parciais, retirada de íntrons, montagem dos éxons, e obtenção das sequências de aminoácidos (tradução) foi realizada através do programa *EditSeq*® (*DNAstar* Lasergene) e *SnapGene*®5.2.5.1 (Insightful Science).

A identidade e similaridade das sequências de aminoácidos das proteínas ortólogas em relação as sequências já descritas das proteínas Cqm1, Aam1 e Agm3, foram obtidas através da ferramenta *Blast® Global Alignment* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). O alinhamento das sequências protéicas foi realizado através do *BioEdit Sequence Alignment Editor*. A disposição de sítios de glicosilação nas proteínas foi obtida através da ferramenta *on line NetNGlyc 1.0* (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>), que são considerados os potenciais de cada sítio de n-glicosilação. Durante a avaliação, os valores potenciais são considerados dentro de parâmetros de nove redes neurais, e aqueles que ultrapassarem o limite padrão (*threshold*) de 0,5 indicam um possível sítio de glicosilação, desde que possuam a sequência de aminoácidos necessária (N-X-T/S). Desta forma, os potenciais são organizados pelo limite padrão e sua concordância com a saída média das 9 redes neurais, através da representação (+/-) (GUPTA & BRUNAC, 2002).

A identificação de domínios conservadas de famílias proteicas, ou seja, domínio catalítico para alfa amilase encontrado em maltases (alfa-glicosidases) e proteínas relacionadas (AmyAc\_family) nas sequencias proteicas estudadas pode ser confirmado através do CD-search da ferramenta *Conseverd domains database* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), e com base na descrição de blocos conservados de  $\alpha$ -glicosidass feito por Krasikov et al. (2001). Diante de estarmos trabalhando com sequências proteicas parciais, não tivemos acesso a região C-terminal das proteínas ortólogas de *Anopheles* spp. e desta forma não conseguimos aplicar uma análise de predição de âncora GPI.

## 7.5 Organização fenética das proteínas ortólogas

A relação filogenética das espécies de *Anopheles* spp. estudadas foi construída pela autora com base na classificação realizada por Harbach, 2013, considerando tanto a divisão de subgênero quanto as divisões informais, que envolvem seções e séries. Considerando as sequências proteicas parciais obtidas neste estudo, foi realizado um alinhamento fenético entre as sequências de *Anopheles* spp. e Cqm1, Aam1 e Agm3, através do programa COBALT\_ *Constraint-based Multiple Alignment Tool\_ Phylogenetic Tree View*. Essa ferramenta realiza o alinhamento de múltiplas sequências, onde se é avaliado uma série de parâmetros derivados de bancos de dados, como dados de domínios conservados, dados de motivos de proteínas e similaridade entre as sequências avalidas, utilizando as ferramentas RPS-BLAST, BLASTP e PHI-BLAST, sendo organizadas em um alinhamento múltiplo progressivo (PAPADOPOULOS

& AGARWALA, 2007). Com os resultados da análise fenética, foi possível realizar a comparação com o alinhamento filogenético e confirmar a organização das sequências de acordo com as espécies.

### 7.6 Caracterização das estruturas das proteínas ortólogas estudadas

As estruturas das proteínas de interesse foram preditas e modeladas pela ferramenta *online* Phyre<sup>2</sup> (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>), que utiliza detecção remota de homologia para construir modelos 3D, avaliando o efeito de aminoácidos variantes. Foi utilizada a estrutura já descrita de Cqm1 (PDB ID - [6K5P](#)) (KUMAR & SHARMA, 2019), para qual as proteínas apresentam maior homologia (KELLEY et al., 2015). Para avaliação das estruturas formadas quanto aos ângulos de torção de cada aminoácido (Plot de Ramachandran) dentro da estrutura final, foi utilizada a ferramenta online MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>), que possibilita avaliar os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente favoráveis e orienta quanto a qualidade para se utilizar modelos teóricos com tal proteína (WILLIAMS et al., 2018).

As estruturas de Cqm1, Aam1 e Agm3, utilizadas como controles nas próximas etapas também foram preditas pelo Phyre<sup>2</sup>. As sequências utilizadas para a predição foram Cqm1 - *GenBank*: ABC59609.1, Aam1 - *GenBank*: EAT37485.1 e Agm3 - *GenBank*: ABW98683.1. Depois de todas as estruturas estabelecidas, com a ferramenta PyMOL 2.5 foi possível delimitar nas proteínas de interesse a região similar em Cqm1 já descrita em outros trabalhos como essencial para ligação à BinB (FERREIRA et al, 2014), que está entre os aminoácidos S129 e A312, com ênfase nos aminoácidos 155PATGGG160. O alinhamento para comparação das estruturas foi realizado pelo TM-Align (<https://zhanggroup.org/TM-align/>), onde é realizado um alinhamento de resíduos de duas estruturas, e quanto mais próximo de 1,0 melhor a combinação das proteínas.

### 7.7 Docking molecular

A partir da predição e análise das estruturas das proteínas de interesse, iniciou-se a análise de *docking* molecular, a fim de se avaliar possíveis interações *in silico* entre as proteínas de interesse (potenciais receptores da toxina Bin) e a toxina binária. A ferramenta utilizada foi o HDock Server (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>), que foi utilizada para realizar *dockings* moleculares do tipo proteína-proteína (YAN et al., 2020). Para análise, como ligante foi

utilizado o cristal Bin com os dois heterodímeros (BinA e BinB), disponível em bancos de dados (PDB ID – [5FOY](#)) (COLLETIER et al., 2016), e como receptor foram utilizadas as proteínas já descritas Cqm1, Aam1 e Agm3, e as proteínas ortólogas de *Anopheles* spp. obtidas neste estudo.

A energia livre considerada pelo programa é organizada em forma de *score*, onde os melhores modelos utilizados para prever os complexos de interação são separados em um *ranking*. Neste *ranking*, os primeiros modelos apresentam menor energia livre de ligação, e esta energia está associada a campos de força e potenciais estatísticos (YAN et al., 2020). Desta forma, neste trabalho foram consideradas as energias dos primeiros 10 modelos, e os resultados dos primeiros *dockings* para BinAB-Cqm1 foram utilizados como base para se avaliar os *scores* das próximas interações.

A análise de *Docking*, foi conduzida com a estrutura completa do cristal da toxina binária, considerando os dois heterodímeros, pois a conformação da BinA pode interferir nos sítios de ligação da BinB, e sua presença é essencial para se compreender os mecanismos de interação *in silico*. Além disso, é importante lembrar que foi demonstrado por Charles et al. (1997) que ambas as subunidades da Bin possuem a mesma afinidade e capacidade de ligação ao epitélio de *An. gambiae*, o que não ocorre em *Culex pipiens*, demonstrando a importância de se consideradas as duas subunidades no *docking*.

A proteína Cqm1 foi utilizada como modelo positivo de interação, já que esta proteína possui a melhor afinidade de ligação a toxina binária dentre as testadas. Na Cqm1, a região necessária para interação à Bin encontra-se entre os aminoácidos S129-A312, descritos em Ferreira et al. (2014). Na toxina binária, a região importante para a interação encontra-se na porção BinB entre os aminoácidos N33-L158, descritos em Romão et al., 2011. Após submissão do *docking* na plataforma, os dez primeiros modelos de possíveis interações foram salvos para análise, onde foram evidenciados tanto a estrutura quanto os aminoácidos envolvidos nesta ligação. Também foram arquivadas a energia livre de cada interação.

Para ampliar os resultados foi realizado uma repetição dos *dockings* de Agm3 e espécies de *Anopheles* spp., sem delimitação de possíveis aminoácidos de interação de nenhuma das proteínas envolvidas, já que para essas espécies tais informações são desconhecidas, e os dados foram salvos para análise comparativa, tanto da estrutura quanto dos aminoácidos envolvidos. Também foram arquivados a energia livre de cada interação. Os resultados de *docking* foram observados na ferramenta PyMOL 2.5, sendo assim possível visualizar e alinhar os modelos de ligação gerados. Na ferramenta, foram diferenciadas cada estrutura, desde o ligante (BinA e BinB) e suas regiões consideradas como essenciais para a ligação com o receptor, e dessa forma foram geradas imagens para cada possível interação.



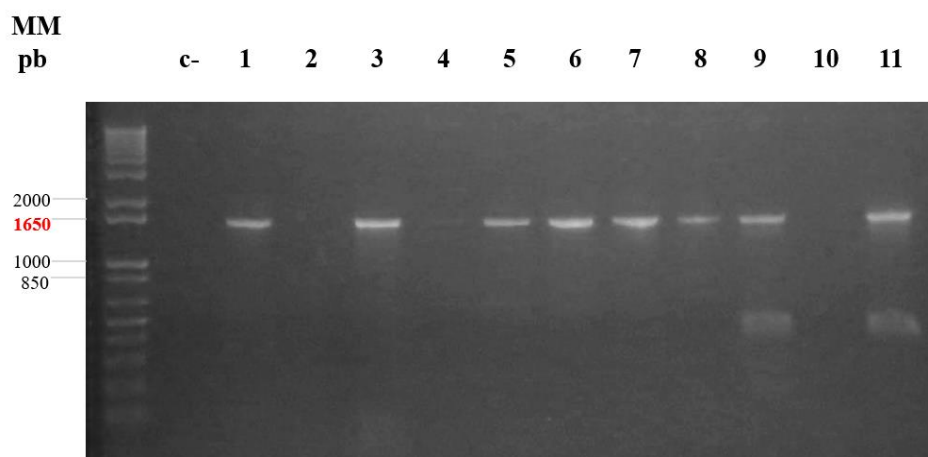
## 8 RESULTADOS

### 8.1 Amplificação e clonagem dos fragmentos gênicos que codificam para proteínas ortólogas ao receptor Cqm1 em *Anopheles* spp.

As PCRs com os primers universais degenerados para amplificação das sequências gênicas parciais que codificam para as  $\alpha$ -glicosidases ortólogas ao receptor da toxina Bin em Cqm1 foram conduzidas com sucesso. Foram utilizadas amostras de DNAs de onze espécies de *Anopheles* spp. (*An. arabiensis*, *An. aquasalis*, *An. oswaldoi*, *An. brasiliensis*, *An. albitarsis*, *An. minor*, *An. triannulatus*, *An. argyritarsis*, *An. peryassui*, *An. sawyeri* e *An. albimanus*). Apenas duas das onze amostras de DNAs das espécies de *Anopheles* spp. não apresentaram amplificação de bandas, que foram *An. oswaldoi* e *An. peryassui*. Acreditamos que a dificuldade de amplificação destas duas amostras foi decorrente da qualidade do DNA que apresentava sinais de degradação. As amostras de *An. arabiensis* foram utilizadas apenas para testes de padronização.

Todos os produtos de PCRs obtidos de ~1.6 kb foram visualizados em corrida eletroforética em gel de agarose a 1% (Figura 10). Utilizamos uma amostra de DNA de *An. gambiae* porém não tivemos sucesso na amplificação do gene *agm3* devido baixa qualidade da amostra (Figura 10, Amostra 2). Também conseguimos amplificar a sequência gênica parcial ~0.8 kb do gene de *An. albimanus*, que se apresentou menor do que o tamanho esperado, e provavelmente por isso não conseguimos ter sucesso na clonagem (Figura 12, Amostra 2). Seguimos as demais análises utilizando a PCR purificada de *An. albimanus*.

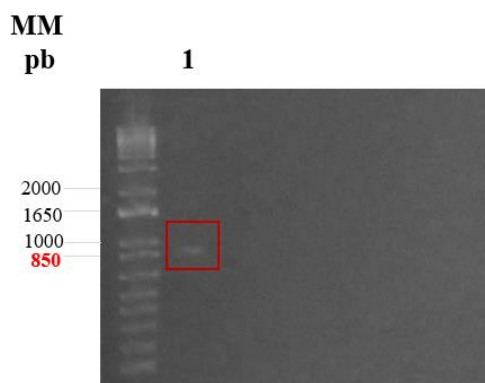
**Figura 10** – Eletroforese em gel de agarose a 1% dos amplicons gênicos que codificam para  $\alpha$ -glicosidases ortólogas ao receptor Cqm1 de diferentes espécies de *Anopheles* spp.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** C - Controle negativo sem DNA, e as seguintes sequências, em ordem: 1 - *An. arabiensis*, 2 - *An. gambiae*, 3 - *An. aquasalis*, 4 - *An. oswaldoi*, 5 - *An. braziliensis*, 6 - *An. albitarsis*, 7 - *An. minor*, 8 - *An. triannulatus*, 9 - *An. argyritarsis*, 10 - *An. peryassui* e 11 - *An. sawyeri*. MM: Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder - Thermo Fisher Scientific; pb: pares de bases.

**Figura 11** – Eletroforese em gel de agarose a 1% dos amplicon gênico da espécie *An. albimanus*.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** 1- *An. albimanus*. MM: Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder - Thermo Fisher Scientific; pb: pares de bases.

Todos os fragmentos gênicos referentes às espécies de *Anopheles* spp. que apresentaram bandas de tamanho molecular similar a ~1.6 kb foram purificados. Destes oito fragmentos gênicos, sete foram clonados em pGEM®-T Easy com sucesso e apenas para *An. sawyeri* utilizamos diretamente o produto de PCR para as demais análises (Tabela 1). As digestões analíticas de todas as minipreparações plasmidiais obtidas neste estudo, realizadas através da utilização da enzima EcoRI-HF®, evidenciaram a liberação de insertos específicos de ~1.6 kb (Figura 12), e estes, juntamente com as PCRs purificadas de *An. albimanus* e *An. sawyeri*, foram sequenciados utilizando além dos primers degenerados, os primers de sequenciamento internos previamente desenhados com tal objetivo (Quadro 6), e primers do plasmídeo M13F e M13R confirmando a identidade e integridade das sequências obtidas.

**Tabela 1** - Quantificação de algumas minipreparações plasmidiais e produtos de PCRs purificados enviadas para sequenciamento através de equipamento NanoDrop® 2000.

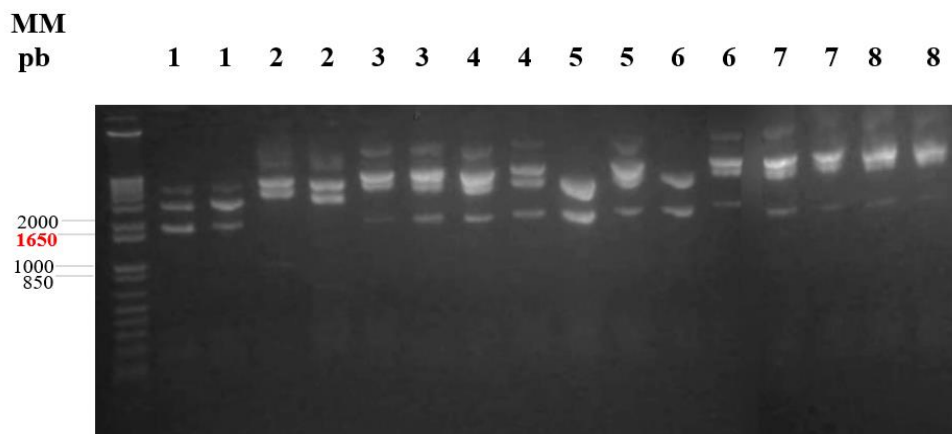
Nome da amostra	Concentração (ng/ul)	Razão 260/280
Miniprep 1.1	156,6	1,87
PCR purificada 2	14,7	1,70
Miniprep 3.1	546,8	1,89
Miniprep 4.1	345,0	1,89

Miniprep 5.1	414,8	1,91
Miniprep 6.1	617,6	1,97
Miniprep 7.1	577,0	1,82
Miniprep 8.1	74,0	1,91
PCR purificada 11	10,4	1,86

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** Seguintes sequências, em ordem: - 1.1 - *An. arabiensis*, - 2 - *An. albimanus*, - 3.1 - *An. aquasalis*, - 4.1 - *An. braziliensis*, - 5.1 - *An. albitarsis*, - 6.1 - *An. minor*, - 7.1 - *An. triannulatus*, - 8.1 - *An. Argyritarsis*, - 11 - *An. sawyeri*. A razão das absorvâncias (nm) 260/280  $\geq$  1,8 indica pureza da amostra de DNA.

**Figura 12** – Eletroforese em gel de agarose a 1% de minipreparações plasmidiais após digestão analítica com a enzima EcoRI para liberação da região de interesse clonada em pGEM®-T Easy.

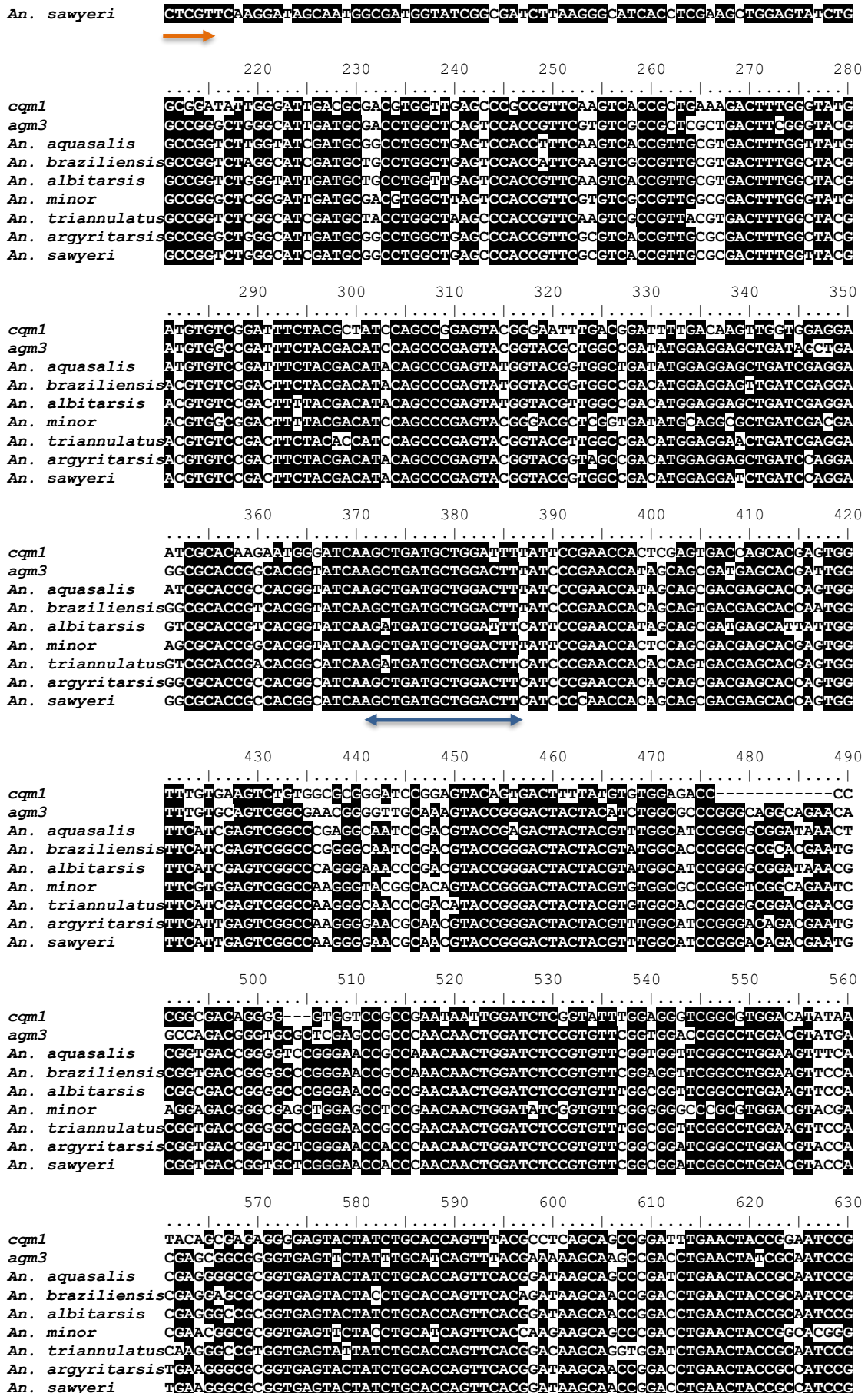


**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** Seguintes sequências, em ordem: - 1 - *An. arabiensis*, - 2 - *An. albimanus*, - 3 - *An. aquasalis*, - 4 - *An. braziliensis*, - 5 - *An. albitarsis*, - 6 - *An. minor*, - 7 - *An. triannulatus*, - 8 - *An. argyritarsis*. MM: 1 Kb Plus DNA Ladder -Thermo Fisher Scientific; pb: pares de bases. Fragmentos liberados pela digestão apresentam tamanho esperado de 1,6 kb, enquanto o vetor apresenta tamanho esperado de ~3,0 kb.

Apenas a minipreparação plasmidial de *An. arabiensis* e a PCR purificada de *An. albimanus* não apresentaram qualidade suficiente nos resultados de sequenciamento, sendo assim, em paralelo aos experimentos de repetição com estas amostras prosseguimos com as demais análises apenas com as amostras que apresentaram resultados de sequenciamento de ótima qualidade que foram: 1- *An. aquasalis*, 2- *An. braziliensis*, 3- *An. albitarsis*, 4- *An. minor*, 5- *An. triannulatus*, 6- *An. argyritarsis*, 7- *An. sawyeri*.





```

        640      650      660      670      680      690      700
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    cqml1    AAGGTGCTGGCGGAGATGACCAAGATCTTGTCTTCTGGTTGACCCGTGGAGTGGATGGGTTCCGGTTCG
    agm3     GCCGTGCTGGAGGAGATGACCAAGATCTTGTCTTCTGGTTGAGAGAGGGCTGGATGGGTTCCGACTTCG
    An. aquasalis  GCCCTGCTCCGGGATATGACGCCATGTTGACCTTCTGGCTCGGGAAGGGTGTGGATGGGTTCCGGCTCG
    An. braziliensis  CCCTGCTCCGGGAAATGACGCCATGTTGACCTTCTGGCTCGAGAAGGGTGTGGATGGGTTCCGGCTTCG
    An. albitarsis  CGGCTGCTCCGGGATATGACCGCATGTTGACCTTCTGGCTCGAGAAGGGTGTGGATGGGTTCCGGCTCG
    An. minor      CCGCTGCTGGAGGAGATGACCGCATGCTTACGTTCTGGCTCGAGAAGGGTGTGGAGGGTTCCGGCTTCG
    An. triannulatus  GTGGTCTGCCGGAGATGACCGCATGTTGACCTTCTGGCTCGAGAAGGGTGTGGATGGGTTCCGGCTCG
    An. argyritarsis  CGTGTCTGGGCGAGATGACGCCATGTTGCTTCTGGCTCGAGAAGGGTGTGGATGGGTTCCGGCTTCG
    An. sawyeri    AAGTGTCTGGGCGAGATGACCGCATGTTGCTTCTGGCTCGAGAAGGGTGTGGATGGGTTCCGGCTTCG

        710      720      730      740      750      760      770
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    cqml1    ACGCTATCAACCACATGTTTCGAGGATGACGACCTTCCGGGATGAGCCGTTCTCTGGTGGGACAGTCCGG
    agm3     ACGCAATCAACCAATATGTTTGGAGATCCGCAGCTGCCGGATGAGCCCGCGGGCTGGGACACCCGG
    An. aquasalis  ATGCGATCAACCACATGTTTCGAGGATGACGACCTTCCGTGATGAGCCACCGGGTGGGGGCCACCCGG
    An. braziliensis  ATGCGATCAACCACATGTTTGGAGACGAGCAGTTCCTGACGAGCCCGCGGGTGGGGTGCACCCGGA
    An. albitarsis  ATGCGATCAACCACATGTTTCGAGGACGAGCAGCTCCGTGATGAGCCACCGGGATATGGGCCACCCGGA
    An. minor      ACGCGATCAACCACATGTTTCGAGGACGAGCAGATGCCGTGACGAGCCCGCGGGTGGGGTGAACCCGG
    An. triannulatus  ATGCGATCAACCACATGTTTCGAGGATGACGACCTTCCGGGATGAGCCCGCGGGTGGGGCGATCCCA
    An. argyritarsis  ATGCGATCAACCACATGTTTCGAGGATCCGCAGCTTACCAATGAGCCACCGGGTGGGGTGGAGCCCGG
    An. sawyeri    ATGCGATCAACCACATGTTTCGAGGATCCGCAGCTTACCAATGAGCCACCGGGTGGGGTGGAGCCCGG

        780      790      800      810      820      830      840
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    cqml1    AGAGTACGATTTCTTTGATTCACATTATATACCAAGGACATCCCGGATGTGTATGATGTTGTTTACAACTGG
    agm3     CACGTACGACAGCTGGACCCACATCTACACGAAGGACAACCCGGAACAGTACACGTTGTTGACGGGTGG
    An. aquasalis  TTCTTACGACGAGCTCGATTCACATCCACACCAAGGACATCCGGATACGTACGAACTGTTGTTACGGTGG
    An. braziliensis  CTATACGATCTACTTACCCATCTACACCAAGGATGTCGGGATACGTACGAACTGTTCTATGGTTGG
    An. albitarsis  CTGTTACGACGTACTCGATTCACATCTACACCAAGGACGTTCTGGATACGTACGAACTGTTCTACGGTGG
    An. minor      CACGTACGACCTGCTGATTCACATCTACACCAAGGACAACCCGGAACAGTACGTTGTTGTTGACCGGTGG
    An. triannulatus  TTCTTACGACGCACTGGACCAATCTACACCAAGGACATCCCGGAACGTGTACGAACTGTTGTTACGGTGG
    An. argyritarsis  CTGTTACGACGCTCGACCCATCTACACCAAGGACAACCCGGAACAGTACGAACTGTTGTTGACGGTGG
    An. sawyeri    CTGTTACGACGAGCTCGACCCATCTACACCAAGGACAACCCGGAACAGTACGAACTGTTGTTGACGGTGG

        850      860      870      880      890      900      910
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    cqml1    CCGGATCAGATGGATAAGTATTCGGCGGAGAAAGGCGGTACTATCATTTCTGATGACGGAAAGCGTATTCCA
    agm3     CCGCAGCTGTGCGATGACTTTGGCCGCCCGATGAAACAAAACATCATCTATGACGAGGCGTACCGGT
    An. aquasalis  AGCCAGCTGTGCGAGGATATGGCCGCCAGAGCGGCAAAAACATCATCTCTGATGACGAGGCGTACCGGT
    An. braziliensis  CGTCAGCTGTGCGAGGATATGGCCGCCAGAGCGGCAAAAACATCATCTCTGATGACGAGGCGTACCGGT
    An. albitarsis  CGTAAGCTGTGCGAGGATATGGTTCGGCAGAAAGGCAAAAACATCATCTCTGATGACGAGGCGTACCGGT
    An. minor      CGTCAGCTGTGCGAGGACTTTGGCCGCCCGATGAAACAAAACATCATCTCTGATGACGAGGCGTACCGGT
    An. triannulatus  CCGCAGCTGTGCGAGGACTATGGCCGCCCGATGGACAAACACATCATCTCTGATGACGAGGCGTACCGGT
    An. argyritarsis  CGTCAGCTGTGCGAGGACCATGGCCGCCAGAGCGGCAAGACATCATCTCTGATGACGAGGCGTACCGGT
    An. sawyeri    CGTCAGCTGTGCGAGGACCATGGCCGCCAGAGCGGCAAGACATCATCTCTGATGACGAGGCGTACCGGT

        920      930      940      950      960      970      980
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    cqml1    GCATCGAGGGAACGATGCTGTACTACGAGAGTCCGGACCAGGAGCGCAGGGAGCTCACATGCCETTCAA
    agm3     CGATCGAGAACACGATGCTGTACTACGAGGATGCCAGCGGGACGCGGAGGGCGGCGACATGCCETTCAA
    An. aquasalis  CGATCGAGAAACGATGCCGTACTACGAGGATGCCCGGGCGGACGGCAGGGTGCCCATATGCCETTCAA
    An. braziliensis  CGATCGAGAACACGATGCCGTACTACGAGGATTTCCGGGGCGGACGGCAGGGTGCCCATATGCCETTCAA
    An. albitarsis  CGATCGAAACACGATGCCGTACTACGAGGATCACCGGGCGGTCCGACGGGTGCCCATATGCCETTCAA
    An. minor      CCATCGAGAACACGATGCTGTACTACGAGGACGCAACCGGGACGCGTCAGGGCGGCGCATATGCCETTCAA
    An. triannulatus  CGATCGAGAACACGATGCCGTACTACGAGGATCCCAGGGTGGTCCGACGGGTGCCCATATGCCETTCAA
    An. argyritarsis  CGATCGAGAACACCATGCCGTACTACGAGGATCACAGGTGGTCCGACGGGTGCCCATATGCCETTCAA
    An. sawyeri    CGATCGAGAACACCATGCCGTACTACGAGGATCACAGGTGGTCCGACGGGTGCCCATATGCCETTCAA

        990      1000     1010     1020     1030     1040     1050
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    cqml1    CTTCCAGCTCATCTATGACTTTAAGAAGGAGCAGAAACCCGTTGGGCTGAAGAGTTCGATCGACTGGTGG
    agm3     CTTCCAGCTCATCTACGACTTCCGGCACGATCAGAAATGCCGATCGGGCTGAAGCACTCGATTGATTTTGG
    An. aquasalis  CTTCCAGCTCATCTACGATTTCAATAGTGATCAGAAATGCCGATGGGTTGAAACAATCGATTGATTTCTGG
    An. braziliensis  CTTCCAGCTCATCTACGATTTCAAGAGTGATCAGAAATGCCGATGGACTCAAGCAATCGACTCGACTTGG
    An. albitarsis  CTTTCAGCTCATCTACGATTTCAAGAGTGATCAGAAATGCCGATCGGATGAAGCAATCGATTCTTGG
    An. minor      CTTTCAGCTCATCTACGACTTCCAGGCGGAGCAGAAACCGGATCGGACTGAAGCACTCATCGACTGGTGG
    An. triannulatus  CTTCCAGCTCATCTACGACTTCAAGGGCGATCAGAAATGCCGATCGGACTGAAGCAATCGACTTCTGG
    An. argyritarsis  CTTCCAGCTCATCTACGACTTCAAGAGCGACAGAAATGCCGATCGGGCTGAAGCAATCGATTGACTTCTGG
    An. sawyeri    CTTCCAGCTCATCTACGACTTCAAGAGCGACAGAAATGCCGATCGGGCTGAAGCAATCGATTGACTTCTGG

        1060     1070     1080     1090     1100     1110     1120
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    cqml1    ATGAACACATGCCGGCTCCGACACACTCCAAGCTGGGTAGCTGGATCCGATGATCACTCCGGGTAGCGT
    agm3     CTGAACCATATGCCGGCGAGGCATACCGCGAGCTGGGTGCTGGGTCGCACGATCACTCCGGGTGGGCA
    
```

