

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)  
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ” (ESALQ/USP)  
DEPARTAMENTO DE ENTOMOLOGIA E ACAROLOGIA

CAROLINA PACCHIONI MONTEIRO

**INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL DO MECANISMO DE  
RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A INSETICIDAS ESPINOSINAS**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso a ser apresentado à COC Ciências Biológicas como parte dos requisitos de obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Celso Omoto  
**Coorientador:** Dr. Antonio Rogério Bezerra do Nascimento

Piracicaba - SP  
Maio/2024

## RESUMO

O uso intensivo de inseticidas químicos para o controle de insetos-praga no Brasil tem sido uma ameaça à produtividade sustentável dos grandes cultivos agrícolas. Com o aumento contínuo da pressão de seleção com inseticidas, os insetos rapidamente evoluíram a capacidade de sobrevivência nesse sistema. Conseqüentemente, a evolução da resistência de insetos a inseticidas é um dos grandes entraves em programas de manejo integrado de pragas. Os inseticidas espinosinas são um dos principais grupos químicos utilizados para o controle de diversos insetos-praga, incluindo *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Porém, casos de resistência dessa praga já foram relatados para ambas as moléculas químicas pertencentes a esse grupo, spinosad e spinetoram. Portanto, a elucidação dos mecanismos de resistência se faz necessária para a implementação eficaz de estratégias de manejo da resistência de insetos, a fim de se mitigar falhas de controle no campo. Dessa forma, a proposta desse projeto visa caracterizar funcionalmente a deleção de três nucleotídeos localizada no gene *nAChR α6* como mecanismo de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas espinosinas por meio da utilização da docagem molecular para a simulação da interação dessas moléculas com a proteína-alvo. Ainda, pretende-se utilizar técnicas de edição gênica para investigar a contribuição dessa modificação para o fenômeno da resistência de *S. frugiperda* a esses inseticidas.

**Palavras-chave:** Lagarta-do-cartucho do milho; spinosad; spinetoram; docagem molecular; CRISPR.

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de inseticidas químicos é uma das táticas mais utilizadas para o controle de insetos-praga no Brasil. Porém, a pressão de seleção contínua ocasionada pela aplicação intensiva dessas moléculas associada à habilidade de adaptação dos insetos resulta em um rápido aumento de casos de resistência a inseticidas (Sparks; Lorsbach, 2017). Dessa forma, a evolução da resistência de insetos a inseticidas tem sido um dos principais entraves na implementação de programas de manejo integrado de pragas (MIP) (Sparks; Lorsbach, 2017; Sparks *et al.*, 2019). Uma vez que as pragas agrícolas não são controladas de modo eficiente por muitos dos atuais inseticidas presentes no mercado, o desenvolvimento de novas moléculas se faz necessário. Contudo, com o crescente aumento de custo e tempo para a produção de novos inseticidas, é essencial que os fatores que impulsionam a evolução da resistência sejam minimizados (Sparks; Nauen, 2015; Sparks *et al.*, 2019). Portanto, é necessária a implementação de estratégias eficazes para o manejo da resistência de insetos (MRI), a fim de que a vida útil dos atuais e futuros inseticidas seja preservada em prol de uma proteção mais sustentável dos cultivos agrícolas.

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma das principais pragas agrícolas que ameaça a produtividade dos cultivos de milho, soja e algodão no Brasil (Montezano *et al.*, 2018). Embora essa praga seja nativa das regiões tropicais do continente americano, recentemente foi reportada como praga invasiva da África, Ásia e Oceania (Montezano *et al.*, 2018; CABI, 2023). O sucesso de colonização dessa praga se deve graças às suas características bioecológicas, como sua natureza polífaga, alta capacidade de reprodução e dispersão e elevado número de gerações durante o ano (Montezano *et al.*, 2018). O controle de *S. frugiperda* se baseia, principalmente, na utilização de inseticidas

químicos e plantas que expressam genes que codificam proteínas de *Bacillus thuringiensis*. Porém, o intensivo uso desses produtos levou à evolução da resistência dessa praga a diversos grupos químicos de inseticidas, como piretroides e organofosforados (Diez-Rodríguez; Omoto, 2001; Carvalho *et al.*, 2013, Garlet *et al.*, 2021, Nascimento *et al.*, 2023), benzoilureias (Nascimento *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2022), diamidas (Bolzan *et al.*, 2019), espinosinas (Okuma *et al.*, 2018; Lira *et al.*, 2020) e avermectinas (Muraro *et al.*, 2021).

As espinosinas são um grupo químico de moléculas inseticidas amplamente utilizadas em programas de MIP devido a sua alta eficiência no controle de diversos insetos-praga e maior seletividade em relação a organismos não-alvo quando comparadas aos demais inseticidas existentes (Kirst, 2010; Salgado *et al.*, 2010; Dripps *et al.*, 2011). As moléculas químicas pertencentes a esse grupo, spinosad e spinetoram, são derivadas de compostos secundários da fermentação da bactéria de solo *Saccharopolyspora spinosa* (Kirst, 2010). Essas moléculas agem como moduladores alostéricos dos receptores nicotínicos de acetilcolina (*nAChR*), uma vez que se ligam alostericamente a esses receptores, permitindo a transmissão contínua do impulso nervoso e ocasionando a morte do inseto por hiperexcitação nervosa (Crouse *et al.*, 2001; Kirst, 2010).

