

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM SAÚDE PÚBLICA

KARLOS DIOGO DE MELO CHALEGRE

**Caracterização e detecção molecular de alelos de
resistência ao biolarvicida *Bacillus sphaericus* em
*Culex quinquefasciatus***

RECIFE
2013

KARLOS DIOGO DE MELO CHALEGRE

**CARACTERIZAÇÃO E DETECÇÃO MOLECULAR DE ALELOS DE RESISTÊNCIA
AO BIOLARVICIDA *Bacillus sphaericus* Em *Culex quinquefasciatus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha

Co-orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

**RECIFE
2013**

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

C436c Chalegre, Karlos Diogo de Melo.

Caracterização e detecção molecular de alelos de resistência ao biolarvicida *Bacillus sphaericus* em *Culex quinquefasciatus*/ Karlos Diogo de Melo Chalegre. — Recife: O autor, 2013.
143 f.: il.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2013.

Orientadora: Maria Helena Neves Lobo Silva Filha, Co-orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto.

1. Controle biológicos de vetores. 2. Toxinas bacterianas. 3. *Culex*. 4. Receptores da superfície celular. 5. Resistência a inseticidas. 6. Frequência do gene. I. Silva Filha, Maria Helena Neves Lobo. II. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de. III. Título.

CDU 614.449

KARLOS DIOGO DE MELO CHALEGRE

**Caracterização e detecção molecular de alelos de resistência ao biolarvicida
Bacillus sphaericus em *Culex quinquefasciatus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 05/02/2013

BANCA EXAMINADORA

Dr. Herbert Álvaro Abreu de Siqueira
Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE
(Membro externo)

Dra. Norma Machado da Silva
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
(Membro externo)

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
(Membro interno)

Dr. Rafael Dhalia
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
(Membro interno)

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
(Orientadora)

Dedico este trabalho a minha mãe, à Klarissa e a Kauã.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha super mãe que sempre me ajudou e, junto comigo, chegamos até aqui.

A minha família, Karla, Kildaire, Klarissa, Heitor, Kauã e papai.

Aos meus colegas e professores do Colégio Decisão que me ajudaram muito a iniciar a minha vida profissional.

À Dra. Maria Helena, por todos seus ensinamentos desde a iniciação científica, paciência em algumas ocasiões e por ter aceitado trabalhar comigo nestes quase 10 anos, incluindo iniciação científica, mestrado e doutorado.

A minha co-orientanda, Daniela Tavares, que sem seu apoio o andamento da tese teria sido muito mais laborioso.

À Dra. Tatiany Romão que foi muito mais que apenas uma colega de laboratório e colaboradora do trabalho, mas sim uma amiga.

Ao Dr. Osvaldo Pompílio e à Dra. Cláudia Oliveira pelo auxílio e colaboração ao longo destes 4 anos.

Às mestres Liliane Amorim e Lígia Ferreira pela colaboração para a realização deste trabalho e amizade construída ao longo de tantos anos.

À equipe do Serviço de Referência em Culicídeos Vetores pela avaliação da susceptibilidade das populações, em especial à Rose por sua paciência e ajuda nos momentos que precisei.

À Dra. Cássia Docena, ao Dr. Marlos Chaves, e à MSc. Vivane Carvalho do NPT/CPqAM pelas suas contribuições no uso da plataforma de sequenciamento e PCR em tempo-real.

Às equipes da FUNASA e CVA pelo apoio na coleta de material biológico no campo.

À banca por ter aceitado participar de minha defesa.

A todos que fazem parte do Depto. de Entomologia, incluindo as equipes do laboratório e insetário, pela ajuda nos experimentos, atenção, risadas e pelo bom cafezinho em muitas de nossas tardes.

Aos meus amigos, tanto do Aggeu como do mundo afora, que me ajudaram muito a esquecer um pouco da ciência nos finais de semana, com sua companhia e amizade, em especial a Lili, Lígia, Ieda, Tati, Dani, Elô, Vlad, Andinho, Caio, Rodrigo, Amaranta, Danona, Jana, Binho, Léo, Emidio, Thiers, Stro, Girleno e Romero. Igualmente ao grupo “volta ao mundo em 80 pratos”, Paloma, Carina, Rosanny, Mari, Vlad, Felipe e Carol pelos almoços e tardes maravilhosas que passamos juntos discutindo sobre ciência e várias outros assuntos.

Ao CNPq, CAPES, FACEPE e ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

“Não, não me arrependo de nada”

Michel Vaucaire

CHALEGRE, K. D. M. **Caracterização e detecção molecular de alelos de resistência ao biolarvicida *Bacillus sphaericus* em *Culex quinquefasciatus*.** Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

RESUMO

A resistência de *Culex quinquefasciatus* à toxina inseticida (Bin) de *Bacillus sphaericus* (Bsp) pode estar associada a uma falha da ligação da toxina com os receptores Cqm1, localizados no *microvilli* intestinal das larvas através de uma âncora GPI. Mutações no gene *cqm1* podem impedir a expressão de proteínas Cqm1 funcionais e gerar um alto nível de resistência. O objetivo deste trabalho foi caracterizar e avaliar a frequência de alelos de resistência (*r*) em populações e colônias de *C. quinquefasciatus*. Neste estudo, o alelo *r cqm1_{REC}*, selecionado e identificado anteriormente na colônia R2362, foi detectado por PCR alelo-específica em quatro populações de Recife com frequências entre 0,001 e 0,017. Em duas populações foram identificados novos alelos *r*, o *cqm1_{REC-D16}* e o *cqm1_{REC-D25}*, com frequência entre 0,002-0,006. Estes alelos são caracterizados por deleções de 16 e 25-nt, respectivamente, as quais geram códon de terminação da tradução prematuro (CTTP) e não codificam proteínas com âncora GPI. Um segundo alelo *r (cqm1_{REC-2})* foi identificado na colônia R2362 e possui uma mutação *nonsense* (G1292A) que também gera um CTTP, impedindo a localização de receptores Cqm1 no epitélio. O alelo *cqm1_{REC-2}* foi co-selecionado com o *cqm1_{REC}* na colônia R2362 e uma análise da competição entre eles mostrou que o *cqm1_{REC-2}* predomina sob pressão de seleção com Bsp, enquanto que o *cqm1_{REC}* é majoritário na ausência de Bsp. A expressão relativa dos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*, avaliada por PCR em tempo real, mostrou que ambos possuem uma expressão significativamente menor em relação ao *cqm1*. Amostras de *microvilli* intestinal de larvas homozigotas para cada alelo apresentaram uma baixa capacidade de interação com a toxina Bin, corroborando os dados de expressão gênica e o fenótipo de resistência. Este estudo mostrou a detecção e caracterização de novos alelos de *C. quinquefasciatus* que conferem resistência a Bsp e estes dados são fundamentais para o diagnóstico e manejo da resistência em programas de controle

Palavras-chave: Toxina Bin, receptor Cqm1, α -glicosidase, alelos de resistência, frequência alélica, manejo da resistência.

CHALEGRE, K. D. M. **Characterization and molecular detection of resistance alleles to the *Bacillus sphaericus* biolarvicide in *Culex quinquefasciatus***. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

ABSTRACT

Culex quinquefasciatus resistance to the insecticidal toxin (Bin) from *Bacillus sphaericus* (Bsp) can be associated with a failure of toxin binding to Cqm1 receptors located on larvae midgut via a GPI anchor. Mutations in the *cqm1* gene can prevent the expression of Cqm1 functional proteins leading to high levels of resistance. The goal of this study was to characterize resistance alleles (*r*) and evaluate their frequency in *C. quinquefasciatus* populations and colonies. In this study, the *r* allele *cqm1_{REC}*, previously selected and identified in the colony R2362, was detected by allele-specific PCR in four populations from Recife Metropolitan Area and the frequencies ranged from 0.001 to 0.017. New *r* alleles were identified in two populations, *cqm1_{REC-D16}* and *cqm1_{REC-D25}*, with frequencies between 0.002-0.006. Both alleles are characterized by deletions of 16 and 25-nt, respectively, which generate a premature translation termination codon (PTTC) preventing the expression of GPI-anchored proteins. A second *r* allele (*cqm1_{REC-2}*) was identified in the colony R2362 and it has a nonsense mutation (G1292A), which also generates a PTTC and prevents the localization of Cqm1 receptors on the midgut. The *cqm1_{REC-2}* allele was co-selected with *cqm1_{REC}* in the R2362 colony and analysis of competition between these alleles showed that the *cqm1_{REC-2}* predominates under selection pressure with Bsp, whereas the *cqm1_{REC}* is majoritary in Bsp absence. The relative expression of *cqm1_{REC}* and *cqm1_{REC-2}* alleles evaluated by real-time PCR showed that both have a significative lower expression in comparison to the *cqm1*. Samples of midgut microvilli from homozygous larvae for each allele had a low capacity to interact with the Bin toxin corroborating data from gene expression and resistance phenotype. This study demonstrated the detection and characterization of new alleles that confer *C. quinquefasciatus* resistance to Bsp and these data are essential for the resistance diagnosis and management in control programs.

Key words: Bin toxin, Cqm1 receptor, α -glucosidase, resistance alleles, allelic frequency, resistance management.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biológico de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	22
Figura 2 – Visão longitudinal em micrografia eletrônica do <i>Bacillus sphaericus</i> , em fase de esporulação.	28
Figura 3 – Modo de ação da toxina Bin de <i>Bacillus sphaericus</i> em larvas de <i>Culex</i> sp.	35
Figura 4 – Análise das α -glicosidases presentes em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> sensíveis (S) e resistentes (R) a <i>Bacillus sphaericus</i> .	42
Figura 5 – Etapas de investigação realizadas ao longo deste trabalho.	57
Figura 6 – Separação eletroforética de fragmentos amplificados por PCR a partir do gene <i>cqm1</i> ou <i>cpm1</i> de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> ou <i>Culex pipens</i> , respectivamente, de uma colônia susceptível (1-3) e da colônia resistente GEO (4).	72
Figura 7 – Separação eletroforética de fragmentos amplificados por PCR a partir de diferentes alelos do gene <i>cqm1</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	75
Figura 8 – Representação do gene que codifica o receptor Cqm1 em <i>Culex quinquefasciatus</i> (número de acesso no GenBank DQ333335) e localização dos polimorfismos dos alelos <i>cqm1</i> _{REC} , <i>cqm1</i> _{REC-D16} e <i>cqm1</i> _{REC-D25} .	76
Figura 9 – Separação eletroforética de fragmentos amplificados por PCR a partir do gene <i>cqm1</i> , de larvas <i>Culex quinquefasciatus</i> da colônia R2362 resistente a <i>Bacillus sphaericus</i> .	81
Figura 10 – Representação do gene que codifica o receptor Cqm1 em <i>Culex quinquefasciatus</i> (número de acesso no GenBank DQ333335) e localização dos polimorfismos dos alelos <i>cqm1</i> _{REC} , <i>cqm1</i> _{REC-D16} , <i>cqm1</i> _{REC-D25} e <i>cqm1</i> _{REC-2} .	81
Figura 11 – Separação eletroforética de fragmentos amplificados por PCR de alelos do gene <i>cqm1</i> de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> das colônias Susceptível, R2362/REC e R2362/REC-2.	84

Figura 12 – Frequência dos alelos <i>cqm1</i> (S), <i>cqm1_{REC}</i> (REC) e <i>cqm1_{REC-2}</i> (REC-2) em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> da colônia resistente R2362 mantida em laboratório há mais de 190 gerações.	87
Figura 13 – Frequência alélica e genotípica do <i>cqm1_{REC}</i> (REC) e <i>cqm1_{REC-2}</i> (REC-2) em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de oito gerações (F ₁₈₇ a F ₁₉₄) da colônia R2362, mantida sob condições de laboratório e tratamento com o biolarvicida <i>Bacillus sphaericus</i> a cada geração.	89
Figura 14 – Frequência alélica e genotípica do <i>cqm1_{REC}</i> (REC) e <i>cqm1_{REC-2}</i> (REC-2) em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de 12 gerações (F ₁ a F ₁₂) da colônia R2362/RECREC-2, mantida sob condições de laboratório e sem tratamento com o biolarvicida <i>Bacillus sphaericus</i> .	90
Figura 15 – Frequência alélica e genotípica do <i>cqm1_{REC}</i> (REC) e <i>cqm1_{REC-2}</i> (REC-2) em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de quatro gerações (F ₁₁ a F ₁₄) da colônia R2362/RECREC-2/EXP, mantida sob condições de laboratório e pressão de seleção com o biolarvicida <i>Bacillus sphaericus</i> (Bsp).	91
Figura 16 – Curva de dissociação da RT-PCR em tempo real quantitativa dos genes <i>cqm1</i> e <i>18S</i> .	93
Figura 17 – Expressão relativa dos alelos de resistência <i>cqm1_{REC}</i> e <i>cqm1_{REC-2}</i> em relação ao gene de referência susceptível, <i>cqm1</i> .	94
Figura 18 – Expressão relativa dos alelos de resistência <i>cqm1_{REC}</i> e <i>cqm1_{REC-2}</i> .	94
Figura 19 – Curva de competição entre a toxina Bin de <i>Bacillus sphaericus</i> radiomarcada (Bin-I ¹²⁵) e preparações de <i>microvilli</i> intestinal de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> das colônias Susceptível, R2362/REC, R2363/REC2 e de larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	95