*An. aquasalis* TTGAACCATATGCCGGCAGCGCAAACACCCAGCTGGGTGGCGGATCGCATGATCACTCCGAGCGGGCA  
*An. braziliensis* TTGAACCATATGCCGGCTCGCCAAACACCCAGCTGGGTGGCGAGGATCGCATGATCACTCCCGACCCAGCA  
*An. albitarsis* TTGAACCATATGCCAGCTCGCCAAACACCCAGCTGGGTGGCGGTTCCGCATGATCACTCCGAGCAGGCA  
*An. minor* CTCAACCATATGCCGGCAGCGCAAACACCCAGCTGGGTGGCGGTTCCGCATGATCACTCCCGGTTGGGCA  
*An. triannulatus* TTGAACCATATGCCGGCTCGCCAAACACCCAGCTGGGTGGCGGATCGCACGATCACTCCCGGCGGGCA  
*An. argyritarsis* TTGAACCATATGCCGGCCCGCCAAACACCCAGCTGGGTGGCGGATCGCACGATCACTCCCGCTGGGCA  
*An. sawyeri* CTGAACCATATGCCGGCCCGCCAAACACCCAGCTGGGTGGCGGATCGCACGATCACTCCCGCTGGGCA

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190

*cqm1* CACCGATTGGACTAGATCGGGTTGATCAGGTCATGACGTTGCTGCATACCCTCCCGGGACTAGTATTAC  
*agm3* GTCGCGTTGGCTGGACCATGTCGATCAGGTGCTGACGCTGCTGCACACCCCTCCAGGGACGAGTATTAC  
*An. aquasalis* GTCGCGTTGGCTGGCCAGGTTGATCAGTTGCTTACCTGCTCCACACACTTCCCGTACCAGTATTAC  
*An. braziliensis* CTGCGGTTGGATTGGCCAGGTTGATCAGCTGATTACCTGCTCCACACCCCTCCCGTACCAGTATTAC  
*An. albitarsis* CTGCGGTTGGCTGGTCAAGTTGATCAGTTGCTTACCTACTGCACACACTTCCCGTACCAGTATTAC  
*An. minor* CCGCGTTGGCCAGACTTTTCTGATCAGGTGCTAACGTTGGTACACACCCCTCCCGGACGAGCATCAC  
*An. triannulatus* CTGCGCCGCGGTTGGCCAGGTTGATCAGTTGCTTACCTACTGCACACCCCTCCCTGTTACAAGCATTAC  
*An. argyritarsis* GTCGCGTTGGCTGGCCAGGTTGATCAGCTGCTTACCTGCTCCACACACTTCCCGTACCAGTATTAC  
*An. sawyeri* GTCGCGTTGGCTGGCCAGGTTGATCAGCTGCTTACCTGCTCCACACACTTCCCGTACCAGTATTAC

1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260

*cqm1* GTATTACC-----  
*agm3* GACTACC-----  
*An. aquasalis* CTACTACGTAAGTAGAATAGTTTACAGAACAT--AATT--TTCTTTTGGATCATGACATGACTTTACT  
*An. braziliensis* CTACTACGTAAGTACAA--CAGCCTACAGGGCAT--AGTT--TTCTCTTAGATTCTGGACACCAATTTTAA  
*An. albitarsis* CTACTACGTAAGTACAA--CAGTCTGCAGAGCATCGGT--TTCTCTTGGCTCTTGAACACGTGTCTTAA  
*An. minor* GACTACGTAAGTCCGA--AGGAGAGGTGCAT-----GCCGGCGCTCTTTAACAACCAATTGT  
*An. triannulatus* CTACTACGTAAGTACTACGTCACACTACGGCA--ATA--TTTGGCTGGGATTTAAAC--CAGACTTTA  
*An. argyritarsis* CTACTACGTAAGTACA--CCTAGCCCTAGTTGCTTCAGCTACTCTAGCCTAGTCTTGGACTAACGTCACT  
*An. sawyeri* CTACTACGTAAGTACA--CCTAGCCCTAGTTGCTTCAGCTACTCTAGCCTAGTCTTGGACTAACGTCACT

1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330

*cqm1* -----GTGAAGAGTACGCCATGCAAGACTTCAAACAGGCTCAGCAGTTCCGACAACCGAGATCC  
*agm3* -----GTGAAGAGATCGGAATGCTGGACTTCAAGCATGCTCAGCTGTACGACAACCGCGACCC  
*An. aquasalis* TCTCTCGGTAGGGAGAAGAGATCGGATGCTGGACTCAAGCGGGCCGAAACAGTTTGACAACCGTGAATCC  
*An. braziliensis* CTTTCCGGCAGGGAGAAGAGATCGGATGCTGGACTCAAGCAAGCCGAGCAGTTTGATAACCCGATCC  
*An. albitarsis* CTGCTTGCAGGGAGAAGAGATCGGATGCTGGACTCAAGCAAGCCGAGCAGTTTGACAACCGCGATCC  
*An. minor* TTT-----AGGTTGAAGAGATCGGATGCAAGACTTCAAACAGGCGAGGTTGTATGACAACCGTGAATCC  
*An. triannulatus* CTTCTCGTTAGGGAGAAGAGATCGGATGCAAGATTAAGCCGGCCGAGCAGTTTGACAACCGTGAATCC  
*An. argyritarsis* CTT--TCGGCAGGGAGAAGAGATCGGATGCTGGACTCAAGCGGGCCGAGCAGTTTGACAACCGCGATCC  
*An. sawyeri* CTT--TCGGCAGGGAGAAGAGATCGGATGCTGGACTCAAGCGGGCCGAGCAGTTTGACAACCGCGATCC

1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400

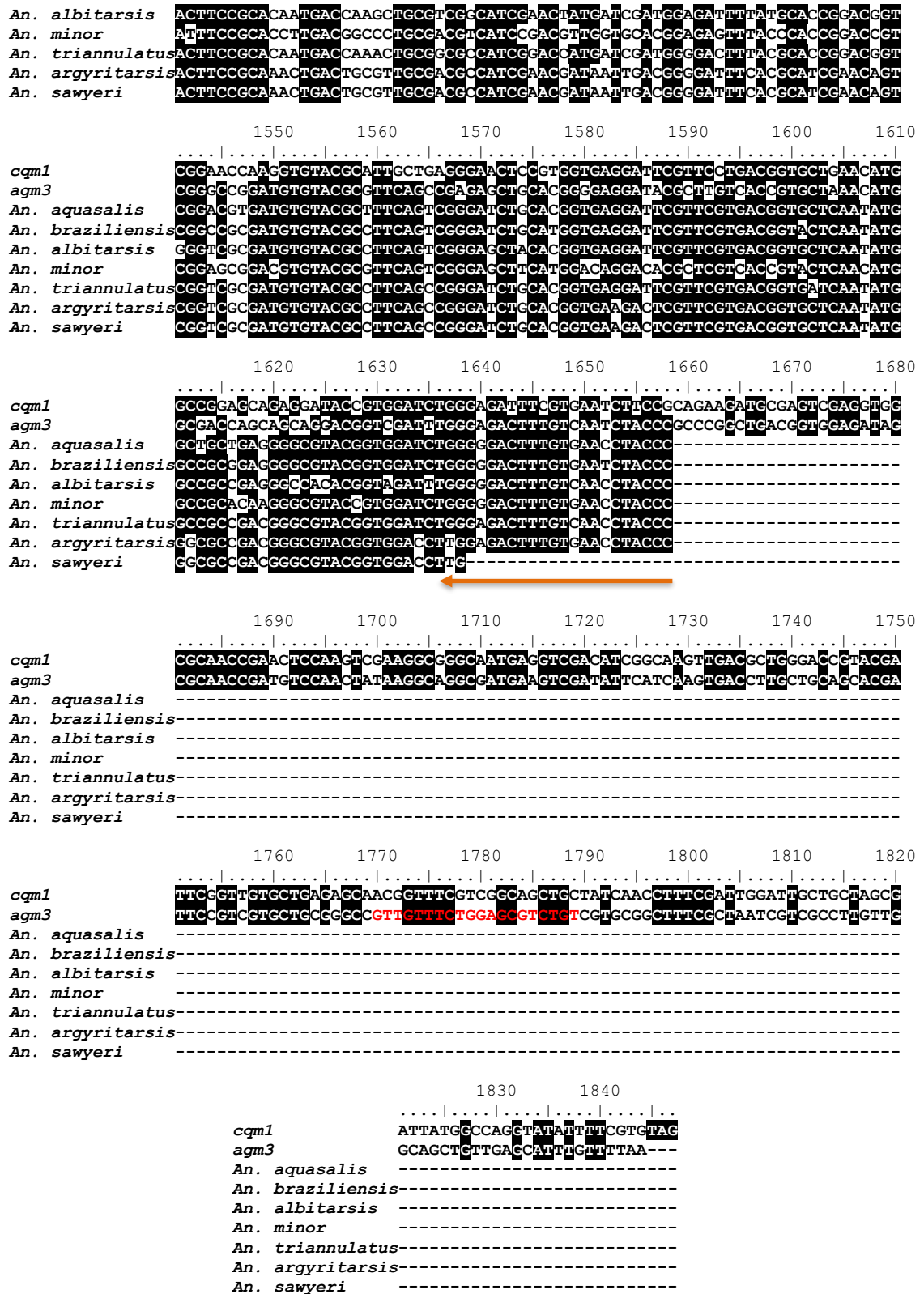
*cqm1* GAACCGACGCCGATGCAGTGGGACTCGTCCGACCACTGCCGGGTTTCAGTACCAACACCAACACTGGCTC  
*agm3* GAACCGCACACCGATGCAGTGGGACAACCTCCATTTCCGCCGGGTTTCAGCAGCAACCCGACCCTGGCTG  
*An. aquasalis* GAACCGCACACCGATGCAGTGGGACAACACATATCTTCTGGGTTTCAGTACCAACCCGACCACCTGGTTA  
*An. braziliensis* GAACCGCACACCGATGCAGTGGGACAATGATATCTGCGCCGGGTTTCAGTACCAACCCGACCCTGGTTA  
*An. albitarsis* GAATCGCACACCCATGCAGTGGGACACTACGATTTCCGCCGGGTTTCAGTACCAACCCGACCCTGGTTA  
*An. minor* GAACCGTACGCCATGCAGTGGGACAACAGTATCTCGCTGGGTTTCAGTACCAATCGGACGACTGGCTG  
*An. triannulatus* GAACCGCACACCGATGCAGTGGGACAACACATATCTGCGCCGGGTTTCAGCAGCAACCCGACCACCTGGGTA  
*An. argyritarsis* GAACCGCACACCGATGCAGTGGGACAACGATATCTGCGCCGGGTTTCAGCAGCAACCCGACCACCTGGGTA  
*An. sawyeri* GAACCGCACACCGATGCAGTGGGACAACACATATCTGCGCCGGGTTTCAGCAGCAACCCGACCACCTGGGTA

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470

*cqm1* CGAGTTCATCCGGACTACGCTCGGTACAACGTAGACGTTGATCCAGAAGAATCCACAAGTACCTTCCACC  
*agm3* CGACTTCATCCGGACTATCCGACCGCAACGTTGCGATGCAGGAAGCGCCGAGAGAGTACCTCAAGC  
*An. aquasalis* CCGATGCATCCGGACTATCCGACCGTAATGTCGCGATGCAGGAGTCCGCGGACAAGAGCACCCTTAAGC  
*An. braziliensis* CCGTGCATCCGGACTATCCGACCGTAACGTTGCCATGCAGGAGTCCGCGGACAAGAGCACCCTTAAGC  
*An. albitarsis* CCGTGCATCCGGACTATCCGACCGCAACGTTGCGATGCAGGAGTCCGCGGAAAAGAGCACCCTCAAGC  
*An. minor* CCGATGCATCCGGACTACCGACCGCAACGTTGCCATGCAGGAGTCCGCGGACAAGAGCACCCTCAAGC  
*An. triannulatus* CCGTGCATCCGGACTATCCGACCGCAACGTTGCCATGCAGGAGTCCGCGGAGAAGAGCACCCTCAAGC  
*An. argyritarsis* CCGTGCATCCGGACTATCCGACCGCAACGTTGCCATGCAGGAGTCCGCGGAGAAGAGCACCCTCAAGC  
*An. sawyeri* CCGTGCATCCGGACTATCCGACCGCAACGTTGCCATGCAGGAGTCCGCGGAGAAGAGCACCCTCAAGC

1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540

*cqm1* ACTTCCAGCATCTGACCAAGCTTCGACGGCACCGGACGATGCAGAGTGGTGAATGCTGCACAAAGCAGCT  
*agm3* ACTTCCGACAGCTGACGGCACCGGCGCCATCCGACGCTGCTGCACGGTGAATTCAGCATCTGACAGT  
*An. aquasalis* ACTTTCGCACATGACCAAGCTTCGCTCGCATCGAACCATGATCGATGGAGAGTTCAAGCATCGGACAGT  
*An. braziliensis* ACTTCCGTACATGACCAAGTTGCGTCCGATCCGAACTATGATGGATGGAGACTTCATGACACCGGACAGT



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: *cqm1*: Sequência de cDNA (ID Genbank DQ333335); *agm3*: sequência de cDNA (ID Genbank EU165335.1); Letras em vermelho indicam os primers flanqueadores F e R que foram utilizados para amplificar a sequência total do gene *agm3*; Setas em laranja indicam a posição dos primers degenerados universais utilizados neste estudo; Setas de duas pontas na cor azul indicam as posições dos primers F e R internos de sequenciamento; Linha vermelha indica a região do íntron 1 identificado em todas as sequências.



Após a análise das sequências de nucleotídeos de cada gene, foram geradas as sequências de aminoácidos utilizando a ferramenta *BioEdit Sequence Alignment Editor*, onde todos os fragmentos gênicos apresentaram o mesmo tamanho ~487aa, com exceção da amostra de *An. sawyeri* com ~474aa (Quadro 7). Estas sequências proteicas parciais não possuem os ~35 aminoácidos na porção N-terminal e ~62 aminoácidos na região C-terminal, com exceção da amostra de *An. sawyeri*, que perdeu 6 aminoácidos a mais na porção N-terminal e 7 aminoácidos na região C-terminal. Ao serem submetidas ao BLAST, todas as sequências de aminoácidos apresentaram mais de 70% de identidade e similaridade quando comparadas às proteínas de referência Cqm1, Aam1 e Agm3 (Quadro 7).

**Quadro 7** – Sequência parciais de aminoácidos de  $\alpha$ -glicosidases ortólogas à Cqm1 presentes em espécies de *Anopheles* spp. e suas identidades/similaridades com as proteínas de referência Cqm1, Aam1 e Agm3.

Espécie	Aminoácidos	Sequência	Identidade/ Similaridade Cqm1	Identidade/ Similaridade Aam1	Identidade/ Similaridade Agm3
<i>An. aquasalis</i>	487aa	FYQIYPRSFKDSNGDGIGDLKGITSKLEYLAGLGI DAAWLSPPFKSPLRDFGYDVSDFYDIQPEYGTVA DMEELIEESHHRHGIKMLDFIPNHSSEHQWFIES ARGNPTYRDYYVWHPGRINSVTGVREPPNNWISV FGGSAWKFEHGRGEYLLHQFTDKQPDLYRNP LLRDMTAMLSFWLKGKVDGFRLDAINHMFEDEQ LRDEPPGWGPPGSYDELHIIHTKDNPDTYEVVYG WRQLCEDYGRQTGKTIILMTEAYASIENTMRYE ESPGGRQGAHMPFNFLIYDFNSDQNAIGLKQSID FWLNHMPARQTPSWVAGSHDHSRAASRVGLAK VDQLLTLHTLPGTSTIYYGEEIGMLDYKAAEQF DNRDPNRTMPQWDNTISSGFSTNRTTWLPMHPD YPTRNVAMQESADKSTLKHFRMTKLRHRHTMI DGEFTHRTVGRDVYAFSRDLHGEDSFVTVLNMA AEGRTVDLGDVFVNL	71%/81%	73%/83%	82%/89%
<i>An. braziliensis</i>	487aa	FYQIYPRSFKDSNGDGIGDLKGITSKLEYVAGLGI DAAWLSPPFKSPLRDFGYDVSDFYDIQPEYGTVA DMEELIEEAHRHGIKMLDFIPNHSSEHQWFIES ARGNPTYRDYYVWHPGRITNAVTGAREPPNNWIS VFGGSAWKFEERGEYLLHQFTDKQPDLYRNP ALLREMTAMLSFWLEKGVDFRLDAINHMFEDE QLRDEPPGWGAPDSYDVLHIIYTKDVADTYEVV YGWRQLCEDYGRQKGTIILMTEAYASIENTMRY YEEFPGGRQGAHMPFNFLIYDFKSDQNAIGLKE SIDFWLNHMPARQTPSWVAGSHDHSRPAVGL AKVDQLITLHTLPGTSTIYYGEEIGMLDYKEAEQ FDNRDPNRTMPQWDSTISAGFSTNRTTWLPLHPD YPTRNVAMQESADKSTLKHFRMTKLRHRHTM MDGDFMHRVGRDVYAFSRDLHGEDSFVTVLN MAAEGRTVDLGDVFVNL	71%/82%	73%/84%	81%/89%
<i>An. albitarsis</i>	487aa	FYQIYPRSFKDSNGDGIGDLKGITSQMEYLAGLGI DAAWLSPPFKSPLRDFGYDVSDFYDIQPEYGTVA DMEELIEESHHRHGIKMMLDFIPNHSSEHYWFIES AQQNPTYRDYYVWHPGRINAATGAREPPNNWIS VFGGSAWKFEHGRGEYLLHQFTDKQPDLYRNP ALLRDMTAMLSFWLEKGVDFRLDAINHMFEDE QLRDEPPGYGPPDSYDVLHIIYTKDVSDTYEVVY GWRKLCEDYGREKGTIILMTEAYASIENTMRYE EESPGGRQGAHMPFNFLIYDFKSDQNAIGLKQSI DFWLNHMPARQTPSWVAGSHDHSRAATRVGLV KVDQLLTLHTLPGTSTIYYGEEIGMLDYKEAEQF	72%/82%	74%/84%	81%/89%

		DNRDPNRTTPMQWDSTISAGFSTNRTTWLPLHPDY PTRNVAMQESA EKSTLKHFRMTKLRHRRTMID GDFMHR TVGRDVYAFSRELHGEDSFVTVLNMAA EGHTVDLGDFVNLP			
<i>An. minor</i>	487aa	FYQTYPRSFQSDDDDGIGDLNGITSRMAYLAGLGI DATWLSPPFV SPLADFGYDVADFYDIQPEYGT LG DMQALIDEAHRHGIKLMLDFIPNHSDEHEWFVE SAKGTAQYRDYVWVRPGRQNQETGELEPPNWI SVFGGPAWTYDERRGEFYLHQFTKKQPD LN YRH GPLLEEMTRMLTFWLEKGVDFRLDAINHM FED EQMRDEPPGWGEPGYD VLDHIYTKDNPDTYGV VYRWRQLCEDFGRQHDKTILMTEAYASIENTML YYEDATGTRQGAHMPFNFLIYDFQAEQNAIGLK QSIDWWLNHMPARHTPSWVAGSHDHSRVGTRV GPEFVDQVLT LVHTLPGTSITYYGEEIGMQDFKEA EYDNRDPNRTTPMQWDNSISAGFSTNRTTWLRM HPDYPTRNVAIQEAERSTLKHFR TLTALRRHPTL VHGEFTHRTV GADVYAFSRELHGQDTLVTVLNM AAQGR TVDLGDFVNLP	70%/80%	72%/83%	88%/93%
<i>An. triannulatus</i>	487aa	FYQIYPRSFKDSNGDGIGDLK GITSKMEYLAGLGI DATWLSPPFKSPLRDFGYDVSDFYTIQPEYGT LAD MEELIEESHRHGIKMMLDFIPNHTSDEHEWFIESA KGNPTYRDYVWHPGR TNAV TGAREPPNWNISV FGGSAWKFKGRGEY YLHQFTDKQVD LN YRNPV VLEMTDMLSFWLEKGVDFRLDAINHM FEDVQ LRDEPPGSGDPSSYDALDHIYTKDIPDVYDVVYG WRQLCEDYGRMDKTILMTEAYTSIENTMRYYE ESPGGRQGAHMPFNFLIYDFKGDQNAIGLKQSI DFWLNHMPARQTPSWVAGSHDHSRAATRAGLA KVDQLLTLHTLPGTSITYYGEEIGMQDYAAAEQ FDNRDPNRTTPMQWDSTISAGFSTNRTTWLPLHPD YPTRNVAMQESA EKSTLKHFRMTKLRHRRTMI DGDFTHRTVGRDVYAFSRDLHGEDSFVTVINMA ADGR TVDLGDFVNLP	71%/81%	72%/82%	81%/88%
<i>An. argyritarsis</i>	487aa	FYQIYPRSFKDSNGDGIGDLK GITSKLEYLAGLGI DAAWLSPPFASPLRDFGYDVSDFYDIQPEYGTVA DMEELIQEAHRHGIKLMLDFIPNHSDEHQWFIES AKGNATYRDYVWHPGQTNAV TGAREPPNWNISV VFGGSAWTYHEGRGEY YLHQFTDKQPD LN YRHP TLLGEMTAMLRFWLDKGVDFRLDAINHM FEDA QLRNEPPGWGEPGSYDEL DHIYTKDNPDTYDVV YGWRQLCEDHGRQTGKTILMTEAYASIENTMRY YEESPGGRQGAHMPFNFLIYDFKSDQNAIGLKQ SIDFWLNHMPARQTPSWVAGSHDHSRVASRVGL AQVDQLLTLVQTLPGTSITYYGEEIGMLDYKAAE QFDNRDPNRTTPMQWDSTISAGFSTNRTTWLPLHP DYPTRNVAMQESA EKSSLKHFRKLTALRRHRRTIID GDFTHRTVGRDVYAFSRDLHGEDSFVTVLNMGA DGRTVDLGDFVNLP	70%/81%	73%/83%	82%/90%
<i>An. sawyeri</i>	474aa	RSFKDSNGDGIGDLK GITSKLEYLAGLGIDAAWLS PPFASPLRDFGYDVSDFYDIQPEYGTVADMEDLIQ EAHRHGIKLMLDFIPNHSDEHQWFIESAKGNAT YRDYVWHPGQTNAV TGAREPPNWNISVFGGSA WTYHEGRGEY YLHQFTDKQPD LN YRHPTLLGEM TAMLRFWLDKGVDFRLDAINHM FEDAQLRNEP PGWGEPPGSYDEL DHIYTKDNPDTYDVVYGWRQL CEDHGRQTGKTILMTEAYASIENTMRYEESPGG RQGAHMPFNFLIYDFKSDQNAIGLKQSIDFWLN HMPARQTPSWVAGSHDHSRVASRVGLAQVDQLL TLVQTLPGTSITYYGEEIGMLDYKAAEQFDNRDP NRTTPMQWDSTISAGFSTNRTTWLPLHPDYPTRNV AMQESA EKSSLKHFRKLTALRRHRRTIIDGDFTHRT VGRDVYAFSRDLHGEDSFVTVLNMGADGR TVDL	69%/80%	72%/83%	81%/89%

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** Possíveis sítios de N-glicosilação preditos estão evidenciados em letras vermelhas; Sítios de inserção do 1° íntron estão em letra azul.

Os sítios de N-glicosilação foram preditos através da ferramenta NetNGlyc 1.0, onde foi possível observar diferenças no padrão de glicosilação entre as sequências proteicas. Glicosilação é uma modificação que ocorre após a tradução, podendo aumentar a diversidade da estrutura ou funcionalidade de proteínas eucarióticas, além de auxiliar interações proteína-proteína e sinalização. Em insetos, existem dois tipos principais: N-glicosilação e O-glicosilação, e focamos na primeira pois tem papel importante em proteínas com atividade catalítica. Os sítios de N-glicosilação são definidos pela sequência N-X-T/S, onde N é asparagina, X é qualquer aminoácido exceto prolina, seguidos de treonina ou serina (WALSKI, et al., 2017). Na Tabela 2 é possível observar a disposição dos sítios de N-glicosilação e seus respectivos potenciais.

**Tabela 2** – Sítios de potenciais N-glicosilações em Cqm1, Aam1, Agm3 e  $\alpha$ -glicosidases de *Anopheles* spp. geradas pela ferramenta NetNGlyc 1.0.

Espécie	Sítios	Potenciais de N-glicosilação
Cqm1	1 – <sup>102</sup> N <sup>102</sup> T <sup>104</sup>	+++
	2 – <sup>127</sup> N <sup>127</sup> H <sup>129</sup> S <sup>129</sup>	+
	3 – <sup>410</sup> N <sup>410</sup> R <sup>412</sup> T <sup>412</sup>	-
	4 – <sup>564</sup> N <sup>564</sup> L <sup>566</sup> S <sup>566</sup>	---
Aam1	1 – <sup>126</sup> N <sup>126</sup> H <sup>128</sup> S <sup>128</sup>	+
	2 – <sup>142</sup> N <sup>142</sup> E <sup>144</sup> T <sup>144</sup>	-
	3 – <sup>310</sup> N <sup>310</sup> R <sup>312</sup> T <sup>312</sup>	++
	4 – <sup>414</sup> N <sup>414</sup> R <sup>416</sup> T <sup>416</sup>	---
	5 – <sup>431</sup> N <sup>431</sup> A <sup>433</sup> T <sup>433</sup>	-
	6 – <sup>533</sup> N <sup>533</sup> S <sup>535</sup> T <sup>535</sup>	-
Agm3	1 – <sup>132</sup> N <sup>132</sup> H <sup>134</sup> S <sup>134</sup>	+
	2 – <sup>291</sup> N <sup>291</sup> K <sup>293</sup> T <sup>293</sup>	++
	3 – <sup>419</sup> N <sup>419</sup> R <sup>421</sup> T <sup>421</sup>	---
	4 – <sup>436</sup> N <sup>436</sup> R <sup>438</sup> T <sup>438</sup>	+
<i>An. aquasalis</i> *	1 – <sup>92</sup> N <sup>92</sup> H <sup>94</sup> S <sup>94</sup>	+
	2 – <sup>108</sup> N <sup>108</sup> P <sup>110</sup> T <sup>110</sup>	+
	3 – <sup>379</sup> N <sup>379</sup> R <sup>381</sup> T <sup>381</sup>	---
	4 – <sup>396</sup> N <sup>396</sup> R <sup>398</sup> T <sup>398</sup>	-
<i>An. braziliensis</i> *	1 – <sup>92</sup> N <sup>92</sup> H <sup>94</sup> S <sup>94</sup>	+
	2 – <sup>108</sup> N <sup>108</sup> P <sup>110</sup> T <sup>110</sup>	+
	3 – <sup>379</sup> N <sup>379</sup> R <sup>381</sup> T <sup>381</sup>	---
	4 – <sup>396</sup> N <sup>396</sup> R <sup>398</sup> T <sup>398</sup>	+

<i>An. albitarsis</i> *	1 – <sup>92</sup> NHS <sup>94</sup>	+
	2 – <sup>108</sup> NPT <sup>110</sup>	+
	3 – <sup>379</sup> NRT <sup>381</sup>	---
	4 – <sup>396</sup> NRT <sup>398</sup>	+
<i>An. minor</i> *	1 – <sup>92</sup> NHS <sup>94</sup>	+
	2 – <sup>379</sup> NRT <sup>381</sup>	---
	3 – <sup>396</sup> NRT <sup>398</sup>	+
<i>An. triannulatus</i> *	1 – <sup>92</sup> NHT <sup>94</sup>	+
	2 – <sup>108</sup> NPT <sup>110</sup>	+
	3 – <sup>379</sup> NRT <sup>381</sup>	---
	4 – <sup>396</sup> NRT <sup>398</sup>	+
<i>An. argyritarsis</i> *	1 – <sup>92</sup> NHS <sup>94</sup>	+
	2 – <sup>108</sup> NAT <sup>110</sup>	+
	3 – <sup>379</sup> NRT <sup>381</sup>	---
	4 – <sup>396</sup> NRT <sup>398</sup>	+
<i>An. sawyeri</i> *	1 – <sup>86</sup> NHS <sup>88</sup>	+
	2 – <sup>102</sup> NAT <sup>104</sup>	+
	3 – <sup>373</sup> NRT <sup>375</sup>	---
	4 – <sup>390</sup> NRT <sup>392</sup>	-

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** Potenciais de N-glicosilação, onde: (+) potencial > 0,5; (++) potencial > 0,5 com concordância das 9 redes neurais ou potencial > 0,75; (+++) potencial > 0,75 com concordância das 9 redes neurais; (++++) potencial > 0,90 com concordância das 9 redes neurais; (-) potencial < 0,5; (--) potencial < 0,5 e concordância das 9 redes neurais; (---) potencial < 0,32 e concordância das 9 redes neurais. \*As espécies de *Anopheles* possuem as posições dos sítios de acordo com suas sequências parciais.

A detecção de domínios conservados de famílias proteicas é feita através padrões ou motivos de sequências entre proteínas. Os domínios conservados são unidades recorrentes na evolução molecular, que podem ser recombinados em diferentes arranjos para definir a função de uma proteína. Para classificação de maltases é considerado o domínio catalítico  $\alpha$ -amilase, e a família  $\alpha$ -amilase compreende a maior família de glicosídeo hidrolases (GH) (CAZy, 2022). Todas as sequências polipeptídicas deste estudo apresentaram os domínios conservados de AmyAc\_maltase (cd11328), conforme o programa CDD - *Conserved domains database*, e apresentaram os blocos conservados de  $\alpha$ -glicosidases de mosquitos descritos por Krasikov et al. (2001), conforme Quadro 8.

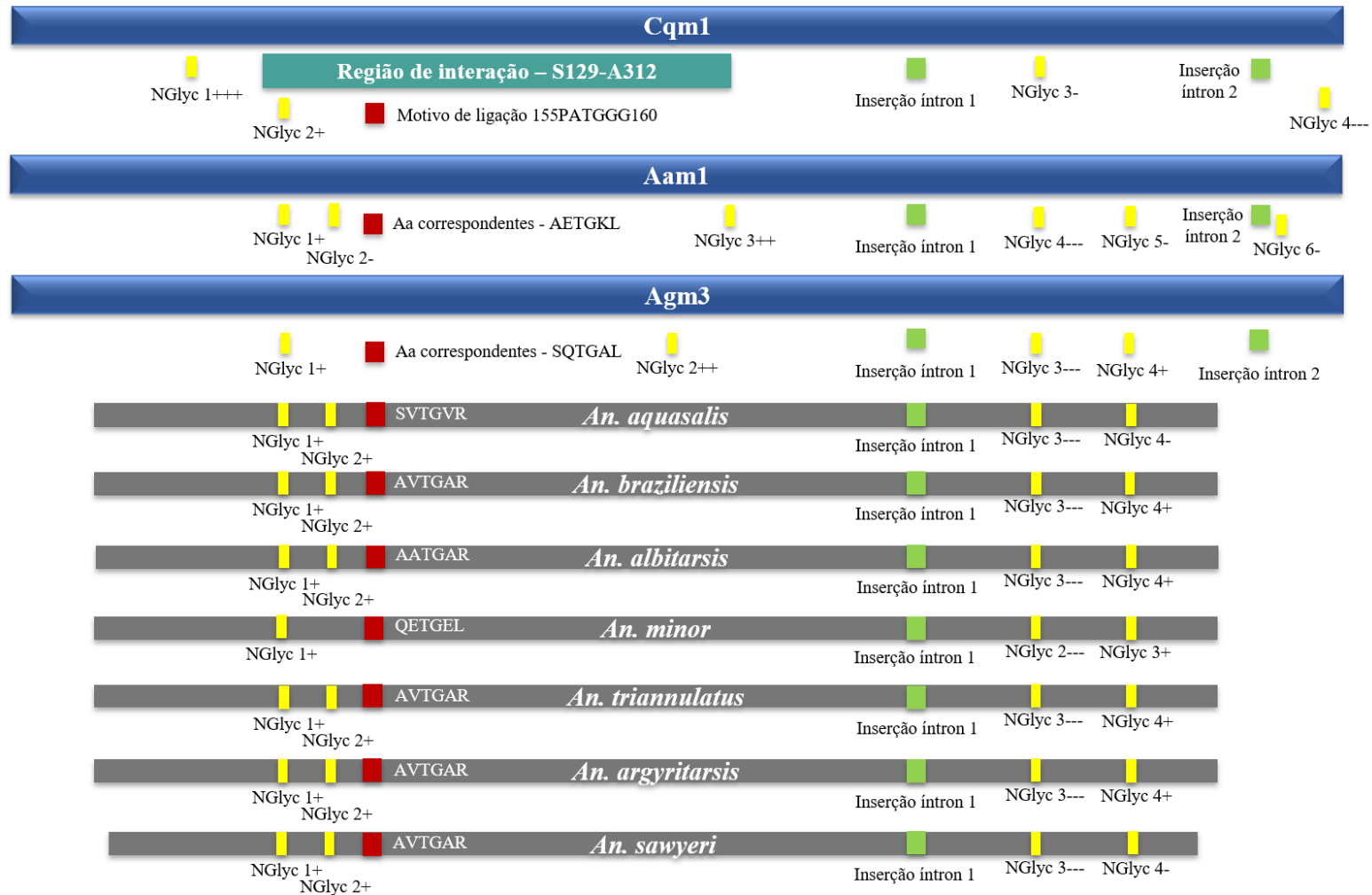
**Quadro 8** – Detecção de domínios conservados em proteínas ortólogas à Cqm1, Aam1 e Agm3 em espécie de *Anopheles* spp.