Casos de resistência a inseticidas espinosinas já foram relatados para algumas espécies de insetos-praga (Sparks *et al.*, 2012), incluindo *S. frugiperda* (Okuma *et al.*, 2018; Lira *et al.*, 2020). O padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas espinosinas foi caracterizado como autossômico e incompletamente recessivo e a resistência cruzada entre as moléculas spinosad e spinetoram já foi relatada (Okuma *et al.*, 2018; Lira *et al.*, 2020). Portanto, para auxiliar na tomada de decisão e implementação eficaz de programas de MRI e mitigar falhas de controle em programas de MIP, os mecanismos de resistências de insetos a inseticidas espinosinas devem ser

elucidados.

Os principais mecanismos já conhecidos pelos quais os insetos evoluem resistência a inseticidas, a nível molecular, envolvem mutações no sítio alvo, aumento da expressão de enzimas de detoxificação e regulação gênica (Bass; Field, 2011; Palli, 2020; Amezian; Nauen; Le Goff, 2021; Nauen *et al.*, 2022). Os casos de evolução de resistência de insetos-praga já relatados para o grupo químico das espinosinas se encontram associados a mutações na proteína receptora do inseticida. Essas mutações provocam mudanças na conformação pós-traducional da proteína e diminuem sua sensibilidade à molécula inseticida (Perry; Mckenzie; Batterham, 2007; Zimmer *et al.*, 2016). Sendo assim, os níveis de resistência a esse grupo químico estão, geralmente, relacionados com modificações localizadas na subunidade  $\alpha 6$  do gene *nAChR*. Essas modificações incluem mutações pontuais (Silva *et al.*, 2016; Zimmer *et al.*, 2016), transcritos truncados (Baxter *et al.*, 2010; Hsu *et al.*, 2012), *exon skipping* - quando um éxon específico não é incorporado no mRNA maduro durante o *splicing* alternativo - (Berger *et al.*, 2016; Grant *et al.*, 2019) e deleções (Wang *et al.*, 2016; Grant *et al.*, 2019). Condizente com o mecanismo de resistência de *Tuta absoluta* a spinosad (Grant *et al.*, 2019), para *S. frugiperda* foi relatado que a presença de uma deleção de três nucleotídeos localizada no gene *nAChR*  $\alpha 6$  está associada com a resistência dessa praga às moléculas spinosad e spinetoram. Essa deleção ocasionou a perda do aminoácido tirosina na posição 232 da proteína receptora dos inseticidas (Kanno *et al.*, 2024). Dessa forma, são necessários demais estudos a fim de se investigar uma possível influência dessa deleção na dinâmica da interação entre o *nAChR* e as espinosinas em *S. frugiperda*.

A simulação de docagem é uma tecnologia amplamente utilizada para o estudo molecular de interações entre moléculas ligantes e proteínas-alvo. A técnica da docagem molecular se baseia no famoso modelo de “chave-fechadura”, desenvolvido por Emil

Fischer (Fan; Fu; Zhang, 2019; Santos; Ferreira; Caffarena, 2019). Uma das principais aplicações da docagem molecular é a predição de moléculas-alvo para determinados ligantes (Fan; Fu; Zhang, 2019). Sendo assim, há um crescente aumento da utilização da simulação de docagem como uma ferramenta adicional em estudos toxicológicos de moléculas químicas, tais como os inseticidas (Gupta; Sharma; Kumar, 2019). Uma vez que as mutações no sítio-alvo são um dos mecanismos mais comuns pelos quais os insetos evoluem resistência a inseticidas, a simulação de docagem se demonstra como uma possível ferramenta para investigar a influência dessas mutações na dinâmica da interação entre a proteína-alvo e a molécula inseticida. Estudos de docagem molecular na área de resistência de insetos já foram realizados para algumas espécies, como resistência a bloqueadores de canais de sódio em *Drosophila melanogaster* (Samantsidis *et al.*, 2019), resistência a organofosforados e carbamatos em *Plutella xylostella* (Sindhu *et al.*, 2018) e resistência a diamidas também em *P. xylostella* (Lin *et al.*, 2020). Logo, a simulação de docagem é uma ferramenta que visa complementar os estudos moleculares dos mecanismos de resistência para que a associação existente entre mutações no sítio-alvo e o fenômeno da resistência seja elucidada.