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Colônias de *Culex* sp. selecionadas sob condições de laboratório (Lab) ou populações de campo expostas ao tratamento com o *Bacillus sphaericus* que apresentaram alterações na susceptibilidade a este agente. 38
- Tabela 2** – Estimativas de frequências de alelos de resistência às toxinas dos biolarvicidas *Bacillus thuringiensis* (Bt) e *Bacillus sphaericus* (Bsp) em diferentes espécies de insetos. 48
- Tabela 3** – *Primers* utilizados para a detecção dos alelos *cqm1*(S), *cqm1_{REC}* (REC), *cqm1_{GEO}* (GEO) e *cqm1_{REC-2}* (REC-2) em *Culex quinquefasciatus*, a partir de reações em cadeia da polimerase (PCR). As bases em minúsculo e sublinhadas correspondem a troca de bases realizadas para conferir uma maior especificidade as reações de PCR. 64
- Tabela 4** – *Primers* utilizados para o sequenciamento do gene *cqm1* e seus alelos. 66
- Tabela 5** – *Primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real. 67
- Tabela 6** – Toxicidade do *Bacillus sphaericus* cepa 2362 (SPH88) para larvas de 4º estágio de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia de laboratório susceptível (S) e duas populações não tratadas (Ipojuca-IPO, Jaboatão dos Guararapes-JAB). 73
- Tabela 7** – Frequência dos alelos *cqm1*, *cqm1_{REC}*, *cqm1_{REC-D16}* e *cqm1_{REC-D25}* em larvas de *Culex quinquefasciatus* de populações da Região Metropolitana do Recife sem histórico de tratamento com o *Bacillus sphaericus* (Ipojuca, Jaboatão, Roda de Fogo e Azeitona) e de uma população tratada (Água Fria). 74
- Tabela 8** – Polimorfismos encontrados na sequência nucleotídica do alelo *cqm1_{REC-D16}* em comparação ao gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus* (número de acesso no GenBank DQ333335). 77
- Tabela 9** – Polimorfismos encontrados na sequência completa de nucleotídeos do alelo *cqm1_{REC-2}* em relação ao gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus* (número de acesso no GenBank DQ333335). 82

Tabela 10 – Frequência dos genótipos a partir dos alelos *cqm1*(S), *cqm1_{REC}* (A1) e *cqm1_{REC-2}* (A2) em larvas de *Culex quinquefasciatus* em diferentes gerações da colônia resistente R2362, mantida em laboratório. 86

Tabela 11 – *Cycle Threshold* (CTs) médios dos genes alvo, *cqm1*, e controle endógeno, *18S*, obtidos através de PCR em tempo real de 15 larvas das colônias susceptível, e resistentes R2362/A1 e R2361/A2. 92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Aam1** – *Aedes aegypti* maltase 1
- Agm3** – *Anopheles gambiae* maltase 3
- AF** – Água Fria
- BBMF** – Frações ricas em microvilosidades intestinais de larvas de *Culex*
- Bin** – Toxina Binária de *Bacillus sphaericus*
- Bin-I¹²⁵** – Toxina Bin radiomarcada com o Iodo 125
- BSA** – Albumina sérica bovina
- Bsp** – *Bacillus sphaericus*
- Bt** – *Bacillus thuringiensis*
- Bti** – *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis*
- cDNA** – DNA complementar
- CL₅₀ e CL₉₀** – Concentrações letais de compostos para 50 e 90% dos indivíduos expostos
- Cpm1** – *Culex pipiens* maltase 1
- CPqAM** – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
- Cqm1** – *Culex quinquefasciatus* maltase 1
- CqSF** – Colônia de laboratório de *Culex quinquefasciatus* susceptível a Bsp 2362
- CT** – Cycle Threshold
- CVA** – Centro de Vigilância Ambiental
- DDT** – Dicloro Difenil Tricloroetano
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- dNTP** – desoxirribonucleotídeos trifosfato
- EC** – Código da enzima dado pela *Enzyme Commission*
- EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EUA** – Estados Unidos da América
- FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz
- FUNASA** – Fundação Nacional de Saúde
- GEO** – Colônia de *Culex quinquefasciatus* altamente resistente a *Bacillus sphaericus*, originária dos Estados Unidos
- GPI** – Glycosylphosphatidylinositol
- HCl** – Ácido Clorídrico
- kDa** – Kilo dálton

L₁, L₂, L₃, L₄ – Estádios larvais 1, 2, 3 e 4.

MIV – Manejo Integrado de Vetores

nM – Nanômetro

NMD – Nonsense mediated decay (via de decaimento do RNA mensageiro)

NPT – Núcleo de Plataforma Tecnológica

nt – nucleotídeos

ORF – Open reading frame (matriz aberta de leitura)

pb – pares de base

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PBS/Az – Solução salina tamponada com fosfato acrescido de azida sódica

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

PM – Peso molecular

r – Alelo de resistência

RMR – Região Metropolitana do Recife

RNA – Ácido ribonucléico

R2362 – Colônia de laboratório de *Culex quinquefasciatus* resistente a Bsp 2362

R2362/REC – Colônia de laboratório de *Culex quinquefasciatus* resistente a Bsp 2362 homozigota para o alelo *cqm1_{REC}*

R2362/REC-2 – Colônia de laboratório de *Culex quinquefasciatus* resistente a Bsp 2362 homozigota para o alelo *cqm1_{REC-2}*

R2362/RECREC-2 – Colônia de laboratório de *Culex quinquefasciatus* resistente a Bsp 2362 obtida a partir do cruzamento das colônias R2362/REC e R2362/REC-2

R2362/RECREC-2/EXP – Colônia de laboratório de *Culex quinquefasciatus* resistente a Bsp 2362 oriunda da R2362/RECREC-2 e tratada com Bsp

REC – Alelo *cqm1_{REC}*

REC-2 – Alelo *cqm1_{REC-2}*

RR – Razão de Resistência

RT-PCR – Real-Time PCR (PCR em tempo-real)

S – Alelo *cqm1*

SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismos de base única)

TA – Temperatura ambiente

UV – Ultravioleta

VNO – Vírus do Oeste do Nilo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 <i>Culex quinquefasciatus</i>	21
2.1.1 Biologia e ecologia	21
2.1.2 Importância na saúde pública	22
2.2 Controle de insetos vetores	25
2.3 Bactérias entomopatógenas	27
2.4 <i>Bacillus sphaericus</i>	27
2.4.1 Toxinas inseticidas	29
2.4.2 Modo de ação da toxina Bin	33
2.5 Receptores da toxina Bin	35
2.6 Resistência à toxina Bin	37
2.6.1 Mecanismos e bases moleculares	39
2.6.2 A resistência da colônia R2362	40
2.7 Manejo da resistência	42
2.8 Caracterização de alelos <i>r</i> que conferem resistência a biolarvicidas	43
2.9 Custo biológico da resistência	50
3 JUSTIFICATIVA	53
4 PERGUNTA CONDUTORA	54
5 HIPÓTESE	55
6 OBJETIVOS	56
6.1 Objetivo geral	56
6.2 Objetivos específicos	56
7 MATERIAL E MÉTODOS	57
7.1 Amostras de culicídeos	58
7.1.1 Colônias	58
7.1.2 Populações	59
7.2 Avaliação da susceptibilidade <i>in vivo</i>	59
7.2.1 Bioensaios dose-diagnóstica	60
7.2.2 Bioensaios dose-resposta	60
7.3 PCR específica para detecção dos alelos <i>cpm1_{GEO}</i>, <i>cqm1_{REC}</i> e <i>cqm1_{REC-2}</i>	61

7.3.1 Extração de DNA	61
7.3.2 PCR alelo-específica	61
7.4 Clonagem e sequenciamento do gene <i>cqm1</i>	65
7.5 Análise da expressão dos alelos <i>cqm1</i>_{REC} e <i>cqm1</i>_{REC-2}	66
7.5.1 Extração de RNA	66
7.5.2 RT-PCR em Tempo Real	67
7.5.3 Preparações de frações ricas em <i>microvilli</i> intestinal	68
7.5.4 Ensaios de competição	68
7.6 Estabilidade do alelo <i>cqm1</i>_{REC-2}	69
7.6.1 Avaliação da frequência do alelo <i>cqm1</i> _{REC-2} na colônia R2362	69
7.6.2 Análise da competição entre os alelos <i>cqm1</i> _{REC} e <i>cqm1</i> _{REC-2}	69
8 RESULTADOS	71
8.1 Screening do alelo <i>cqm1</i>_{GEO} na população tratada de Água Fria	71
8.2 Detecção do alelo <i>cqm1</i>_{REC} em populações naturais de <i>C. quinquefasciatus</i>	72
8.3 Identificação de novos alelos de resistência em populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	75
8.4 Caracterização do alelo <i>cqm1</i>_{REC-2} na colônia R2362	79
8.4.1 Identificação do polimorfismo associado à resistência do alelo <i>cqm1</i> _{REC-2}	79
8.4.2 Detecção dos alelos <i>cqm1</i> , <i>cqm1</i> _{REC} e <i>cqm1</i> _{REC-2} por PCR-multiplex	82
8.5 Frequência dos alelos <i>cqm1</i>_{REC} e <i>cqm1</i>_{REC-2} na colônia R2362	84
8.6 Competição dos alelos <i>cqm1</i>_{REC} e <i>cqm1</i>_{REC-2} sob condições de laboratório	87
8.7 Expressão dos alelos <i>cqm1</i>_{REC} e <i>cqm1</i>_{REC-2}	92
9 DISCUSSÃO	96
10 CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS	107
ANEXO A – Sequência do gene <i>cqm1</i> (N. de acesso no GenBank DQ333335) e localização dos 6 <i>primers</i> internos (Tabela 4) utilizados no sequenciamento dos alelos <i>cqm1</i>_{REC-D16}, <i>cqm1</i>_{REC-D25} e <i>cqm1</i>_{REC-2}.	124
APÊNDICE A – Considerações éticas	125
APÊNDICE B – Artigo 1	126
APÊNDICE C – Artigo 2	132

1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Culex quinquefasciatus* pode atuar como vetor de *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose bancroftiana no Brasil, além de ser um potencial vetor para arboviroses emergentes, tal como o Vírus do Oeste do Nilo (VNO), que já causou várias epidemias nos Estados Unidos e recentemente foi detectado em países da América do Sul, inclusive no Brasil. A redução populacional de *C. quinquefasciatus* pode ser alcançada através de métodos de controle e esta ação é essencial para interromper o ciclo de transmissão de patógenos e a morbidade causada por esta espécie. *Bacillus sphaericus* (Bsp) é uma bactéria entomopatogena utilizada como larvicida eficiente para o controle de espécies do gênero *Culex* e sua efetividade tem sido demonstrada em vários programas de controle. O principal fator tóxico de Bsp para larvas de culicídeos é a toxina binária (Bin) contida em um cristal protéico produzido durante a fase de esporulação da bactéria. Após a ingestão deste cristal pelas larvas, ocorre a sua solubilização em pH intestinal alcalino e a protoxina liberada no lúmen é clivada por serina-proteases para atingir a forma de toxina ativa. A ação da toxina Bin depende da interação com receptores específicos presentes na região apical da membrana das células do epitélio intestinal das larvas, e o receptor em *C. quinquefasciatus*, denominado Cqm1, é uma α -glicosidase ligada ao epitélio intestinal através de uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI). A ação deste biolarvicida depende da interação de apenas uma toxina com uma única molécula que é o receptor Cqm1 e, portanto, alterações neste sítio-alvo estão associadas à resistência.

Estudos da base molecular da resistência a Bsp permitiram a caracterização de quatro alelos de resistência do gene que codifica o receptor da toxina Bin, que foram identificados em duas colônias mantidas em laboratório e em uma população de campo do complexo *Culex pipiens*. Nas colônias GEO de *C. pipiens* (EUA), e R2362 de *C. quinquefasciatus* (Brasil), uma mutação pontual no gene *cpm1* (*cpm1_{GEO}*) e uma deleção de 19 nucleotídeos no gene *cqm1* (*cqm1_{REC}*), respectivamente, geram um códon de terminação de tradução prematuro levando à produção de proteínas truncadas, desprovidas de âncora GPI. Com a ausência da âncora, o receptor não é localizado na superfície do epitélio e, portanto não há ação da toxina Bin. Os outros dois alelos foram identificados na população de campo BP da França. O *cpm1_{BP}* apresenta uma mutação pontual que leva à produção de uma

proteína truncada, sem âncora GPI, devido a um códon de terminação prematuro. O *cpm1_{BP-del}* apresenta a inserção de um elemento transponível que causa uma deleção de 198 nt que gera uma perda de 66 aminoácidos na proteína sintetizada. Apesar desta proteína possuir a âncora GPI, ela não se liga à toxina Bin provavelmente por mudanças conformacionais ou perda do epitopo de ligação.

Um dos fatores determinantes no processo da seleção de resistência é a frequência inicial dos alelos de resistência (*r*) e o seu modo de herança em populações naturais expostas ao tratamento com biolarvicidas. Indivíduos resistentes podem ser identificados a partir de ensaios de susceptibilidade *in vivo*, porém esta detecção é difícil quando os alelos *r* têm herança recessiva. Por esta razão, para a detecção e o estabelecimento das frequências destes alelos, o método mais direto e específico é através de ferramentas moleculares como a PCR. Para o desenvolvimento das estratégias de manejo da resistência são necessários dados relativos à identidade e frequência inicial de alelos *r* nas populações que são alvo de inseticidas. A caracterização dos quatro alelos de resistência a Bsp (*cqm1_{REC}*; *cpm1_{GEO}*; *cpm1_{BP}* e *cpm1_{BP-del}*) em larvas do complexo *Culex pipiens* abriu perspectivas para o desenvolvimento de ferramentas moleculares para a avaliação de suas frequências em populações naturais tratadas ou não com Bsp e a ocorrência dos mesmos em áreas geográficas diferentes.

Várias áreas da Região Metropolitana do Recife (RMR) vêm sendo expostas a tratamentos com biolarvicidas à base de Bsp para o controle de populações de *Culex* e um trabalho prévio realizado por nossa equipe mostrou a viabilidade e importância da aplicação de uma ferramenta molecular para avaliar a frequência de alelos de resistência nestas populações. O alelo *cqm1_{REC}* foi caracterizado na colônia R2362, oriunda da RMR, e um *screening* realizado através de PCR alelo-específica permitiu determinar sua frequência em populações, demonstrando a sua importância para avaliar o risco de seleção da resistência. No caso de outros alelos, como o *cpm1_{GEO}*, oriundos de áreas geográficas diferentes, não se sabe se ocorrem nas populações da RMR e em que frequência.