Proteína	Região			
	1	2	3	4
Mosquito AG' (Krasikov et al., 2001)	114 - <b>DFVPNH</b>	215 - <b>GFRLDAVPY</b>	297- <b>EAYT</b>	358- <b>VLGNHD</b>
Cqm1	123 - <b>DFIPNH</b>	220 - <b>GFRLDAINH</b>	290 - <b>EAYS</b>	353 - <b>VAGSHD</b>
Aam1	122 - <b>DFIPNH</b>	224 - <b>GFRLDAINH</b>	294 - <b>EAYS</b>	357 - <b>VSGSHD</b>
Agm3	128 - <b>DFIPNH</b>	230 - <b>GFRLDAINH</b>	299 - <b>EAYA</b>	362 - <b>VAGSHD</b>
<i>An. aquasalis</i>	88 - <b>DFIPNH</b>	190 - <b>GFRLDAINH</b>	259 - <b>EAYA</b>	322 - <b>VAGSHD</b>
<i>An. braziliensis</i>	88 - <b>DFIPNH</b>	190 - <b>GFRLDAINH</b>	259 - <b>EAYA</b>	322 - <b>VAGSHD</b>
<i>An. albitarsis</i>	88 - <b>DFIPNH</b>	190 - <b>GFRLDAINH</b>	259 - <b>EAYA</b>	322 - <b>VAGSHD</b>
<i>An. minor</i>	88 - <b>DFIPNH</b>	190 - <b>GFRLDAINH</b>	259 - <b>EAYA</b>	322 - <b>VAGSHD</b>
<i>An. triannulatus</i>	88 - <b>DFIPNH</b>	190 - <b>GFRLDAINH</b>	259 - <b>EAYT</b>	322 - <b>VAGSHD</b>
<i>An. argyritarsis</i>	88 - <b>DFIPNH</b>	190 - <b>GFRLDAINH</b>	259 - <b>EAYA</b>	322 - <b>VAGSHD</b>
<i>An. sawyeri</i>	82 - <b>DFIPNH</b>	184 - <b>GFRLDAINH</b>	253 - <b>EAYA</b>	316 - <b>VAGSHD</b>

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** Regiões de domínios conservados para  $\alpha$ -glicosidases, tendo como base a classificação feita por Krasikov et al. (2001) e através da ferramenta *CD-Search* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Os aminoácidos em negrito das proteínas de estudo são aqueles destacados pelo programa *CD-Search* como sítios catalíticos.

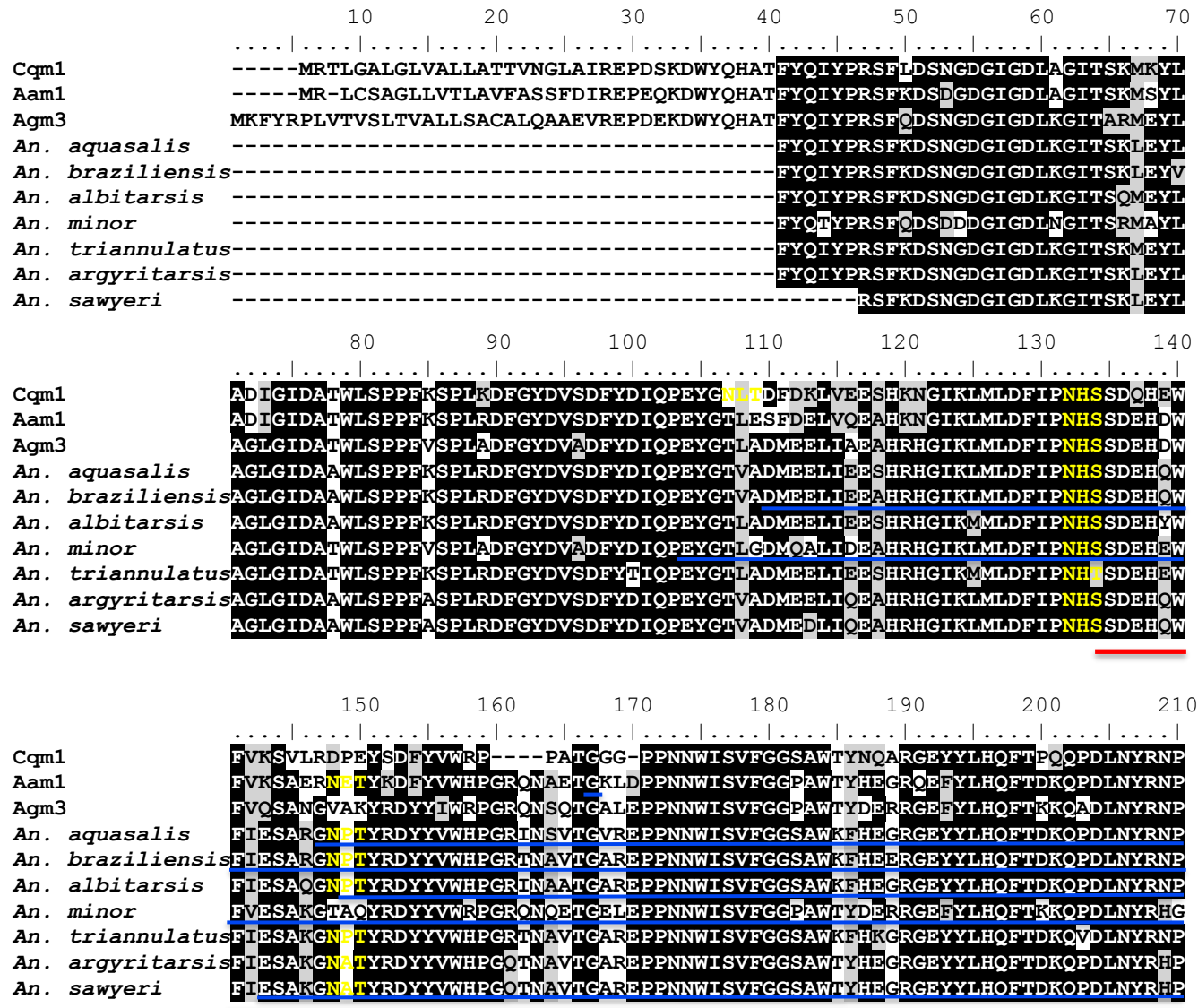
Apesar das sequências preditas de proteínas de *Anopheles* spp. deste estudo apresentarem truncagens, foi possível analisar de forma comparativa a conservação da região S129 – A312 já descrita em Cqm1 como importante para a interação com a toxina binária, representados na Figura 14 (FERREIRA et al., 2014). Além disso, ao alinhar as sequências de aminoácidos foi possível observar as diferenças na posição dos sítios de glicosilação e conservação de regiões importantes. No alinhamento, a região referente à S129 – A312 apresentou aminoácidos conservados nas proteínas de *Anopheles* spp., e uma das maiores diferenças se concentrou na região 155PATGGG160, descrita como crucial na ligação à BinB por Ferreira et al., 2014. As regiões descritas como importantes no *docking* também apresentaram diferenças entre as proteínas, principalmente para Agm3 (Figura 15).

**Figura 14** – Diagrama esquemático da disposição e comparação das sequências de aminoácidos das  $\alpha$ -glicosidasas ortólogas à Cqm1 nas espécies.

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** Diagrama linear das sequências polipeptídicas das  $\alpha$ -glicosidasas, enfatizando região amplificada pelos primers degenerados, N-glicosilações, aa presentes na região considerada crítica para a ligação de Cqm1 e inserção de íntron.

Figura 15 – Alinhamento múltiplo das proteínas ortólogas à Cqm1 em *Anopheles* spp com  $\alpha$ -glicosidases de referência Cqm1, Aam1 e Agm3.



	220	230	240	250	260	270	280
Cqm1	KVLAEMTKMLFEWLD	RGVDDGFRLLDA	INHMFEDE	QQRDEPLS	SGWGQPG	EYDSL	DHIYTKDIPDVYDVVYNW
Aam1	AVLEEMTKMLFEWLD	RGVDDGFRLLDA	INHMFEDE	PELRDEPPS	SGWSDPGKY	DSL	DHIYTKDVEDVYKVVYDW
Agm3	AVVEEMTKMLFEWLD	RGVDDGFRLLDA	INHMFEDE	AOLRDEPP	-GWCAPGTY	DEL	DHIYTKDNPDYINVVYGW
<i>An. aquasalis</i>	ALLRDMTAMLSEWLD	RGVDDGFRLLDA	INHMFEDE	QOLRDEPP	-GWCPPGSY	DEL	DHIYTKDNPDYEVVYGW
<i>An. braziliensis</i>	ALLREMTAMLSEWLD	RGVDDGFRLLDA	INHMFEDE	QOLRDEPP	-GWCAPDSY	VDL	DHIYTKDVADTYEVVYGW
<i>An. albitarsis</i>	ALLRDMTAMLSEWLD	RGVDDGFRLLDA	INHMFEDE	QOLRDEPP	-GYGPPDSY	VDL	DHIYTKDVSDTYEVVYGW
<i>An. minor</i>	PLLEEMTRMLFEWLD	RGVDDGFRLLDA	INHMFEDE	QMRDEPP	-GWGEPGTY	VDL	DHIYTKDNPDYGVVYRW
<i>An. triannulatus</i>	VVLRDMTAMLSEWLD	RGVDDGFRLLDA	INHMFEDE	VOLRDEPP	-GSGDPSSY	DAL	DHIYTKDIPDVYDVVYGW
<i>An. argyritarsis</i>	TLLGEMTAMLFEWLD	DKGVDDGFRLLDA	INHMFEDE	AOLRNEPP	-GWGEPGSY	DEL	DHIYTKDNPDYDVVYGW
<i>An. sawyeri</i>	TLLGEMTAMLFEWLD	DKGVDDGFRLLDA	INHMFEDE	AOLRNEPP	-GWGEPGSY	DEL	DHIYTKDNPDYDVVYGW

	290	300	310	320	330	340	350
Cqm1	RDQMDKYSAEKCR	TIIILMTEAYSS	SIEGTMYYE	SADRKRQ	GAHMPFNF	QLIYDFKKE	QNAVGLKNSIDWW
Aam1	RDLMDTYSKENCR	TIIILMTEAYSS	SIEGTMYYE	NA	NRTRQGAHMPFNF	QLIYDFKDI	QNAVGLKQSIDWW
Agm3	RQLCDDFGRRM	NKTIILMTEAYAS	IENFMYYE	DATGTRQ	GAHMPFNF	QLIYDFRHD	QNAIGLKQSIDFW
<i>An. aquasalis</i>	RQLCEDYGRQ	TGKTIILMTEAYAS	IENFMYYE	ESPGGRQ	GAHMPFNF	QLIYDFNS	DQNAIGLKQSIDFW
<i>An. braziliensis</i>	RQLCEDYGRQ	TGKTIILMTEAYAS	IENFMYYE	ESPGGRQ	GAHMPFNF	QLIYDFKS	DQNAIGLKQSIDFW
<i>An. albitarsis</i>	RKLCEDYGREK	TGKTIILMTEAYAS	IENFMYYE	ESPGGRQ	GAHMPFNF	QLIYDFKS	DQNAIGLKQSIDFW
<i>An. minor</i>	RQLCEDYGRQ	HDKTIILMTEAYAS	IENFMYYE	DATGTRQ	GAHMPFNF	QLIYDFQAE	QNAIGLKQSIDWW
<i>An. triannulatus</i>	RQLCEDYGRMD	KTIILMTEAYAS	IENFMYYE	ESPGGRQ	GAHMPFNF	QLIYDFKGD	QNAIGLKQSIDFW
<i>An. argyritarsis</i>	RQLCEDYGRQ	TGKTIILMTEAYAS	IENFMYYE	ESPGGRQ	GAHMPFNF	QLIYDFKS	DQNAIGLKQSIDFW
<i>An. sawyeri</i>	RQLCEDYGRQ	TGKTIILMTEAYAS	IENFMYYE	ESPGGRQ	GAHMPFNF	QLIYDFKS	DQNAIGLKQSIDFW

	360	370	380	390	400	410	420
Cqm1	MNNMPARETPSWV	AGSHDHSRVAS	RVGLDRVDQ	VMILLHTLP	PGTSITYY	GEEVAMQ	DEKEAQDFNRP
Aam1	MNHMPARETPSWV	SGSHDHERFAS	RVGENRVEQ	MMILLHTLP	PGTSITYY	GEEIGMLDY	KEAQTYDCRDP
Agm3	LNHMPARETPSWV	AGSHDHSRVAS	RVGLRVDQ	VTLLHTLP	PGTSITYY	GEEIGMLDE	KEAQLYDNRDP
<i>An. aquasalis</i>	LNHMPAROTPSWV	AGSHDHSRAAS	RVGLAKVDQ	LLHTLP	PGTSITYY	GEEIGMLDY	KAAEQDFNRP
<i>An. braziliensis</i>	LNHMPAROTPSWV	AGSHDHSRPA	TRVGLAKVDQ	LLHTLP	PGTSITYY	GEEIGMLDY	KEAQDFNRP
<i>An. albitarsis</i>	LNHMPAROTPSWV	AGSHDHSRAA	TRVGLKVDQ	LLHTLP	PGTSITYY	GEEIGMLDY	KEAQDFNRP
<i>An. minor</i>	LNHMPARETPSWV	AGSHDHSRVG	TRVGPPEVDQ	VTLVHTLP	PGTSITYY	GEEIGMDE	KEAEVYDNRDP
<i>An. triannulatus</i>	LNHMPAROTPSWV	AGSHDHSRAA	TRAGLAKVDQ	LLHTLP	PGTSITYY	GEEIGMODY	AAEQDFNRP
<i>An. argyritarsis</i>	LNHMPAROTPSWV	AGSHDHSRVAS	RVGLAQVDQ	LLVQTL	PGTSITYY	GEEIGMLDY	KAAEQDFNRP
<i>An. sawyeri</i>	LNHMPAROTPSWV	AGSHDHSRVAS	RVGLAQVDQ	LLVQTL	PGTSITYY	GEEIGMLDY	KAAEQDFNRP



	430	440	450	460	470	480	490
Cqm1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RTPMQWDSST	SAGFSTNTNTWLRVHPDYARYNVDVMQKNPOSTFHHFOHLTKLRRHRTMQSCEYVHKTVG				
Aam1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RTPMQWDGTT	SAGFSTNATTWLKVHPDYASLNVDLQONAEKSHFHFHFRALTSLRRHETMQNGDFLHRTVG				
Agm3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RTPMQWDNSI	SAGFSTNRTTWLRLHPDYPTRNVAMOEAAEKSTLKHFRITLALRRHPTLVHGEFHKHRTVG				
<i>An. aquasalis</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RTPMQWDNTISS	GFSTNRTTWLPLHPDYPTRNVAMQESADKSTLKHFRITLTKLRRHRTMIDGFEFTHRTVG				
<i>An. braziliensis</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RTPMQWDSST	ISAGFSTNRTTWLPLHPDYPTRNVAMQESADKSTLKHFRITLTKLRRHRTMMDGDFMHRITVG				
<i>An. albitarsis</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RTPMQWDSST	ISAGFSTNRTTWLPLHPDYPTRNVAMQESAEKSTLKHFRITLTKLRRHRTMIDGDFMHRITVG				
<i>An. minor</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RTPMQWDNSI	SAGFSTNRTTWLRLHPDYPTRNVAIQEAAERSTLKHFRITLALRRHPTLVHGEFTHRTVG				
<i>An. triannulatus</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RTPMQWDSST	ISAGFSTNRTTWLPLHPDYPTRNVAMQESAEKSTLKHFRITLTKLRRHRTMIDGDFTHRTVG				
<i>An. argyritarsis</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RTPMQWDSST	ISAGFSTNRTTWLPLHPDYPTRNVAMQESAEKSSLKHFRITLTKLRRHRTIIDGDFTHRTVG				
<i>An. sawyeri</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RTPMQWDSST	ISAGFSTNRTTWLPLHPDYPTRNVAMQESAEKSSLKHFRITLTKLRRHRTIIDGDFTHRTVG				
	500	510	520	530	540	550	560
Cqm1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	TKVYALLREL	LHGEDSFLTVLNMAGAEDTVDLGDFVNLPQKMRVEVAQPNSKSKAGNEVDIGKLTLPYDS				
Aam1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	THVYALLREL	QGRDSFLTVLNVADKQYDADLGDFVNLPKMTVQVAQSNSTLKAGDVVEISKVTLGPYDS				
Agm3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RDVYAFSRDL	HGEDTILVTVLNMATSSRTVDLGDFVNLPARLTVEIAQPMSNYKAGDEVDIHQVTLLOHDS				
<i>An. aquasalis</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RDVYAFSRDL	HGEDSEVTVLNMAAEGRTVDLGDFVNLP-----				
<i>An. braziliensis</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RDVYAFSRDL	HGEDSEVTVLNMAAEGRTVDLGDFVNLP-----				
<i>An. albitarsis</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RDVYAFSRDL	HGEDSEVTVLNMAAEGRTVDLGDFVNLP-----				
<i>An. minor</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	ADVAFSRDL	HGEDTILVTVLNMAAEGRTVDLGDFVNLP-----				
<i>An. triannulatus</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RDVYAFSRDL	HGEDSEVTVLNMAADGRTVDLGDFVNLP-----				
<i>An. argyritarsis</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RDVYAFSRDL	HGEDSEVTVLNMGADGRTVDLGDFVNLP-----				
<i>An. sawyeri</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RDVYAFSRDL	HGEDSEVTVLNMGADGRTVDL-----				
	570	580	590				
Cqm1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	VVLRATVSSAAAINLS	IGLLLAIMARYIFV				
Aam1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	IVLRA--SSAAAIQLSLS	SVVIALIVKYFLV				
Agm3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	VVLRAVVSGASVVRLSL	IVALLAAVEHLF-				
<i>An. aquasalis</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	-----	-----				
<i>An. braziliensis</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	-----	-----				
<i>An. albitarsis</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	-----	-----				
<i>An. minor</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	-----	-----				
<i>An. triannulatus</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	-----	-----				
<i>An. argyritarsis</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	-----	-----				
<i>An. sawyeri</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	-----	-----				

Fonte: Elaborado pela autora.

**Legenda:** Alinhamento das proteínas de *Anopheles* com  $\alpha$ -glicosidases de referência Cqm1, Aam1 e Agm3. A região S129-A312 está destacada pela linha em vermelho (Ferreira et al., 2014). Todos os possíveis sítios de N-glicosilações destacados na Tabela 2 estão em letras amarelas, a disposição das Âncoras GPI nas proteínas Cqm1, Aam1 e Agm3 estão destacados em verde. As regiões de interação ao Cristal BinAB (especificamente aos aminoácidos 78NKDPRF83 da BinB) relatadas nos dez primeiros resultados de *docking* com delimitação estão destacados pelas linhas azuis em cada espécie.

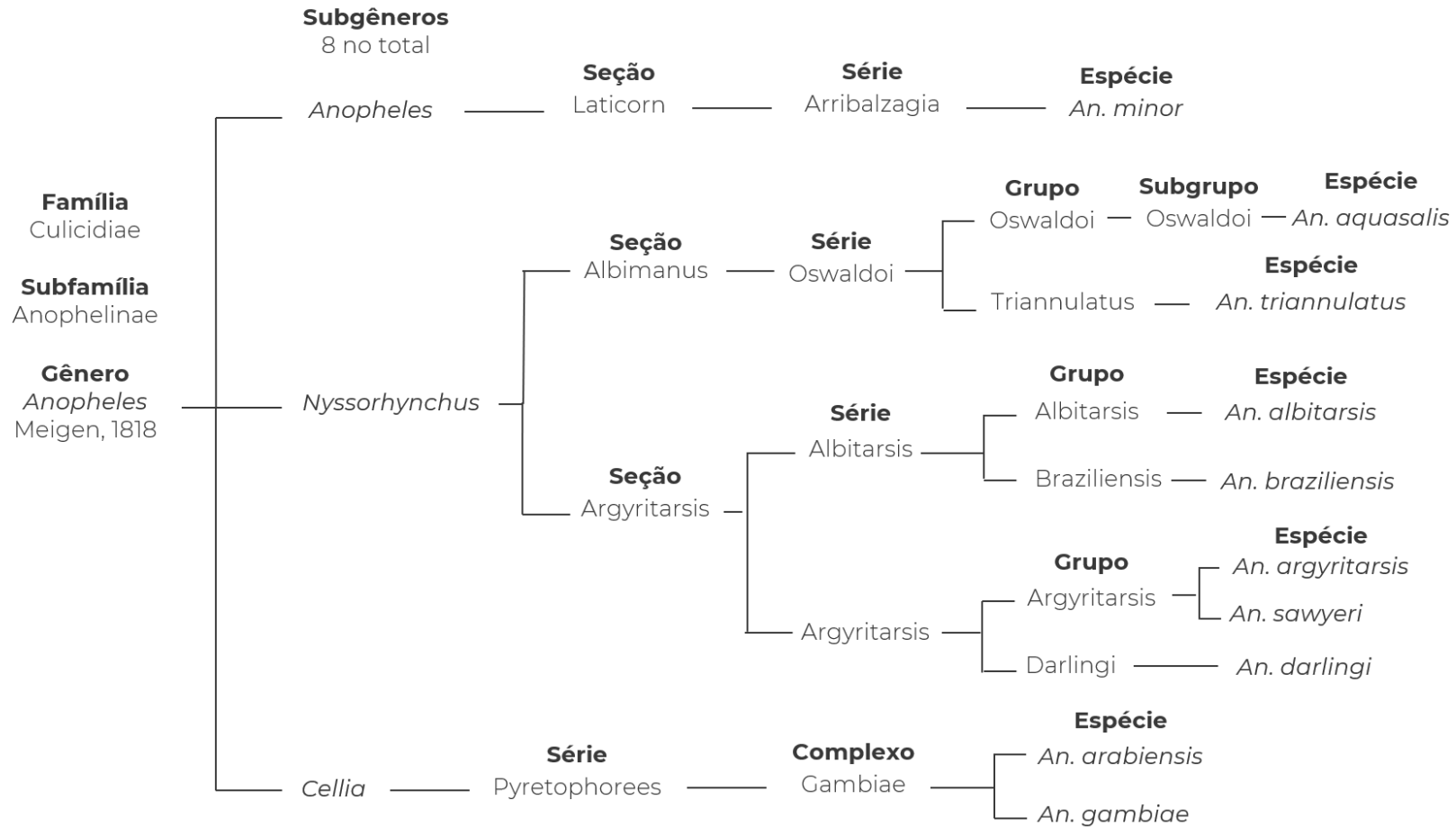
### 8.3. Estudo filogenético das espécies de *Anopheles* spp.

O gênero *Anopheles* é o mais estudado entre os mosquitos diante do seu grande impacto na saúde pública, desta forma, são mais de 530 espécies conhecidas, e aproximadamente 465 destas formalmente nominadas. As espécies se dividem em 7 subgêneros: *Anopheles* (182 espécies), *Cellia* (220 espécies), *Nyssorhynchus* (39 espécies), *Kertezia* (12 espécies), *Baimaia* (1 espécie) *Lophopodomyia* (6 espécies) e *Stethomyia* (5 espécies). Os 4 primeiros subgêneros incluem as espécies que são capazes de transmitir malária, sendo também os mais estudados. Os três maiores subgêneros (*Anopheles*, *Cellia* e *Nyssorhynchus*) são subdivididos em sistemas hierárquicos informais, que consideram categorias taxonômicas informais. Subgênero *Anopheles* é dividido em duas seções, e o *Nyssorhynchus* dividido em três seções, ambos considerando características taxonômicas. Essas seções, junto com o subgênero *Cellia*, são divididos em séries, que podem apresentar grupos, subgrupos e complexos (HARBACH, 2013).

Baseado na divisão descrita acima, as espécies utilizadas neste trabalho foram agrupadas em termos de sua filogenia (Figura 16), considerando as subdivisões dentro de cada subgrupo. A maioria das espécies encontradas no território brasileiro são pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus*, e as utilizadas neste trabalho estão nas seções *Albimanus* e *Argyritarsis*. Dentre as espécies coletadas no país, a única pertencente ao subgênero *Anopheles* foi *Anopheles minor*. As espécies sabiamente africanas, *An. gambiae* e *An. arabiensis*, são pertencentes ao subgênero *Cellia*, que possui a maior representatividade de espécies.

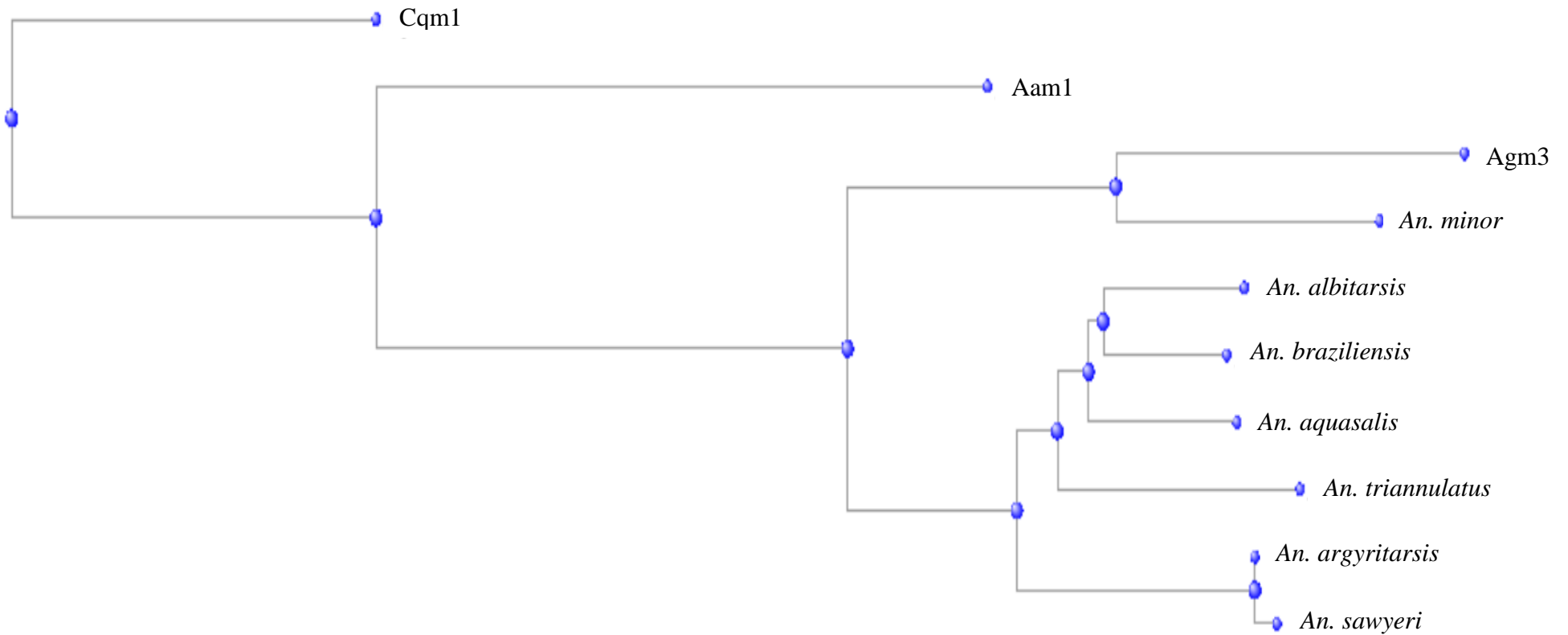
Além disso, a partir das sequências parciais das proteínas de *Anopheles* spp., foi realizado um *BLAST* através da ferramenta COBALT, onde é possível visualizar a relação fenética com as proteínas já descritas, Cqm1, Aam1 e Agm3 (Figura 17), que corrobora com a organização filogenética demonstrada na Figura 16 e os achados de identidade e similaridade do Quadro 7.

**Figura 16** – Esquema demonstrando a organização filogenética das espécies de *Anopheles* spp. utilizadas neste trabalho.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** Relação filogenética entre espécies de *Anopheles* spp., abrangendo os três principais subgêneros, e considerando seções, séries, grupos, subgrupos e complexos.

**Figura 17** – Árvore de relação fenética entre as sequências de *Anopheles* spp. utilizadas neste trabalho e Cqm1, Aam1 e Agm3.

**Fonte:** Elaborado pela autora utilizando a ferramenta COBALT (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>).

**Legenda:** Relação fenética entre sequências proteicas das espécies de *Anopheles* spp. ortólogas à Cqm1 e  $\alpha$ -glicosidases Cqm1, Aam1 e Agm3.

#### 8.4 Obtenção das estruturas das proteínas de referência Cqm1, Aam1 e Agm3 e das proteínas parciais ortólogas à Cqm1 em *Anopheles* spp.

Foi realizada a predição da estrutura de cada proteína pela ferramenta Phyre<sup>2</sup>, sendo selecionados os resultados baseados na estrutura 3D estabelecida de Cqm1 (PDB ID - [6K5P](#)). Foi realizada a predição de todas as proteínas, tanto as que possuem sequência de aminoácidos já estabelecidas, Cqm1, Aam1 e Agm3, quanto as sequências parciais das proteínas ortólogas à Cqm1 de *Anopheles* spp. Apenas a proteína Cqm1 possui a sua estrutura 3D definida em banco de dados (SHARMA & KUMAR, 2019), e mesmo sendo estabelecido que Agm3 interage com o cristal BinAB, não existem estudos aprofundados descrevendo possíveis regiões de interação, como é possível visualizar no Quadro 9.