Além da docagem molecular, as tecnologias de edição gênica também podem ser utilizadas para a validação funcional dos mecanismos moleculares associados à resistência de insetos a inseticidas, bem como visam complementar os estudos de genômica e transcritômica. A edição da informação gênica e a regulação de sua expressão são fatores essenciais para um melhor entendimento dos genes e suas funções (Mei *et al.*, 2016; Wang; La Russa; Qi, 2016). Dentre as variadas ferramentas que objetivam a manipulação de genoma, a tecnologia CRISPR/Cas9 tem proporcionado maiores habilidades de edição gênica para diversos organismos (Mei *et al.*, 2016; Wang; La Russa; Qi, 2016). O sistema CRISPR/Cas9 é um componente do sistema imune de

bactérias, sendo constituído por dois fatores principais, o RNA-guia e a proteína Cas9. O RNA-guia age como mediador ao reconhecer uma sequência de DNA específica e mediar a Cas9 até essa, a qual age como efetora ao clivar a dupla fita de DNA após reconhecer uma sequência específica denominada de PAM (Redman *et al.*, 2016; Jiang; Doudna, 2017). A quebra da dupla fita de DNA pela Cas9 estimula dois tipos de processo de reparo, sendo (I) reparo por junção de extremidade não-homóloga (NHEJ) e (II) reparo dirigido por homologia (HDR). A grande diferença entre esses dois tipos se dá pelo fato de que HDR necessita de sequências de DNA de doadores homólogos para a realização do reparo, enquanto NHEJ não (Redman *et al.*, 2016; Jiang; Doudna, 2017). Sendo assim, esse sistema tem sido amplamente utilizado para a validação funcional de mecanismos de resistência de insetos a inseticidas (Zimmer *et al.*, 2016; Samantsidis *et al.*, 2019; Douris *et al.*, 2020).

## 2. JUSTIFICATIVA

Recentemente, a tecnologia de CRISPR/Cas9 foi utilizada para inativar o gene *nAChR  $\alpha 6$*  em *S. frugiperda*, conferindo resistência dessa praga a inseticidas espinosinas (Shi *et al.*, 2022). Embora tenha apresentado resultados promissores, esse estudo não visou validar funcionalmente modificações genéticas presentes no gene *nAChR  $\alpha 6$*  como possível mecanismo de resistência de populações naturais de *S. frugiperda*. Dessa forma, o sistema CRISPR/Cas9 se mostra como uma tecnologia de edição gênica promissora para a validação funcional da deleção de três nucleotídeos no gene *nAChR  $\alpha 6$*  como mecanismo de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas espinosinas.

Ademais, estudos anteriores na área de resistência de insetos já demonstraram resultados significativos ao utilizarem da metodologia de docagem molecular para o estudo da interação entre moléculas inseticidas e suas proteínas receptoras contendo mutações no sítio-alvo (Sindhu *et al.*, 2018; Samantsidis *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2020). Logo, a validação

funcional do mecanismo de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas espinosinas possibilita não só o desenvolvimento de marcadores moleculares para uma identificação rápida e eficaz de indivíduos resistentes advindos do campo, mas também auxilia no desenvolvimento de novas moléculas inseticidas que apresentem melhor conformação de ligação à sua respectiva proteína-ligante.

A hipótese fundamental desse trabalho é que a deleção de três nucleotídeos no gene *nAChR α6* se caracteriza como o principal mecanismo de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas espinosinas devido às alterações geradas por essa deleção na dinâmica da interação entre a proteína receptora e as moléculas inseticidas spinosad e spinetoram. Esses resultados são importantes para que a contribuição da deleção de três nucleotídeos para o fenótipo da resistência seja elucidada, bem como sua influência fisiológica na dinâmica da interação entre proteína-alvo e moléculas espinosinas.

Dessa forma, o objetivo desse estudo é fornecer informações funcionais sobre o mecanismo molecular de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas espinosinas. Pretende-se caracterizar, de maneira funcional, a mudança fisiológica ocasionada pela deleção de três nucleotídeos na interação entre as moléculas espinosinas e a proteína *nAChR α6*, utilizando-se da simulação de docagem molecular. Além disso, pretende-se realizar curvas de concentração-resposta para a caracterização funcional da contribuição dessa deleção para o fenótipo da resistência. Assim, espera-se que os conhecimentos produzidos por esse trabalho possam ser efetivamente usufruídos na implementação de programas de MRI em prol da mitigação da evolução da resistência de insetos a táticas de controle.

### 3. OBJETIVOS

**Objetivo Geral:** Caracterizar, a nível funcional, a deleção de três nucleotídeos localizada na subunidade *α6* do gene do receptor nicotínico de acetilcolina (*nAChR*) como mecanismo de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas espinosinas.



**Objetivos específicos:**

- I) Realizar uma simulação de docagem molecular para avaliar se há influência da deleção de três nucleotídeos na interação entre o *nAChR α6* e as moléculas inseticidas spinosad e spinetoram;
- II) Estabelecer uma linhagem mutante que contenha a deleção de três nucleotídeos no gene *nAChR α6* por meio de técnicas de edição gênica;
- III) Caracterizar a suscetibilidade da linhagem mutante para a deleção de três nucleotídeos no gene *nAChR α6* aos inseticidas spinosad e spinetoram por meio de curvas de concentração-resposta.

**4. MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho será realizado no Laboratório de Resistência de Artrópodes, localizado no Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP.