Os dados da literatura indicam que o gene *cqm1* apresenta vários polimorfismos e alguns deles estão associados à resistência. A colônia R2362, selecionada em laboratório com Bsp, foi caracterizada como resistente após 46 gerações e a análise molecular demonstrou que a colônia era composta por indivíduos homocigotos para o alelo *cqm1_{REC}*. Recentemente, uma avaliação

genotípica de indivíduos desta colônia, após 160 gerações, demonstrou a presença de indivíduos portando outro alelo que pode conferir um alto nível de resistência a Bsp e foi co-selecionado com o alelo *cqm1_{REC}* na colônia R2362. A sucessão de alelos *r* em populações de campo expostas a inseticidas químicos têm sido registrada na literatura. No entanto, a seleção deste novo alelo em uma colônia sob condições de laboratório e sem fluxo gênico constitui um modelo interessante para o estudo da resistência.

O principal objetivo deste trabalho foi contribuir para a caracterização de alelos associados à resistência e desenvolvimento de métodos diagnósticos, visando usar estes conhecimentos para o manejo da resistência. Neste estudo foi realizado um *screening* de dois alelos *r* previamente caracterizados, o *cqm1_{REC}* e o *cpm1_{GEO}*, em populações de campo da RMR tratadas ou não com Bsp. Durante essa avaliação, foram detectados dois novos polimorfismos no gene *cqm1* associados à resistência em indivíduos destas populações, aumentando, desta forma, o repertório de alelos *r* a Bsp, o que é estratégico para identificar o risco de seleção da resistência. Além disso, um novo polimorfismo no gene *cqm1* foi identificado na colônia de laboratório R2362 que também leva a um fenótipo similar àquele apresentado pelo alelo *cqm1_{REC}* e avaliações para caracterizar este novo alelo em colônias de laboratório foram realizadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Culex quinquefasciatus*

C. quinquefasciatus é um inseto da ordem Diptera, pertencente à família Culicidae, que apresenta distribuição cosmopolita, preponderando nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É um mosquito amplamente encontrado no Brasil, principalmente devido às características climáticas do país e a sua abundância em áreas urbanas está ligada à ocupação desordenada e aos problemas de saneamento (CONSOLI, 1994), que possibilitam uma grande disponibilidade de criadouros preferenciais desta espécie com água estagnada e rica em matéria orgânica.

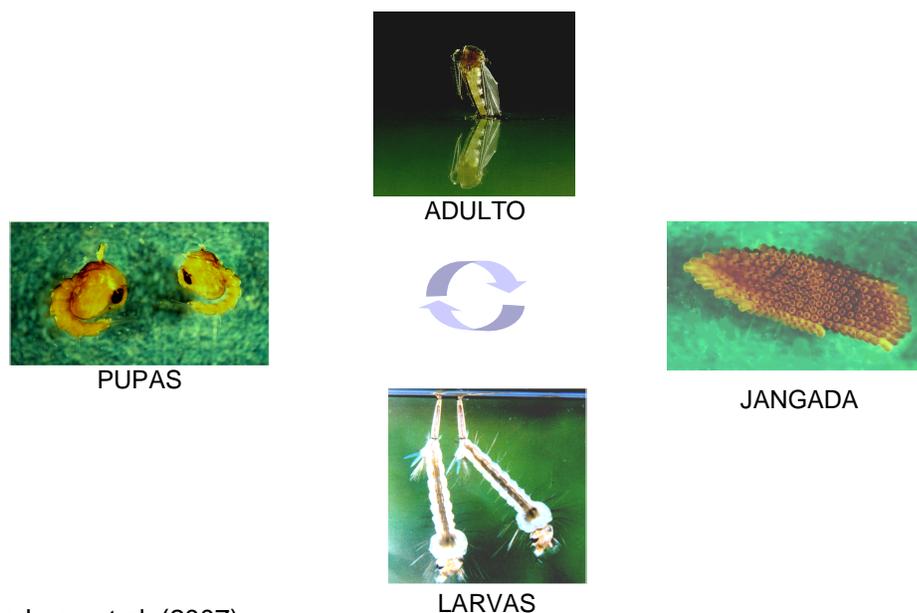
2.1.1 Biologia e ecologia

C. quinquefasciatus tem um ciclo biológico relativamente curto, com média de 10 dias, compreendendo as fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (Figura 1). Os mosquitos adultos têm hábitos noturno e endofílico e as fêmeas são hematófagas. Para realizar a postura dos ovos, as fêmeas necessitam fazer o repasto sanguíneo em uma grande variedade de animais, sobretudo o homem, pois são antropofílicas. Cerca de 48 horas após o repasto sanguíneo, as fêmeas depositam, em ambiente aquático, seus ovos agrupados em forma de jangadas. Aproximadamente 48 horas após a oviposição, ocorre a eclosão das larvas do 1º estágio (L₁), as quais sofrem mudas e passam por mais três estádios (L₂, L₃ e L₄), cada um com duração média de 24 h, até atingir a fase de pupa que dura cerca de 24-48 h. Após esta fase, ocorre a emergência dos adultos dando início à fase alada no ambiente terrestre. É importante salientar que os culicídeos possuem características biológicas, tais como curto ciclo de vida, alta capacidade reprodutiva e de adaptação ao ambiente, que fazem com que seu controle populacional seja difícil (CONSOLI, 1994).

Os criadouros preferenciais de *C. quinquefasciatus* são ambientes com água parada e com elevada carga de matéria orgânica, sobretudo dejetos animais e

humanos. As fêmeas põem seus ovos, preferencialmente, em fossas, valas, bem como outros criadouros, tais como bebedouros de animais, poços e caixas d'água (CONSOLI, 1994). É comum observar a abundância de larvas em um determinado criadouro, pois sabe-se que as fêmeas produzem um feromônio de oviposição, depositado no pólo apical dos ovos, que atrai outras fêmeas para fazerem a oviposição em criadouros já colonizados. Em alta concentração, este feromônio pode ter efeito repelente, que seria percebido pela fêmea como um local inadequado para oviposição devido à possível competição por recursos (BARBOSA et al., 2007).

Figura 1 - Ciclo biológico de *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Barbosa et al. (2007).

2.1.2 Importância na saúde pública

C. quinquefasciatus possui grande importância na saúde pública, pois é o vetor de *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose linfática no Brasil. Atualmente, mais de 1,3 bilhão de pessoas (cerca de 19% da população mundial) vivem em área de risco de contrair a infecção e estima-se que há cerca de 120 milhões de indivíduos parasitados em áreas tropicais e subtropicais. Destes infectados, quase 25 milhões de homens têm doenças genitais (a mais comum é

hidrocele) e quase 15 milhões, a maioria mulheres, têm linfodema ou elefantíase. Dos 120 milhões de indivíduos parasitados, 90% são portadores de *W. bancrofti* e 10% de outras espécies de filárias de menor ocorrência (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

Os vermes adultos de *W. bancrofti* alojam-se nos linfonodos e vasos linfáticos do indivíduo infectado, e as microfilárias (formas embrionárias) são encontradas no sangue periférico, possuindo uma periodicidade noturna com um pico entre 23:00 e 01:00 h. Este pico coincide com o horário preferencial de hematofagia de *C. quinquefasciatus*, na maioria das regiões endêmicas. As fêmeas ingerem as microfilárias no momento do repasto sanguíneo, que atravessam o epitélio intestinal e dirigem-se ao tórax onde se desenvolvem e depois migram para as glândulas salivares, onde atingem o estágio larval infectante (L₃). O quadro clínico da filariose pode ser assintomático, agudo ou crônico. As manifestações agudas podem ser linfangite, linfadenite, febre e mal estar e as crônicas podem ser linfedema, hidrocele, quilúria e elefantíase, podendo esta última, ser agravada por infecções bacterianas ou fúngicas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

Em um levantamento realizado na década de 50 no Brasil, foram encontrados casos autóctones da doença em 11 cidades (ROCHA; FONTES, 1998). Atualmente, após campanhas de profilaxia, com base no tratamento do doente e controle do vetor, a parasitose ainda é endêmica em áreas da Região Metropolitana de Recife (RMR). Na década de 90, o Recife apresentava índices de prevalência entre as microregiões variando de 0,6% até 14,9%, sendo a média da cidade de 6,5% (MACIEL et al., 1996). No ano de 2007, um total de 169 casos da doença foi notificado de acordo com dados da Secretaria de Saúde do Recife (RECIFE, 2008), e atualmente, o Recife tem mostrado avanços significativos no combate à filariose. Comparando os anos de 2003 e 2011, foi observada uma redução de 99% dos casos, ou seja, uma queda de 907 para quatro portadores da doença. Há oito anos, a prevalência era de 61 casos para cada 100 mil habitantes e, atualmente, esta taxa caiu para 0,24 por 100 mil (RECIFE, 2011).

Em Pernambuco a parasitose também foi encontrada em cidades como Olinda, Jaboatão dos Guararapes e Paulista que pertencem a Região Metropolitana do Recife (ROCHA et al., 2010; RECIFE, 2008). Dados estimados em diferentes localidades de vários países indicam que o número de picadas infectivas requerido para produzir um caso de microfilaremia é elevado e pode variar de 269 (em Machui,

Tanzânia) a 67.568 (em Koro, Guji) (SOUTHGATE, 1992). A manutenção da transmissão da filariose em uma área é um indicador de péssima qualidade ambiental, pois a transmissão do verme só ocorre devido à alta densidade populacional do vetor aliada à ausência de medidas de proteção individual (REGIS et al., 1996).

A transmissão de patógenos causadores de arboviroses também pode ser atribuída ao mosquito *Culex*, destacando-se o Vírus do Nilo Ocidental (VNO). A febre do Nilo Ocidental foi originada na África, e as aves são os principais hospedeiros e reservatórios naturais do VNO. A doença pode acometer o homem, o cavalo e outras espécies, causando desde febre, dor de cabeça e mialgias até encefalite severa e meningite. Desde sua introdução na América do Norte em 1999, quase 36 mil casos humanos da infecção pelo vírus foram reportados nos Estados Unidos, resultando em mais de 1.400 casos fatais (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012). A circulação do vírus foi detectada no Caribe e o seu isolamento foi obtido na Colômbia e em cavalos mortos na Argentina (BERROCAL et al., 2006; MORALES et al., 2006), constituindo, assim, uma grande ameaça para os países da América do Sul. O Brasil apresenta condições propícias para introdução e circulação do vírus no país, visto que *C. quinquefasciatus*, potencial vetor, é abundante, além de ser rota de um contingente considerável de aves migratórias originárias de outros países das Américas (LUNA et al., 2003). Recentemente, após um inquérito realizado em cavalos do Pantanal brasileiro, foram detectados animais positivos para anticorpos do VNO, sendo este o primeiro relato de detecção do vírus no Brasil (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011). Para identificar evidências de circulação viral em território brasileiro, diversas ações foram intensificadas, dentre elas a vigilância de epizootias de equinos e aves, além de inquéritos sorológicos em diferentes regiões do país. Para que eventuais medidas de prevenção e controle sejam possíveis, a notificação de mortes de aves e equinos nestas áreas, assim como a suspeita de casos em humanos, são eventos de notificação compulsória e imediata ao Ministério da Saúde, conforme determina a Portaria nº 104/GM/MS, de 25 de janeiro de 2011 (BRASIL, 2011).

Além do VNO, que ganhou grande destaque na última década, *C. quinquefasciatus* também pode ser o vetor de outras arboviroses importantes, embora menos discutidas no Brasil, como encefalite equina venezuelana, cujo vírus pode ser transmitido eventualmente aos humanos, encefalite de Saint Louis, Rocio e

do Oropouche (FIGUEIREDO, 2007). Além de seu papel como vetor de agentes etiológicos causadores de doenças ao homem, *C. quinquefasciatus* pode causar problemas secundários de saúde em inúmeras áreas urbanizadas do Brasil, pois gera um forte incômodo, causado pelas picadas, sons emitidos e alergias, contribuindo, dessa forma, para a diminuição da qualidade de vida da população.

2.2 Controle de insetos vetores

Desde longa data, o homem vem lutando contra os insetos nocivos e a utilização de substâncias de síntese química com poder inseticida possibilitou grandes avanços no controle destes insetos, a partir do início da década de 40, quando o composto DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) foi descoberto (HEMINGWAY; RANSON, 2000). Os métodos de controle até então empregados, como o uso de componentes inorgânicos e extratos vegetais, foram rapidamente substituídos pelo DDT devido à sua ação rápida e eficiente. Atualmente, inseticidas químicos, das classes dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides têm sido utilizados em várias regiões do mundo para o controle de mosquitos (BECKER, 2003).

Os principais problemas relacionados ao uso dos inseticidas químicos são a seleção de insetos resistentes e o seu modo de ação inespecífico que pode afetar os organismos não alvo. A falta de seletividade dos inseticidas químicos, visto que eles eliminam tanto os insetos nocivos como seus predadores naturais, provoca efeitos diretos no equilíbrio destas populações. Além disso, a presença de resíduos de inseticidas nos alimentos e problemas ambientais decorridos da persistência dos produtos no solo e na água, bem como sua acumulação na cadeia alimentar foram identificados. O DDT, da classe dos organoclorados que apresenta alta toxicidade e persistência na cadeia alimentar, foi amplamente utilizado, mas devido a todos os fatores adversos decorrentes do seu uso teve sua aplicação proibida em vários países (BECKER, 2003).

Outro aspecto que tem provocado sérias limitações ao uso dos inseticidas químicos é a seleção de resistência observada entre populações de insetos. No início da década de 80, já havia o registro de 84 espécies de culicídeos resistentes, e o fator agravante é que muitas espécies apresentavam resistência simultânea ou

cruzada a vários inseticidas químicos de diferentes categorias (GEORGHIOU; LAGUNES-TEJEDA, 1991). A resistência pode ocorrer devido ao uso indiscriminado dos inseticidas, sendo recomendada a racionalização do seu emprego, sobretudo devido ao fato que a maioria dos compostos disponíveis possui um modo de ação baseado na interação com um único sítio-alvo, facilitando assim, a seleção de indivíduos resistentes nas populações tratadas. Além disso, a resistência cruzada entre alguns compostos químicos pode ser outro fator que amplia os efeitos negativos da seleção da resistência. Devido ao impacto negativo do uso dos inseticidas químicos ao meio ambiente e à saúde humana, cresceu a busca por estratégias ambientalmente seguras para o controle de insetos.