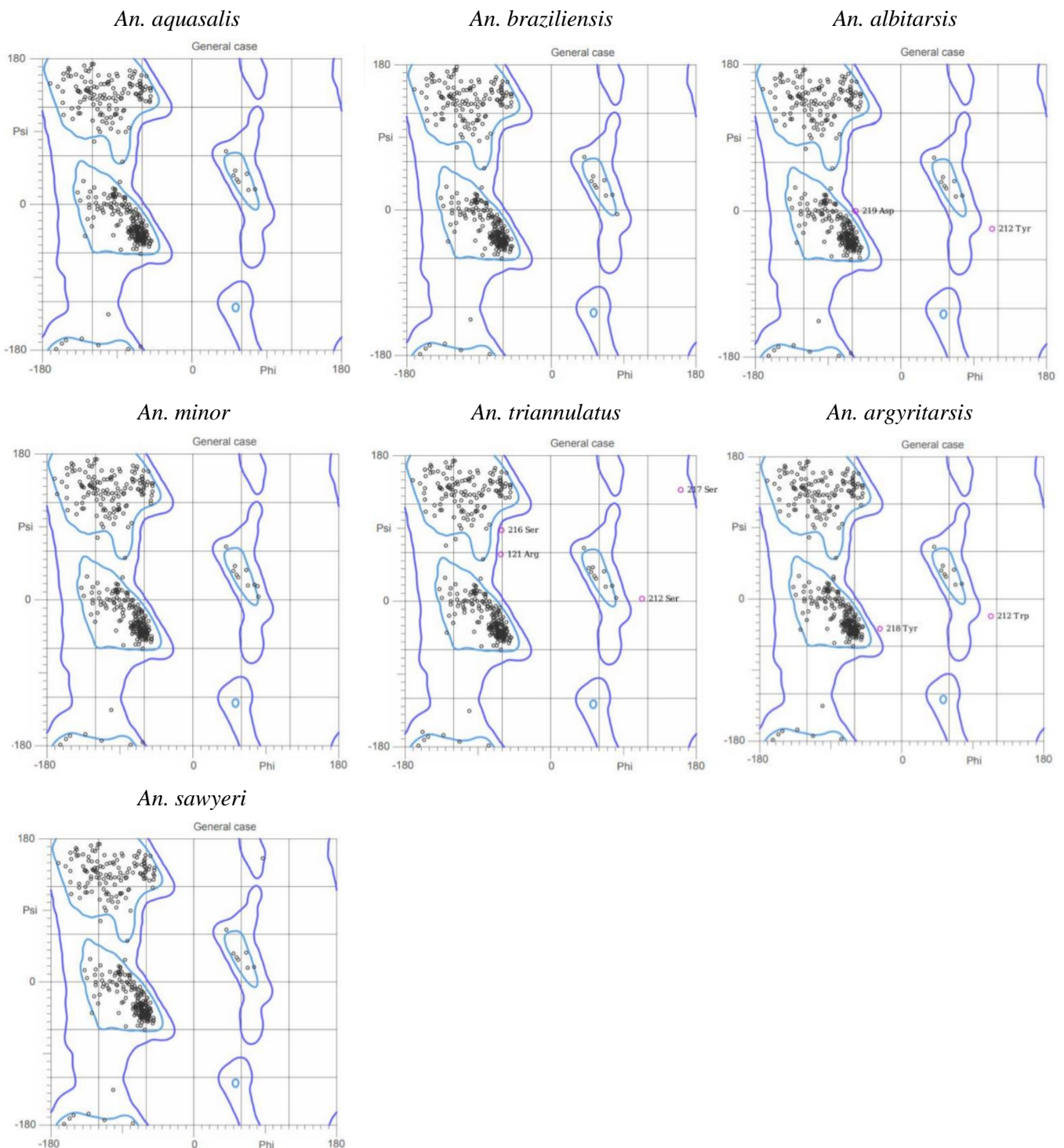
**Quadro 9** - Informações disponíveis na literatura sobre regiões de aminoácidos de interação entre Cristal BinAB e  $\alpha$ -glicosidases escolhidas para as análises proteicas.

Proteína	Região	Importância	Referência
Cqm1	S129-A312	Região de possível interação com a toxina binária	Ferreira et al. (2014)
Cqm1	155PATGGG160	Resíduos mutados se mostraram críticos para ligação	Ferreira et al. (2014)
Agm3	-	Apesar de confirmada a susceptibilidade ao Cristal BinAB, a literatura não apresenta descrição de resíduos importantes	Opota, et al. (2008)
Toxina binária BinB	N33-L158	Região importante para ligação à Cqm1	Romão et al. (2011)
Toxina binária BinB	147FQFY150	Resíduos com papel crítico na ligação e consequentemente atividade tóxica da BinA	Singkhamanan et al. (2010)
Toxina binária BinB	85IRF87/147FQF149	Resíduos com possível papel na ligação e consequentemente atividade tóxica da BinA	Romão et al. (2011)

**Fonte:** Elaborada pela autora.

Ao prever as sequências, foi realizado o Plot de Ramachandran para confirmar a qualidade das estruturas tridimensionais. Essa análise é essencial para confirmar a qualidade e a acurácia da predição de estruturas de cada proteína, prevendo as propriedades estereoquímicas estruturais (AGHINOTRY et al., 2022). Ao realizar as análises, todas as estruturas apresentaram mais de 95% dos aminoácidos em regiões favoráveis (Figura 18).

**Figura 18** – Gráficos dos Plots de Ramachandran das sequências de aminoácidos de  $\alpha$ -glicosidases de *Anopheles* spp. ortólogas à Cqm1.

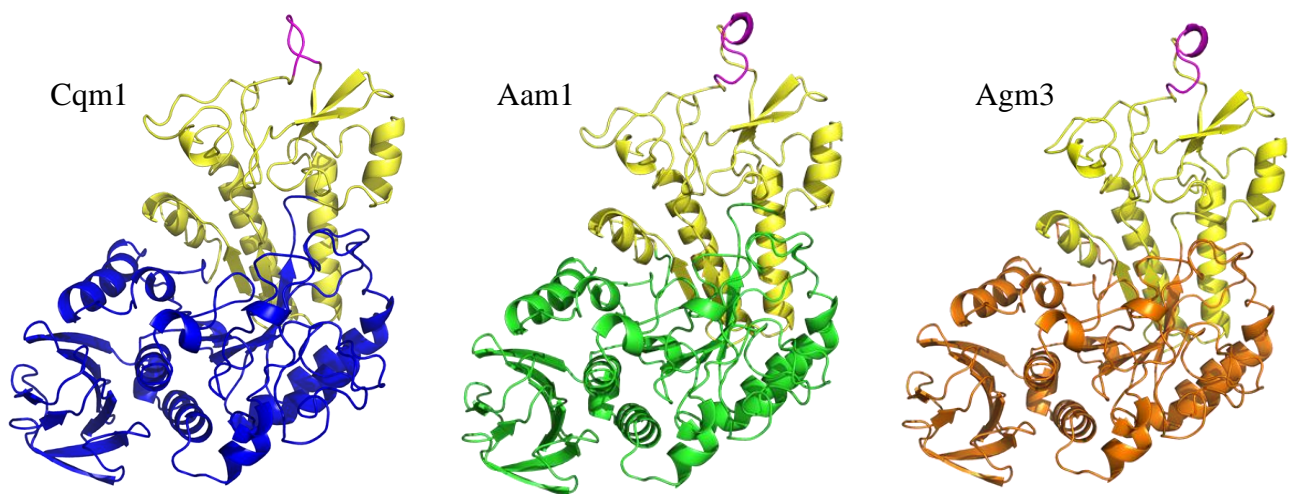


**Fonte:** Elaborada pela autora utilizando a ferramenta MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>).

**Legenda:** Gráficos de Ramachandran das possíveis  $\alpha$ -glicosidases, onde todas apresentam mais de 95% dos resíduos em regiões favoráveis.

Depois de obter os resultados da predição e selecionar os arquivos, os mesmos foram visualizados pela ferramenta PyMOL 2.5, que é uma ferramenta de visualização molecular capaz de gerar imagens 3D de alta qualidade, além de possibilitar a delimitação de sequências nas estruturas e realizar alinhamentos. Essa ferramenta foi utilizada para padronizar as imagens geradas, além de delimitar regiões importantes para a análise, como regiões N e C-terminal, e regiões consideradas importantes para a ligação em Cqm1, conforme mostrado no Quadro 9.

**Figura 19** – Predição de estruturas das proteínas de  $\alpha$ -glicosidases Cqm1, Aam1 e Agm3.



**Fonte:** Elaborado pela autora

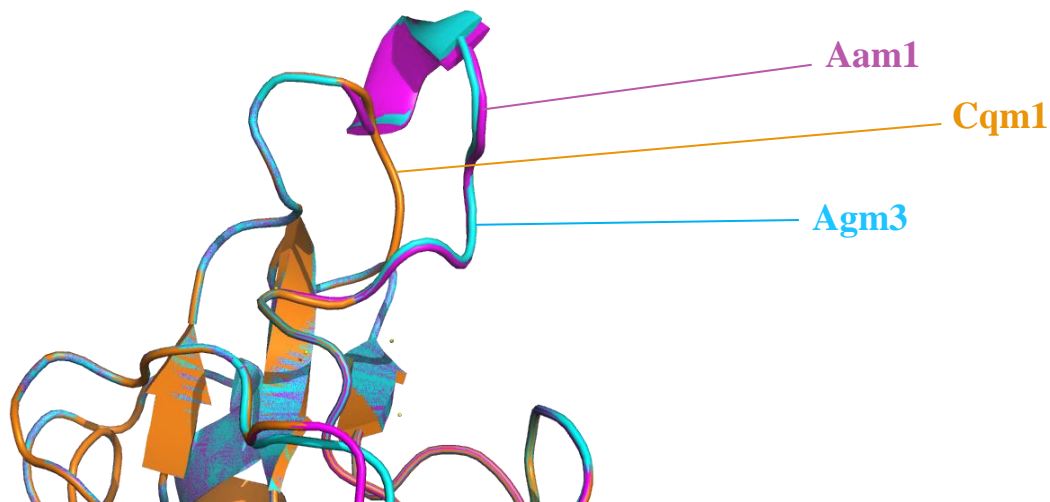
**Legenda:** Predição de proteínas, Cqm1 (*Culex quinquefasciatus* maltase 1) em azul, Aam1 (*Aedes aegypti* maltase 1) em verde e Agm3 (*Anopheles gambiae* maltase 1) em laranja, e em todas as proteínas em amarelo encontra-se destacado a região predita como importante para a ligação com a BinB em Cqm1 (S129 – A312) (Ferreira et al., 2014), e em roxo os aminoácidos referentes à região 155PATGGG160, caracterizados como críticos para esta interação em Cqm1 (Ferreira et al., 2014).

As proteínas mostradas na Figura 19 apresentam uma conservação de sua estrutura geral. Algumas das diferenças mais significativas entre as proteínas encontram-se na região N-terminal, que nas estruturas acima se localizam na porção superior. Entre os aminoácidos 155PATGGG160, que é uma região considerada crítica para ligação a subunidade BinB na Cqm1 (FERREIRA et al., 2014), existe uma diferença significativa tanto para Aam1 quanto em Agm3. Em Cqm1 é possível observar a formação de um loop, enquanto em Aam1 e Agm3 a estrutura se apresenta como o início de uma hélice, conforme mostrado na Figura 20, e ao



realizar a predição da estrutura das demais proteínas percebe-se diferenças neste mesmo trecho (Figura 21).

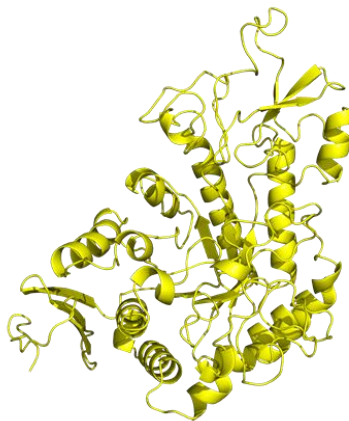
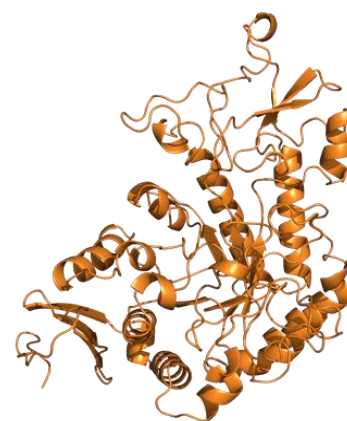
**Figura 20** – Alinhamento das estruturas das proteínas Cqm1, Aam1 e Agm3 com foco na região 155PATGGG160 importante para ligação a BinB já descrita em Cqm1 (Ferreira et al., 2014).



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** Alinhamento das estruturas das proteínas Cqm1, Agm3 e Aam1, com foco na região referente à 155PATGGG160 da Cqm1, onde Agm3 encontra-se na cor azul, Cqm1 na cor laranja e Aam1 na cor roxo.

As proteínas de *Anopheles* spp. avaliadas neste estudo mantiveram uma conservação de suas estruturas (Figura 21), apresentando diferenças sutis na região N-terminal, assim como ocorreu com as  $\alpha$ -glicosidases já estabelecidas (Cqm1, Aam1 e Agm3). Ao realizar o alinhamento das estruturas pelo TM-Align, todas as combinações apresentaram o TM-score acima de 0.991, com exceção das comparações com *An. saweyri*, que possui menos aminoácidos, e os TM-scores se apresentaram acima de 0.960. A predição destas estruturas em espécies de *Anopheles* spp. é fundamental para se entender melhor os possíveis padrões de interação e susceptibilidade ao Cristal BinAB, e as diferenças apresentaram-se importantes para o *docking* molecular, gerando diferentes padrões de interação.

**Figura 21** - Predição de estruturas de  $\alpha$ -glicosidasas ortólogas à Cqm1 obtidas em *Anopheles* spp.*An. aquasalis**An. braziliensis**An. albitarsis**An. minor**An. triannulatus**An. argyritarsis**An. sawyeri*

**Fonte:** Elaborado pela autora

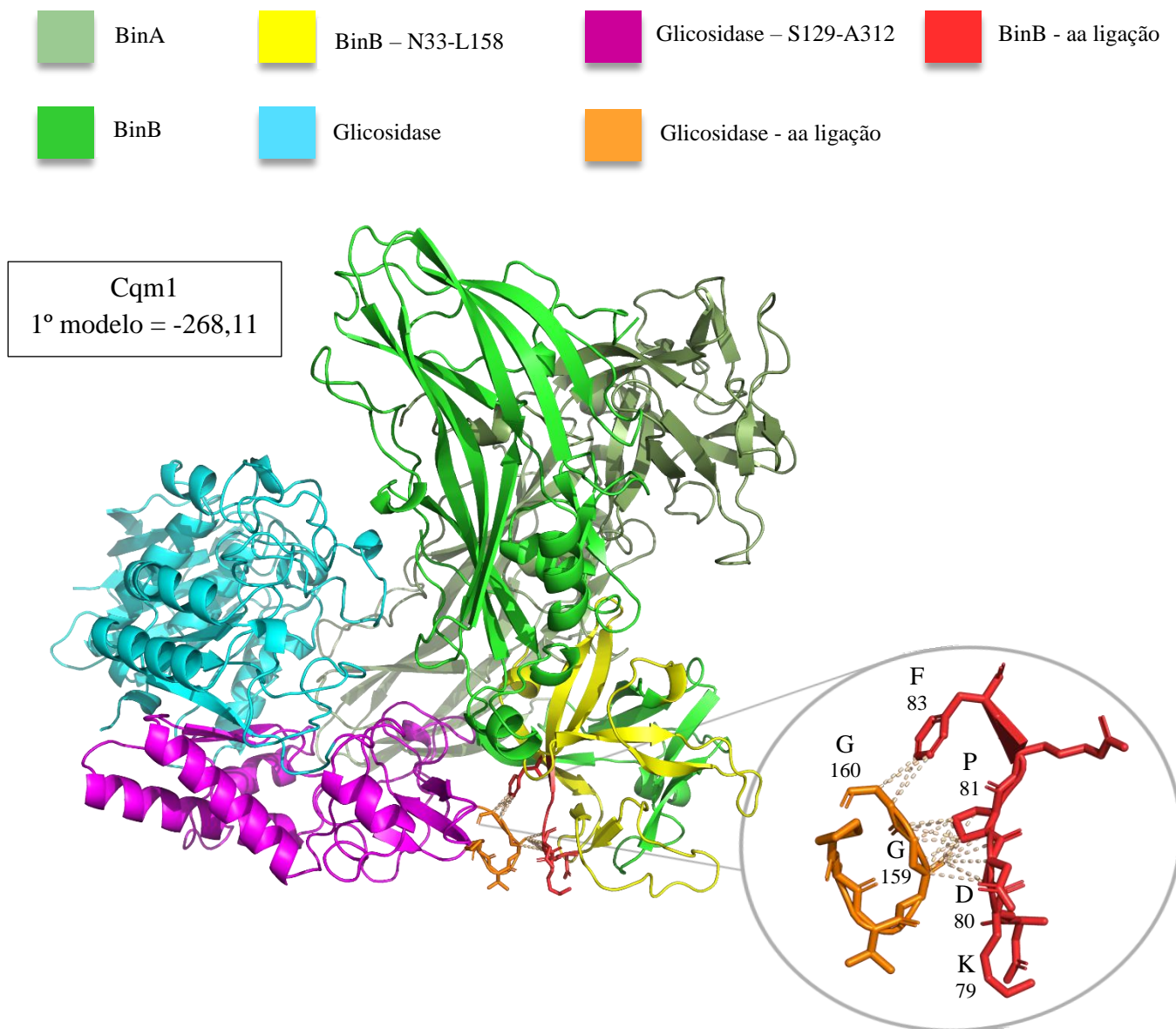
**Legenda:** Predição de estruturas de  $\alpha$ -glicosidasas ortólogas à Cqm1 em diferentes espécies de *Anopheles* spp.

## 8.5 Docking molecular

Inicialmente, antes de realizar as análises de *docking*, foi necessário estabelecer as regiões descritas na literatura como importantes na interação entre as proteínas e quais seriam consideradas importantes as análises, conforme descritas no Quadro 9. Dessa forma, as sequências proteicas já descritas (Cqm1, Aam1 e Agm3) e as de *Anopheles* spp. foram submetidas ao *docking*, inicialmente delimitando as regiões correspondentes à S129-A312 em Cqm1 (FERREIRA et al., 2014) e no Cristal BinAB foi delimitada a região N33-L158 na BinB (ROMÃO et al., 2011). Essa delimitação é apenas uma orientação, já que se não houver possíveis interações nas regiões escolhidas, serão gerados modelos de *docking* considerando as regiões livres (YAN et al., 2020).

Primeiramente foi realizado o *docking* entre a toxina binária e Cqm1, com caráter de controle positivo, delimitando os aminoácidos importantes na ligação. A energia livre da ligação do primeiro modelo gerado foi de -268,11, que se apresentou consideravelmente menor que os outros modelos. Nesse modelo, foi encontrada interação entre os aminoácidos 159GG160 em Cqm1, descritos anteriormente como importantes, e os aminoácidos 79KDP81 e 83F na BinB (Figura 22).

A partir dessa região de interação na toxina, foi realizada uma análise nas sequências de aminoácidos do Cristal BinAB (Figura 23), avaliando as regiões importantes descritas na literatura para interação, e uma análise estrutural da BinB (Figura 24), destacando a região 147FQFY150 na toxina descrita como essencial na ligação (SINGKHAMANAN et al., 2010) e os resíduos descritos como importantes no *docking* (78NKDP81 e 83F), que se encontram na região considerada importante segundo Romão et al. (2011) (N33-L158). Ao analisar a localização desses trechos, encontrados dentro da região crítica, foi evidenciado a proximidade entre os aminoácidos já descritos e os encontrados no *docking*, e dessa forma ambos foram utilizados como referência para os *dockings* seguintes.

**Figura 22** – *Docking* molecular demonstrando interação entre Cqm1 e cristal BinAB.

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** *Docking* entre Cqm1 (em azul), com enfoque na região entre os aminoácidos S129-A312 (em roxo), e os aminoácidos 155PATGGG160 (em laranja) indicados como importantes para sua ligação a BinB. Cristal BinAB encontra-se na cor verde, onde a BinA está em verde acinzentado e a BinB está destacada em um tom de verde mais claro, com enfoque na região N33-L158 (em amarelo), descrita como importante para interação ao receptor Cqm1 (ROMÃO et al., 2011), e em vermelho encontram-se os aminoácidos na BinB possivelmente envolvidos nesta ligação.

**Figura 23** – A. Sequência de aminoácidos da toxina BinB, com destaque em regiões importantes de interação descritas pela literatura. B. Sequência de aminoácidos da toxina BinA, com destaque em regiões importantes de interação.

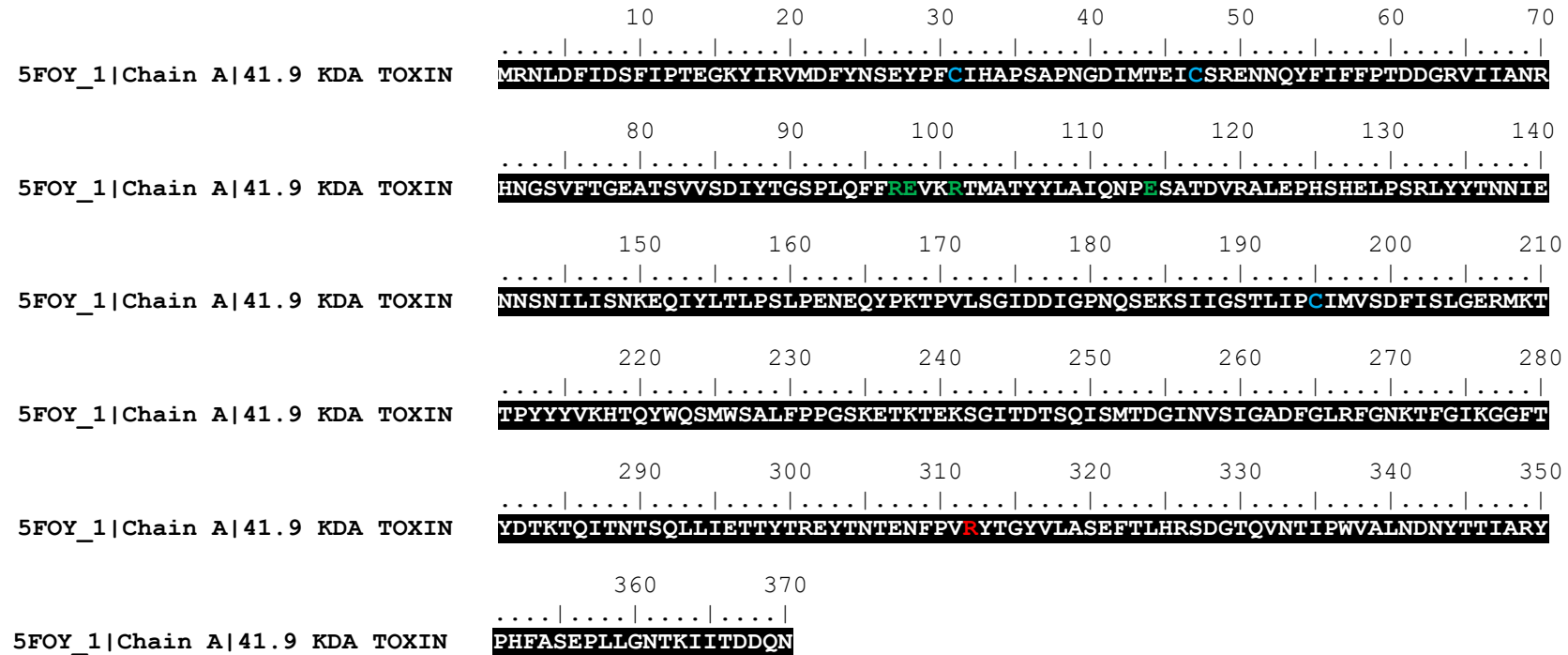
(A)

```

      10      20      30      40      50      60      70
5FOY_2|Chain B|51KDA TOXIN LSP MCDSKDNSGVSEKCGKFTNYPLNTPPTSLNLYNLPEISKKFFYNLKNKYSRNGYGLSKTEFPSSIENCPSN
      80      90     100     110     120     130     140
5FOY_2|Chain B|51KDA TOXIN LSP EYSIMYLNKDPRELRFLDDGRYIIADRDDGEVDFEAPTYLDNNNHPIISRHYTGEERQKFEQVSGDY
      150     160     170     180     190     200     210
5FOY_2|Chain B|51KDA TOXIN LSP ITGEQFQFYTONKTRVLSNCRALDSRTILLSTAKIFPIYPPASETQLTAFVNSSFYAAAI PQLPQTSLL
      220     230     240     250     260     270     280
5FOY_2|Chain B|51KDA TOXIN LSP ENIPEPTSLDDSGVLPKDAVRAVKGSALLPCIIVHDPNLNNSDKMKFNITYYLLEYKEYWHQLWSQIIPAH
      290     300     310     320     330     340     350
5FOY_2|Chain B|51KDA TOXIN LSP QTVKIQERTGISEVVQNSMIEDLNMYIGADFGLFYFRSSGFKEQITRGLNRPLSQITTTQLGERVEEMEY
      360     370     380     390     400     410     420
5FOY_2|Chain B|51KDA TOXIN LSP YNSNDLDVRYVKYALAREFTLKRVNGEIVKNWVAVDYRLAGIQSYPNAPI TNPLTLTKHTIIRCENSYDG
      430     440
5FOY_2|Chain B|51KDA TOXIN LSP HIEKTPLEFKNGEVIVKTNEELIPKINQ

```

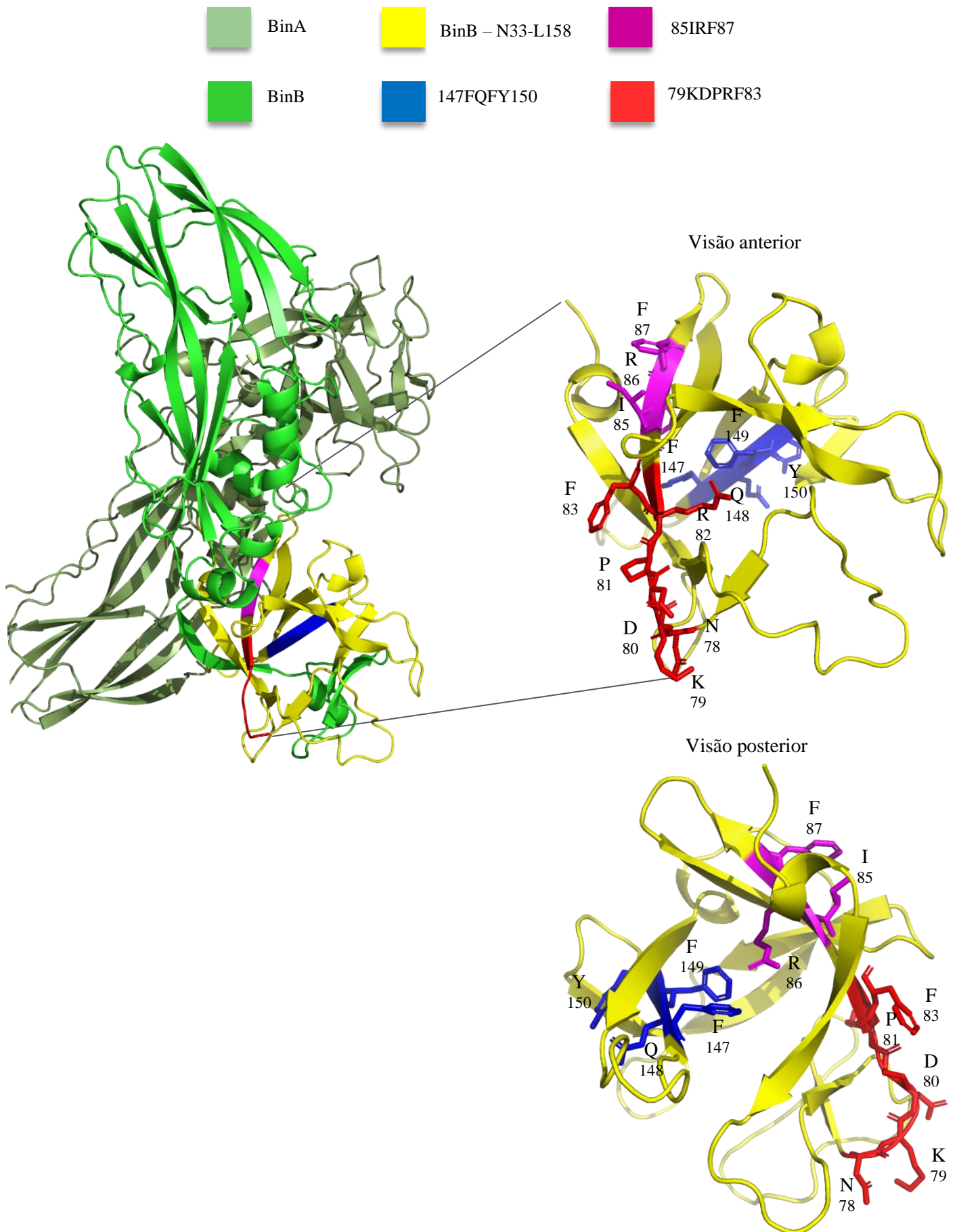
(B)



**Fonte:** Elaborado pela autora através do programa Bioedit.

**Legenda:** A. BinB – 51kDA. A região descrita como importante entre os aminoácidos N33-L158 está destacada pela linha azul (ROMÃO et al., 2011), e as demais aminoácidos importantes estão destacados em verde (SINGKHAMANAN et al, 2010; SINGKHAMANAN et al, 2013) e laranja (ROMÃO et al., 2011). Em vermelho encontram-se os aminoácidos possivelmente envolvidos na ligação descritos pelo *docking*. B. BinA – 41.9kDA. Estão destacados os aminoácidos descritos como importante para a atividade tóxica da BinA, em verde os descritos por Sanitt et al., 2008, em vermelho o descrito por Elangovan et al., 2000, e em azul os resíduos de cisteína descritos por Promdonkoy et al., 2008.

**Figura 24** – Cristal BinAB, com destaque para as regiões importantes na BinB para ligação à Cqm1.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** Bin AB encontra-se na cor verde, onde a BinB está destacada em um tom de verde mais claro, com enfoque na região N33-L158 em BinB em amarelo (ROMÃO et al., 2011), e suas respectivas regiões já descritas (em roxo e azul) (SINGKHAMANAN et al, 2010; ROMÃO et al., 2011), enfatizadas como importantes, e em vermelho encontram-se os aminoácidos possivelmente envolvidos na ligação descritos pelo *docking*.

A partir dos aminoácidos encontrados, foi realizado o *docking* das outras proteínas, incluindo Aam1 e Agm3, onde a primeira é sabidamente refratária à toxina (FERREIRA et al., 2010), e a segunda possui ligação à toxina binária e é do mesmo gênero que as espécies avaliadas (OPOTA et al., 2008). Depois de estabelecidos os *dockings* das proteínas de referência, foram realizados então os *docking* com as sequências preditas de proteínas de *Anopheles* spp. deste estudo. Foram gerados diversos modelos de *docking* para cada proteína, e foram selecionados os dez primeiros melhores modelos para análise. Nessa análise, inicialmente são avaliadas as energias livres de cada modelo, que é um parâmetro importante, mas não necessariamente o modelo de menor energia é o ideal, por isso também são analisados os aminoácidos envolvidos em todos os modelos (Quadro 10).