**4.1. Criação das linhagens de *Spodoptera frugiperda***

Para a realização desse trabalho serão utilizadas duas linhagens de *S. frugiperda*: 1 linhagem suscetível de referência (Sf-SS) e 1 linhagem mutante (Sf-Mut). A linhagem Sf-SS foi obtida da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG, Brasil) em 1996 e, desde então, vem sendo mantida no Laboratório de Resistência de Artrópodes sem pressão de seleção por inseticidas ou proteínas Bt. A linhagem Sf-Mut será originada a partir da linhagem Sf-SS por meio da técnica de CRISPR/Cas9 e apresentará homozigose para a deleção de três nucleotídeos no gene *nAChR α6*. As linhagens serão mantidas em dieta artificial (Kasten; Precceti; Parra, 1978) e sobre condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2$  °C), 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (D:N) h.

**4.2. Docagem molecular**

Uma simulação de docagem molecular será realizada para a avaliação de uma

possível influência da deleção de três nucleotídeos na dinâmica da interação entre a proteína receptora e os inseticidas espinosinas. A simulação de docagem molecular entre proteína e ligante será realizada nos softwares AutoDock Vina ou GROMACS. As proteínas *nAChR α6*, contendo ausência ou presença da deleção de três nucleotídeos, serão utilizadas como moléculas receptoras para a simulação de docagem. As estruturas 3D dessas proteínas serão construídas, a partir de suas sequências nucleotídicas (Kanno *et al.*, 2024.), no software I-TASSER. As espinosinas A, D, J e L, fatores constituintes dos inseticidas spinosad e spinetoram, serão utilizadas como moléculas ligantes para a simulação de docagem. As estruturas 3D dessas moléculas serão adquiridas da plataforma ChemSpider (<https://www.chemspider.com/>). A qualidade dessas estruturas teóricas 3D será avaliada por meio do software SAVES v6.0 (Zheng *et al.*, 2023). O software PyMol (Zheng *et al.*, 2023) será utilizado para a visualização das imagens geradas durante todo o processo de simulação de docagem molecular.

### **4.3. Estabelecimento da linhagem mutante**

#### **4.3.1. Preparação dos sgRNAs e oligonucleotídeo modelo**

Serão sintetizados dois sgRNAs que flanqueiem o local da deleção de três nucleotídeos no gene *nAChR α6*. As sequências alvos dos sgRNAs serão desenhadas através de inspeção visual da sequência referência do gene *nAChR α6* de *S. frugiperda*, disponível na plataforma NCBI (BioProject: PRJNA590312). As sequências alvos deverão abranger um sítio PAM e serão alinhadas contra a sequência referência para verificação de possíveis locais não-alvo em outras regiões do genoma. Serão desenhados 4 iniciadores específicos (5' TAATACGACTCACTATAG + sequência alvo 3' e 3' TTCTAGCTCTAAAAC + complemento reverso da sequência alvo 5'), sem a presença do sítio PAM, para a síntese dos dois modelos de DNA sgRNAs por meio de técnicas de PCR (GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific, EUA). Cada

reação de PCR será composta por 2,5  $\mu\text{L}$  de Pfusion High-Fidelity PCR Master Mix (2 $\times$ ), 1  $\mu\text{L}$  de Tracr Fragment + T7 Primer Mix, 1  $\mu\text{L}$  de 0,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Target F/R oligonucleotide mix, com um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . As condições de ciclagem de temperatura serão: 1 ciclo de 98°C por 10 s, 32 ciclos de 98°C 5 s, 55°C 15 s e 72° C 15 s, e uma etapa final de 72° C por 1 min. Transcrições *in vitro* serão realizadas para a síntese dos sgRNAs. Cada reação da transcrição *in vitro* será composta por 8  $\mu\text{L}$  de mistura de desoxinucleotídeos (dNTP), 6  $\mu\text{L}$  de molde de DNA gRNA, 4  $\mu\text{L}$  5 $\times$  Transcript Aid™ Reaction Buffer e 2  $\mu\text{L}$  de Transcript Aid™ Enzyme Mix, com um volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Por fim, os sgRNAs serão purificados. Cada reação de purificação será composta por 100  $\mu\text{L}$  de Binding Buffer, 300 de Etanol 96%  $\mu\text{L}$ , 700  $\mu\text{L}$  de Wash Buffer 1 e 700  $\mu\text{L}$  de Washer Buffer 2, com um volume final de 200  $\mu\text{L}$ .

Um oligonucleotídeo de fita simples servirá como modelo para o reparo dirigido por homologia (HDR) da fita de DNA após a clivagem pela enzima Cas9 (TrueCut™ Cas9 Protein v2, Thermo Fisher Scientific, EUA). O oligonucleotídeo modelo apresentará a deleção de três nucleotídeos no gene *nAChR  $\alpha 6$* , bem como braços homólogos de 40 pb para sua inserção correta na região clivada. Além disso, o oligonucleotídeo também apresentará um polimorfismo de nucleotídeo único para evitar a clivagem pela Cas9 do novo fragmento inserido.