Neste contexto, o conceito do Manejo Integrado de Vetores (MIV) surgiu como resultado de uma mudança de paradigma após o uso intenso e exclusivo de inseticidas químicos que predominou a partir da década de 50. O MIV preconiza utilizar uma combinação racional de diversos métodos de controle disponíveis objetivando manter a densidade da população de vetores em níveis aceitáveis e da maneira mais efetiva, econômica e segura, incluindo componentes biológicos, químicos, físicos e ambientais, visando interferir o mínimo possível no ecossistema. No MIV, várias ações são empregadas na tentativa de englobar todas as causas do problema (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008). Para programas de controle de mosquitos, por exemplo, estas ações podem incluir a melhoria da rede de esgoto e distribuição de água, eliminação física de criadouros, uso de barreiras físicas nas habitações, medidas de proteção individual, uso de larvicidas específicos em criadouros que não podem ser eliminados, além da conscientização e mobilização comunitária (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1994).

O uso de larvicidas é um componente importante dentro de programas de controle de culicídeos, principalmente para *C. quinquefasciatus* já que criadouros com alta densidade de larvas podem ser identificados e tratados resultando em uma importante redução populacional. Os biolarvicidas de maior destaque para o controle de vetores são à base de bactérias entomopatógenas, visto que apresentam grande seletividade e são inócuos para o meio ambiente.

2.3 Bactérias entomopatógenas

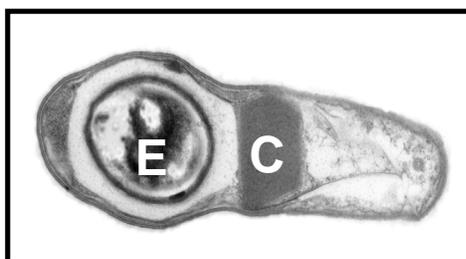
As bactérias entomopatógenas estão classificadas dentre os agentes de controle biológico, pois são capazes de produzir toxinas com ação inseticida seletiva para algumas classes de insetos. Do ponto de vista aplicado, as bactérias do gênero *Bacillus* são consideradas os agentes de controle biológico mais efetivos devido à eficácia de suas toxinas, facilidade de produção em larga escala, de armazenamento, transporte e aplicação (LACEY, 2007). Duas espécies de bactérias entomopatógenas se destacam no controle biológico dos insetos da ordem Diptera, *Bacillus sphaericus* (Bsp) e *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) e larvicidas a base destes microrganismos estão sendo comercializados desde a década de 80. Estas bactérias produzem proteínas inseticidas que, ao serem ingeridas pelas larvas de espécies susceptíveis são letais devido a sua ação no trato digestivo. Bti tem atividade decrescente para os gêneros *Aedes*, *Simulium*, *Culex* e *Mansonia*. Já Bsp, tem maior especificidade para espécies dos gêneros *Culex* e *Anopheles* e menor para os gêneros *Aedes* e *Mansonia* (LACEY, 2007). *Ae. aegypti*, espécie de grande importância na transmissão do vírus da dengue, é altamente susceptível a Bti, porém é refratária a Bsp. Por outro lado, Bsp apresenta uma grande vantagem operacional em relação a Bti, que é a maior persistência em criadouros ricos em matéria orgânica, típicos de larvas de *Culex*, além de seus esporos sofrerem reciclagem nos cadáveres das larvas, o que pode ampliar seu período de persistência nos criadouros (NICOLAS; DARRIET; HOUGARD, 1987; SKOVMAND; BAUDUIN, 1997). Até o momento, foram identificadas mais de 80 sorovariedades de Bt e a maioria delas é conhecida por sua alta atividade contra lepidópteros, coleópteros ou dípteros (BERRY, 2012).

2.4 *Bacillus sphaericus*

Bacillus sphaericus merece destaque como agente de controle de larvas de *C. quinquefasciatus*, vetor do agente etiológico da filariose linfática no Brasil. Descoberto por Neide (1904), é uma bactéria Gram-positiva, saprófita e esporulante, geralmente encontrado em solos e ambientes aquáticos. Durante a fase de esporulação são produzidos esporos arredondados, localizados na região terminal

em um esporângio em forma de raquete, além de inclusões ou cristais que contém as proteínas inseticidas (Figura 2).

Figura 2 - Visão longitudinal em micrografia eletrônica de *Bacillus sphaericus*, em fase de esporulação.



Fonte: Kalfon et al. (1984), modificado.

Nota: E, esporo; C, cristal protéico.

A primeira cepa de Bsp com atividade larvicida foi isolada por Kellen et al. (1965), mas não recebeu muita atenção devido a sua baixa toxicidade. Posteriormente, Singer (1973) isolou diversas cepas, dentre elas a SSII-1, com uma toxicidade relevante ao ponto de incentivar os estudos nesta área. Posteriormente, outras cepas com alta atividade larvicida e potencial de produção comercial, foram isoladas, como a 1593 da Indonésia (SINGER, 1977), 2297 do Sri Lanka (WICKREMESINGHE; MENDIS, 1980), 2362 da Nigéria (WEISER, 1984) e C3-41 da China (ZHANG et al., 1987). Estas são as principais cepas que têm sido utilizadas para a produção industrial de bioinseticidas à base de Bsp. A denominação de cada cepa é dada de acordo com a sua origem geográfica e a sua classificação pode ser feita por vários métodos, sendo a técnica de aglutinação flagelar que determina os sorotipos, a mais utilizada. As cepas mais ativas estão classificadas segundo os seguintes sorotipos: H5a5b, que inclui as cepas 1593, 2362, 2317, 1691 e C3-41; H25, onde se encontra a cepa 2297 e o H6, no qual se inclui a IAB59 (CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELÉCLUSE, 1996; DE BARJAC et al., 1985).

A atividade tóxica de Bsp é particularmente elevada para larvas de *C. quinquefasciatus* e produtos comerciais à base desta bactéria estão disponíveis, inclusive no Brasil. A eficácia do uso de Bsp para o controle de vetores já foi comprovada em vários países (LACEY, 2007) e uma das experiências

representativas da viabilidade operacional de Bsp foi realizada no Brasil, onde este agente foi empregado para o controle de *C. quinquefasciatus* em bairros do Recife, endêmicos para a filariose e que apresentavam uma alta densidade populacional do vetor (REGIS et al., 1995; SILVA-FILHA et al., 2001). Devido à permanência de áreas endêmicas na cidade de Recife, atualmente, o Programa de Controle da Filariose tem sido conduzido pela Secretaria de Saúde, dentro do Plano Global de Erradicação da Filariose estabelecido em 1997, que tem como meta a erradicação mundial da doença até 2020 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1997; 2000). Neste programa, foi estabelecido um subprograma para o controle do vetor, através de medidas integradas, e uma delas é o tratamento de criadouros de *Culex* com larvicidas à base de Bsp. O programa teve início em duas áreas endêmicas, Água Fria e Alto Santa Terezinha, com cerca de 15.000 habitantes cada, em março de 2003. No ano seguinte, ele foi ampliado para 55 bairros, incluindo as áreas que fazem limite entre o Recife e Olinda. Em 2006, foi feita a segunda e última ampliação do controle do vetor abrangendo a totalidade de criadouros cadastrados nas áreas endêmicas do Recife (RECIFE, 2008). Outra experiência bem sucedida com Bsp no Brasil é o seu emprego para o controle de *C. quinquefasciatus* ao longo do Rio Pinheiros em São Paulo (MARQUES-FILHO et al., 2011; SILVA-FILHA et al., 2008). Neste caso, Bsp tem sido aplicado desde 2003 em rotação com Bti nas áreas marginais ao longo de 22,4 km do rio.

Além de *C. quinquefasciatus*, os anofelinos que compreendem várias espécies de importância na saúde pública, como *Anopheles darlingi* vetor da malária no Brasil, têm sido alvo do controle com Bsp. Experiências bem sucedidas no Norte do país, área de transmissão da doença, têm sido conduzidas principalmente no que concerne à aplicação de Bsp em tanques de piscicultura que constituem um potencial criadouro para espécies do gênero *Anopheles* e que não podem ser tratados com inseticidas químicos (RODRIGUES et al., 2008).

2.4.1 Toxinas inseticidas

Bsp apresenta quatro classes de toxinas inseticidas: a toxina Binária (Bin), as toxinas Mtx, as toxinas Cry e a sphaericolisina que são sintetizadas em fases distintas do desenvolvimento da bactéria, e por diferentes cepas de Bsp. Cada

categoria será descrita a seguir e é importante ressaltar que a toxina Bin é a mais importante delas, visto que todos os produtos comerciais são baseados nas cepas produtoras desta toxina.

Toxinas Mtx. Três tipos de toxinas denominadas mosquitocidas (Mtx) foram identificados: Mtx1 (100 kDa), Mtx2 (31,8 kDa) e Mtx3 (35,8 kDa). A Mtx1, considerada uma protoxina, foi identificada a partir da clonagem da cepa SSII-1, e é expressa durante a fase vegetativa de crescimento (THANABALU et al., 1991). Esta toxina é processada por proteinases intestinais em fragmentos menores de 27 e 70 kDa (THANABALU et al., 1993). Partridge e Berry (2002), observaram que a Mtx1 é a primeira toxina de Bsp ativa para uma espécie de díptero da família Chironomidae, o *Chironomus riparus*. Outro dado importante deste estudo foi a detecção de atividade larvicida da Mtx1 contra *Ae. aegypti*, diferentemente da toxina Bin. Pelo fato de serem produzidas durante a fase vegetativa, as toxinas Mtx são degradadas por proteases e quase não contribuem para a toxicidade final de culturas esporuladas de Bsp (CHARLES et al., 1996). No entanto, quando expressas de forma recombinante em *Escherichia coli*, as toxinas Mtx1 e Mtx2 possuem alta atividade larvicida para culicídeos (WEI; CAI; YUAN, 2006; WIRTH et al., 2007).

Toxinas Cry. Os estudos realizados na cepa IAB59, que apresenta atividade inseticida para larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes às cepas de Bsp 2362 e C3-41, que produzem apenas a toxina Bin, indicaram que esta cepa deveria produzir outro fator tóxico além desta toxina (PEI et al., 2002). Foram identificadas duas toxinas da família Cry na cepa IAB59, a Cry48Aa e Cry49Aa de 135 e 53 kDa, respectivamente, que agem em sinergia e, assim como a toxina Bin, são produzidas como inclusões cristalinas durante a fase de esporulação (JONES et al., 2007). A presença desta nova categoria de toxina diferente da Bin pode explicar porque esta cepa supera a resistência à toxina Bin (DE MELO et al., 2008). As toxinas Cry48Aa e Cry49Aa apresentam alta toxicidade para *C. quinquefasciatus* quando administradas de forma purificada e em concentração equimolar. Porém, a produção destes fatores na cepa IAB59 não contribui para um aumento considerável de sua toxicidade devido ao baixo nível de acumulação da Cry48Aa em Bsp, o que impede a proporção de 1:1 requerida para a ação destas toxinas (JONES et al., 2007). O espectro larvicida da nova toxina Cry48Aa/Cry49Aa é restrito a larvas de *Culex*, e assim como a toxina Bin, não possui atividade para *Ae. aegypti* (JONES et al., 2008). A constituição destas duas toxinas é única, pois a subunidade Cry48Aa é

uma toxina Cry de três domínios, que diferentemente das outras toxinas Cry desta família necessita de uma proteína acessória que é a Cry49Aa, que possui homologia com a toxina Bin de Bsp (JONES et al., 2007). Apesar das toxinas Mtx e Cry não serem utilizadas em formulações comerciais, elas apresentam grande potencial pois sua ação inseticida tem como alvos moléculas que são diferentes daquelas identificados para a toxina Bin. Estudos prévios demonstraram que estas toxinas apresentam atividade para larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes para a toxina Bin, confirmando a ausência de resistência cruzada entre elas (WIRTH et al., 2007; DE MELO et al., 2008).

Sphaericolisina. Foi descoberta em uma cepa de Bsp, A3-2, que não apresenta genes para as toxinas Bin ou Mtx (NISHIWAKI et al., 2007) e esta toxina não tem ação em dípteros, mas exibe toxicidade quando injetada em *Blattella germanica* (Blattodea) e *Spodoptera litura* (Lepidoptera). O gene responsável pela produção da sphaericolisina parece ser amplamente distribuído, visto que foi encontrado em outras cepas de Bsp como a C3-41 (HU et al., 2008). A cepa A3-2 que contém a sphaericolisina foi isolada do inseto *Myrmeleon bore* que injeta em sua presa, *S. litura*, um fluido digestivo e é possível que esta toxina contribua para a morte da presa, pois foi observada sua produção e secreção *in vivo* durante a proliferação de Bsp desta cepa (NISHIWAKI et al., 2007).