**Quadro 10** – Energia livre dos modelos de *docking* molecular e possíveis regiões de interação.

Espécie	Energia livre dos modelos	Região de interação do modelo escolhido	Região de interação na BinB
Cqm1	1° = -268,11 / 2° = -244,16 / 3° = -240,81 / 4° = -235,87 / 5° = -232,00 / 6° = -228,50 / 7° = -225,16 / 8° = -224,41 / 9° = -224,01 / 10° = -223,56	1° modelo = 159GG160	79KDP81, 83F
Aam1	1° = -236,46 / 2° = -232,22 / 3° = -232,03 / 4° = -231,11 / 5° = -227,05 / 6° = -225,66 / 7° = -223,09 / 8° = -222,64 / 9° = -222,58 / 10° = -220,31	4° modelo = G160A	P81A
Agm3	1° = -259,88 / 2° = -258,46 / 3° = -243,45 / 4° = -242,78 / 5° = -237,70 / 6° = -237,60 / 7° = -231,14 / 8° = -230,36 / 9° = -229,09 / 10° = -228,48	1° modelo = 447PY448	78NK79
<i>An. aquasalis</i>	1° = -257,96 / 2° = -247,60 / 3° = -238,39 / 4° = -237,01 / 5° = -235,01 / 6° = -229,60 / 7° = -	2° modelo = L240A, D245A, 247RQ248	79KDP81, F83A

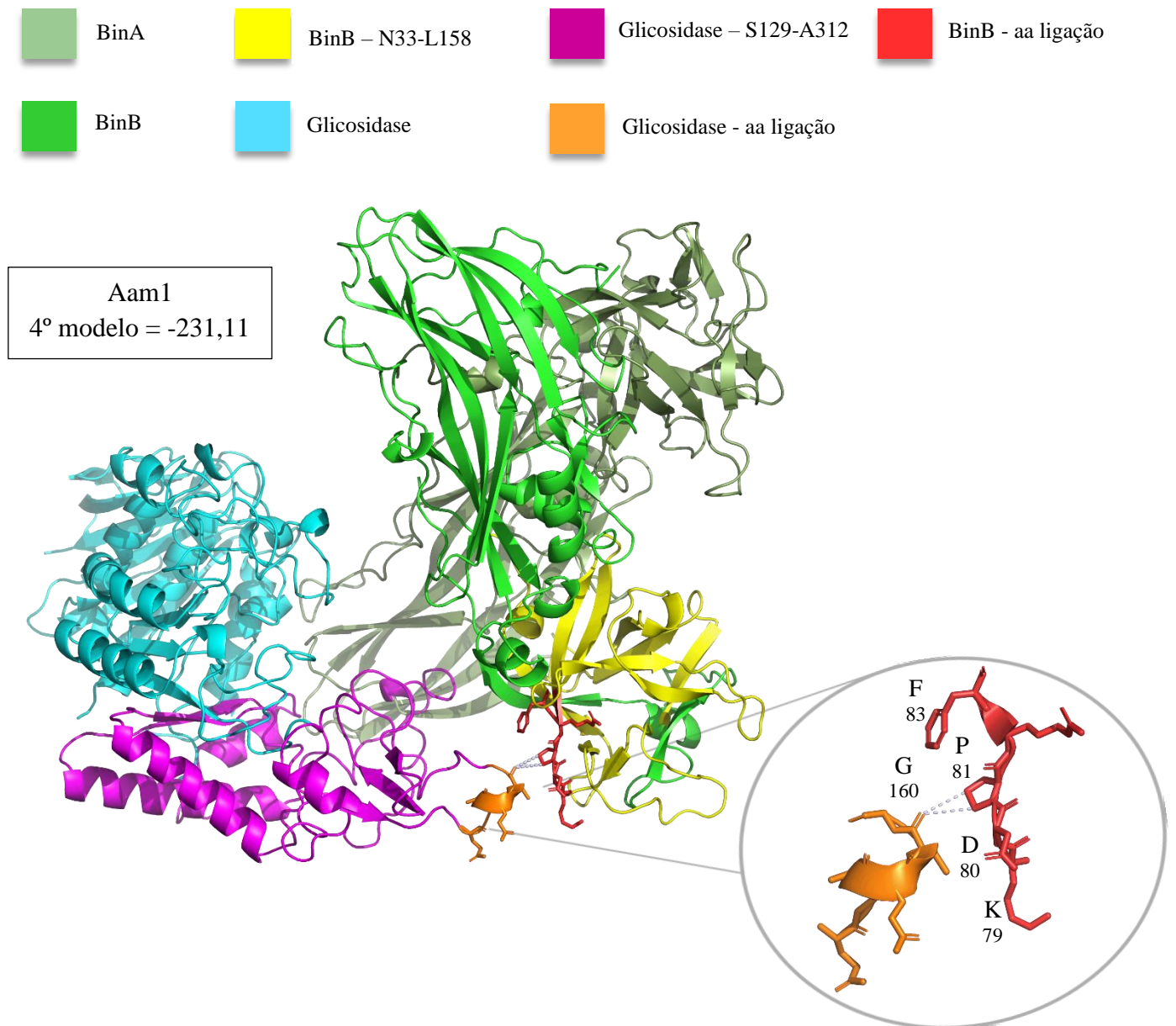


	$228,75 / 8^\circ = 228,22 / 9^\circ = -228,15 / 10^\circ = -226,69$		
<i>An. braziliensis</i>	$1^\circ = -264,79 / 2^\circ = -259,01 / 3^\circ = -258,75 / 4^\circ = -246,80 / 5^\circ = -239,66 / 6^\circ = -237,62 / 7^\circ = -225,27 / 8^\circ = -224,21 / 9^\circ = -223,02 / 10^\circ = -220,65$	2º modelo = N123, T126A, 128RE129	78NKD80, F83A
<i>An. albitarsis</i>	$1^\circ = -273,74 / 2^\circ = -257,55 / 3^\circ = -238,81 / 4^\circ = -238,80 / 5^\circ = -237,65 / 6^\circ = -235,46 / 7^\circ = -228,60 / 8^\circ = -227,50 / 9^\circ = -226,34 / 10^\circ = -225,67$	2º modelo = 109PT110, 112RD113, R174A	78NKDP81
<i>An. minor</i>	$1^\circ = -283,54 / 2^\circ = -272,51 / 3^\circ = -261,67 / 4^\circ = -244,36 / 5^\circ = -243,22 / 6^\circ = -240,23 / 7^\circ = -238,40 / 8^\circ = -236,14 / 9^\circ = -234,78 / 10^\circ = -233,05$	2º modelo = R238A, D245A, 247QR248	N78A, 80DP81, F83A
<i>An. triannulatus</i>	$1^\circ = -273,74 / 2^\circ = -257,55 / 3^\circ = -238,81 / 4^\circ = -238,80 / 5^\circ = -237,65 / 6^\circ = -235,46 / 7^\circ = -228,60 / 8^\circ = -227,50 / 9^\circ = -226,34 / 10^\circ = -225,67$	10º modelo = 314NA315	79KDP81
<i>An. argyritarsis</i>	$1^\circ = -254,59 / 2^\circ = -241,34 / 3^\circ = -236,77 / 4^\circ = -234,34 / 5^\circ = -232,00 / 6^\circ = -228,34 / 7^\circ = -227,69 / 8^\circ = -224,31 / 9^\circ = -224,05 / 10^\circ = -223,93$	2º modelo = 442DF443	77DNK79
<i>An. sawyeri</i>	$1^\circ = -256,22 / 2^\circ = -245,99 / 3^\circ = -244,19 / 4^\circ = -240,53 / 5^\circ = -239,91 / 6^\circ = -239,59 / 7^\circ = -235,96 / 8^\circ = -235,36 / 9^\circ = -230,97 / 10^\circ = -230,30$	2º modelo = 120ARE123	80DP81, 83F

Fonte: Elaborado pela autora.

Ao realizar a análise de *docking* para Aam1 (que é refratária a toxina binária), os modelos se apresentaram de forma distinta sem reprodutibilidade quando comparada à Cqm1. Mesmo delimitando as regiões de possíveis interações já descritas, o modelo BinAB-Aam1 com maior similaridade com o modelo BinAB-Cqm1 apresentava apenas um único aminoácido interagindo entre a Aam1 e a BinB (Figura 25). Além disso, a energia livre de ligação não mudou entre o primeiro e os outros modelos, permanecendo entre -236,11 e -220,31.

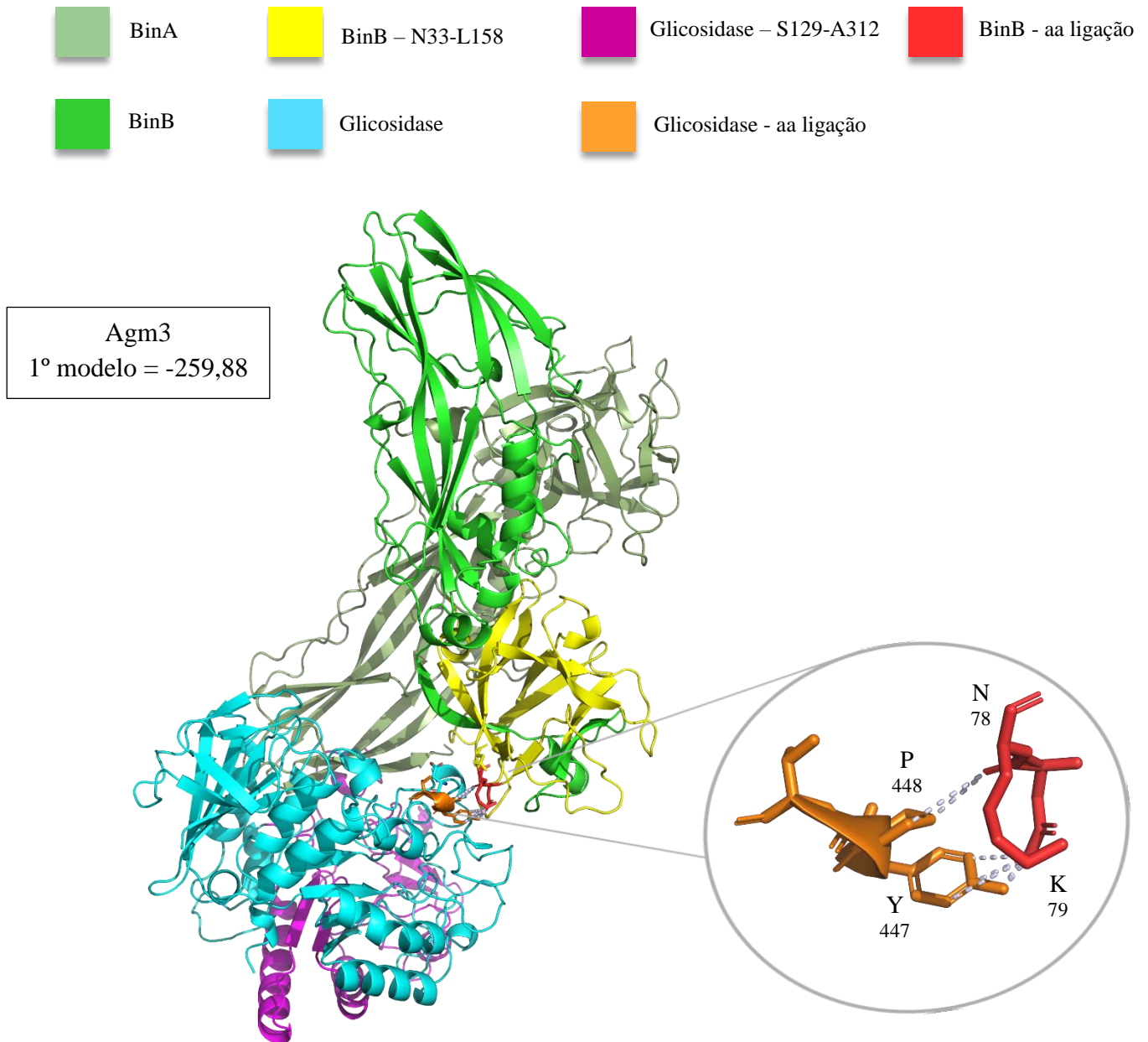
**Figura 25** - *Docking* molecular entre Aam1 e cristal BinAB.



**Legenda:** *Docking* entre Aam1 (em azul), com enfoque na região homóloga em Cqm1 - S129-A312 (em roxo) descrita como importante para interação à BinB, e os aminoácidos homólogos ao trecho 155PATGGG160 (em laranja). O cristal BinAB encontra-se na cor verde, onde a BinB está destacada em um tom de verde mais claro, com enfoque na região N33-L158 (em amarelo), e em vermelho encontram-se os aminoácidos que interagiram com a Aam1 durante o *docking*.

Para Agm3, nenhum dos dez modelos apresentados no *docking* se mostrou similar à Cqm1, e os modelos que demonstraram ligação com a região estabelecida da BinB apresentaram aminoácidos na porção C-terminal da proteína participando da interação. Além disso, em Agm3, quando comparado à Cqm1, existe uma maior quantidade de modelos sugerindo interações com aminoácidos da região C-terminal da BinA. Os modelos apresentaram pouca variação em relação à energia livre, o primeiro modelo apresentando energia de -259,88, sendo o escolhido para gerar a Figura 26.

Para as análises com as proteínas de *Anopheles* spp. investigadas foram utilizadas os mesmos parâmetros no controle positivo de ligação (Cqm1), delimitando a região de ligação em BinB (N33-L158), e a possível região homóloga a região de interação em Cqm1 (S129-A312). Essas especificações são usadas pela ferramenta HDOCK para melhorar os modelos gerados, sendo utilizadas como informações para produção do modelo e para clusterização dos resultados. No entanto os modelos gerados não são restritos a região de interação apresentada como dado de entrada para ferramenta, resultando assim em modelos para outras regiões, quando esses apresentam uma pontuação melhor (YAN et al., 2020). Para cada uma das proteínas foi escolhido um modelo de *docking* exposto na Figura 27, considerando os aminoácidos participantes na ligação e sua localização. Foram armazenados os dados de energias livres de cada modelo.

**Figura 26** - *Docking* molecular entre Agm3 e cristal BinAB.

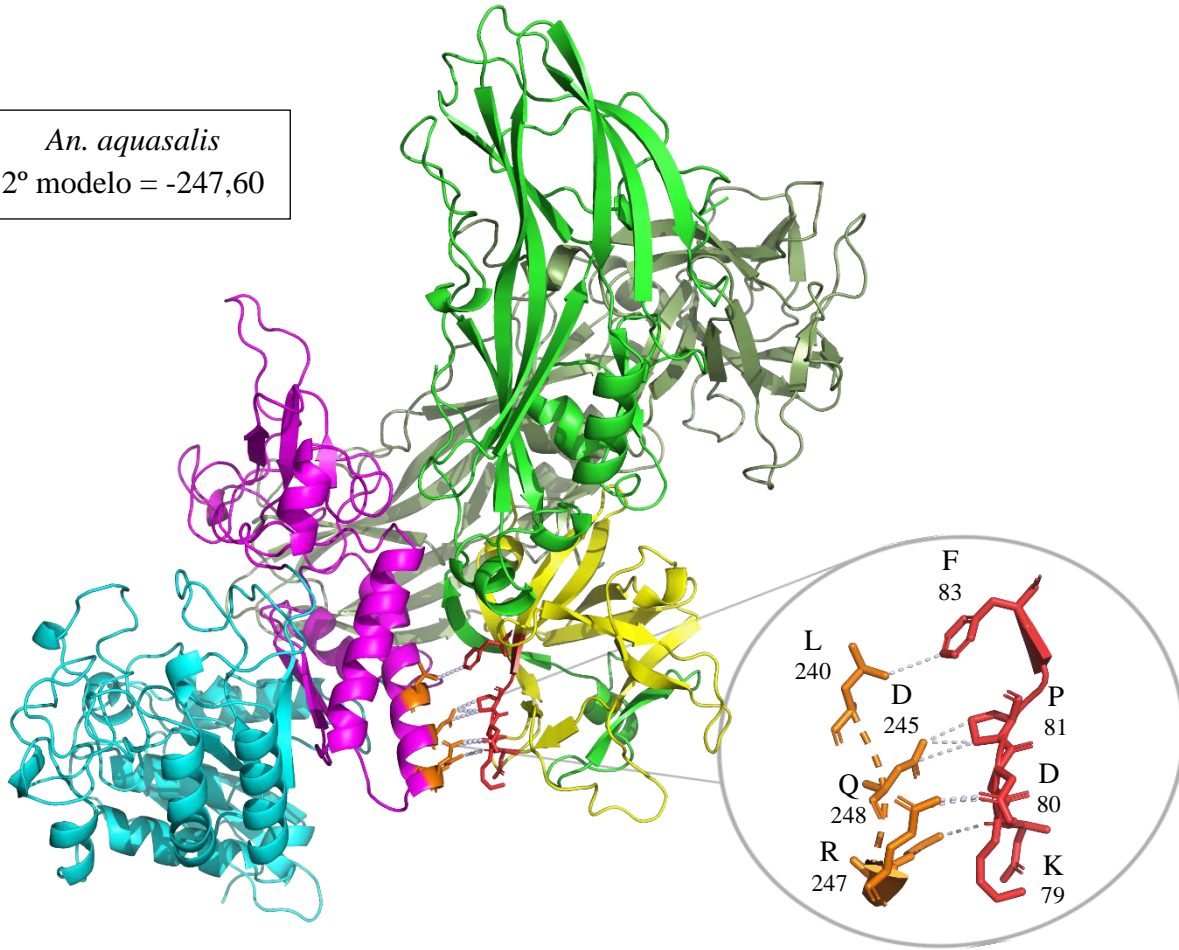
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** *Docking* entre Agm3 (em azul), com enfoque na região homóloga em Cqm1 - S129-A312 (em roxo) descrita como importante para interação à BinB, e os aminoácidos que apresentaram interação à BinB (em laranja). O cristal BinAB encontra-se na cor verde, onde a BinB está destacada em um tom de verde mais claro, com enfoque na região N33-L158 (em amarelo), e em vermelho encontram-se os aminoácidos que interagiram com a Agm3 durante o *docking*.

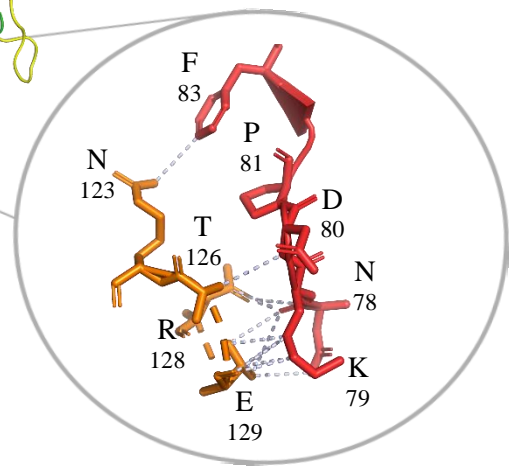
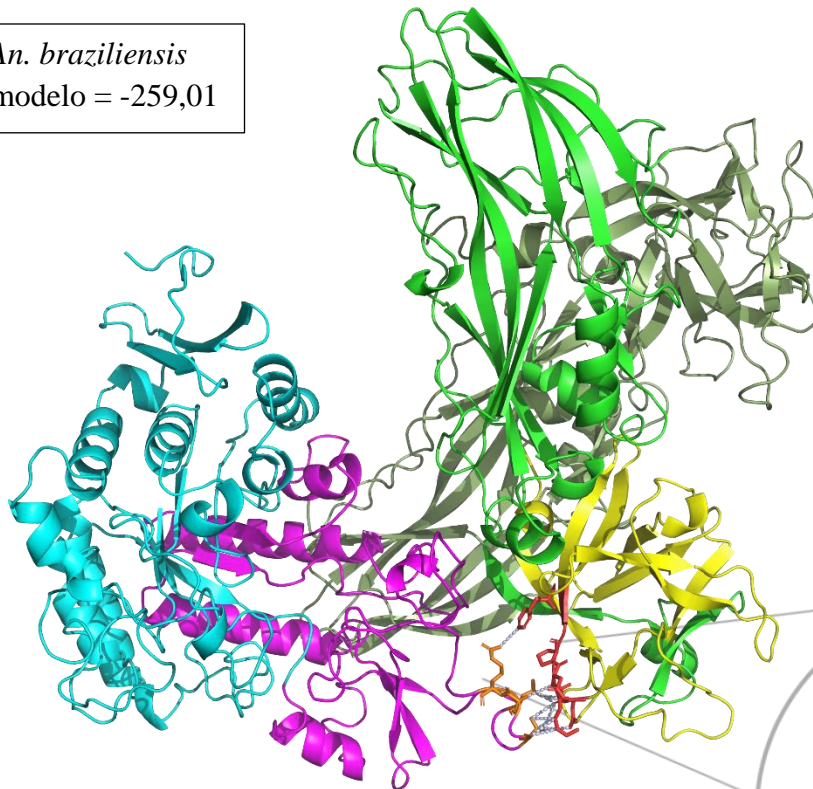
**Figura 27** - Docking molecular entre proteínas de *Anopheles* spp. e cristal BinAB.



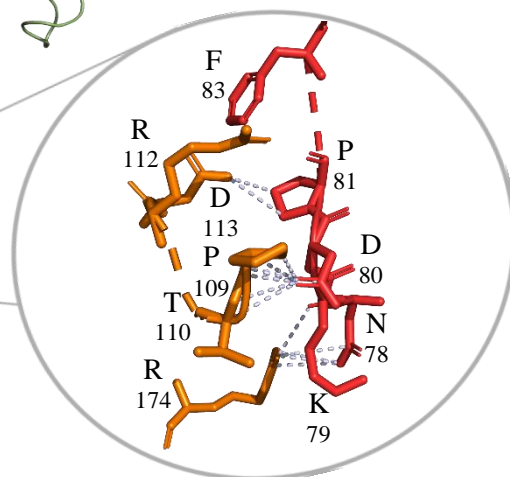
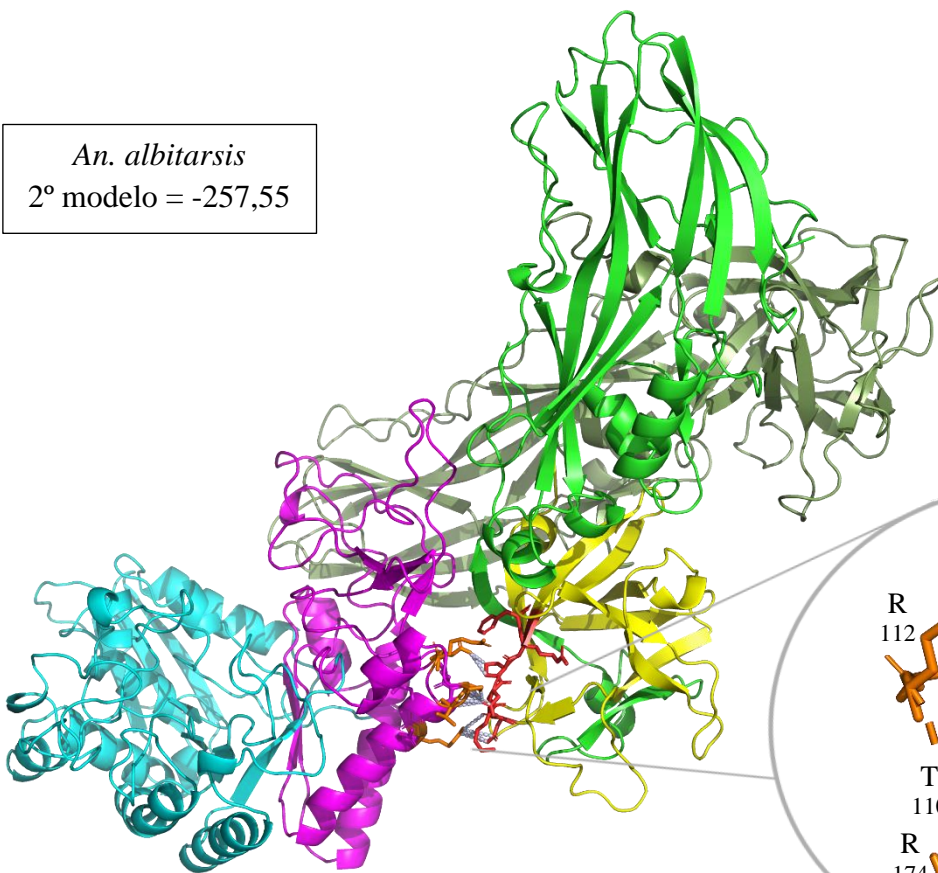
*An. aquasalis*  
2º modelo = -247,60



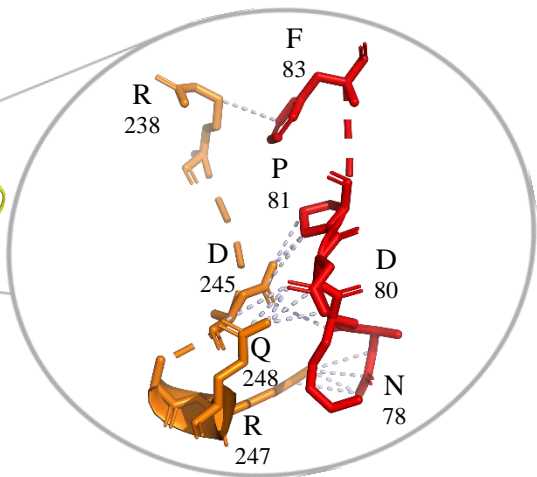
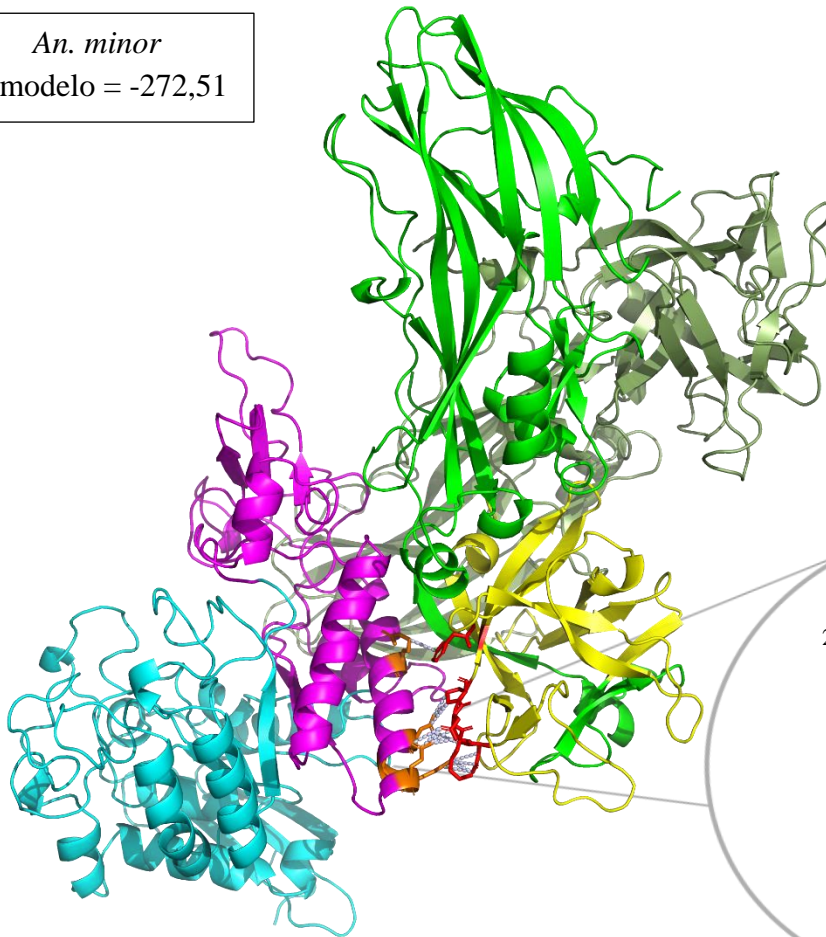
*An. braziliensis*  
2º modelo = -259,01



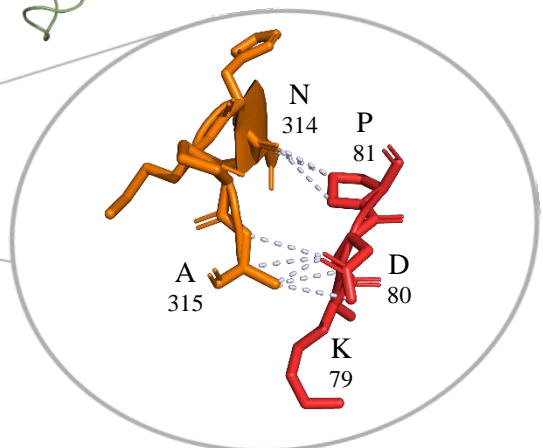
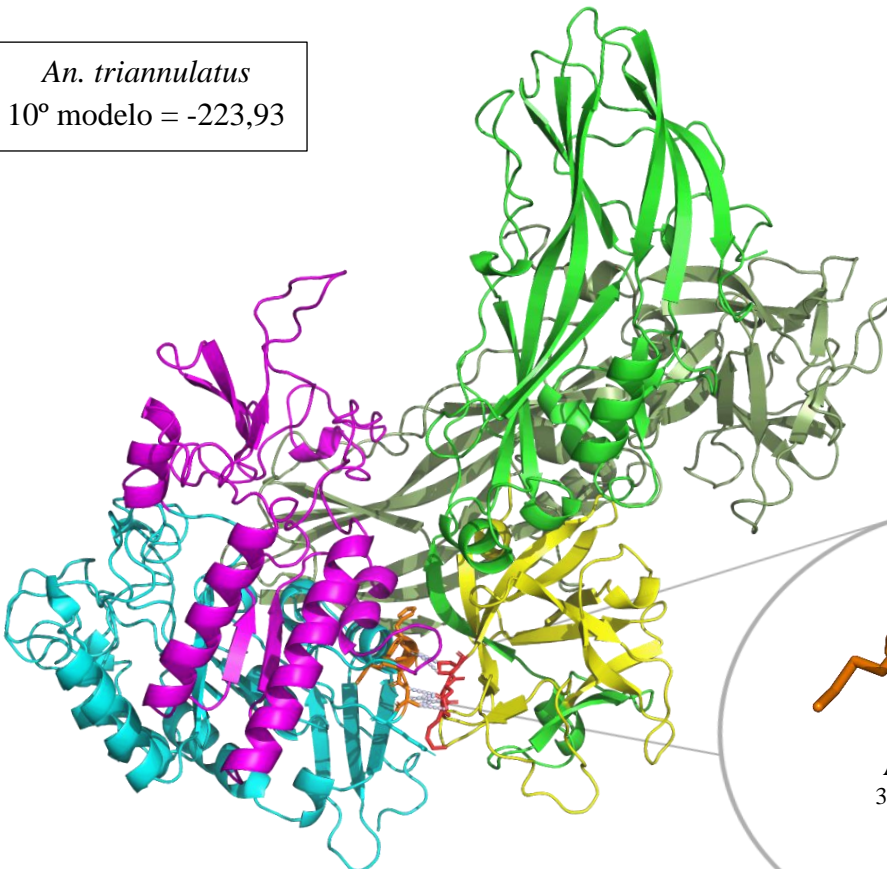
*An. albitarsis*  
2º modelo = -257,55