#### **4.3.2. Coleta e microinjeção dos ovos**

Indivíduos adultos da linhagem Sf-SS serão mantidos em gaiolas de PVC (23 cm altura  $\times$  10 cm diâmetro), internamente revestidas com papel, para coleta de ovos. Os adultos serão alimentados com uma solução de mel e água em uma concentração de 10%. Os ovos serão coletados até 30 minutos após a oviposição e tratados com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v). Será injetado no polo posterior de cada ovo, dentro de até 2 horas após a oviposição, cerca de 1 nL de uma solução *buffer* contendo 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$

de proteína Cas9 (TrueCut™ Cas9 Protein v2, Thermo Fisher Scientific, EUA), 250 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de cada sgRNA e 100 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  do oligonucleotídeo modelo para reparo por HDR. O sistema de microinjeção Flaming/Brown Micropipette Puller Model P-1000 será utilizado para a injeção dos ovos. Os ovos injetados serão mantidos sobre condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2$  °C), 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (D:N) h até a eclosão.

#### **4.3.3 Identificação da mutação na linhagem Sf-Mut**

Para identificar a presença da deleção de três nucleotídeos no genoma da linhagem Sf-Mut, será feita uma extração de DNA dos adultos geneticamente modificados utilizando-se um protocolo modificado de CTAB (Doyle e Doyle, 1987). A qualidade da extração de DNA será avaliada por meio de uma reação de eletroforese em gel de agarose concentrado a 1.5%. Será realizada uma técnica de PCR para a amplificação de uma região de 129 pb do gene *nAChR  $\alpha 6$*  que flanqueie a deleção. Serão utilizados iniciadores específicos para a PCR (Kanno *et al.*, 2024). A reação de PCR será composta por 2,5  $\mu\text{L}$  de 10X PCR Buffer  $\text{Mg}^{2+}$  Free, 1,75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  a 25mM, 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP Mix a 10 mM, 0,8  $\mu\text{L}$  de cada iniciador a 10  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq DNA Polimerase a 5 unidades/ $\mu\text{L}$  e 2  $\mu\text{g}$  de DNA, com um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . As condições de ciclagem de temperatura serão: 1 ciclo de 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 45 s, 58,5°C por 30 s e 72°C por 1 min, e uma etapa final de 72°C por 10 min. Os produtos de PCR serão purificados utilizando o reagente ExoSAP-IT™ PCR (Thermo Fisher Scientific) e a qualidade da purificação será avaliada por meio de uma reação de eletroforese em gel de agarose concentrado a 3%. Os fragmentos de PCR purificados serão sequenciados através do método de Sanger.

#### **4.4. Curvas de concentração-resposta**

A caracterização da suscetibilidade das linhagens Sf-SS e Sf-Mut será realizada

através de curvas de concentração-resposta. As linhagens serão expostas aos inseticidas spinosad (Tracer®, 480 g i.a. L<sup>-1</sup>, Dow AgroSciences, Indianapolis, USA) e spinetoram (Exalt® 120 g i.a. L<sup>-1</sup>; Dow AgroSciences, São Paulo, Brasil). Os bioensaios serão realizados em placas de acrílico de 24 células (Costar®, Corning Inc., Corning, NY, USA) contendo 1.25 ml de dieta artificial cada (1.9 cm<sup>2</sup> área). Os inseticidas serão diluídos separadamente em água destilada com a adição de 0,1% (v/v) do surfactante Triton™ X-100 (Labsynth, Diadema, SP, Brasil). Uma alíquota de 30µL da solução inseticida será aplicada em cada célula. O tratamento controle será constituído de uma solução contendo apenas água destilada e surfactante. Uma lagarta de terceiro instar será infestada em cada célula. As linhagens serão testadas em sete ou oito concentrações espaçadas logaritmicamente. Os bioensaios serão mantidos sobre condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (D:N) h.

## **5. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS**

### **5.1. Análise dos resultados da docagem molecular**

Os resultados da simulação de docagem serão analisados por meio das distâncias das ligações de hidrogênio estabelecidas pelo software durante a interação entre as proteínas receptoras e as moléculas ligantes. As ligações de hidrogênio com distâncias de 1,6–2,5 Å são fortes e principalmente covalentes, enquanto as ligações de hidrogênio com distâncias de 2,5–3,2 Å são moderadas e principalmente eletrostáticas (Sindhu *et al.*, 2018), demonstrando maior instabilidade na dinâmica da interação, fator que pode ser associado à presença de mutações no sítio-alvo das proteínas receptoras.

### **5.2. Análise dos dados do sequenciamento**

As sequências obtidas a partir do sequenciamento de Sanger serão analisadas para a possível identificação da deleção de três nucleotídeos no genoma da linhagem Sf-Mut. Será realizado o alinhamento das sequências obtidas contra a sequência referência

do gene *nAChR α6* de *S. frugiperda* disponível na plataforma NCBI (BioProject: PRJNA590312). O alinhamento realizado será do tipo global (Needleman-Wunsch) com 93% de similaridade e realizado no software Geneious Prime.