Toxina Bin. Durante as investigações das propriedades inseticidas de Bsp, a toxina Bin foi o primeiro e principal fator tóxico a ser caracterizado. Vários estudos mostraram que a alta atividade inseticida de Bsp é observada, exclusivamente, naquelas cepas produtoras de cristal durante a fase de esporulação, que contém a protoxina Binária. Esta é um heterodímero formado por dois componentes denominados BinA e BinB que nas cepas nativas, tais como a 2362, 1593 e C3-41, estão presentes nos cristais em quantidades equimolares, permitindo, dessa forma, a toxicidade máxima da Bin. Os componentes BinA e BinB agem em sinergia e, por esta razão, é considerada uma toxina binária (Bin) (NICOLAS et al., 1993). Experimentos para determinar a atividade *in vivo* dos dois componentes obtidos isoladamente através de cepas recombinantes, mostraram que BinA individualmente é tóxico para larvas de *C. pipiens*, embora seja requerido em altas concentrações, enquanto BinB isolado não é tóxico (NICOLAS et al., 1993). Posteriormente, estudos *in vitro* mostraram que o componente BinB é responsável por reconhecer e se ligar a receptores específicos presentes na membrana apical do epitélio intestinal das

larvas, enquanto BinA não tem capacidade de ligação e sua função está relacionada à toxicidade (CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 1997). Com base na avaliação das sequências do gene da toxina Bin (*btx*) em diversas cepas de Bsp, quatro tipos de toxina foram classificados e divididos em duas linhagens, segundo algumas diferenças observadas entre as sequências de aminoácidos, menores ou igual a 6, demonstrando a alta conservação entre essas sequências (PRIEST et al., 1997). O grupo que contém os tipos Bin1 e Bin2, mais tóxicos para larvas de *Anopheles* e *Culex*, inclui cepas como a IAB59, 2362 e 1593. O segundo inclui os tipos Bin3 e Bin4, das cepas 2297 e LP1-G, respectivamente. A cepa LP1-G que contém o tipo Bin4 é a única que apresenta baixa toxicidade dentre as cepas produtoras de toxina Bin. Quando comparadas as sequências de aminoácidos dos quatro tipos de toxina Bin, a Bin4 possui seis diferenças e uma delas ocorre no resíduo 93 que é uma serina, enquanto uma leucina está presente nos outros três tipos (PRIEST et al., 1997). Yuan et al. (2001) mostraram que esta alteração da Bin4 é responsável pela diminuição da toxicidade da cepa LP1-G e sugerem que essa posição deve ser um elemento chave na formação do complexo BinA-BinB responsável pela toxicidade de Bsp.

Alguns avanços têm sido realizados na elucidação da estrutura da toxina Bin, mas até o momento nenhuma estrutura tridimensional foi obtida por cristalografia (BERRY, 2012). Devido à ausência de dados estruturais, os domínios funcionais das subunidades BinA e BinB têm sido determinados através de diferentes técnicas, como a mutagênese seguida de ensaios de funcionalidade (ROMÃO et al., 2011). A estrutura secundária da BinA indica uma composição de 49,3% de folhas beta e 3,1% de alfa hélices (HIRE et al., 2009) enquanto BinB contém uma maior porcentagem de alfa hélices em relação a BinA (TANGSONGCHAROEN et al., 2011). A interação entre estes dois componentes, necessária para a atividade da toxina Bin, aumenta a composição de folhas beta levando a mudanças estruturais deste complexo e, dessa forma, ocorre sua interação com o epitélio intestinal (BOONSERM et al., 2006). Até o momento foram identificadas regiões de aminoácidos importantes para as interações entre os componentes BinA e BinB e com o receptor. Em BinB, a região entre os resíduos 33-158 foi caracterizada como importante na interação com o receptor e os resíduos 147-149 parecem ser críticos para esta ligação (ROMÃO et al., 2011). Outro estudo sugeriu que o resíduo 150

também parece ser importante na interação com o receptor (SINGKHAMANAN et al., 2010).

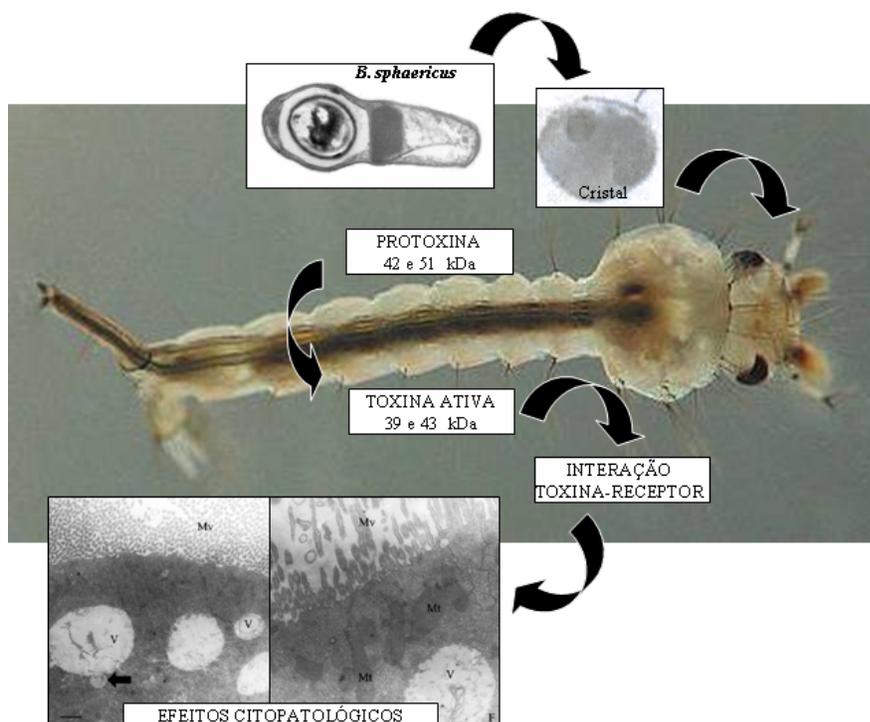
2.4.2 Modo de ação da toxina Bin

Bsp apresenta um espectro de ação restrito para larvas de mosquitos e as espécies do complexo *Culex pipiens* são consideradas as mais sensíveis (LACEY et al., 1988, DAVIDSON; YOUSTEN, 1990; GROVES; MEISCH, 1996). As cepas produtoras de cristais contendo a toxina Bin são as únicas utilizadas na preparação de produtos comerciais à base de Bsp, visto que este é o principal fator tóxico produzido por este biolarvicida. Quando ingerido pelas larvas, o cristal produzido durante a fase de esporulação de Bsp é solubilizado em pH intestinal alcalino liberando a protoxina Bin que é clivada por serina-proteases, para atingir a forma de toxina ativa (BAUMANN et al., 1985; DAVIDSON et al., 1987; BROADWELL; BAUMANN, 1987). A protoxina é formada por dois polipeptídeos de 42 e 51 kDa (BAUMANN; BROADWELL; BAUMANN, 1988), denominados BinA e BinB, respectivamente, que após a ativação proteolítica, são clivados em fragmentos de 39 e 43 kDa, respectivamente. As etapas iniciais do modo de ação, tais como a necessidade de ingestão do cristal, aliado a um pH intestinal alcalino (≈ 10) e à proteólise enzimática são, sem dúvida, aspectos seletivos da toxicidade de Bsp. Porém, a etapa determinante do modo de ação da toxina Bin é o reconhecimento e ligação a receptores específicos presentes na superfície das microvilosidades intestinais. A presença dos receptores já foi demonstrada em larvas de *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus*, *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensi*, através de ensaios de ligação *in vitro* entre a toxina radiomarcada e microvilosidades intestinais (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA et al., 1995; 1997; 1999; 2008). Larvas de *Ae. aegypti* são capazes de processar o cristal, no entanto são refratárias a Bsp, pois não possuem receptores específicos para a toxina Bin no epitélio intestinal (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992).

A atividade *in vivo* de Bsp é diretamente correlacionada com a afinidade de ligação observada entre a toxina Bin e o receptor, ou seja, um padrão decrescente de ligação entre a toxina Bin e a susceptibilidade é encontrado para *C. quinquefasciatus*, *An. stephensi*, *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, espécie refratária, onde

o nível de ligação específica é extremamente baixo (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA et al., 1997). A distribuição dos receptores no mesêntero da maioria das espécies de *Culex* susceptíveis é regional e ocorre principalmente no ceco gástrico e no intestino posterior (CHARLES et al., 1996). Ainda não foram elucidadas todas as etapas que sucedem a ligação da toxina ao receptor, porém a partir de 15 minutos após a ingestão do cristal protéico, podem ser observadas alterações nas células epiteliais do intestino das larvas, como destruição das microvilosidades, vacuolização citoplasmática, intumescimento das mitocôndrias e alterações do retículo endoplasmático rugoso, com subsequente morte das mesmas (DE MELO et al., 2008; CHARLES, 1987; SINGH; GILL, 1988). Estudos recentes mostraram que a toxina Bin, especificamente o componente BinA, teria capacidade de formar poros em sistema de membrana artificial como lipossomas (SCHWARTZ et al., 2001). Também foi possível registrar a imunolocalização da toxina Bin no interior das células epiteliais de larvas de *C. quinquefasciatus* tratadas com uma dose letal, sugerindo uma possível internalização da toxina (SILVA-FILHA; PEIXOTO, 2003). Opota et al. (2011) identificaram alguns eventos que ocorrem após ligação da toxina Bin utilizando uma linhagem celular epitelial de mamíferos expressando o receptor para a toxina Bin. Além da formação de poros e vacuolização, há uma indução do processo de autofagia nas células intoxicadas, além de sua internalização em vias de reciclagem para evitar a degradação da própria toxina. As principais etapas do modo de ação da toxina Bin estão descritas na Figura 3.

Figura 3 - Modo de ação da toxina Bin de *Bacillus sphaericus* em larvas de *Culex* sp.



Fonte: Romão (2010).

Nota: Após a ingestão pela larva, o cristal é solubilizado em pH alcalino, a protoxina Bin é liberada no lúmen intestinal e processada até a forma de toxina ativa. Esta interage com receptores específicos presentes na membrana apical do epitélio intestinal e desencadeia os efeitos citopatológicos que levam à morte da larva.

2.5 Receptores da toxina Bin

Como descrito na seção anterior, a ligação da toxina Bin à receptores específicos presentes no epitélio intestinal nas larvas de culicídeos é crucial para a atividade inseticida de Bsp. O receptor da toxina Bin presente no mesêntero de *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus*, principais espécies-alvo de Bsp, é uma α -glicosidase (EC 3.2.1.20) de cerca de 60 kDa, com 580 aminoácidos, ligada à membrana apical do epitélio intestinal, através de uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (SILVA-FILHA et al., 1999; DARBOUX et al., 2001; PAUCHET et al., 2005; ROMÃO et al., 2006). Os receptores nestas espécies citadas acima foram denominados Cpm1 e Cqm1, em referência à "*C. pipiens* ou *C. quinquefasciatus*, maltase 1", respectivamente. As sequências do cDNA de *cpm1* e *cqm1* possuem 1871 e 1851 pb, respectivamente, com uma região codificante de 1743 pb, e estão depositadas

no GenBank sob os números de acesso AF222024 e DQ333335 (DARBOUX et al., 2001; ROMÃO et al., 2006). O receptor Cqm1 compartilha uma identidade de 97% ao nível de aminoácidos em relação ao Cpm1 e de 66%, 74% e 65% com maltases ortólogas de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *Drosophila melanogaster*, respectivamente (NENE, et al. 2007; OPOTA et al., 2008; ROMÃO et al., 2006). Em *An. gambiae*, a proteína ortóloga Agm3 foi caracterizada como o receptor da toxina Bin. A sequência de aminoácidos do Agm3 apresenta alta homologia com as sequências do Cqm1 e Cpm1, principalmente na região N-terminal, onde possivelmente está localizado o sítio de ligação à toxina Bin (OPOTA et al., 2008; ROMÃO et al., 2006). O reconhecimento e a ligação da toxina Bin ao receptor são considerados etapas chave na ação de Bsp em larvas de mosquitos (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; NIELSEN-LEROUX et al., 1995). Larvas de *Ae. aegypti* também expressam no epitélio intestinal uma α -glicosidase, Aam1, ortóloga e com 80% de similaridade à Cqm1, no entanto, tal molécula não é capaz de interagir com a toxina Bin, demonstrando que diferenças nas sequências destas proteínas sejam determinantes na especificidade da ligação (FERREIRA et al., 2010).

As α -glicosidases em questão, além de terem um sítio funcional para o seu papel de receptor da toxina Bin, têm um papel primordial na digestão dos insetos. O metabolismo energético da maioria dos mosquitos depende da ingestão de glicose, sacarose, maltose e frutose e as α -glicosidases atuam na clivagem de oligossacarídeos que são parte importante da nutrição de mosquitos (KRASIKOV; KARELOV; FIRSOV, 2001). As α -glicosidases no intestino de insetos podem ser solúveis ou ligadas à membrana (SILVA; TERRA, 1995) e sua atividade relativa e distribuição foi de 75% no lúmen do intestino médio posterior e 25% no intestino anterior (BILLINGSLEY; HECKER, 1991). Para o funcionamento dessas moléculas como receptores da toxina Bin, são essenciais a sua apresentação no epitélio intestinal via âncora GPI, o seu estado conformacional nativo, bem como a integridade do epitopo de ligação da toxina (FERREIRA et al., 2010). Esses dois últimos fatores, apesar de serem cruciais, ainda são poucos conhecidos, visto que a estrutura do receptor Cqm1 não está disponível.

2.6 Resistência à toxina Bin

O modo de ação de Bsp baseado na interação apenas da toxina Bin a uma única classe de receptores (Cqm1) pode favorecer a seleção de alelos de resistência (r), caso a população de culicídeo seja exposta de forma contínua a este agente. Populações de larvas de *Culex* podem apresentar resistência a Bsp após serem submetidas à forte pressão de seleção, sob condições de laboratório (RODCHAROEN; MULLA, 1994; WIRTH et al., 2000; PEI et al., 2002; AMORIM et al., 2007) ou de campo (SINÈGRE et al., 1994; RAO et al., 1995; SILVA-FILHA et al., 1995; YUAN; ZHANG; LIU, 2000; NIELSEN-LEROUX et al., 2002; MULLA et al., 2003) (Tabela 1). Estes resultados chamam a atenção para a necessidade de racionalizar o uso de Bsp, a fim de evitar a seleção de populações resistentes.