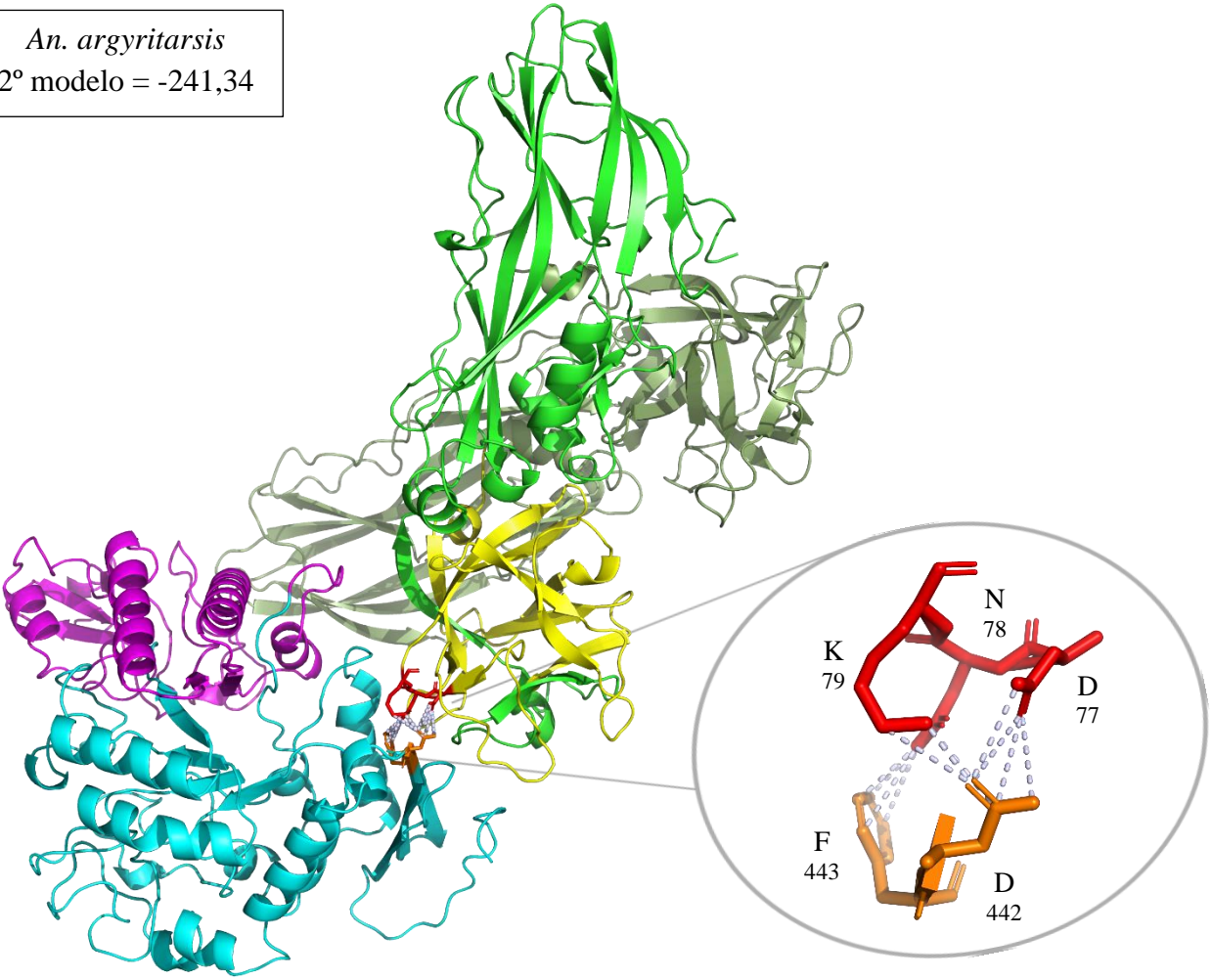
*An. minor*  
2º modelo = -272,51



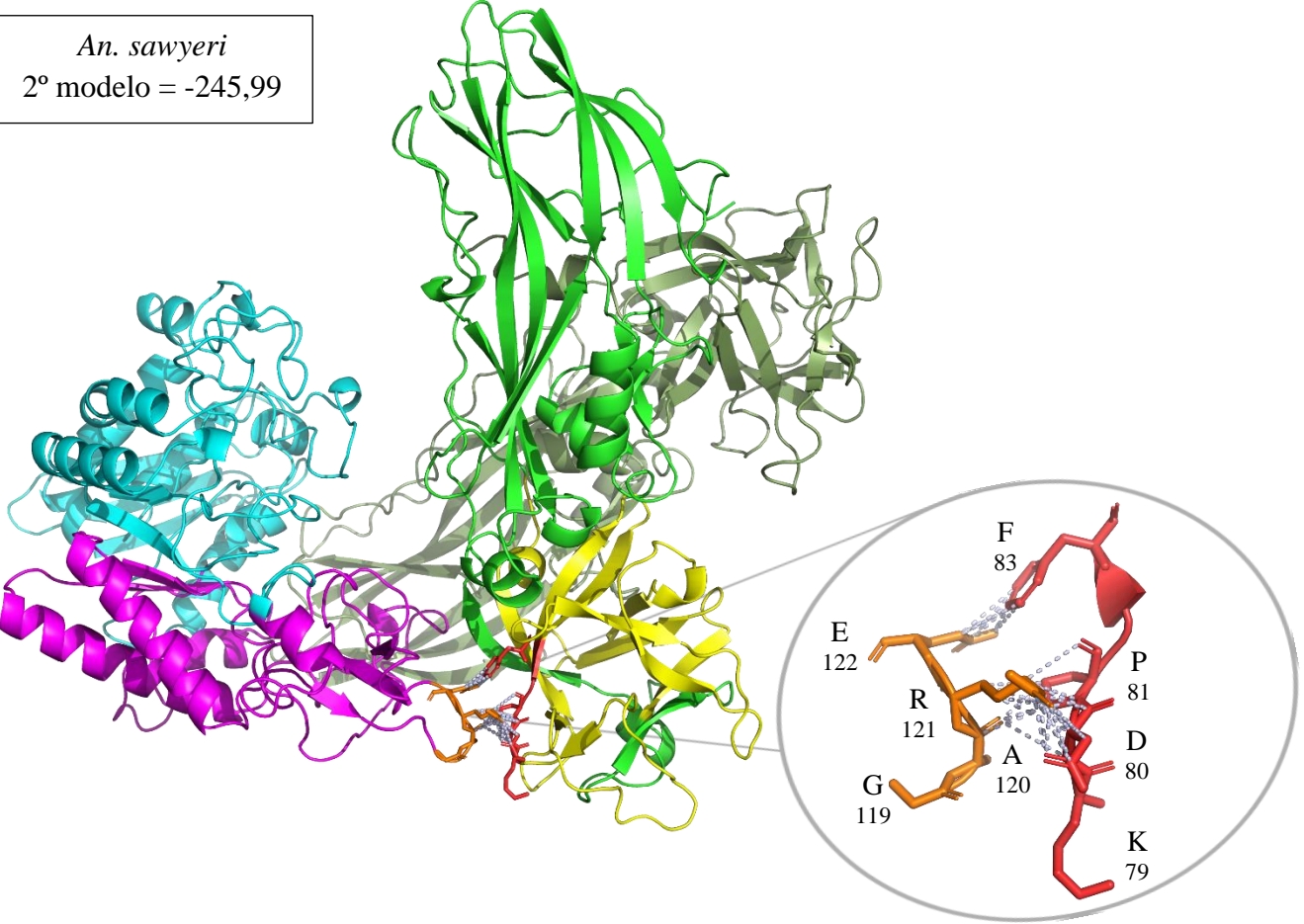
*An. triannulatus*  
10º modelo = -223,93



*An. argyritarsis*  
2º modelo = -241,34



*An. sawyeri*  
2º modelo = -245,99



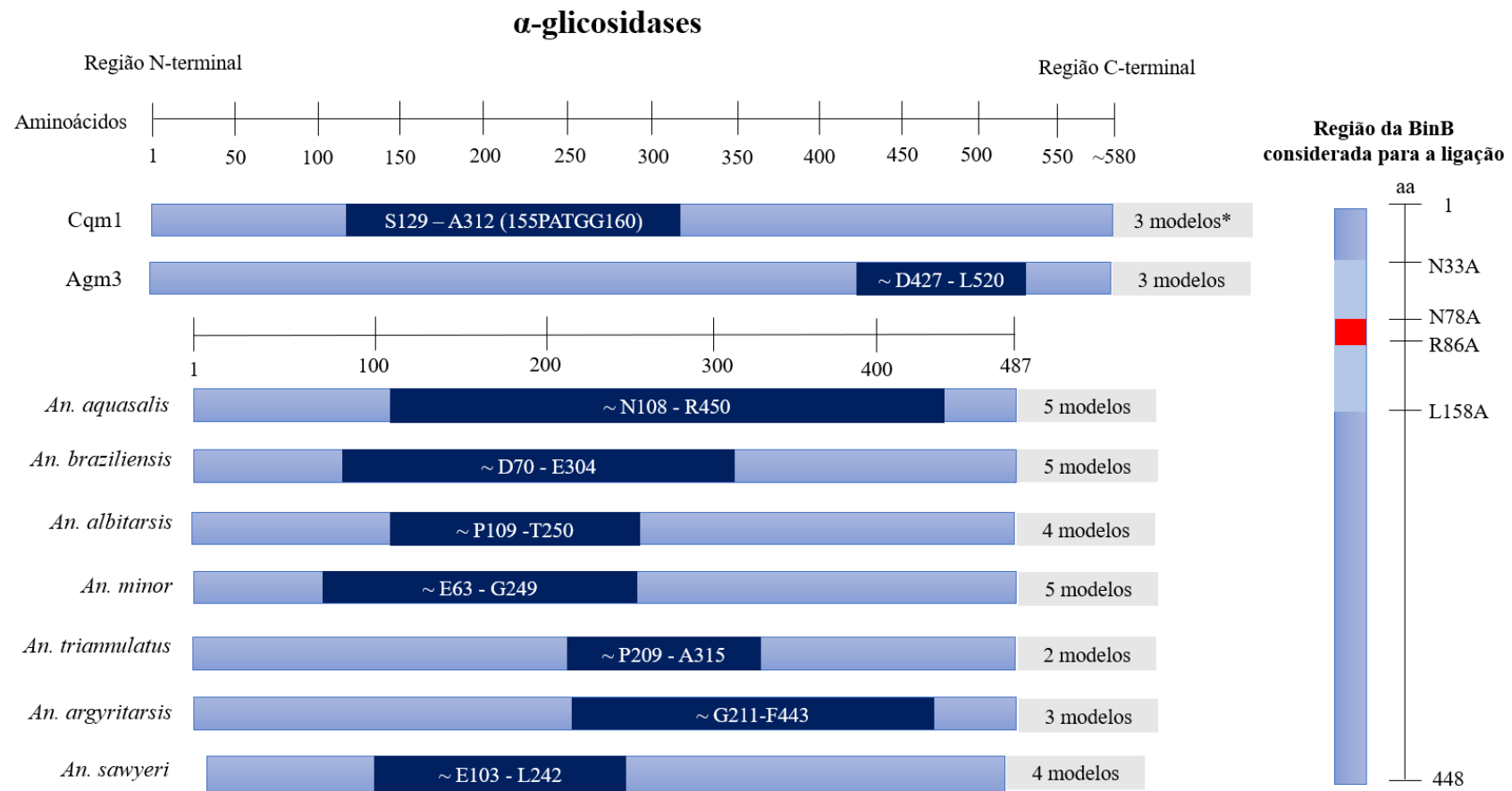


**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** *Docking* entre proteínas ortólogas à Cqm1 em *Anopheles* spp. (em azul), com enfoque na região homóloga em Cqm1 - S129-A312 (em roxo) descrita como importante para interação à BinB, e os aminoácidos que apresentaram interação à região definida da BinB (em laranja). O cristal BinAB encontra-se na cor verde, onde a BinB está destacada em um tom de verde mais claro, com enfoque na região N33-L158 (em amarelo), e em vermelho encontram-se os aminoácidos que interagiram com as proteínas durante o *docking*.

Diante dos resultados apresentados, foi organizado um diagrama com as regiões de interação descritas pelo *docking*, considerando os dez primeiros modelos (Figura 28). Com exceção de *An. argyritarsis*, é possível observar que o padrão de *docking* das espécies de *Anopheles* spp. se apresentou diferente quando comparado à Agm3, se assimilando à região de interação da Cqm1. Por ter delimitado as regiões de interação e considerado apenas os ligantes à porção N78-R86 da BinB, foi realizado uma repetição do *docking* sem delimitar regiões de interação.

**Figura 28** – Desenho esquemático das possíveis regiões de interação evidenciadas nas análises de *docking* molecular de  $\alpha$ -glicosidases de mosquitos com delimitação de regiões de interação para a BinB.



\*Modelos de *docking* que apresentam regiões similares de interação, considerando os 10 primeiros resultados.

**Legenda:** Comparativo entre os resultados apresentados nos dez primeiros modelos de *docking* envolvendo as regiões de interação de  $\alpha$ -glicosidases, com referência da Cqm1 e Agm, e das proteínas ortólogas de *Anopheles* spp. A região em BinB evidenciada como região de ligação aos receptores foi N33-L158, com enfoque nos aminoácidos 78NKDPRFIRF87.

Diante da diferença nos resultados apresentados em relação a interação da Agm3 e cristal BinAB, foram realizadas repetições de *dockings* sem delimitar regiões de interação. Alguns dos novos modelos gerados apresentaram aminoácidos similares aos modelos com delimitação de regiões, enquanto outros apresentaram novas regiões interagindo, considerando também aqueles que interagiram com a subunidade BinA (Quadro 11). Para gerar as imagens foram escolhidos os modelos com as menores energias livres ou com maior semelhança entre os aminoácidos envolvidos na interação com cristal BinAB em relação aos modelos delimitados, e a representação da interação com o Cristal BinAB encontra-se na Figura 29.

Foi realizado uma repetição do *docking* de Cqm1 e o cristal BinAB sem delimitação de regiões de interação, sendo possível observar que nenhum modelo corrobora com os achados *in vitro* já citados, ressaltando a importância das duas formas de análise. Para *Anopheles*, considerando a escassez de informações de possíveis aminoácidos de interação, ambos os parâmetros são importantes para futuras análises *in vitro*, principalmente considerando a participação da subunidade BinA.

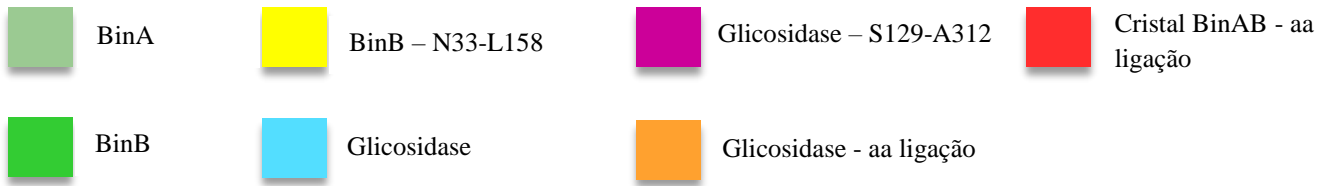
**Quadro 11** – Energia livre dos modelos de *docking* molecular e possíveis regiões de interação sem delimitação de regiões.

Espécie	Energia livre dos modelos	Região de interação do modelo escolhido	Região de interação na BinA	Região de interação na BinB
Agm3	1° = -243,76 / 2° = -241,51 / 3° = -238,97 / 4° = -236,80 / 5° = -234,78 / 6° = -233,72 / 7° = -232,15 / 8° = -231,83 / 9° = -229,91 / 10° = -225,11	1° modelo = W252A, D262A, I304A, 1344A, 347DE348, 354PAR365, D522A, 524VN525, 527PA528, H550A	H33A, 35PE36, M43A, E45A, 87IYT89, S91A, D254A, T247A	153NKT155, A174A, I176A, 178PI179
<i>An. aquasalis</i>	1° = -243,99 / 2° = -243,10 / 3° = -242,74 / 4° = -235,37 / 5° = -234,90 / 6° = -234,43 / 7° = -234,43 / 8° = -232,61 / 9° = -232,41 / 10° = -231,78	2° modelo = N121A, 124SV125, W211A, I299A, 265EN266, R269A, I299A, Q204A, 307DF308, 311NH312	T77A, 86DIYT89, D118A, R120A, H125A, 130PS131, 134YYTN137	Y180A
<i>An. braziliensis</i>	1° = -254,89 / 2° = -247,44 / 3° = -239,37 / 4° = -237,99 / 5° = -236,38 / 6° = -234,62 / 7° = -	1° modelo = N121A, T126A, N134A, P170A, R174A,	352HF353, S355A, 306TEN308,	78NK79, 195SFYA198

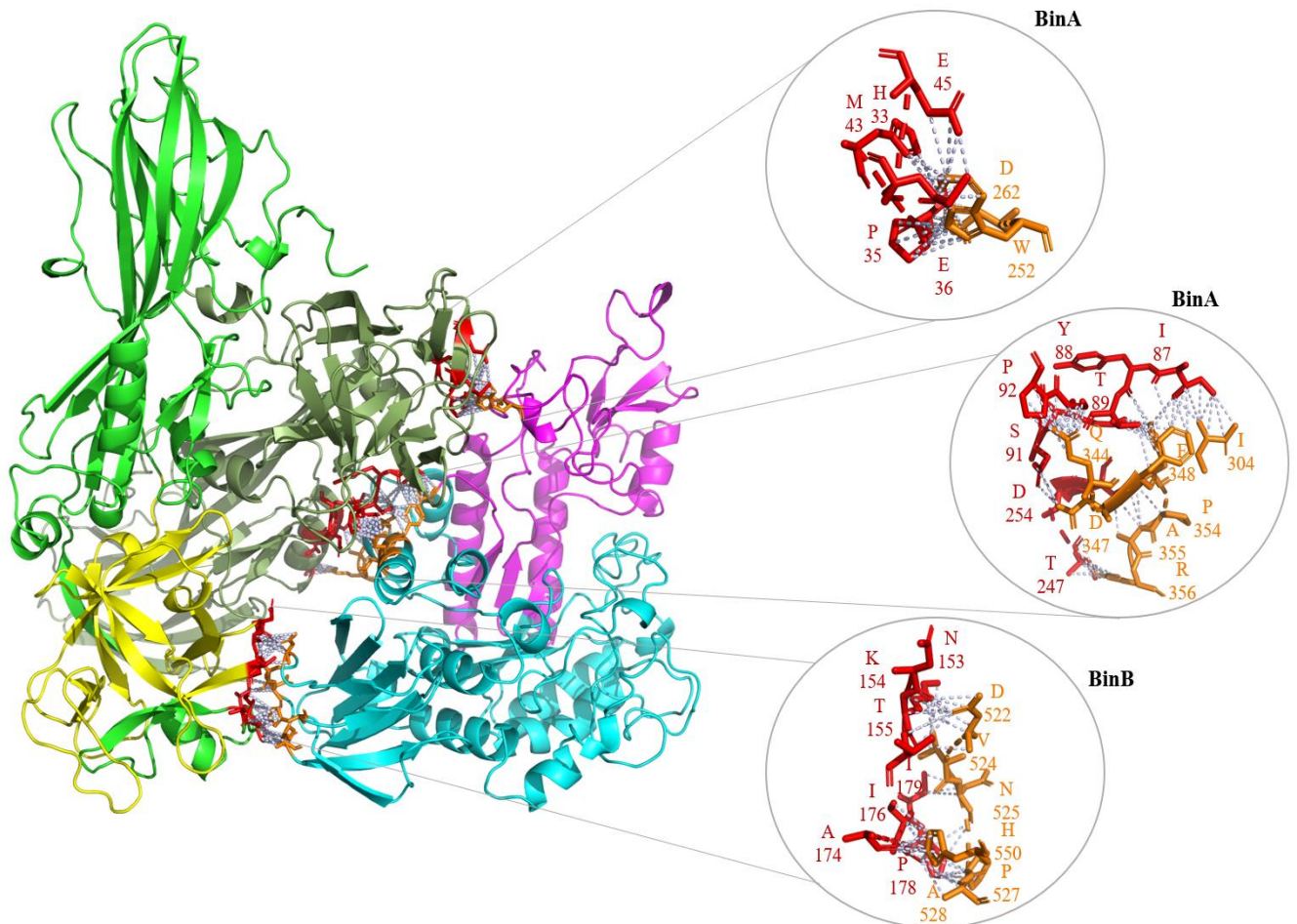
	234,44 / 8° = -230,02 / 9° = - 228,41 / 10° = -225,72	D207A, 209PP210, V235A, G238A, L242A		
<i>An. albitarsis</i>	1° = -256,07 / 2° = -240,57 / 3° = - 239,22 / 4° = -234,96 / 5° = - 233,83 / 6° = -230,65 / 7° = - 229,86 / 8° = -229,58 / 9° = - 227,60 / 10° = -226,97	1° modelo = 212YGP214, K303A, D307A, N311A, M313A, 315AR316, 446RT447	G77A, 80AT81, L93A, N112A	P109A, Y111A, N115A, 122RH123, T125A, R129A
<i>An. minor</i>	1° = -279,65 / 2° = -271,78 / 3° = - 255,54 / 4° = -246,11 / 5° = - 242,34 / 6° = -231,15 / 7° = - 229,61 / 8° = -227,82 / 9° = - 227,67 / 10° = -226,61	2° modelo = G170A, 173EL174, 177TR178, 210PGW212, D222A, R238A, L242A, D245A, 247QR248	R349A, 352HF353	78NKDP81, 195SFYA198, K256A
<i>An. triannulatus</i>	1° = -240,30 / 2° = -238,08 / 3° = - 237,70 / 4° = -231,86 / 5° = - 230,21 / 6° = -230,17 / 7° = - 226,99 / 8° = -226,75 / 9° = - 226,42 / 10° = -226,35	1° modelo = 213GD214, 216SSYD129, 295GD296, 387STI289, 408PT409, 413AM414, S417A	T169A, V171A, R349A, H352A, 355SE356	197YA198, N248A, K256A, N375A, 377EI378
<i>An. argyritarsis</i>	1° = -244,49 / 2° = -242,61 / 3° = - 241,31 / 4° = -236,62 / 5° = - 234,35 / 6° = -233,59 / 7° = - 232,29 / 8° = -231,67 / 9° = - 231,24 / 10° = -231,00	1° modelo = 45ASPLR49, S56A, 62QP63, E97A, Q99A, 371EQF373, S387A, W399A, Y406A, P408A, M414A	352HF353 355SE356	D100A, 195SFYA198, N248A, 252SD253, F257A, I378A
<i>An. sawyeri</i>	1° = -242,70 / 2° = -239,86 / 3° = - 237,50 / 4° = -236,13 / 5° = - 235,99 / 6° = -235,61 / 7° = - 233,53 / 8° = -233,13 / 9° = - 231,98 / 10° = -231,55	2° modelo = 120ARE123, Q282A, D286A, 288KSD290, N292A, G295A, S298A, F302A	172LS173, Y350A, 352HF353	K51, 80DP81, 83F, S195A, 197YF198

Fonte: Elaborado pela autora.

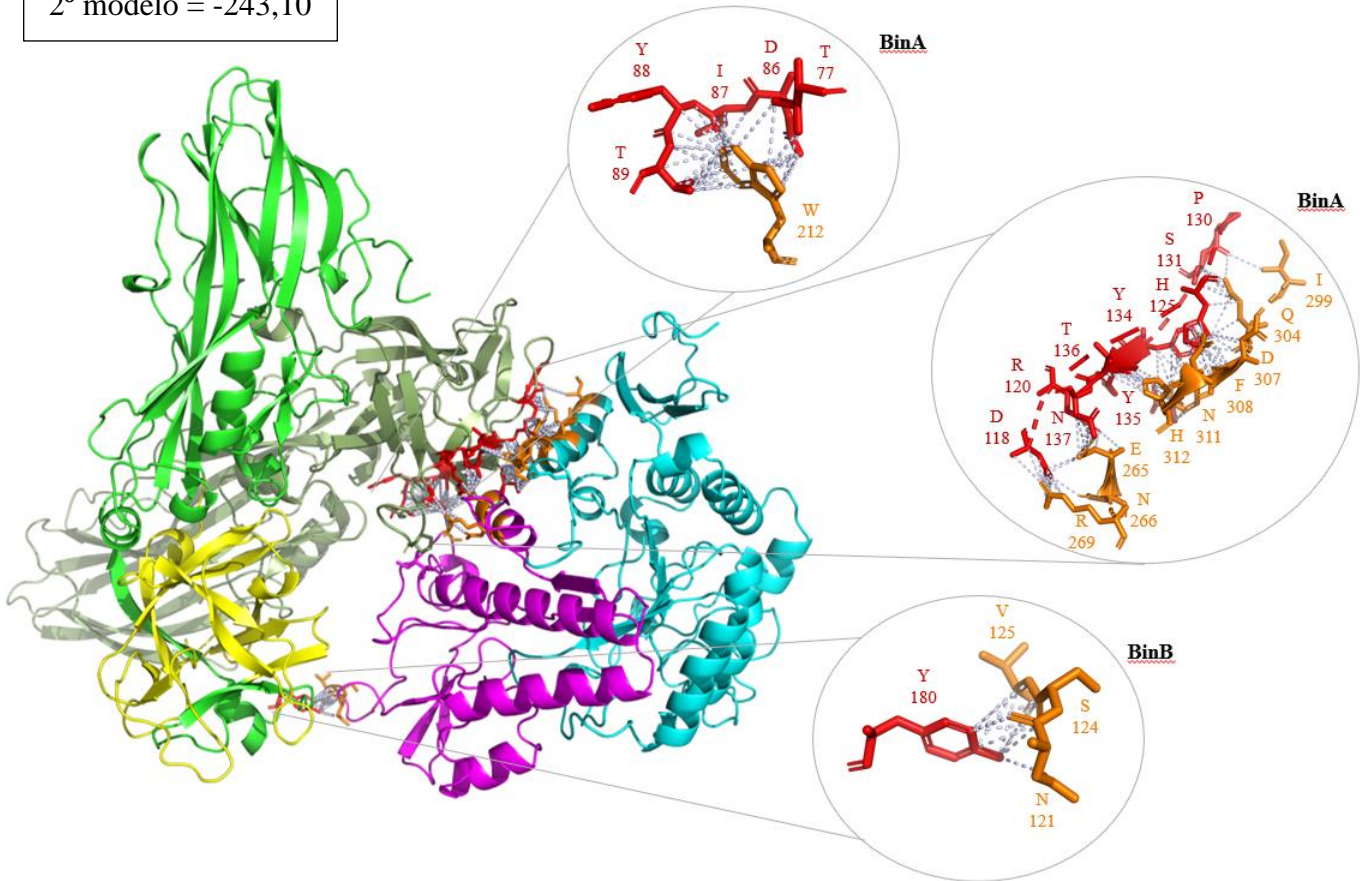
**Figura 29** - Docking molecular entre Agm3, proteínas de *Anopheles* spp e cristal BinAB sem delimitação de regiões.