### 5.3 Análise dos resultados das curvas de concentração-resposta

A mortalidade das larvas será avaliada 48 horas após a infestação dos bioensaios. Larvas que não apresentarem movimentos coordenados ao serem tocadas com um pincel serão consideradas mortas. Todas as análises estatísticas serão realizadas no software R (*R Core Team*, 2022). Os dados de mortalidade serão submetidos a uma análise de Probit utilizando-se GLM para distribuição binomial. As  $CL_{50s}$  (concentração letal necessária para matar 50% dos indivíduos) serão calculadas por meio da função *dose.p* utilizando-se o pacote MASS (Venables; Ripley, 2002). A razão de resistência será calculada por meio da divisão entre a  $CL_{50}$  da população mutante e a  $CL_{50}$  da população suscetível.

## 6. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Atividades	Mês						
	Em andamento	1°	2°	3°	4°	5°	6°
Revisão da literatura							
Condução dos experimentos de docagem molecular							
Estabelecimento da linhagem mutante							
Sequenciamento de Sanger dos indivíduos mutantes							
Condução dos bioensaios das curvas de concentração-resposta							
Redação do trabalho de conclusão de curso							
Defesa do trabalho de conclusão de curso							

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMEZIAN, D.; NAUEN, R.; LE GOFF, G. Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification genes in insects - An overview. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Academic Press Inc., v. 174, 104822, 2021.

BASS, C.; FIELD, L. M. Gene amplification and insecticide resistance. **Pest Management Science**, v. 67, p. 886–890, 2011.

- BAXTER, S. W.; CHEN, M.; DAWSON, A.; ZHAO, J. Z.; VOGEL, H.; SHELTON, A. M.; HECKEL, D. G.; JIGGINS, C. D. Mis-spliced transcripts of nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 6$  are associated with field evolved spinosad resistance in *Plutella xylostella* (L.). **PLoS Genetics**, v. 6, n. 1, 2010.
- BERGER, M.; PUINEAN, A. M.; RANDALL, E.; ZIMMER, C. T.; SILVA, W. M.; BIELZA, P.; FIELD, L. M.; HUGHES, D.; MELLOR, I.; HASSANI-PAK, K.; SIQUEIRA, H. A. A.; WILLIAMSON, M. S.; BASS, C. Insecticide resistance mediated by an exon skipping event. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 22, p. 5692–5704, 2016.
- BOLZAN, A.; PADOVEZ, F. E. O.; NASCIMENTO, A. R. B.; KAISER, I. S.; LIRA, E. C.; AMARAL, F. S. A.; KANNO, R. H.; MALAQUIAS, J. B.; OMOTO, C. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest Management Science**, v. 75, n. 10, p. 2682–2689, 2019.
- CABI *Spodoptera frugiperda*. 2022. In: **Invasive species compendium**. Wallingford, UK: CABI International. <https://www.cabi.org/isc/fallarmyworm>. Acesso em: 04 de março de 2023.
- CARVALHO, R. A.; OMOTO, C.; FIELD, L. M.; WILLIAMSON, M. S.; BASS, C. Investigating the Molecular Mechanisms of Organophosphate and Pyrethroid Resistance in the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.
- CROUSE, G. D.; SPARKS, T. C.; SCHOONOVER, J.; GIFFORD, J.; DRIPPS, J.; BRUCE, T.; LARSON, L. L.; GARLICH, J.; HATTON, C.; HILL, R. L.; WORDEN, T. V.; MARTYNOW, J. G. Recent advances in the chemistry of spinosyns †. **Pest Management Science**, v. 57, p. 177-185, 2001.
- DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311-316, 2001.
- DOURIS, V.; DENECKE, S.; VAN LEEUWEN, T.; BASS, C.; NAUEN, R.; VONTAS, J. Using CRISPR/Cas9 genome modification to understand the genetic basis of insecticide resistance: *Drosophila* and beyond. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 167, n. April, p. 104595, 2020.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11-15. 1987.
- DRIPSS J.E., BOUCHER R. E., CHLORIDIS A., et al . The spinosyn insecticides. In: Lopez O, Fernandez Bolanos JG (eds). Green trends in insect control. Spec. Publ. – **Royal Society of Chemistry**, p. 163-212, 2011.
- FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, n. 2, p. 83–89,

2019.

GARLET, C. G.; GUBIANI, P. da S.; PALHARINI, R. B.; MOREIRA, R. P.; GODOY, D. N.; FARIAS, J. R.; BERNARDI, O. Field-evolved resistance to chlorpyrifos by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Inheritance mode, cross-resistance patterns, and synergism. **Pest Management Science**, v. 77, n. 12, p. 5367–5374, 2021.

GRANT, C.; JACOBSON, R.; ILIAS, A.; BERGER, M.; VASAKIS, E.; BIELZA, P.; ZIMMER, C. T.; WILLIAMSON, M. S.; FFRENCH-CONSTANT, R. H.; VONTAS, J.; RODITAKIS, E.; BASS, C. The evolution of multiple-insecticide resistance in UK populations of tomato leafminer, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science**, v. 75, n. 8, p. 2079–2085, 2019.

GUPTA, M.; SHARMA, R.; KUMAR, A. Docking Techniques in Toxicology: An Overview. **Current Bioinformatics**, v. 15, n. 6, p. 600–610, 2019.