A primeira colônia resistente obtida sob condições de laboratório, GEO, foi submetida à forte pressão de seleção e atingiu uma razão de resistência (RR) da ordem de 100.000 vezes, em relação à colônia susceptível (WIRTH et al., 2000). Em outro estudo realizado em laboratório, foram selecionadas duas colônias de *C. quinquefasciatus*, no Brasil e na China, que atingiram um alto nível de resistência (>100.000) (PEI et al., 2002). Também foi demonstrado que é possível selecionar a resistência a Bsp cepa IAB59, sob condições de laboratório, embora esta seleção tenha ocorrido de forma mais lenta em relação a Bsp 2362, pois como descrito anteriormente, esta cepa possui além da toxina Bin, toxinas Cry. Mesmo assim, o nível de resistência chegou a mais de 40.000 vezes (AMORIM et al., 2007). Em campo, já foram detectadas populações com níveis de resistência variáveis na França (SINÈGRE et al., 1994; CHEVILLON et al., 2001), Índia (RAO et al., 1995), China (YUAN; ZHANG; LIU, 2000), Tunísia (NIELSEN-LEROUX et al., 2002) e na Tailândia (MULLA et al., 2003). O processo de seleção da resistência em populações de campo é modulado por diversos fatores relativos ao *background* genético da população, tal como a frequência inicial de alelos r e modo de herança, bem como fatores ecológicos e ambientais.

Tabela 1 – Colônias de *Culex* sp. selecionadas sob condições de laboratório (Lab) ou populações de campo expostas ao tratamento com o *Bacillus sphaericus* que apresentaram alterações na susceptibilidade a este agente.

Colônia ou população	País	Origem	Razão de resistência ³	Ligação toxina-receptor	Alelo <i>r</i>	Forma de herança ⁴	Referência
GEO ¹	EUA	Lab	>100.000	Não	<i>cpm1_{GEO}</i>	R/A	WIRTH et al., 2000
R2362 ²	Brasil	Lab	>100.000	Não	<i>cqm1_{REC}</i>	R/A	PEI et al., 2002
RIAB59 ²	Brasil	Lab	≈40.000	Não	<i>cqm1_{REC}</i>	R/A	AMORIM et al., 2007
RLCq1/C3-41 ²	China	Lab	>100.000	Não	ND	R/A	PEI et al., 2002
Kochi ²	Índia	Campo	≈150	ND	ND	ND	RAO et al., 1995
SPHAE ¹	França	Campo	>20.000	Sim	ND	R/S	NIELSEN-LEROUX et al., 1997
RFCq1 ²	China	Campo	>20.000	ND	ND	ND	YUAN et al., 2000
TUNIS ¹	Tunísia	Campo	≈750	Sim	ND	R/S	NIELSEN-LEROUX et al., 2002
BP ¹	França	Campo	>5.000	Não	<i>cpm1_{BP}</i> <i>cpm1_{BP-del}</i>	R/S	CHEVILLON et al., 2001
Wat Pikul ¹	Tailândia	Campo	>125.000	ND	ND	ND	MULLA et al., 2003

Fonte: Elaborada pelo autor.

¹*C. pipiens*.

²*C. quinquefasciatus*.

³Razão entre a concentração letal do *B. sphaericus* para 50% (LC₅₀) das larvas em 48h da colônia avaliada e a LC₅₀ observada para uma colônia susceptível usada como referência no estudo.

⁴R/A: Recessiva autossômica; R/S: Recessiva ligada ao sexo

ND: não determinado.

2.6.1 Mecanismos e bases moleculares

A investigação de algumas populações de *Culex* mostrou que o mecanismo de resistência detectado com maior frequência está relacionado a falhas que podem ocorrer na ligação entre a toxina Bin e os receptores (Tabela 1) (AMORIM et al., 2007; NIELSEN-LEROUX et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004; WIRTH et al., 2000). Existem outros fatores envolvidos, pois já foram detectadas populações altamente resistentes a Bsp, tais como a SPHAE e a TUNIS (Tabela 1), que possuem receptores funcionais no epitélio, ou seja, capazes de interagir com a toxina Bin, e os mecanismos responsáveis pela resistência ainda não foram elucidados (NIELSEN-LEROUX et al., 1997; 2002), indicando que há mecanismos de internalização ou de sinalização da toxicidade falhos.

A base molecular da resistência foi elucidada em duas colônias de *Culex* selecionadas sob condições de laboratório, GEO (EUA) e R2362 (Brasil), e em uma população natural denominada BP (França). Nos três casos, as larvas são altamente resistentes a Bsp e exibem um mecanismo de falha de ligação da toxina ao epitélio intestinal das larvas (DARBOUX et al., 2007; NIELSEN-LEROUX et al., 2002; PEI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004; WIRTH et al., 2000). No caso da colônia GEO de *C. pipiens*, uma mutação pontual no gene *cpm1* (alelo *cpm1_{GEO}*), a troca de uma timina por uma adenina na posição 1706, gera um códon de terminação de tradução prematuro levando à produção de uma proteína de 568 aminoácidos, desprovida de âncora GPI, que seria secretada no lúmen intestinal (DARBOUX et al., 2002). Por esta razão, não há receptores ligados ao epitélio intestinal e, conseqüentemente, a toxina Bin não apresenta ação inseticida para larvas desta colônia.

Na colônia R2362 de *C. quinquefasciatus*, o gene *cqm1* apresentou uma deleção de 19 nucleotídeos na posição 1334-1352 (alelo *cqm1_{REC}*), que causa uma mudança na fase de leitura, gerando um códon de terminação da tradução prematuro (ROMÃO et al., 2006). Neste caso, a exemplo da colônia GEO, caso o RNA mensageiro fosse traduzido e a proteína fosse estável, a mesma seria solúvel, impedindo a ação da toxina Bin, pois não haveria receptores disponíveis no epitélio. A proteína truncada de 452 aminoácidos que seria codificada pelo alelo *cqm1_{REC}* não foi observada em amostras de *microvilli* intestinal de larvas da colônia R2362 a partir de ensaios de imunodeteção, indicando que esta proteína possivelmente não é expressa (ROMÃO et al., 2006).

No caso da população BP da França, foi detectada a co-existência de dois alelos, denominados *cpm1_{BP}* e *cpm1_{BP}-del*, que estão associados à resistência a Bsp em larvas de *C. pipiens* (CHEVILLON et al., 2001; DARBOUX et al., 2007). O alelo *cpm1_{BP}* possui uma mutação “nonsense” (Gln396Stop) que leva à formação de um códon de terminação prematuro, tal como ocorre nas colônias GEO e R2362, ocasionando a síntese de uma proteína truncada com 395 aminoácidos, sem a âncora GPI. O outro alelo *r* identificado foi o *cpm1_{BP}-del*, originado a partir da inserção de um elemento transponível no éxon 2. Esta inserção modifica o processamento do RNA mensageiro, gerando uma deleção de 198 nt neste éxon. Esta deleção não muda a fase de leitura e provoca a produção de uma proteína de 514 aminoácidos ligada ao epitélio intestinal, pois retém a sequência da âncora GPI na porção C-terminal. Entretanto, esta proteína é incapaz de se ligar à toxina Bin possivelmente devido à perda de 66 aminoácidos que deve afetar o sítio de ligação do receptor ou causar mudanças na conformação da molécula, parâmetros essenciais para a funcionalidade como receptor da toxina Bin (DARBOUX et al., 2007).

2.6.2 A resistência da colônia R2362

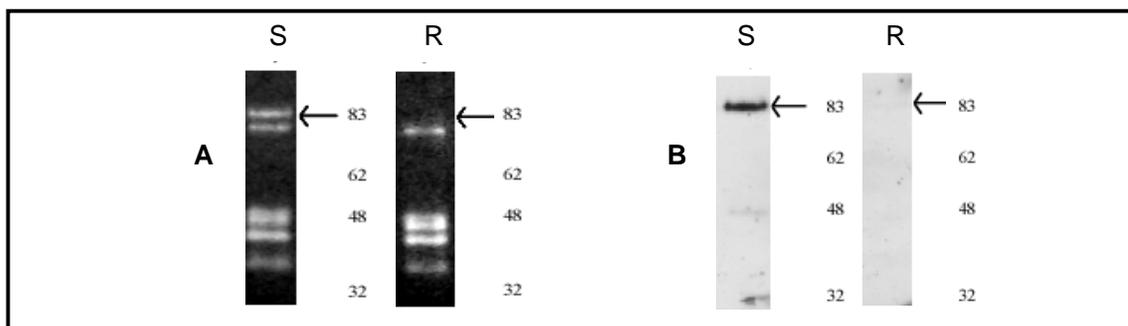
A colônia R2362 tem um papel central neste estudo, pois o alelo *cqm1_{REC}* que foi caracterizado previamente nesta colônia (ROMÃO et al., 2006) foi alvo de *screening* em populações de *C. quinquefasciatus* e um novo alelo *r* foi detectado na colônia e caracterizado neste trabalho. Esta colônia de *C. quinquefasciatus* altamente resistente foi fundada a partir da colônia susceptível (S), originada de um grande número de ovos coletados de diferentes criadouros no Recife (PE), e foi selecionada em laboratório com Bsp 2362 até atingir um alto nível de resistência, observado após 46 gerações (PEI et al., 2002). O mecanismo de resistência associado a esta colônia é uma falha na ligação da toxina ao receptor Cqm1 (OLIVEIRA et al., 2004; ROMÃO et al., 2006). O perfil de α -glicosidases detectado a partir de amostras de microvilosidades intestinais de larvas susceptíveis de *C. quinquefasciatus*, submetido a um ensaio enzimático *in gel*, é composto por cinco bandas de clivagem correspondentes às proteínas com atividade α -glicosidase (Figura 4A, S). Larvas da colônia R2362, cuja resistência está associada à ausência

da α -glicosidase Cqm1 no *microvilli* intestinal, diferem em apenas uma banda, correspondente ao receptor Cqm1 (Figura 4, R) (ROMÃO et al., 2006).

Como descrito na seção anterior, o alelo responsável por este mecanismo é o *cqm1_{REC}* (ROMÃO et al., 2006). Este confere resistência total a Bsp pois impede a expressão do receptor Cqm1 no epitélio, sítio-alvo da toxina Bin, e uma amostra de indivíduos analisados no período de caracterização molecular da resistência desta colônia mostraram o genótipo homozigoto para o alelo *cqm1_{REC}* (ROMÃO et al., 2006). A colônia vem sendo mantida sob pressão de seleção há mais de 190 gerações e o fenótipo de alto nível de resistência (>100.000 vezes) é monitorado periodicamente através de bioensaios de dose-diagnóstica. Após uma análise do genótipo das larvas desta colônia, foram observadas mudanças quanto à composição homozigota para o alelo *cqm1_{REC}* característico da R2362 e a partir de investigações recentes, foi detectada a presença de outro polimorfismo, cuja caracterização é um dos alvos deste estudo, que confere resistência na colônia e é diferente daquele encontrado no alelo *cqm1_{REC}*.

Uma avaliação prévia de polimorfismos no gene *cqm1* mostrou a existência de pelo menos 13 substituições de aminoácidos na sequência deduzida do receptor Cqm1 obtida a partir da análise de indivíduos da população tratada de Água Fria (CHALEGRE, 2008). Sete dentre as 13 mudanças de aminoácidos observadas ocorreram na parte C-terminal da molécula, entre as posições 430 e 556, região onde foram descritos, nas espécies analisadas, as mutações que levam à resistência via perda da âncora GPI, apesar destas modificações não apresentarem, aparentemente, associação com a resistência (DARBOUX et al., 2002; 2007; ROMÃO et al., 2006). O alto polimorfismo associado a este gene indica que outros alelos *r* podem ocorrer e serem selecionados em uma dada população submetida a tratamento com Bsp. A maioria dos estudos de sucessão de alelos *r* em mosquitos tem sido realizada no campo e, portanto, podem estar mais sujeitos a variáveis não controladas. Na colônia R2362 parece ter havido uma co-seleção de alelos e as condições sob as quais este fenômeno ocorreu permitem a realização de uma série de estudos para inferir quais são os fatores que estão contribuindo para este processo, sem interferência externa visto que este fenômeno ocorreu em uma colônia de laboratório.

Figura 4 - Perfil das α -glicosidases presentes em larvas de *Culex quinquefasciatus* sensíveis (S) e resistentes (R) a *Bacillus sphaericus*.



Fonte: Romão et al. (2006), modificado.

Nota: **A:** Ensaio *in gel* de α -glicosidases realizados com amostras de *microvilli* intestinal de larvas S e R. **B:** Imunodeteção das amostras mostradas em **A** com anticorpo anti α -glicosidase Cqm1. Setas indicam o receptor Cqm1. Peso molecular em kDa à direita.

2.7 Manejo da resistência

A maioria das estratégias de manejo da resistência tem sido desenvolvida a partir de modelos que assumem que a frequência inicial de alelos *r* em uma dada população é baixa e a herança desta característica é recessiva, como ocorre em larvas de *Culex* resistentes a Bsp (NIELSEN-LEROUX et al., 1997, 2002; WIRTH et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2004; AMORIM et al., 2007). Nielsen-LeRoux et al. (2001) demonstraram que ocorre resistência cruzada entre várias cepas de Bsp de alta toxicidade (2362, 1593 e C3-41), pois estas cepas produzem unicamente a toxina Bin como principal fator tóxico (AQUINO-DE-MURO; PRIEST, 1994; PRIEST et al., 1997). As pequenas diferenças na sequência de aminoácidos das toxinas Bin1 e Bin 2 das cepas acima não são importantes na estrutura e função do complexo toxina-receptor e, conseqüentemente, da atividade larvicida (SILVA-FILHA et al., 2004).