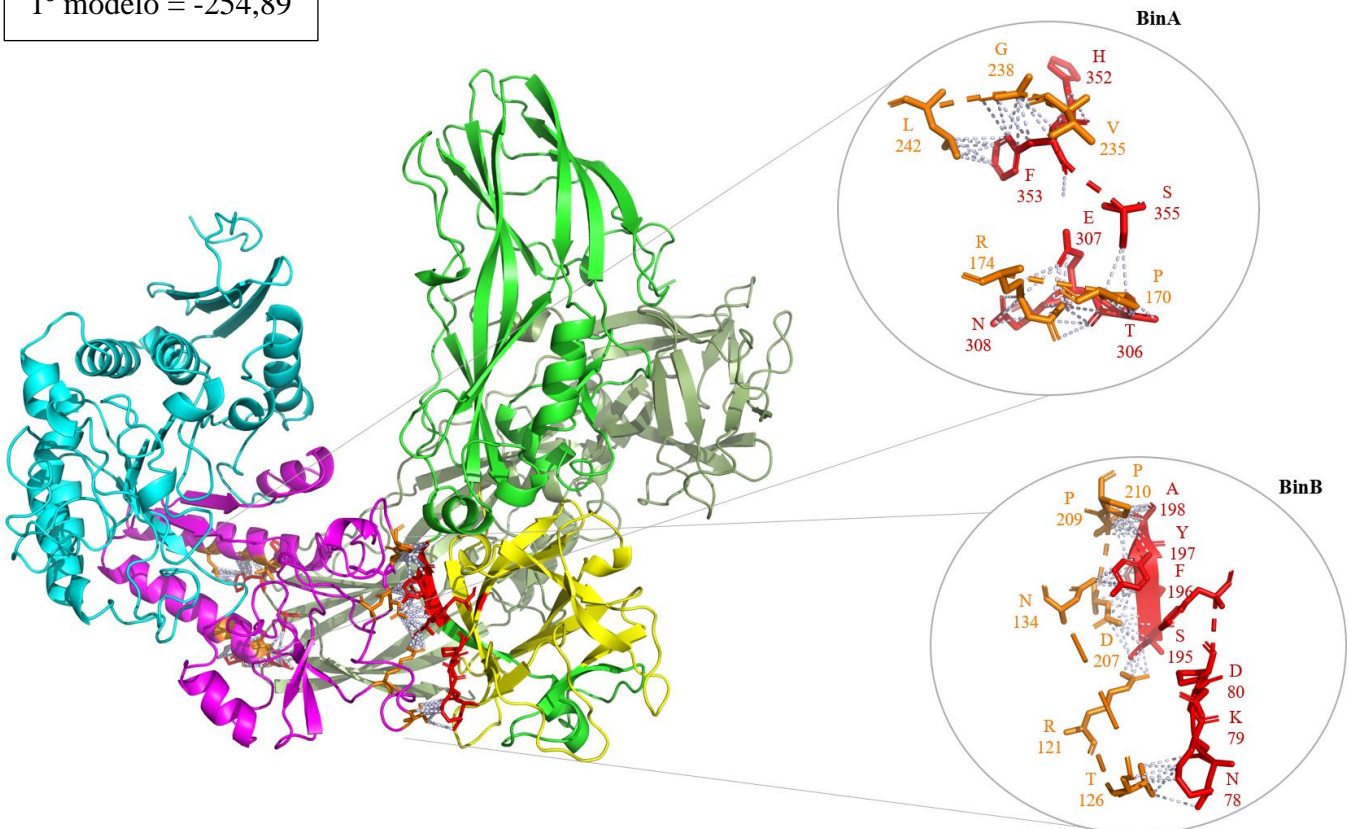
Agm3  
1º modelo = -246,76



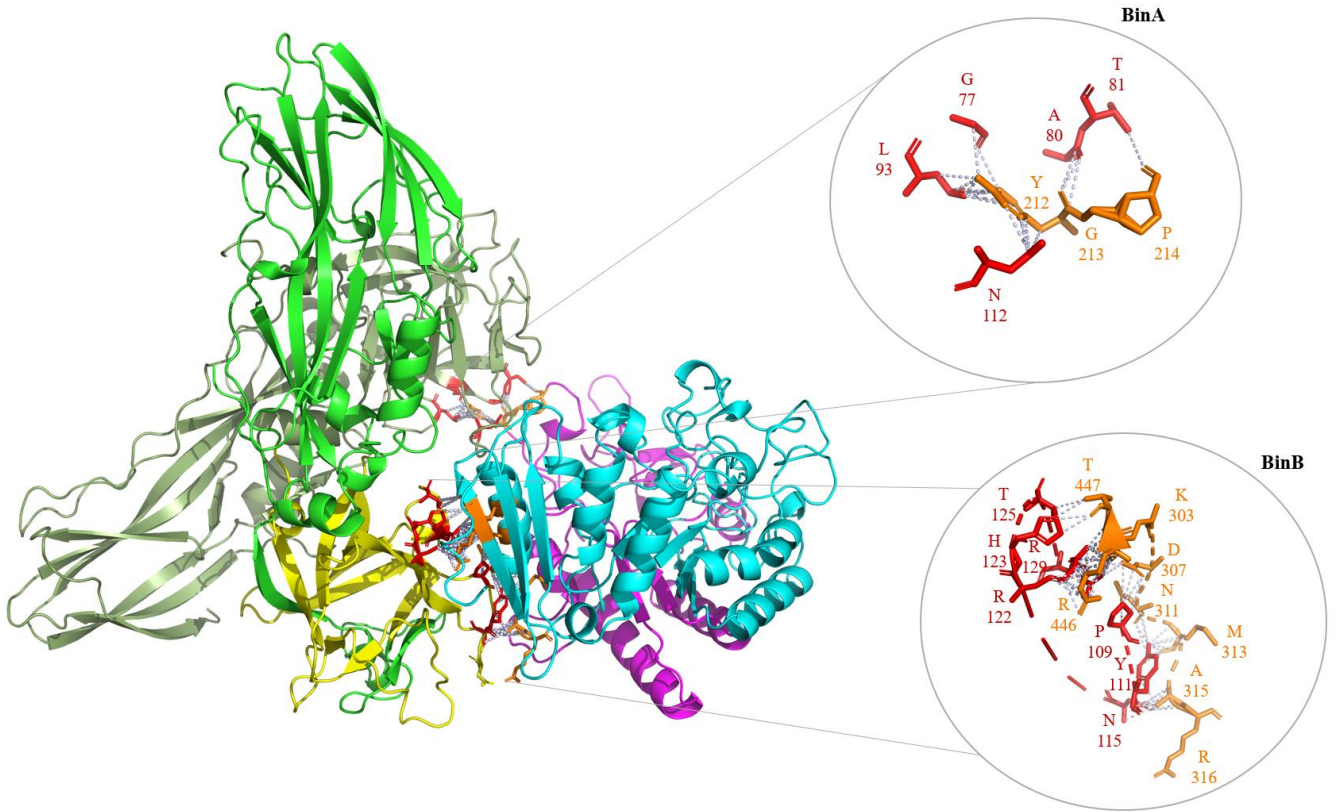
*An. aquasalis*  
2º modelo = -243,10



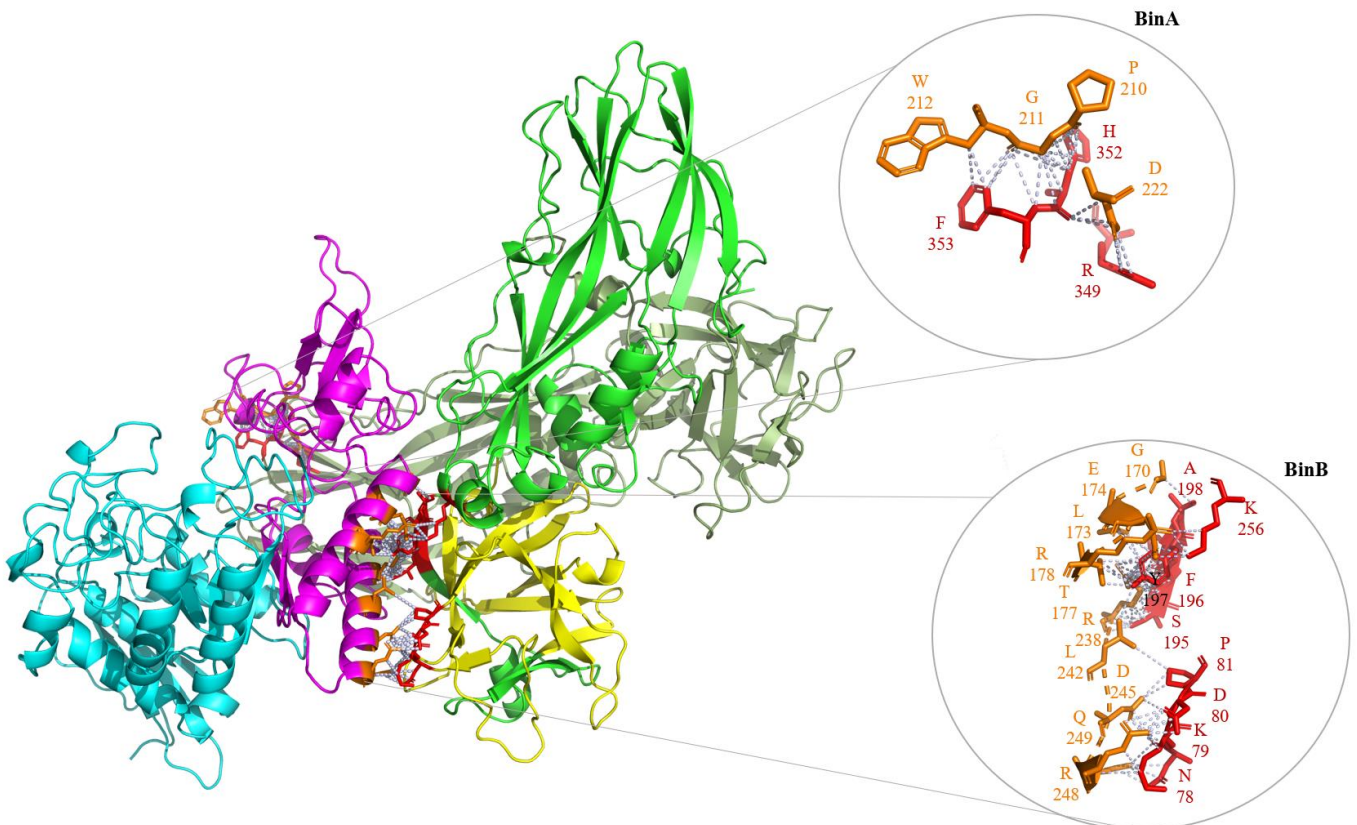
*An. brasiliensis*  
1º modelo = -254,89



*An. albitarsis*  
1º modelo = -256,07

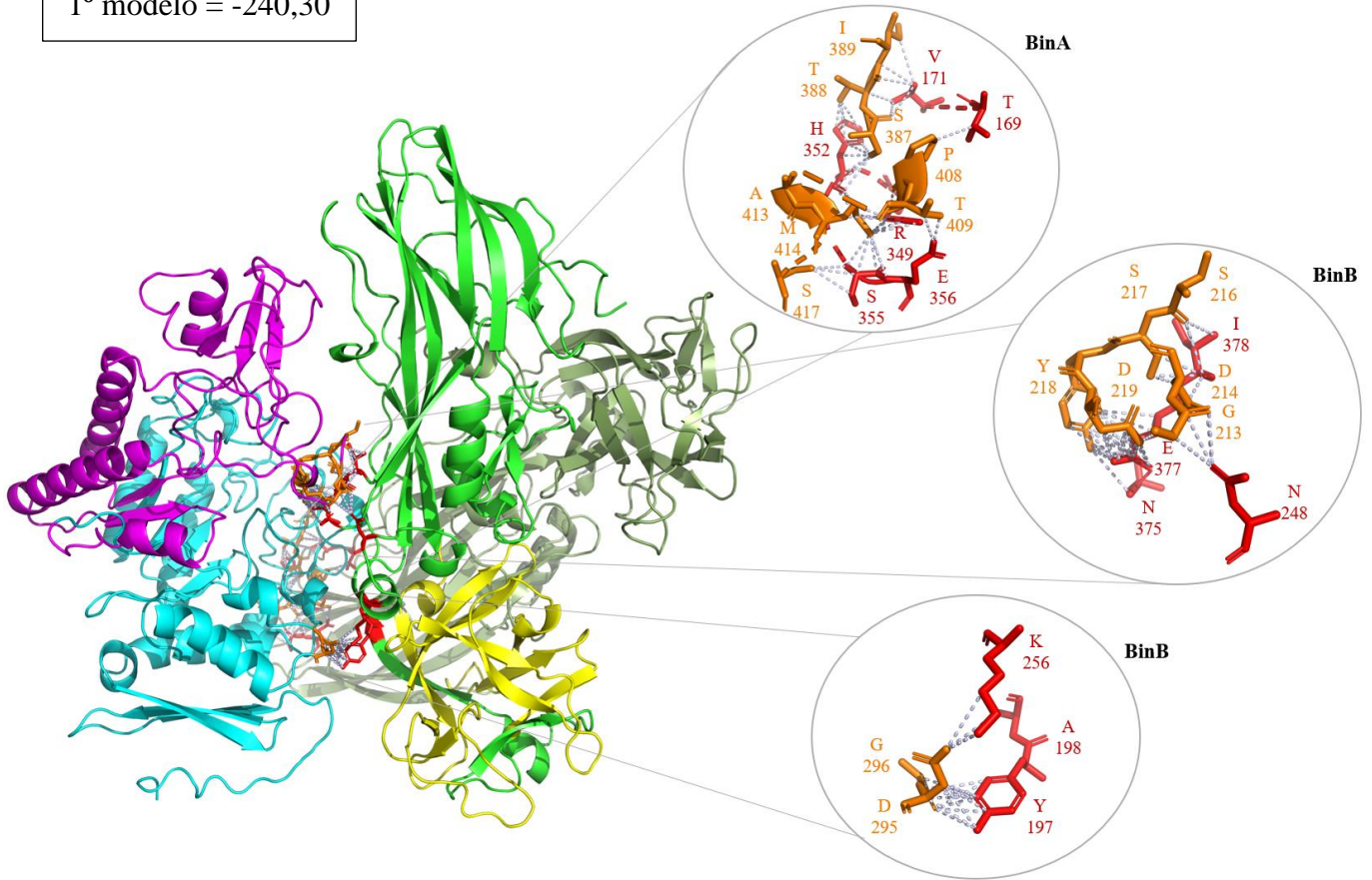


*An. minor*  
2º modelo = -271,78

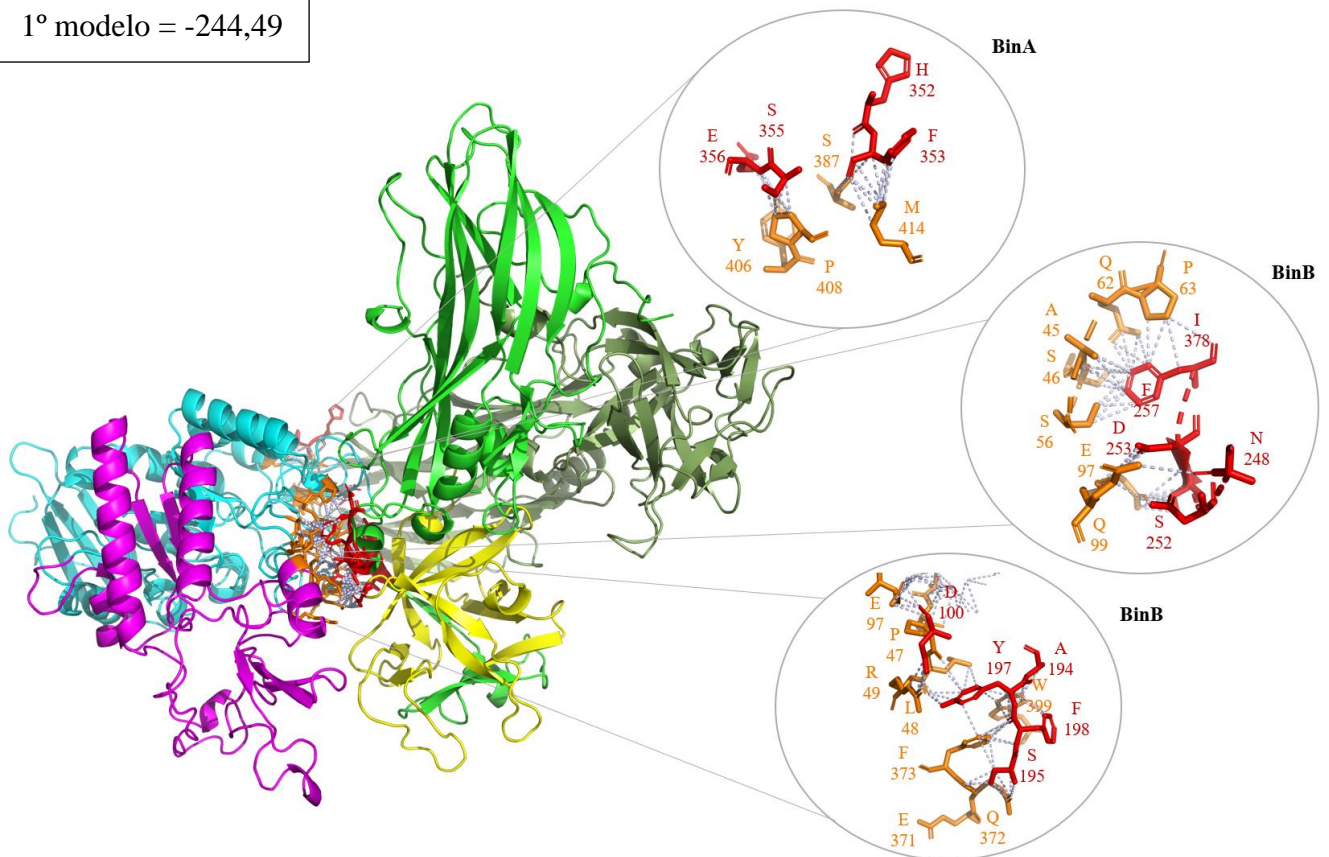




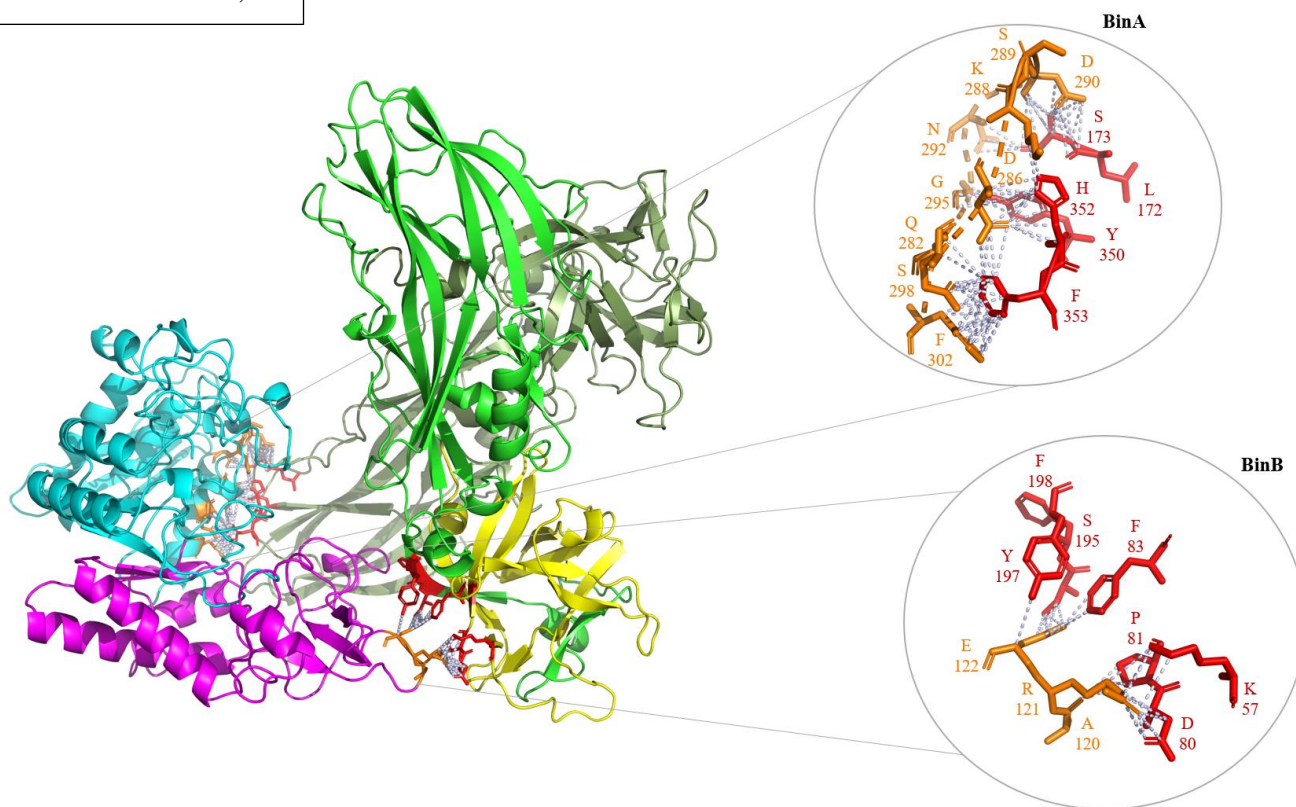
*An. triannulatus*  
1° modelo = -240,30



*An. argyritarsis*  
1° modelo = -244,49



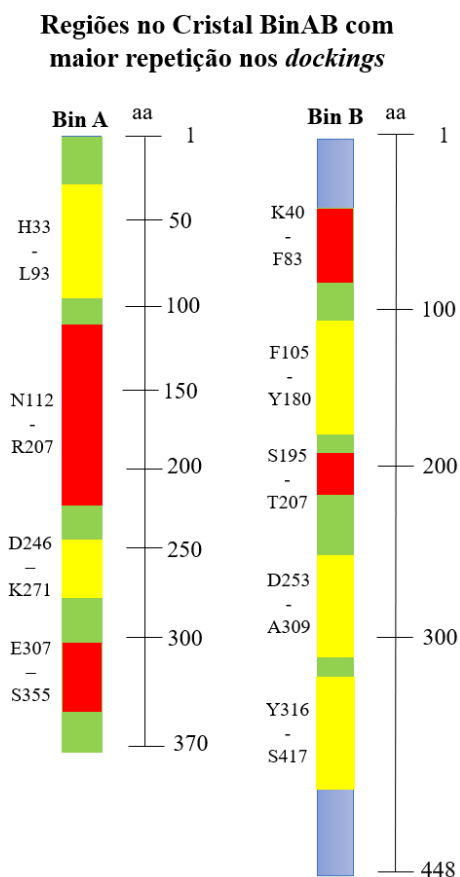
*An. sawyeri*  
1º modelo = -242,70



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** *Docking* entre proteínas de *Anopheles* (em azul), com enfoque na região homóloga em Cqm1 - S129-A312 (em roxo) descrita como importante para interação à BinB, e os aminoácidos com interação ao Cristal BinAB em laranja. O cristal BinAB encontra-se na cor verde, onde a BinB está destacada em um tom de verde mais claro, com enfoque na região N33-L158 (em amarelo) e BinA em verde mais escuro, e em vermelho encontram-se os aminoácidos que interagiram com as proteínas de *Anopheles* durante o *docking*.

Apesar de apresentar algumas diferenças consideráveis entre as análises, algumas regiões do Cristal BinAB se apresentaram com certa frequência entre os modelos sem delimitação. Na BinA, aminoácidos da região C-terminal apresentaram interação em algumas espécies, principalmente os aminoácidos 349RY350, 352HF353 e 355SE356, que se repetiram para a maioria dos modelos. Para BinB, além dos aminoácidos já encontrados nos modelos com delimitação, a região 195SFYA198 apareceu nos *dockings* de algumas espécies, assim como o aminoácido K256A. Algumas destas regiões encontram-se descritas na Figura 30.

**Figura 30** - Frequência de interação dos aminoácidos do Cristal BinAB no *docking* sem delimitação.

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Legenda:** Os aminoácidos da região azul não apareceram com frequência, os aminoácidos das regiões verdes aparecem em poucos modelos, nas amarelas apareceram em alguns modelos, e nas regiões vermelhas apresentaram alta frequência entre os dez primeiros modelos de cada interação.

## 9 DISCUSSÃO

Com o registro de um surto de malária em áreas não endêmicas no Brasil e detecção da presença de algumas espécies de anofelinos nas regiões de transmissão, foi possível investigar aspectos importantes nestas espécies que podem ser utilizados como base para futuros estudos envolvendo susceptibilidade ao *L. sphaericus*, ressaltando a presença de  $\alpha$ -glicosidases que podem atuar como receptores do larvicida, considerando o contexto de Manejo integrado de vetores junto a outras formas de controle de espécies de *Anopheles* (WILSON et al., 2020).

Ao amplificar as regiões de interesse no DNA total de mosquitos adultos, obtivemos as sequências pretendidas com tamanho esperado, e após sequenciamento e construção das sequências proteicas de cada espécie foi possível observar que as mesmas são ortólogas à Cqm1 e apresentaram mais de 70% de identidade e similaridade à  $\alpha$ -glicosidases já estabelecidas, possibilitando o uso dessas sequências para as análises *in silico* subsequentes.

As sequências proteicas obtidas, mesmo com perda de aminoácidos nas porções N e C-terminal, contemplam as regiões consideradas importantes para ligação descritas na Cqm1, com aproximadamente 80% de representação. É possível observar nessas sequências um padrão de N-glicosilação distinto, tanto nas  $\alpha$ -glicosidases já descritas (Cqm1, Aam1 e Agm3), quanto nas espécies de *Anopheles* spp., e o padrão de N-glicosilação deve ser considerado por se tratar de uma modificação pós-traducional (WALSKI et al., 2017), sendo importante a avaliação desse parâmetro em futuros estudos.

As sequências das sete espécies de *Anopheles* spp. apresentaram sítios catalíticos com domínios conservados para a família AmyAc\_maltase, assim como Cqm1, o que sugere que estas proteínas tenham atividade catalítica para  $\alpha$ -glicosidases (KRASIKOV et al., 2001). Em relação às sequências de aminoácidos das maltases de *Anopheles*, é possível observar que existe uma conservação significativa em todas, que apresentam mais de 80% de identidade e similaridade quando comparadas à proteína Agm3. É importante destacar que, apesar de pertencer ao mesmo gênero, as espécies de estudo são encontradas principalmente em regiões da América Central e do Sul, enquanto *An. gambiae* é uma espécie que se concentra no continente Africano, e devido questões evolutivas e geográficas podem apresentar diferenças, como é possível observar através da análise da filogenia (HARBACH, 2013).

As espécies de *Anopheles* spp. investigadas possuem escassez de informações em diversos aspectos, como biológicos, comportamentais, bioquímicos e em bancos de dados, principalmente no que se diz respeito a sequências de nucleotídeos. As únicas com representação de genoma é *An. darlingi* e *An. aquasalis*, enquanto as outras possuem

informações principalmente sobre sequências mitocondriais. Inclusive, algumas destas espécies, como *An. minor* e *An. sawyeri*, não possuem um vasto registro de ocorrência, mas foram encontrados em locais não descritos anteriormente, mostrando a necessidade de maior investigação (GOMES et al., 2020). Em relação à *An. gambiae*, apesar de ter a  $\alpha$ -glicosidase descrita por Opota et al. (2008), não se sabe quais aminoácidos da Agm3 estão envolvidos na interação com o cristal BinAB. Em relação ao cristal, apesar de se saber que a ambas as subunidades possuem um papel fundamental na interação, também não há descrição de aminoácidos importantes nesta interação (CHARLES et al., 1997).

Depois de identificadas as sequências de aminoácidos das proteínas de interesse, foi realizada a predição das estruturas com base na estabelecida de Cqm1, demonstrando que existe uma similaridade considerável entre estas maltases. Uma diferença é encontrada na região referente à 155PATGGG160, descrita como importante para ligação à Bin por Ferreira et al. (2014), tanto em relação à sequência como a forma que se apresenta na estrutura. Mesmo com as diferenças, é possível observar que as espécies pertencentes ao mesmo subgênero (*Nyssorhynchus*) possuem um padrão de aminoácidos similar nesta região, enquanto as espécies de diferentes subgêneros, como *Anopheles minor* (subgênero *Anopheles*) e *An. gambiae* (subgênero *Cellia*), possuem maiores diferenças nesta região.

Na análise estrutural, foi demonstrada uma diferença importante na região 155PATGGG160, mencionada por Ferreira et al., 2014, que é a formação de um loop exposto em Cqm1 que possa estar envolvido no processo de ligação, e ao predizer as estruturas de Aam1 e Agm3 é possível observar uma mudança na conformação deste loop. As espécies de *Anopheles* possuem diferentes conformações na respectiva região, onde apenas *An. argyritarsis* possui uma conformação parecida com Aam1 e Agm3, e *An. sawyeri* possui uma conformação similar à Cqm1, e inclusive apresentou um perfil de *docking* similar à Cqm1, com aminoácidos próximos daqueles anteriormente descritos.

Nos ensaios de *docking*, a primeira interação analisada para guiar as próximas análises foi a de Cqm1 e a toxina binária, utilizada com seus dois heterodímeros para que o perfil de ligação seja o mais real possível, considerando que pode haver mudanças na conformação dos ligantes, principalmente *in vivo*. É possível visualizar no primeiro modelo uma compatibilidade com a região de ligação em Cqm1 descrita por Ferreira et al., 2014, inclusive ressaltando os aminoácidos 159GG160, e a maior parte dos modelos sugeridos envolveu a região S129-A312. A energia livre do primeiro modelo dentro do *score* de resultados BinAB-Cqm1 foi utilizada como parâmetro para os demais *rankings*, considerando a sua similaridade com as regiões descritas anteriormente.

No que diz respeito à BinB, o resultado corroborou com a região descrita por Singkhamanan et al. (2010) e Romão et al. (2011), porção entre N33-L158, e fisicamente próximo das regiões 85IRF87 e 147FQFY150, descrita pelos autores. Como são regiões muito próximas, existe a possibilidade que a mutação de alguma dessas sequências possa potencialmente ter influência significativa o padrão de ligação com as  $\alpha$ -glicosidases. Assim, ao analisar os modelos propostos das próximas espécies, foi feita uma análise melhores modelos de cada espécie, considerando os aminoácidos que interagem com a porção da BinB demonstrada no *docking* da Cqm1 (78NKDPRF83), e dentro ou próximo da região compatível de interação à Cqm1 descrita por Ferreira et al., 2014 (S129-A312).

Os modelos de *docking* referentes à Aam1 apresentaram valores discretamente maiores de energia livre quando comparado à Cqm1, corroborando com resultados *in vivo*. Um dos modelos apresentou um padrão similar de ligação à Cqm1, mas envolvendo apenas um aminoácido, e esta interação foi utilizada como controle negativo, considerando sua refratariedade. É importante ressaltar que mesmo que sejam descritas possíveis regiões de interação *in silico*, podem ocorrer uma série de interferências *in vivo* nesta interação, como as mudanças pós-traducionais.

Dentre todas as análises de  $\alpha$ -glicosidases já descritas, o perfil de *docking* de Agm3 se apresentou como o mais distinto, e os aminoácidos envolvidos na maioria dos modelos de análise se apresentou na porção C-terminal. Na literatura, não é bem descrito como a ligação entre Agm3 e a Bin ocorre, sendo apresentadas apenas evidências sobre um perfil de afinidade mais fraco quando comparado à *Culex*, descrito em Silva-Filha et al. (1997), e em termos de ligação ambas as subunidades da Bin se ligam, porém com menor afinidade, como descrito em Charles et al. (1997), como já citado.

Em relação às espécies de *Anopheles* de interesse, os modelos de *docking* apresentaram-se distintos de Agm3, considerando que se trata do mesmo gênero, com exceção de *An. argyritarsis*. Nas demais análises, as regiões de interação apontadas pelos *dockings* se concentraram próximos à porção anteriormente descrita em Cqm1, entre S129-A312. Para a análise final, também foram considerados a relação filogenética entre as espécies. *An. aquasalis* apresentou modelos com interação com 79KDPRF83, e o segundo modelo, representado na figura do *docking*, apresentou aminoácidos dentro do estabelecido, e foi a espécie com maior amplitude de aminoácidos interagindo nos dez primeiros modelos.

Dentro da mesma série filogenética que *An. aquasalis* encontra-se *An. triannulatus*, que apresentou 2 modelos de ligação próximos da região estabelecida na BinB, porém concentradas

em sua região C-terminal. O 10º modelo foi selecionado para gerar imagem do *docking*, pois era o que apresentava maior coerência no perfil de ligação à BinB, além dos aminoácidos envolvidos. As energias livres dos modelos propostos desta espécie se apresentaram maiores em comparação às outras espécies, sendo a única com um perfil de interação diferente, que deve ser avaliado em estudos futuros.

*An. minor*, o único investigado das 7 espécies que pertence a outro subgênero (*Anopheles*), apresentou modelos que corroboram com a região descrita para Cqm1, com os mesmos aminoácidos que *An. aquasalis* envolvidos da ligação, além de apresentar energias livres de ligação menores que as outras espécies, incluindo Cqm1. *An. braziliensis* e *An. albitarsis*, pertencentes à série Albitarsis, apresentaram resultados parecidos, considerando todos os resultados de *docking*. Em ambos foram utilizados o segundo modelo para formação da imagem, e os aminoácidos participantes encontram-se próximos entre ambas espécies, além de se ligarem aos aminoácidos estabelecidos na BinB.

*An. argyritarsis* e *An. sawyeri*, pertencentes à série Argyritarsis, demonstraram padrões de ligação diferentes. O primeiro apresentou modelos com participação de aminoácidos mais próximos à região C-terminal, e o modelo utilizado para formação da imagem apresenta poucos aminoácidos envolvidos na ligação, sendo mais próximos da região encontrada em Agm3, e é a única proteína de *Anopheles* spp. que apresentou uma alteração no loop da região N-terminal, da mesma forma que Agm3 quando comparado à Cqm1. Já *An. sawyeri* apresentou modelos próximos da região descrita para Cqm1, inclusive no modelo escolhido apresentando um perfil de ligação muito parecido com Cqm1.

Ao realizar a repetição dos *dockings* de forma livre e considerando aminoácidos que interagem com a BinA, foi possível observar algumas regiões do cristal com maior perfil de interação entre as espécies. Agm3 apresentou o mesmo perfil de aminoácidos da região C-terminal interagindo com a BinB, e muitos aminoácidos interagindo com regiões da BinA. Apesar de ter apresentado um padrão parecido com Agm3 na análise com delimitação, *An. argyritarsis* apresentou mais aminoácidos da região N-terminal interagindo com as subunidades no segundo *docking*.