HSU, J.; FENG, H.; WU, W.; GEIB, S. M.; MAO, C.; VONTAS, J. Truncated transcripts of nicotinic acetylcholine subunit gene *Bd a6* are associated with spinosad resistance in *Bactrocera dorsalis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 10, p. 806–815, 2012.

JIANG, F.; DOUDNA, J. A. CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms. **Annual Review of Biophysics**, v. 46, p. 505–529, 2017.

KANNO, R. H.; NASCIMENTO, A. R. B.; MONTEIRO, C. P.; AMARAL, F. S. A.; SINGH, K. S.; TROCZKA, B. J.; BASS, C.; CONSOLI, F. L.; OMOTO, C. Genome mapping and transcriptome analysis reveals the molecular mechanism of spinetoram resistance in *Spodoptera frugiperda*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 202, 105921, 2024.

KASTEN P Jr, PRECETTI A. A. C. M, PARRA J. R. P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Brazilian Journal of Agriculture**, v. 53, p. 68– 78, 1978.

KIRST, H. A. The spinosyn family of insecticides: Realizing the potential of natural products research. **Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 3, p. 101–111, 2010.

LIN, L.; HAO, Z.; CAO, P.; YUCHI, Z. Homology modeling and docking study of diamondback moth ryanodine receptor reveals the mechanisms for channel activation, insecticide binding and resistance. **Pest Management Science**, v. 76, n. 4, p. 1291–1303, 2020.

LIRA, E. C.; BOLZAN, A.; NASCIMENTO, A. R. B.; AMARAL, F. S. A.; KANNO, R. H.; KAISER, I. S.; OMOTO, C. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram: inheritance



- and cross-resistance to spinosad. **Pest Management Science**, v. 76, n. 8, p. 2674–2680, 2020.
- MEI, Y.; WANG, Y.; CHEN, H.; SUN, Z. S.; JU, X. Da. Recent Progress in CRISPR/Cas9 Technology. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 43, n. 2, p. 63–75, 2016.
- MONTEZANO, D. G.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; SPECHT, A.; ROQUE-SPECHT, V. F.; SOUSA-SILVA, J. C.; PAULA-MORAES, S. V.; PETERSON, J. A.; HUNT, T. E. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) in the Americas. **African Entomology**, v. 26, n. 2, p. 286–300, 2018.
- MURARO, D. S.; DE OLIVEIRA ABBADE NETO, D.; KANNO, R. H.; KAISER, I. S.; BERNARDI, O.; OMOTO, C. Inheritance patterns, cross-resistance and synergism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistant to emamectin benzoate. **Pest Management Science**, v. 77, n. 11, p. 5049–5057, 2021.
- NASCIMENTO, A. R. B. do; FARIAS, J. R.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; OMOTO, C. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science**, v. 72, n. 4, p. 810–815, 2016.
- NASCIMENTO, A. R. B. do; PAVINATO, V. A. C.; RODRIGUES, J. G.; SILVA-BRANDÃO, K. L.; CONSOLI, F. L.; MICHEL, A.; OMOTO, C. There is more than chitin synthase in insect resistance to benzoylureas: molecular markers associated with teflubenzuron resistance in *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, v. 95, n. 1, p. 129–144, 2022.
- NASCIMENTO, A. R. B. do; RODRIGUES, J. G.; KANNO, R. H.; AMARAL, F. S. A.; MALAQUIAS, J. B.; SILVA-BRANDÃO, K. L.; CONSOLI, F. L.; OMOTO, C. Susceptible monitoring and comparative gene expression of susceptible and resistant strains of *Spodoptera frugiperda* to lambda-cyhalothrin and chlorpyrifos. **Pest Management Science**, 2023.
- NAUEN, R.; BASS, C.; FEYEREISEN, R.; VONTAS, J. The role of Cytochrome P450s in Insect Toxicology and Resistance. **Annual Review of Entomology**, v. 67, p. 105-124, 30 set. 2022.
- OKUMA, D. M.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, O.; SILVA, A. P.; OMOTO, C. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, p. 1441–1448, 2018.
- PALLI, S. R. CncC/Maf-mediated xenobiotic response pathway in insects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 2, 2020.
- PERRY, T.; MCKENZIE, J. A.; BATTERHAM, P. A *Da6* knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 2, p. 184–188, 2007.