No caso de ocorrer a seleção de resistência em uma população exposta ao biolarvicida, é possível interromper e reverter este processo através da introdução de um novo agente de controle, como Bti, em sistema de rotação, com modo de ação distinto de Bsp e que tem a capacidade de eliminar os indivíduos resistentes (SILVA-FILHA; REGIS, 1997; MULLA et al., 2003). Também se admite, devido à herança recessiva de muitos alelos *r*, que indivíduos resistentes homocigotos podem acasalar com susceptíveis homocigotos, presentes na população, devido a refúgios não tratados ou provenientes de migração, dando origem a heterocigotos que podem ser eliminados pela ação de Bsp ou de outro agente de controle. A rotação

de agentes com princípios inseticidas diferentes é uma estratégia utilizada para evitar a seleção da resistência a Bsp e um exemplo é o uso de misturas de Bsp e Bti, que reduziria o risco de seleção por ser um conjunto mais complexo de toxinas inseticidas, de modo similar ao que ocorre em cultivares mais recentes de Bt que expressam mais de uma toxina (MULLA et al., 2003; ZHAO et al., 2003). Atualmente algumas experiências têm sido realizadas com produtos à base de uma mistura de cristais de Bti e Bsp e os dados mostraram que o produto foi eficiente para o controle de espécies dos gêneros *Culex* e *Aedes* (ANDERSON et al., 2011; DRITZ et al., 2011). A avaliação do sucesso dessas estratégias dependerá do monitoramento da resistência ao longo dos programas de controle de vetores. Este monitoramento pode ser realizado a partir de ensaios de susceptibilidade *in vivo*, ensaios bioquímicos para avaliar a expressão de moléculas alvo de inseticidas e análises da frequência de alelos *r* antes e durante o tratamento. É importante ressaltar que o ensaio de susceptibilidade *in vivo* de larvas, método mais utilizado, não fornece informações suficientes quanto à seleção de resistência em estágios iniciais, pois falham em detectar indivíduos heterozigotos para os alelos *r*. Por estas razões, medidas de monitoramento baseadas no estudo da frequência destes alelos, a partir de ferramentas moleculares, são mais informativas quanto ao estado real de susceptibilidade de uma população (TABASHNIK; GOULD; CARRIÈRE, 2004).

2.8 Caracterização de alelos *r* que conferem resistência a biolarvicidas

Embora já se saiba muito sobre a natureza da resistência aos inseticidas, não é possível afirmar com certeza se todos os alelos *r* estavam presentes nas populações antes da introdução dos inseticidas. Se isto ocorrer, então a frequência de alelos *r*, após a introdução de um agente de controle, deverá aumentar devido à pressão de seleção (FFRENCH-CONSTANT, 2007). A caracterização do mecanismo de resistência e de suas bases genéticas é fundamental para o desenvolvimento de ferramentas moleculares para detectar e monitorar genes associados à resistência. Sabe-se que um dos fatores determinantes para a evolução do processo de seleção é a frequência inicial dos alelos que conferem a resistência em populações naturais, bem como seu modo de herança.

O desenvolvimento e a adoção do plantio de cultivares transgênicos que expressam toxinas Cry do entomopatógeno *B. thuringiensis* (Bt) levaram à realização de estudos da avaliação da frequência de alelos *r* em populações de insetos pragas antes e/ou após a introdução destes cultivares Bt no campo (HUANG et al., 2012; ZHAO et al., 2002; WENES et al., 2006; GÉNISSEL et al., 2003; TABASHNIK et al., 2000; GOULD et al., 1997). A tabela 2 reúne dados de frequências de alelos de resistência ligados a toxinas de Bt e à toxina Bin de Bsp que foram obtidos por ensaios de susceptibilidade ou por PCR alelo-específica.

O método mais utilizado para avaliar esta frequência, denominado “F₂ screen”, foi proposto por Andow e Alstad (1998). Este método consiste em (1) coletar fêmeas de campo acasaladas; (2) manter a progênie F₁ de cada fêmea separada e acasalar os adultos desta progênie entre si; (3) coletar os ovos obtidos dos acasalamentos da F₁ de cada linhagem e submeter os neonatos da geração F₂ à avaliação da susceptibilidade; (4) fazer inferências quanto à frequência do alelo *r* na população de campo a partir da análise estatística dos dados obtidos a partir dos ensaios de susceptibilidade. Entretanto, é difícil estimar a frequência de alelos *r* recessivos a partir de bioensaios que só detectam homozigotos resistentes, pois sua frequência é proporcional ao quadrado da frequência do alelo *r*, ou seja, se esta frequência for muito baixa, a amostra de indivíduos a ser analisada deverá ser grande. Com a recente caracterização de alelos *r* e o estabelecimento de colônias resistentes mantidas em laboratório, é possível realizar as análises de frequências através do “F₁ screen”, cujo método é mais rápido para a detecção de alelos de um determinado gene ligado à resistência. Nesta avaliação, indivíduos provenientes de campo são individualmente acasalados com os indivíduos homozigotos da colônia resistente e a geração F₁ obtida deste cruzamento é submetida a testes de susceptibilidade para identificar na prole indivíduos homozigotos resistentes para o alelo *r* analisado (ZHAO et al., 2010).

Gould et al. (1997) realizaram a primeira avaliação para estimar a frequência do alelo *r* em populações de campo do lepidóptero praga do algodoeiro *Heliothis virescens*, conhecido como lagarta-das-maçãs, em áreas onde o algodão Bt não havia sido comercializado. A avaliação por “F₂ screen” apontou que o principal alelo de resistência teria uma frequência de 0,0015 na população. Em populações de campo de *Pectinophora gossypiella*, um lepidóptero praga do algodoeiro, coletadas no estado americano do Arizona, foi estimada uma frequência bastante elevada de

0,16 para o alelo *r* no ano de 1997 e, nos anos de 1998 e 1999, essa frequência caiu para 0,007 e 0. Devido à plantação do algodão Bt ocorrer em grande escala no Arizona desde 1995, esperava-se um aumento desta frequência ocasionado por uma possível pressão de seleção, porém isto não foi detectado (TABASHNIK et al., 2000).

Um estudo realizado em populações de outro lepidóptero praga, a broca do colmo de milho, *Ostrinia nubilalis*, coletadas na França e nos Estados Unidos demonstrou que a frequência do alelo *r* foi inferior a 9,2 e 4,23 x 10⁻⁴, respectivamente (BOURGUET et al., 2003). Estes dados diferem das frequências iniciais encontradas para *Heliothis virescens* (GOULD et al., 1997) e *Pectinophora gossypiella* (TABASHNIK et al., 2000), levando à conclusão que estes alelos são raros naquelas áreas onde *O. nubilalis* é a principal praga do milho (BOURGUET et al., 2003). Outro estudo, realizado com o lepidóptero *Sesamia nonagrioides*, praga do milho, apontou que frequência de alelos de resistência à toxina Cry1Ab, em populações da Espanha e Grécia, foi de 0,0086 e 0,0097, respectivamente (ANDREADIS et al., 2007).

Génissel et al. (2003) estimaram a frequência do alelo *r* em *Chrysomela tremulae*, um coleóptero praga do álamo, árvore das florestas boreais, em áreas da França, e a frequência, de 1999 a 2001, antes de seu contato com o cultivar Bt, foi de 0,017 em 1999 e 0,0037 em 2001. Em outra amostra de insetos coletados a 500 km do local da população anterior, a frequência inicial do alelo *r* foi estimada em 0,011, estatisticamente similar àquela encontrada na população analisada por Génissel et al. (2003) (WENES et al., 2006).

Um extenso monitoramento também foi realizado em *Diatraea saccharalis*, a broca da cana, para a avaliação da resistência à toxina Cry1Ab presente no milho Bt na Luisiana e Mississippi, EUA. De 2007 a 2009, a população de Luisiana apresentou uma frequência do principal alelo de resistência de 0,0177 no ano de 2009, que foi 16 vezes maior comparada com a frequência de 0,0011 identificada entre 2004 e 2008, o que pode estar relacionado a uma maior pressão de seleção já que houve um aumento do plantio de milho Bt (HUANG et al., 2012). Todos os trabalhos realizados anteriormente foram baseados no uso da técnica de F₂ *screen*, ou seja, na avaliação da susceptibilidade *in vivo* dos insetos para detecção de homozigotos e a estimativa de heterozigotos.

Até o momento, 14 alelos da caderina ligados à resistência à toxina Cry1Ac foram identificados em três espécies de lepidópteros, *Helicoverpa armigera*, *P. gossypiella* e *H. virescens* (ZHAO et al., 2010; XU et al., 2005; MORIN et al., 2003; GAHAN et al., 2001). Tabashnik et al. (2006) analisaram por PCR alelo-específica mais de 5.500 larvas de *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera) coletadas de campos de algodão nos Estados Unidos e não detectaram nenhum alelo de três *r* avaliados nesta busca, e a frequência, estimada através de modelos estatísticos, foi de 0,0003. GAHAN et al. (2007), também através de uma abordagem baseada na PCR, investigaram *Heliothis virescens* a partir de uma amostra de 7.000 indivíduos e o alelo de resistência não foi detectado com uma frequência estimada estatisticamente de 0,00007. Uma das possíveis razões para estes alelos *r* não terem sido detectados em campo pode ser devido à sua caracterização a partir de colônias resistentes selecionadas em condições de laboratório e, portanto, é possível que tais alelos não ocorram necessariamente em campo. Por isso é importante o estabelecimento de um sistema de vigilância que integre, dentro do seu escopo, um método baseado na detecção de alelos *r* que foram caracterizados no campo (YANG et al., 2006).

Como descrito, uma alternativa útil, para identificar alelos *r* nas populações é a utilização do método “F₁ screen”. Na China, o algodão Bt foi adotado há 13 anos para evitar os danos causados por *H. armigera* e representa aproximadamente 70% de todo o algodão plantado naquele país (JAMES, 2008). Essa grande cobertura de algodão Bt pode exercer, conseqüentemente, uma forte pressão de seleção e a resistência em *H. armigera* é considerada o maior desafio a ser superado para o sucesso a longo prazo desse cultivar transgênico (ZHAO et al., 2010). Neste estudo, baseado na análise de acasalamentos de indivíduos provenientes de uma área com plantio Bt por mais de 10 anos, mostrou que a frequência de um dos 14 alelos *r* caracterizados para a caderina foi de 0,024. Outros trabalhos demonstram que as frequências de alelos *r* para toxinas do Bt são variáveis e, portanto, a avaliação deste parâmetro constitui uma ferramenta importante para diminuir o risco de seleção da resistência em diferentes situações (LIU et al., 2008; GAO et al., 2009; XU et al., 2009; DOWNES; MAHON, 2012; ZHANG et al., 2012).

O primeiro trabalho que mostrou a detecção direta de alelos *r* para um biolarvicida em populações de campo através de PCR foi realizado por Chalegre et al. (2009). Neste estudo a frequência do alelo *cqm1_{REC}* que confere resistência a

Bsp, e foi caracterizado na colônia R2362, foi avaliada em uma população tratada e duas não tratadas. Foi demonstrado que a frequência do alelo *cqm1_{REC}* foi mais elevada na população tratada (ordem de 10^{-2}) em relação às áreas não tratadas (ordem de 10^{-3}) (CHALEGRE et al, 2009). A detecção desta frequência em populações naturais não tratadas é importante para avaliar comparativamente, com populações sob tratamento, o risco de seleção para resistência. As frequências do alelo *cqm1_{REC}* encontradas nas populações naturais não tratadas analisadas neste trabalho mostram que o monitoramento da resistência é parte fundamental de um programa de controle. No caso de outros alelos *r* oriundos de áreas geográficas diferentes, como o *cpm1_{GEO}*, *cpm1_{BP}*, *cpm1_{BP}-del*, não se sabe se ocorrem nas populações de *C. quinquefasciatus* da RMR e em que frequência.

Tabela 2 – Estimativas de frequências de alelos de resistência às toxinas dos biolarvicidas *Bacillus thuringiensis* (Bt) e *Bacillus sphaericus* (Bsp) em diferentes espécies de insetos.

(continua)

Inseto	Agente de seleção	País	Método	Frequência	Referência
<i>Chrysomela tremulae</i>	Álamo-Bt	França	F ₂ screen	0,0037	Génissel et al., 2003
<i>C. tremulae</i>	Álamo-Bt	França	F ₂ screen	0,0113	Wenes et al., 2006
<i>Culex quinquefasciatus</i>	-	Brasil	PCR	0,006; 0,003;	Chalegre et al., 2009
<i>C. quinquefasciatus</i>	Bsp	Brasil	PCR	0,055 e 0,053	Chalegre et al., 2009
<i>Diatraea saccharalis</i>	Milho-Bt	EUA	F ₂ screen	0,017	Huang et al., 2012
<i>Helicoverpa armigera</i>	Algodão-Bt	China	F ₂ screen	0,0146	Xu et al., 2009
<i>H. armigera</i>	Algodão-Bt	China	F ₁ screen	0,024	Zhao et al., 2010
<i>H. armigera</i>	Algodão-Bt	Austrália	F ₂ screen	0,009	Downes; Mahon, 2012
<i>Helicoverpa punctigera</i>	Algodão-Bt	Austrália	F ₂ screen	0,005	Downes; Mahon, 2012
<i>Helicoverpa zea</i>	Algodão-Bt	EUA	F ₂ screen	0,00039 e 0,00043	Burd et al., 2003
<i>Heliothis virescens</i>	Algodão-Bt	EUA	F ₂ screen	0,0015	Gould et al., 1997
<i>H. virescens</i>	Algodão-Bt	EUA	PCR	0,00007	Gahan et al., 2007
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Milho-Bt	EUA	F ₂ screen	0,0039	Andow et al., 2000
<i>O. nubilalis</i>	Milho-Bt	França	F ₂ screen	< 0,00092	Bourguet et al., 2003
<i>O. nubilalis</i>	Milho-Bt	EUA	F ₂ screen	0,000423	Bourguet et al., 2003
<i>Pectinophora gossypiella</i>	Algodão-Bt	EUA	F ₂ screen	0,16; 0,07 e 0	Tabashnik et al., 2000

Tabela 2 – Estimativas de frequências de alelos de resistência às toxinas dos biolarvicidas *Bacillus thuringiensis* (Bt) e *Bacillus sphaericus* (Bsp) em diferentes espécies de insetos.