*An. aquasalis* apresentou um perfil de interação diferente daquele apresentado no modelo com delimitação, mas ainda com aminoácidos dentro da região estabelecida como importante para a Cqm1, o que não ocorreu para *An. albitarsis*, que apresentou um perfil diferente e aminoácidos mais próximos da região C-terminal interagindo com ambas as subunidades. *An. braziliensis*, *An. minor* e *An. sawyeri* apresentaram regiões de interação muito similares com os modelos anteriores, e também demonstraram ligação à aminoácidos da região

C-terminal da BinA. *An. triannulatus* apresentou um modelo com maior interação à aminoácidos do cristal quando comparado à primeira análise.

Com os resultados de *docking* é possível reafirmar que proteínas homólogas poderiam apresentar diferentes sítios ou perfis de ligação (MARTIN, 2010). Essa informação se reforça com os dados sobre *An. gambiae*, que apesar de ser suscetível ao *L. sphaericus* apresenta uma menor afinidade com a toxina binária quando comparado à *Culex*, apresentando características diferentes, sobretudo pela interação ocorrer através das duas subunidades da Bin (SILVA-FILHA et al, 1997; CHARLES, et al., 1997). Além disso, apesar de coincidir com a região descrita na BinB por Romão et al. (2011), algumas regiões, tanto da subunidade BinA quanto da BinB, se repetiram ao longo dos *dockings*, e podem ser utilizadas como referência para futuras análises *in vitro*, onde é possível confirmar o verdadeiro papel destes aminoácidos.

Como ocorreu na cidade do Conde/PA, a presença dos mosquitos e um grande fluxo de pessoas é o necessário para se ter um surto, mesmo em locais sem histórico de transmissão. Também é importante reafirmar a necessidade de utilização de meios alternativos de controle, já que existe a possibilidade de desenvolvimento de resistência à inseticidas químicos (INGHAM, 2018). A presença de possíveis  $\alpha$ -glicosidases com considerável identidade e similaridade às descritas anteriormente, como Cqm1 e Agm3, em espécies que possuem poucas informações em bancos de dados, amplia o conhecimento sobre o gênero *Anopheles* no Brasil, e traz embasamento para futuros estudos de susceptibilidade para estas espécies.



## 10 CONCLUSÕES

- a) As espécies de *Anopheles* spp. contempladas no estudo, possivelmente envolvidas em um surto de malária extra-amazônico, apresentam  $\alpha$ -glicosidases que potencialmente podem atuar como receptores da toxina Bin, ingrediente ativo do *Lysinibacillus sphaericus*, com alta identidade e similaridade às  $\alpha$ -glicosidases descritas anteriormente;
- b) As diferenças sutis entre as  $\alpha$ -glicosidases tanto a nível de sequência quanto de estrutura, principalmente quando comparado o motivo de ligação descrito em Cqm1, podem indicar variações no padrão de interação à toxina Bin e consequentemente sua suscetibilidade *in vivo*;
- c) Estruturalmente, o motivo de ligação da Cqm1 forma um loop exposto, e no padrão de *docking* foi demonstrado a sua importância na ligação à Bin. É possível observar que as diferenças nesta região implicam nos modelos de interação;
- d) As análises de *docking* de Cqm1-BinB se mostraram importantes, já que foi validada a participação dos aminoácidos descritos dentro da interação de ambas as proteínas *in vitro*, evidenciando a importância de serem realizadas análises *in silico*;
- e) Todas as espécies de *Anopheles* apresentaram algum modelo de interação à região estabelecida da BinB, com diferentes padrões de aminoácidos, e apresentaram energias livres de ligação próximos de Cqm1, considerado o controle positivo;
- f) Nas análises livres de *docking* para *Anopheles* spp., foi possível observar regiões similares de ambas as subunidades interagindo com as  $\alpha$ -glicosidases. Na subunidade BinA foram descritos aminoácidos principalmente da região C-terminal, e na BinB, além dos aminoácidos anteriormente ressaltados, outras regiões apareceram em diferentes espécies;
- g) As análises *in silico* são importantes neste contexto, considerando a dificuldade de se realizar análises de suscetibilidade *in vivo* com larvas de anofelinos, e essas descrições são fundamentais para futuros estudos *in vitro*, onde podem ser avaliadas as características proteicas e regiões descritas nos *dockings*.

**REFERÊNCIAS**

- AHMED, I. et al. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 57, n. Pt 5, p. 1117-1125, 2007.
- AGNIHOTRY, S. et al. Chapter 11 - Protein structure prediction. Bioinformatics, Methods and applications. **Academic Press**, p. 177-188, 2022.
- ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C. et al. Biological Control Program against Simuliidae in the state of São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 131–133, 1995.
- ASHLEY E. A.; PYAE P. A.; WOODROW C. J. Malaria. **The Lancet**, v. 39, n. 10130, p.1608-1621, 2018.
- AYRES, C. F. J. et al. Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. **Mol Biol**, v. 97, n. 6, p. 871-875, 2002.
- BARBAZAN, P. et al. Impacto dos tratamentos com *Bacillus sphaericus* nas populações de *Anopheles* e na transmissão da malária em Maroua, uma grande cidade em uma região de savana de Camarões. **J Am Mosq Control Assoc**, v. 14, p. 33-39, 1998.
- BARRÓN, M. G. et al. A new species in the major malaria vector complex sheds light on reticulated species evolution. **Science Report**, v. 9, p. 14753, 2019.
- BAUMANN, P. et al. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. **J Bacteriol.**, v. 163, n. 2, p. 738-747, 1985.
- BERRY, C. et al. Nucleotide sequence of two toxin genes from *Bacillus sphaericus* IAB59: sequence comparisons between five highly toxinogenic strains. **Nucleic Acids Res**, v. 17, p. 7516, 1989.
- BERRY, C. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. **J Invert Pathol**, v. 109, p. 1-10, 2012.
- BHAAT, S. et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. **Nature**, v. 526, n. 7572, p. 207–211, 2016.
- BOONYOS, P. et al. Role of cysteine at positions 67, 161 and 241 of a *Bacillus sphaericus* binary toxin BinB. **BMB reports**, v. 43, p. 23-28, 2010.
- BRITO, G. A. et al. Identification of Bioactive Compounds against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by Bioassays and *in Silico* Assays. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, e2100242, 2021.
- BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. **Appl Environ Microbiol**, v. 53, n. 6, p. 1333-1337, 1987.

- CANTAREL, B. L. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Res**, v. 37, p. 233-238, 2009.
- CARLOS B. C. et al. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathog Glob Health**, v. 113, n.1, p. 1-13, 2019.
- CASTRO, S. D. B. et al. Biolarvicide *Bacillus sphaericus*-2362(GRISELESF) for the control of malaria in a health area of the Republic of Honduras. **Rev Cubana Med Trop**, v. 54, n. 2, p. 134-141, 2002.
- CHAGAS, C. Novas espécies de Culicídeos Brasileiros. **Instituto de Manguinhos, Besnard Frères**, Rio de Janeiro, p. 28, 1907.
- CHAREONVIRIYAPHAP, T. Biochemical detection of pyrethroid resistance mechanisms in *Anopheles minimus* in Thailand. **J Vector Ecol**, v. 28, n. 1, p. 108-116, 2003.
- CHARLES, J. F.; NIELSON-LEROUX, C.; DELECLUSE, A. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. **Annu Rev Entomol**, v. 41, p. 451-472, 1996.
- CHARLES, J. F. et al. Binding of the 51- and 42-kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). **FEMS Microbiol**, v. 156, p. 153-159, 1997.
- CAZy (Carbohydrate-Active enzymes). Glycoside Hydrolase family classification. **AFMB - CNRS - Université d'Aix-Marseille**, 2022. Disponível em: <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>. Acesso em: 18 abr 2022.
- CHIBA, S. Molecular Mechanism in  $\alpha$ -Glucosidase and Glucoamylase. **Biosci Biotech Biochem**, v. 61, n. 8, p. 1233-1239, 1997.
- CHOOCHOTE, W.; SAEUNG, A. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors Systematic Techniques for the Recognition of Anopheles Species Complexes. **IRD**. Intechopen, 2013.
- COLLETIER, J. P. et al. *De novo* phasing with X-ray laser reveals mosquito larvicide BinAB structure. **Nature**, v. 539, p. 7627, p. 43-47, 2016.
- CONN, J. E et al. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors Systematic Phylogeography, Vectors and Transmission in Latin America. **IRD**, Intechopen, 2013.
- CONN, J. E & RIBOLLA, P. E. Ecology of *Anopheles darlingi*, the Primary Malaria Vector in the Americas and Current Nongenetic Methods of Vector Control. **Gen Control Malaria Dengue**, p. 81-102, 2016.
- CONSOLI, R. A. G. B; OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil [online]. Rio de Janeiro: **Editora FIOCRUZ**, p. 228, 1994.
- CORBEL V. et al. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. **Acta Tropica**, v. 101, p. 207-216, 2007.

- CORREIA, D. M. C. Análise de  $\alpha$ -glicosidases de Mosquitos: Papel como receptores do biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus* e atividade catalítica. 2017. Monografia -UFPE, Recife, 2017.
- CURRY, D. P. Some observations on the *Nyssorhynchus* group of the *Anopheles* (Culicidae) of Panama. **Amer J Epidemiol**, v. 15, n. 2, p. 566–572, 1932.
- DARBOUX, I. et al. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 31, n. 10, p. 981-990, 2001.
- DE BARJAC, H. A new variety of *Bacillus thuringiensis* very toxic to mosquitoes: *B. thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14. **C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D**, v. 286, n. 10, p. 797-800, 1978.
- DE BARJAC, H.; VÉRON, M.; COSMAO, D. V. Biochemical and serological characterization of "*Bacillus sphaericus*" strains, pathogenic or non-pathogenic for mosquitoes. **Ann Microbiol**, v. 131B, n. 2, p. 191-201, 1980.
- DERUA, Y. A. et al. Bacterial larvicides used for malaria vector control in sub-Saharan Africa: review of their effectiveness and operational feasibility. **Parasit Vectors**, v. 12, p. 426, 2019.
- DERUA, Y. A. et al. Susceptibility of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes to microbial larvicides in diverse ecological settings in western Kenya. **Med Vet Entomol**, v. 33, n. 2, p. 220–227, 2019.
- DZUL F. A. et al. Susceptibility and insecticide resistance mechanisms in *Anopheles albimanus* from the southern Yucatan Peninsula, Mexico. **Salud Publica Mex**, v. 49, n. 4, p. 302-11, 2007.
- ELANGO VAN, G. et al. Identification of the functional site in the mosquito larvicidal binary toxin of *Bacillus sphaericus* 1593M by site-directed mutagenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 276, n. 3, p. 1048-1055, 2000.
- FERREIRA, L. M. F. et al. The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI-anchored  $\alpha$ -glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 40, n. 8, p. 604-610, 2010.
- FERREIRA, L. M. F. et al. Non-conserved residues between Cqm1 and Aam1 mosquito  $\alpha$ -glucosidases are critical for the capacity of Cqm1 to bind the Binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 50, p. 34-42, 2014.
- FOLEY, D. H. et al. Geographic distribution, evolution, and disease importance of species within the Neotropical *Anopheles albitarsis* Group (Diptera, Culicidae). **J Vector Ecol**, v. 39, n. 1, p. 168-81, 2014.
- FONTAINE, M. C. et al. Extensive introgression in a malaria vector species complex revealed by phylogenomics. **Science**, v. 347, n. 6217, p. 1258524, 2015.

- FORATTINI, O. P. et al. Studies on mosquitos (Diptera: Culicidae) and anthropic environment parity of blood seeking *Anopheles* (Kerteszia) in South Eastern Brazil. **Rev Saúde Públ**, v. 27, p. 1-8, 1993.
- FOSTER, W. A. Mosquito Sugar Feeding and Reproductive Energetics. **Ann Rev Entomol**, v. 40, n. 1, p. 443–474, 1995.
- FOSTER, P. G. et al. Phylogeny of Anophelinae using mitochondrial protein coding genes. **The Royal Society**, v. 4, n. 11, p. 170758, 2017.
- GALARDO, A. K. R. et al. Larval control of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* using granular formulation of *Bacillus sphaericus* in abandoned gold-miners excavation pools in the Brazilian Amazon Rainforest. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 2, 2013.
- GALVÃO, A. L. A.; DAMASCENO, R. G. Sobre um novo anofelino da Ilha de Marajó, *Anopheles* (Nys.) *marajoara* n. sp. **Folia Clinic Biol**, v. 14, n. 6066, 1942.
- GILLES, G. M. A handbook of the gnats or mosquitoes giving the anatomy and life history of the Culicidae together with descriptions of all species noticed up to the present date. **John Bale, Sons & Danielsson, Ltd**, v. 2, 530 pp., 1902.
- GOMES, E. C. S. et al. Outbreak of autochthonous cases of malaria in coastal regions of Northeast Brazil: the diversity and spatial distribution of species of *Anopheles*. **Parasit Vectors**, v. 13, n. 621, 2020.
- GOSH, A.; EDWARDS, M.J.; JACOBS-LORENA, M. The Journey of the Malaria Parasite in the Mosquito: Hopes for the New Century. **Parasitol Today**, v. 16, n.5, p. 196–201, 2000.
- HALL, T. A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HARBACH, R. Genus *Anopheles* Meigen, 1818. **Mosquito Taxonomic Inventory**, 2008. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6047>. Acesso em 12 jan 2021.
- HARBACH, R. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. The Phylogeny and Classification of Anopheles. **Institut de Recherche pour le Développement**, Intechopen, 2013.
- HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **The Royal Society**, v. 270, p. 313–321, 2003.
- HEMINGWAY, J. The role of vector control in stopping the transmission of malaria: threats and opportunities. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 369, n. 1645, p. 20130431, 2014.
- HEMMING-SCHRODER, E. et al. Ecological drivers of genetic connectivity for African malaria vectors *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. **Sci Report**, vol. 10, n.1, p. 19946, 2020.

- HIRE, R. S. et al. Purification and characterization of mosquitocidal *Bacillus sphaericus* BinA protein. **J Invert Pathol**, v. 101, n. 2, p. 106–111, 2009.
- HUMPHREYS, M. J.; BERRY, C. Variants of the *Bacillus sphaericus* Binary Toxins: Implications for Differential Toxicity of Strains. **J Invert Pathol**, v. 71, n. 2, p. 184–185, 1998.
- INGHAM, V. A.; WAGSTAFF, S.; RANSON, H. Transcriptomic meta-signatures identified in *Anopheles gambiae* populations reveal previously undetected insecticide resistance mechanisms. **Nat Com**, v. 9, n. 5282, 2018.
- JARIYAPAN, N. et al. Salivary gland proteins of the human malaria vector, *Anopheles dirus B* (Diptera: Culicidae). **Rev Inst Med Trop**, v. 49, n. 1, p. 5-10, 2007.
- JISNA, V. A.; JAYARAJ, P. B. Protein Structure Prediction: Conventional and Deep Learning Perspectives. **The Protein J**, v. 40, n. 4, p. 522–544, 2021.
- JONES, G. W. et al. A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. **FASEB J**, v. 21, n. 14, p. 4112-4120, 2007.
- JOSHI, A. & MILLER, C. Review of machine learning techniques for mosquito control in urban environments. **Ecological Info**, v. 61, 2021.
- KALE, A. et al. Interaction between mosquito-larvicidal *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin components: Analysis of complex formation. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 43, n. 11, p. 1045-1054, 2013.
- KALFON, A. et al. Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297: an electron microscope study of crystal-like inclusion biogenesis and toxicity to mosquito larvae. **J Gen Microbiol**, v. 130, n. 4, p. 893-900, 1998.
- KAMAREDDINE, L. The Biological Control of the Malaria Vector. **Toxins (Basel)**, v. 4, n. 9, p. 748–767, 2012.
- KANG, S. et al. The polymorphism and the geographical distribution of the knockdown resistance (kdr) of *Anopheles sinensis* in the Republic of Korea. **Malaria J**, n. 11, v. 151, 2012.
- KAREEMI, T. et al. Analysis of the insecticide resistance mechanism in *Anopheles culicifacies* sensu lato from a malaria-endemic state in India. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 23, n. 110, 2021.
- KELLEN, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nat Prot**, v. 10, p. 845-858, 2015.
- KELLEN, W. R. et al. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. **J Invertebr Pathol**, v. 7, n. 4, p. 442-448, 1965.
- KELLY-HOPE, L. A. et al. Spatiotemporal distribution of insecticide resistance in *Anopheles culicifacies* and *Anopheles subpictus* in Sri Lank. **Trans Royal Soc Trop Med Hyg**, v. 99, p. 751-761, 2005.

- KILLEEN, G. F. et al. Developing an expanded vector control toolbox for malaria elimination. **BMJ Global Health**, v. 2, e000211, 2017.
- KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nat Rev Drug Disc**, v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.
- KRASIKOV, V. V.; KARELOV, D. V.; FIRSOV, L. M. alpha-Glucosidases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 66, n. 3, p. 267-281, 2001.
- KUMAR, A. et al. Malaria control utilizing *Bacillus sphaericus* against *Anopheles stephensi* in Panaji, Goa. **J Am Mosq Control Assoc**, v. 10, n. 4, p. 534-9, 1994.
- LACEY L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **J Am Mosq Control Assoc.**, v. 23, p.133-163, 2007.
- LEKAKARN, H., PROMDONKOY, B., & BOONSERM, P. Interaction of *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin with mosquito larval gut cells: Binding and internalization. **J Invertebr Pathol**, v. 132, p. 125–131, 2015.
- LI, J.; FU, A.; ZHANG, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. **Inter Sci Comp Life Sci**, v. 11, n. 2, p. 320–328, 2019.
- LINDNER, G. et al. Analysis of Apoptosis during Hair Follicle Regression (Catagen). **Am J Pathol**, v. 151, n. 6, p. 1601-1617, 1997.
- LYNCH-ARRIBALZAGA, F. Descripción de tres nuevos Culicidae de Buenos Aires. **Nat argent**, v. 1, p. 149–152, 1878.
- LOVERING, A. L. et al. Mechanistic and Structural Analysis of a Family 31  $\alpha$ -Glycosidase and Its Glycosyl-enzyme Intermediate. **J Biol Chem**, v. 280, n. 3, p. 2105-15, 2005.
- LOZANO, L. C.; AYALA, J. A.; DUSSÁN, J. *Lysinibacillus sphaericus* S-layer protein toxicity against *Culex quinquefasciatus*. **Biotechnol Lett**, v. 33, p. 2037–2041, 2011.
- Lu S. et al. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. **Nucleic Acids Res**, v. 48, n. 1, p. 265-268, 2020.
- MARDINI, B. L. F. et al. Field studies with the bacterial larvicide INPALBAC for *Simulium* spp. control in Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 679–681, 1999.
- MARINOTTI O. et al. The genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. 15, p. 7387-7400, aug 2013.
- MARINOTTI, O.; JAMES, A. A. An  $\alpha$ -glucosidase in the salivary glands of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry**, v. 20, n. 6, p. 619–623, 1990.
- MARTIN, J. Beauty Is in the Eye of the Beholder: Proteins Can Recognize Binding Sites of Homologous Proteins in More than One Way. **PLoS Comput Biol** v. 6, n. 6, 2010.

- MATAMBO, T. S. et al. Insecticide resistance in the malarial mosquito *Anopheles arabiensis* and association with the kdr mutation. **Med Vet Entomol**, v. 21, p. 97–102, 2007.
- MCPHERSON, A. & GAVIRA, J. A. Introduction to protein crystallization. **Acta Crystallogr F Struct Biol Commun**, v. 70, p. 2–20, 2014.
- MESQUITA, R. S. et al. Synthesis, molecular docking studies, and larvicidal activity evaluation of new fluorinated neonicotinoids against *Anopheles darlingi* larvae. **PLoS One**, v. 15, n. 2, 2020.
- MILNER, D. A. JR. Malaria Pathogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 8, n.1, a025569, 2018.
- MINETTI, C.; INGHAM, V. A.; RANSON, H. Effects of insecticide resistance and exposure on *Plasmodium* development in *Anopheles* mosquitoes. **Cur Opin Insect Sci**, v. 39, p. 42–49, 2020.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2010.
- MITTAL, P. K. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. **J Vector Borne Dis**, v. 40, n. 1-2, p. 20-32, 2003.
- MOREIRA-FERRO, C. K.; MARINOTTI, O.; BIJOVSKY, A. T. Morphological and biochemical analyses of the salivary glands of the malária vector, *Anopheles darlingi*. **Tissue Cell**, v. 31, n. 3, p. 264-273, 1999.
- MOTOKI, M. T. et al. Redescription of *Anopheles oswaldoi* (Peryassú, 1922) (Diptera: Culicidae), with formal lectotype designation. **Zootaxa**, p. 31-51, 2007.
- NARTEY, R. et al. Use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a viable option in an integrated malaria vector control programme in the Kumasi Metropolis, Ghana. **Parasit Vectors**, v. 6, n. 116, 2016.
- NICOLAS, L. et al. Efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 against larvae of *Anopheles gambiae* under laboratory and field conditions in West Africa. **Med Vet Entomol**, v. 1, n. 2, 1987.
- NICOLAS, L. et al. Respective role of the 42- and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol Letters**, v. 106, p. 275-280, 1993.
- NISHIWAKI, H. et al. Cloning, functional characterization, and mode of action of a novel insecticidal poreforming toxin, Sphaericoly produced by *Bacillus sphaericus*. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, p p. 3404–3411, 2007.
- NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. **Eur J Biochem**, v. 210, n. 2, p. 585-590, 1992.



- OEI, C.; HINDLEY, J.; BERRY, C. Binding of purified *Bacillus sphaericus* binary toxin and its deletion derivatives to *Culex quinquefasciatus* gut: elucidation of functional binding domains. **J Gen Microbiol**, v. 138, n. 7, p. 1515-1526, 1992.
- OGUNAH, J. A. et al. Malaria vector control strategies. What is appropriate towards sustainable global eradication? **Sust Chem Pharm**, v. 18, 2020.
- OLIVEIRA, C. M F. et al. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. **J Med Entomol.**, v. 41, n. 1. p. 58-64, 2004.
- ONONAMADU, C. J. Insecticide Resistance Profile of *Anopheles gambiae* Mosquitoes: A Study of a Residential and Industrial Breeding Sites in Kano Metropolis, Nigeria. **Environ Health Insights**, v. 14, 2020.
- ORFANÓ, A. S. Abordagens distintas à Interação entre *Anopheles* spp. e *Plasmodium* spp.: Estabelecendo um modelo murino de laboratório, estudando o escape dos esporozoítos e a microbiota. Dissertação (Doutorado em Ciências). **Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz**. Belo Horizonte, 2016.
- OPOTA, O. et al. Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 149, n. 3, p. 419-427, 2008.
- PAPADOPOULOS, J. S., & AGARWALA, R. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. **Bioinformatics**, v. 23, n. 9, p. 1073–1079, 2007.
- PATTON, W. S. The coulicid fauna of the Aden Hinterland, their haunts and habits. **J Bomb Nat Hist Soc**, v. 15, n. 4, p. 623-637, 1905.
- PIMENTA, F. P. P. et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 23–47, 2015.
- PRIEST, F. G. et al. Distribution and characterization of mosquitocidal toxin genes in some strains of *Bacillus sphaericus*. **Appl Environ Microbiol**, v. 63, p. 1195–1198, 1997.
- PROMDONKOY, B. et al. Cys31, Cys47, and Cys195 in BinA Are Essential for Toxicity of a Binary Toxin from *Bacillus sphaericus*. **Cur Microbiol**, v. 56, n. 4, p. 334–338, 2008.
- RAGHAVENDRA, K. et al. Malaria vector control: from past to future. **Parasitol Res**, v. 108, n. 4, p. 757–779, 2011.
- RANDSON, H; LISSENDEN, N. Insecticide Resistance in African *Anopheles* Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control. **Trends Parasitol**, v. 32, n. 3, p. 187–196, 2016.
- REGIS, L. et al. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends Parasitol**, v. 17, n. 8, p. 377-380, 2001.
- REY, L. Bases da Parasitologia Médica. 3ª Edição - **Guanabara Koogan**. Rio de Janeiro, 2010.

- REZENDE, F. O. *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, Curry 1932: estudo de contaminação por bacilo entomopatogênico em colônias mantidas em insetários. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). **Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz**, Belo Horizonte, 2013.
- ROMÃO, T. P. et al. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its  $\alpha$ -glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. **FEBS Journal**, v. 273, n. 7, p. 1556-1568, 2006.
- ROMÃO, T. P. et al. The N-terminal third of the BinB subunit from the *Bacillus sphaericus* binary toxin is sufficient for its interaction with midgut receptors in *Culex quinquefasciatus*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 321, p. 167–174, 2011.
- ROSSATI, A. et al. Climate, environment and transmission of malaria. **Le Infezioni in Medicina**, n. 2, p. 93-104, 2016.
- RUBERT, A. et al. Résistance aux insecticides chez le moustique anophèle: des obstacles en plus dans la lutte antipaludique. **Médecine et Santé Tropicales**, v. 26, n. 4, p. 423-431, 2016.
- RUIZ-LOPEZ et al. Systematics of the Oswaldoi Complex (*Anopheles*, *Nyssorhynchus*) in South America. **Parasit Vectors**, v. 6, p. 324, 2013.
- SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DA PARAÍBA (SESPA). Nota Técnica N° 02/2019 – **NDTA /GOVE/GEVS/SES-PB**. Disponível em: [https://www.infectologia.org.br/admin/zcloud/principal/2019/04/NOTA\\_CLINICA\\_02\\_MALARIA\\_2019.pdf](https://www.infectologia.org.br/admin/zcloud/principal/2019/04/NOTA_CLINICA_02_MALARIA_2019.pdf). Acesso em: 16 set 2019.
- SELVARAJ K. et al. Larvicidal activity of novel anthraquinone analogues and their molecular docking studies. **Saudi J Biol Sci**, v. 28, n. 1, p. 157-162, 2021.
- SHARMA M. et al. Mosquito-larvicidal binary toxin receptor protein (Cqm1): crystallization and X-ray crystallographic analysis. **Acta Crystallogr F Struct Biol Commun**. v. 74, n. 9, p. 571-577, 2018.
- SHARMA, M. & KUMAR, V. Crystal structure of BinAB toxin receptor (Cqm1) protein and molecular dynamics simulations reveal the role of unique Ca(II) ion. **Inte J Bio Macrom**, v. 140, p. 1315-25, 2019.
- SILVA-FILHA, M. H., NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. mosquito larvae. **Eur J Biochem**, v. 247, p. 754-761, 1997.
- SILVA-FILHA, M. H.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Insect Biochem Mol Biol**, v. 29, n. 8, p. 711-721, 1999.
- SILVA-FILHA, M. H.; BERRY, C.; REGIS, L. *Lysinibacillus sphaericus*: Toxins and Mode of Action, Applications for Mosquito Control and Resistance Management. **Adva Insect Physiol**, v. 47, n. 1, p. 89-176, 2014.

- SILVA-FILHA, M. H. et al. Bacterial Toxins Active against Mosquitoes: Mode of Action and Resistance. **Toxins**, v. 13, n.8, p. 523, 2021.
- SINGER, S. Bacterial pathogens of *Culicidae* (mosquitos). **World Health Org**, v. 55 n. 1, p. 47-56, 1977.
- SINGH, O. P. Presence of two alternative *kdr*-like mutations, L1014F and L1014S, and a novel mutation, V1010L, in the voltage gated Na<sup>+</sup> channel of *Anopheles culicifacies* from Orissa, India. **Malaria J**, v. 9, n. 146, 2010.
- SINGKHAMANAN, K. et al. Identification of amino acids required for receptor binding and toxicity of the *Bacillus sphaericus* binary toxin. **FEMS Microbiol Lett**, v. 303, p. 81-91, 2010.
- SINGKHAMANAN, K. et al. Amino acid residues in the N-terminal region of the BinB subunit of *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin play a critical role during receptor binding and membrane insertion. **J Invert Pathol**, v. 114, n. 1, p. 65–70, 2013.
- SINKA, M. E. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. Global Distribution of the Dominant Vector Species of Malaria. **IRD**, Intechopen, 2013.
- SOUZA-NETO, J. A. et al. Sugar digestion in mosquitoes: Identification and characterization of three midgut  $\alpha$ -glucosidases of the neo-tropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). **Comp Biochem Physiol**, v. 147, p. 993–1000, 2007.
- SRISUCHARITPANIT, K. et al. Expression and purification of the active soluble form of *Bacillus sphaericus* binary toxin for structural analysis. **Protein Expr Purif**, v. 82, n. 2, p. 368-372, 2012.
- SUMANROTE, A. et al. Species diversity and insecticide resistance within the *Anopheles hyrcanus* group in Ubon Ratchathani Province, Thailand. **Parasit Vectors**, v. 13, n.1, p. 525, 2020.
- TANGPUKDEE, N. et al. Malaria Diagnosis: A Brief Review. **Korean J Parasitol**, v. 47, n. 2 p. 93–102, 2009.
- THIERY, I. et al. Applications de *Bacillus thuringiensis* et' de *B. sphaericus* dans la démoustication et la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales. **Annales de l'institut pasteur/ actualités**, v. 7, n. 4, p. 247-260, 1996.
- TOMASIK, P.; HORTON, D. Chapter 2 - Enzymatic conversions of starch. **Adv Carbo Chem Biochem**, v. 68, p. 59-436, 2012.
- WALSKI, T. et al. Diversity and functions of protein glycosylation in insects. **Insect Biochem Mol Bio**, v. 83, p. 21–34, 2017.
- WEISER, J. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. **Zentralbl Mikrobiol**, v. 139, n. 1, p. 57-60, 1984.

WEI, S.; CAI, Q.; YUAN, Z. Mosquitocidal Toxin From *Bacillus Sphaericus* Induces Stronger Delayed Effects Than Binary Toxin on *Culex Quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol**, v. 43, n. 4, p. 726-730, 2006.

WHITE, J. P., LOTAY, H. K. Minimal nutritional requirements of *Bacillus sphaericus* NCTC9602 and 26 others strains of this species: the majority grow and sporulate with acetate as sole major source of carbon. **J Gen Microbiol**, n. 118, p. 13–19, 1980.

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

WILLIAMS et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**, v. 27, p. 293-315, 2018.

WILSON, A. L. et al. The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 14, n. 1, e0007831, 2020.

WIRTH, M. C. et al. Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 19, p. 6066-71, 2007.

WOLFARTH-COUTO B.; SILVA R. A.; FILIZOLA N. Variabilidade dos casos de malária e sua relação com a precipitação e nível d'água dos rios no Estado do Amazonas, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 35, n. 2, p. e00020218, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Malaria Report 2018. **Geneva: World Health Organization**, 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Malaria Report 2020: 20 years of global progress and challenges. **Geneva: World Health Organization**; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO recommends groundbreaking malaria vaccine for children at risk. **Geneva: World Health Organization**; 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/06-10-2021-who-recommends-groundbreaking-malaria-vaccine-for-children-at-risk>. Acesso em: 12 abr 2022.

XIU-XIA, G., et al. Analysis of population genetic diversity of mosquitoes from Shandong Province based on mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I gene fragment. **Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi**, v. 30, p. 37-41, Sep 2017.

YAN, Y. et al. The HDock server for integrated protein–protein docking. **Nat Protoc**, v. 15, n. 5, p. 1829-52, 2020.

ZÚÑIGA, M. A., et al. Updating the bionomy and geographical distribution of *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* F: A vector of malaria parasites in northern South America. **PloS one**, v. 16, n. 6, e0253230, 2021.