- R Core Team. 2023. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- REDMAN, M.; KING, A.; WATSON, C.; KING, D. What is CRISPR/Cas9? **Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition**, v. 101, n. 4, p. 213–215, 2016.
- SALGADO, V. L. et al. The spinosyns: chemistry, biochemistry, mode of action, and resistance. **Insect control: Biological and synthetic agents**, p. 207–243, 2010.
- SAMANTSIDIS, G. R.; O'REILLY, A. O.; DOURIS, V.; VONTAS, J. Functional validation of target-site resistance mutations against sodium channel blocker insecticides (SCBIs) via molecular modeling and genome engineering in *Drosophila*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 104, n. December 2018, p. 73–81, 2019.
- SANTOS, L. H. S.; FERREIRA, R. S.; CAFFARENA, E. R. Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. **Methods in Molecular Biology**, v. 2053, p. 13-35, 2019.
- SHI, T.; TANG, P.; WANG, X.; YANG, Y.; WU, Y. CRISPR-mediated knockout of nicotinic acetylcholine receptor (*nAChR*)  $\alpha 6$  subunit confers high levels of resistance to spinosyns in *Spodoptera frugiperda*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 187, n. August, p. 105191, 2022.
- SILVA, W. M.; BERGER, M.; BASS, C.; WILLIAMSON, M.; MOURA, D. M. N.; RIBEIRO, L. M. S.; SIQUEIRA, H. A. A. Mutation (G275E) of the nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 6$  subunit is associated with high levels of resistance to spinosyns in *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 131, p. 1–8, 2016.
- SINDHU, T.; VENKATESAN, T.; PRABHU, D.; JEYAKANTHAN, J.; GRACY, G. R.; JALALI, S. K.; RAI, A. Insecticide-resistance mechanism of *Plutella xylostella* (L.) associated with amino acid substitutions in acetylcholinesterase-1: A molecular docking and molecular dynamics investigation. **Computational Biology and Chemistry**, v. 77, n. September, p. 240–250, 2018.
- SPARKS, T. C.; DRIPPS, J. E.; WATSON, G. B.; PAROONAGIAN, D. Resistance and cross-resistance to the spinosyns - A review and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, n. 1, p. 1-10., 2012.
- SPARKS, T. C.; LORSBACH, B. A. Perspectives on the agrochemical industry and agrochemical discovery. **Pest Management Science**, v. 73, n. 4, p. 672–677, 2017.
- SPARKS, T. C.; NAUEN, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 122–128, 2015.

SPARKS, T. C.; WESSELS, F. J.; LORSBACH, B. A.; NUGENT, B. M.; WATSON, G. B. The new age of insecticide discovery-the crop protection industry and the impact of natural products. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 161, n. October, p. 12–22, 2019.

VENABLES W.N., RIPLEY B.D. Modern Applied Statistics with S. **Springer**. New York. 4<sup>th</sup>. 2002.

WANG, H.; LA RUSSA, M.; QI, L. S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and beyond. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, p. 227–264, 2016.

WANG, J.; WANG, X.; LANSDELL, S. J.; ZHANG, J.; MILLAR, N. S.; WU, Y. A three amino acid deletion in the transmembrane domain of the nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 6$  subunit confers high-level resistance to spinosad in *Plutella xylostella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 71, p. 29–36, 2016.

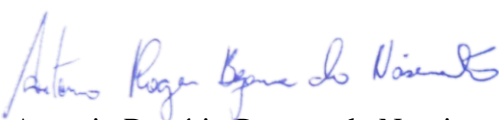
ZHENG, X; LIU, G; OZOE, Y; JU, X. Mechanistic insights into the selectivity of bicycphosphorothionate antagonists for housefly versus rat GABA receptors. **Pest Management Science**, v. 80, i. 3, p. 1382-1399, 2023.

ZIMMER, C. T.; GARROOD, W. T.; PUINEAN, A. M.; ECKEL-ZIMMER, M.; WILLIAMSON, M. S.; DAVIES, T. G. E.; BASS, C. A CRISPR/Cas9 mediated point mutation in the *alpha 6* subunit of the nicotinic acetylcholine receptor confers resistance to spinosad in *Drosophila melanogaster*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 73, p. 62–69, 2016.




Celso Omoto  
Professor Titular  
Depto. de Entomologia e Acarologia  
USP/ESALQ

Professor Dr. Celso Omoto  
Orientador



Dr. Antonio Rogério Bezerra do Nascimento  
Coorientador



Carolina Pacchioni Monteiro  
Carolina Pacchioni Monteiro  
Graduanda em Ciências Biológicas



COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP

## PARECER

Projeto intitulado: “*Investigação funcional do mecanismo de resistência de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas espinosinas*”, de responsabilidade do Professor Celso Omoto, analisado pela Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa – ESALQ/USP, Ad Referendum, está de acordo com os princípios éticos ambientais adotados das leis e decretos complementares (Lei 6.894/80, Lei 7.803/89, Lei 9.985/00, Lei 9.974/00, Decreto 99.556/90, Decreto 4.340/02, Instrução Normativa 169/2008, ABNT/NBR 10004:2004, Resolução ANVISA RDC 306/2004, Resolução 358/05) acrescida dos dispositivos e alterações, bem como os demais decretos e instruções normativas relativas aos assuntos ambientais pertinentes. Parecer válido para o período de 01/10/2019 a 01/10/2024, com extensão de 12 (doze) meses.

Piracicaba, 07 de julho de 2023.

Prof. Dr. Antonio Sampaio Baptista  
Presidente da CEAP/ESALQ/USP

Este parecer exclui demais aspectos éticos que envolvam a utilização de animais de laboratório ou seres humanos, os qual competência das Comissões de Ética em Pesquisa com Animais e de Seres Humanos, respectivamente.