(conclusão)

Inseto	Agente de seleção	País	Método	Frequência	Referência
<i>P. gossypiella</i>	Algodão-Bt	EUA	PCR	0,0003	Tabashnik et al., 2006
<i>Scirpophaga incertulas</i>	Arroz-Bt	Filipinas	F ₂ screen	0,0036	Bentur et al., 2000
<i>Sesamia nonagrioides</i>	Milho-Bt	Espanha	F ₂ screen	0,0086	Andreadis et al., 2007
<i>S. nonagrioides</i>	Milho-Bt	Grécia	F ₂ screen	0,0097	Andreadis et al., 2007

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.9 Custo biológico da resistência

Um tema central no estudo da resistência é a compreensão dos fatores que determinam o surgimento, aumento e distribuição dos alelos de resistência nas populações e o potencial custo biológico que pode estar associado a este fenótipo (RIGBY; HECHINGER; STEVENS; 2002). Este custo é visto geralmente como uma consequência da realocação de fontes limitadas, que são necessárias em vários aspectos do desempenho biológico do inseto, para a maquinaria que confere o fenótipo de resistência (SHELDON; VERHULST, 1996).

O *fitness* ou desempenho biológico é geralmente definido como o sucesso reprodutivo ou a contribuição genética de um indivíduo para a próxima geração em relação a outros membros da mesma população. Embora o indivíduo possa se beneficiar do fenótipo de resistência, por evitar ou diminuir os efeitos causados, neste caso pelo agente inseticida, as defesas utilizadas para alcançar a resistência poderiam ter um custo associado ao *fitness*, quando este supera seus benefícios (RIGBY; HECHINGER; STEVENS, 2002). Sendo assim, a evolução da resistência dos insetos aos inseticidas pode ser influenciada diretamente pelo custo biológico, que seria a diminuição do desempenho biológico que pode ocorrer, quando genes com uma função importante são afetados em associação aos genes de resistência, na ausência da pressão de seleção (COUSTAU; CHEVILLON; FFRENCH-CONSTANT, 2000). No entanto, a análise do desempenho biológico é algo complexo, sendo necessária a avaliação de diversos parâmetros tais como sobrevivência, crescimento e reprodução para se chegar a uma conclusão definitiva (RIGBY; HECHINGER; STEVENS, 2002; GASSMAN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009).

Foi observado que os efeitos pleiotrópicos negativos no desempenho biológico podem ser reduzidos sequencialmente por seleção natural e a substituição alélica pode ocorrer para modificar ou compensar o custo biológico de um determinado alelo *r* (FISHER, 1928; 1958). Quando um polimorfismo surge e está ligado à resistência ou a outras características que tragam vantagem ao indivíduo em determinados ambientes, ele pode estar associado a um custo. Embora essa mutação inicial possa apresentar um elevado custo, deve ser reconhecido que se esta confere uma vantagem sob alguma circunstância, mutações secundárias subsequentes poderiam ocorrer para reduzir o custo biológico (RIGBY;

HECHINGER; STEVENS, 2002). No entanto, quando o ambiente tem forte pressão de seleção, o alelo que apresenta maior custo pode permanecer em frequências elevadas, pois são capazes de conferir o fenótipo resistente mais bem sucedido (LABBÉ et al., 2009). Outro ponto importante que precisa ser destacado é que, embora a resistência esteja geralmente associada a custos relacionados ao *fitness*, alguns alelos *r* podem persistir nas populações de campo sem uma forte pressão de seleção com inseticida (FFRENCH-CONSTANT, 1994; FFRENCH-CONSTANT et al., 2000).

Análises de populações de *C. pipiens* em Montpellier, sul da França, expostas à pressão de seleção com diferentes inseticidas, incluindo organofosforados, têm demonstrado que alelos de resistência têm sido sequencialmente substituídos por outros ao longo de 23 anos nesta população (GUILLEMAUD et al., 1998). Em outro estudo, realizado na mesma região, foi verificada em uma população de *C. pipiens* a substituição do alelo *Ester*¹ pelo *Ester*⁴ por este último oferecer o mesmo fenótipo de resistência, mas com um custo biológico menor para o mosquito. Um segundo evento de substituição ocorreu, no qual o *Ester*⁴ foi substituído pelo *Ester*². Este último oferece um custo mais elevado, porém possui uma vantagem seletiva maior na área tratada com o inseticida. Estes dados revelam a importância do conhecimento sobre as condições nas quais os indivíduos estão expostos, pois reforçam o conceito de adaptação local (LABBÉ et al., 2009).

Alguns estudos relacionados ao custo biológico em colônias de *C. quinquefasciatus* resistentes a Bsp têm sido desenvolvidos. Rodcharoen; Mulla (1997) demonstraram que as larvas de uma colônia de laboratório resistente a Bsp tiveram uma redução significativa, de 23 e 48%, na fecundidade e fertilidade, respectivamente, enquanto que para a população de campo, esses valores foram de 27 e 37%. Em outro estudo, realizado por Oliveira et al. (2003), a colônia R2362 também teve uma redução significativa na fecundidade e fertilidade, embora de uma forma mais discreta em relação ao trabalho de Rodcharoen; Mulla (1997). Além disso, as fêmeas resistentes necessitavam de dois repastos sanguíneos para realizar a primeira oviposição, com as progênies apresentando um desenvolvimento embrionário mais lento e, conseqüentemente, o número de gerações por ano era menor em relação à colônia susceptível. Amorim et al. (2010) não observaram nenhum custo biológico para uma colônia resistente a Bsp cepa IAB59, em comparação à colônia susceptível, quando comparados parâmetros de fecundidade,

fertilidade e peso pupal. Também foi possível avaliar, após cruzamentos entre indivíduos homozigotos susceptíveis e resistentes, que o alelo *cqm1_{REC}* manteve uma alta frequência após 11 gerações sem tratamento com Bsp, indicando que este alelo pode não estar associado a um alto custo biológico para o inseto por ter se mantido estável na ausência de pressão de seleção. Com relação à resistência a Bt, em 77 estudos envolvendo 18 espécies de coleópteros, dípteros e lepidópteros, 34% mostraram um custo biológico para o inseto e a maioria dos aspectos biológicos afetados foi sobrevivência, tempo de desenvolvimento e massa corpórea (GASSMANN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009). Estes dados sugerem que a resistência nem sempre está associada a um custo biológico para o inseto, embora deva ser ressaltado que em alguns casos o desempenho biológico pode ser afetado de forma crítica, impedindo, inclusive, a manutenção de colônias em laboratório, mesmo na ausência de pressão de seleção (ANILKUMAR; PUSZTAI-CAREY; MOAR, 2008).

3 JUSTIFICATIVA

O controle de vetores é uma intervenção necessária para a interrupção do ciclo de transmissão de patógenos causadores de doenças e para a melhoria da qualidade da saúde e do ambiente onde vivem as populações, constituindo um importante campo de atenção à saúde de acordo com a Norma Operacional Básica do SUS (NOB-SUS/96). O uso de larvicidas seletivos é uma opção que proporciona a sustentabilidade dos programas de controle e nesse contexto, *Bacillus sphaericus* (Bsp) tem uma importância fundamental, pois está sendo atualmente utilizado no Programa de Controle de *C. quinquefasciatus* na cidade do Recife, além de outras áreas no país. O uso racional de Bsp depende das estratégias utilizadas para evitar a seleção da resistência e garantir a vida útil do produto. Neste contexto, a tese em questão teve como objetivo central caracterizar polimorfismos do gene *cqm1* em *C. quinquefasciatus* que podem levar à resistência a Bsp e desenvolver ferramentas moleculares para sua detecção. O monitoramento da susceptibilidade e avaliação do risco de seleção de resistência, através de métodos tradicionais e ferramentas moleculares, são avanços importantes para estabelecer estratégias adequadas para o uso de inseticidas no controle de vetores.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Há outros polimorfismos que ocorrem no gene *cqm1*, além daqueles já identificados, que podem conferir resistência ao biolarvicida *Bacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus*?

5 HIPÓTESE

O gene *cqm1* possui outros polimorfismos, além daqueles já caracterizados, que podem conferir resistência ao biolarvicida *Bacillus sphaericus*.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Caracterizar alelos do gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus* que conferem resistência ao biolarvicida *Bacillus sphaericus* a fim de subsidiar sua utilização sustentável em programas de controle deste vetor.

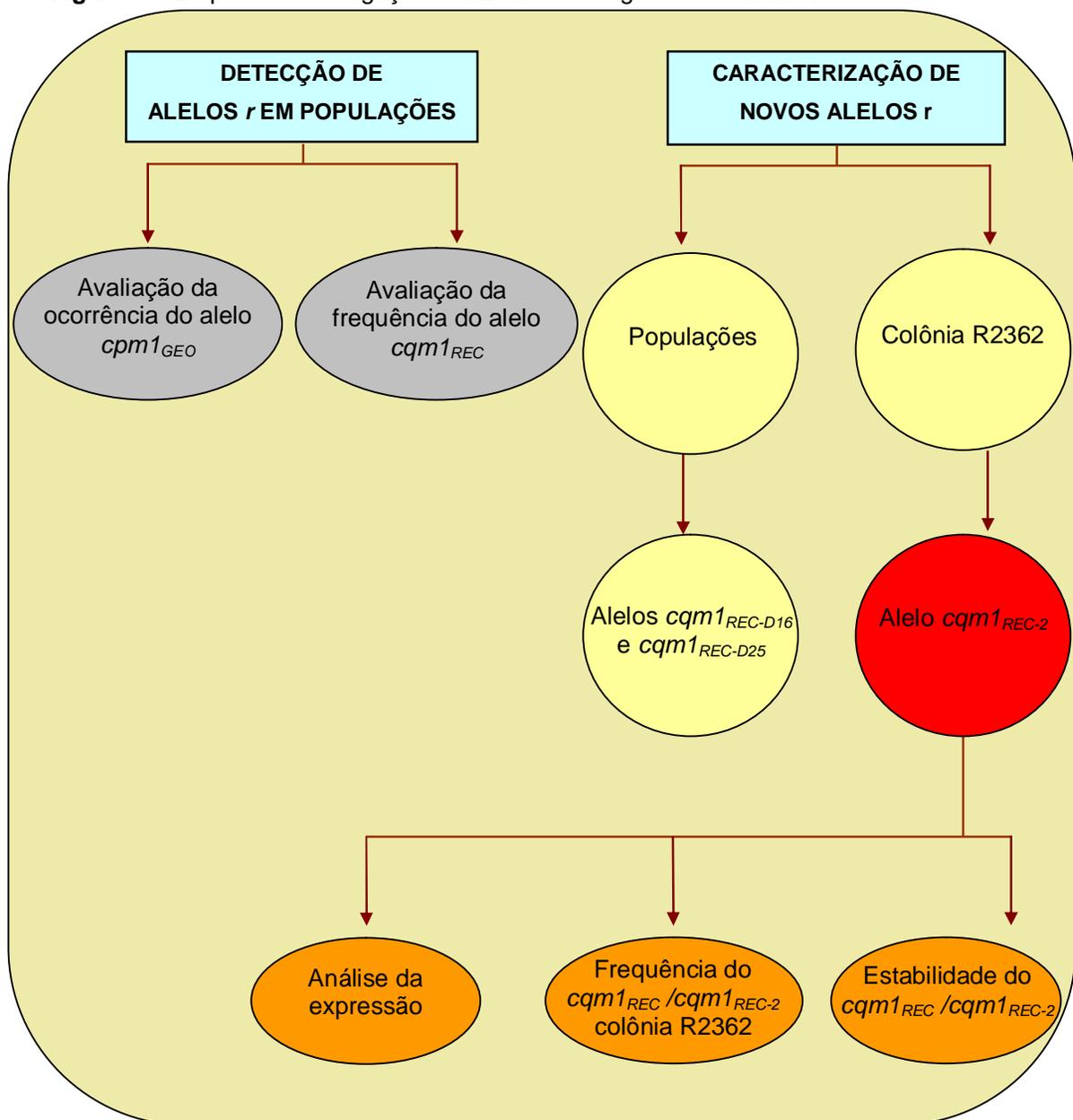
6.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a presença do alelo *cqm1_{GEO}* em uma população de *C. quinquefasciatus* da Região Metropolitana do Recife (RMR).
- b) Determinar a frequência do alelo *cqm1_{REC}* em populações de *C. quinquefasciatus* da RMR não tratadas com Bsp.
- c) Identificar alelos de resistência a *Bacillus sphaericus* em populações de *C. quinquefasciatus* da RMR.
- d) Caracterizar um novo alelo, *cqm1_{REC-2}*, selecionado na colônia de laboratório R2362.
- e) Avaliar a expressão e competição dos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* sob diferentes condições de laboratório.

7 MATERIAL E MÉTODOS

O esquema abaixo apresenta as etapas de investigação para caracterização e detecção de alelos de resistência a *Bacillus sphaericus* em *Culex quinquefasciatus* (Figura 5).

Figura 5 – Etapas de investigação realizadas ao longo deste trabalho.



Fonte: Dados do autor.

7.1 Amostras de culicídeos

Neste trabalho foram utilizadas cinco colônias de *C. quinquefasciatus* e uma colônia de *Aedes aegypti* mantidas em laboratório, além de amostras de larvas provenientes de populações naturais de *C. quinquefasciatus* da Região Metropolitana do Recife (RMR).

7.1.1 Colônias

As colônias descritas abaixo foram mantidas no insetário sob as seguintes condições: temperatura de 26 ± 1 °C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo 12:12 h (dia/noite). Os adultos foram alimentados em solução de sacarose a 10% e às fêmeas foi oferecido repasto sanguíneo em *Gallus* sp. As larvas foram mantidas em água potável e alimentadas com ração para gatos.

S. Colônia susceptível a Bsp, estabelecida a partir de ovos coletados em criadouros de áreas urbanas do Recife e mantida há mais de 10 anos no insetário.

R2362. Colônia que apresenta um alto nível de resistência (>100.000) a Bsp 2362 selecionada em laboratório (PEI et al., 2002) e mantida há mais de 190 gerações. O mecanismo de resistência caracterizado nesta colônia é a ausência do receptor Cqm1 no epitélio intestinal associada ao alelo *cqm1_{REC}* em homozigose (OLIVEIRA et al., 2004; ROMÃO et al., 2006). Em 2010, avaliações do genótipo das larvas indicaram a existência de um novo alelo nesta colônia que foi caracterizado neste trabalho.

R2362/REC. Sub-colônia fundada a partir de jangadas provenientes da R2362, através de avaliação de ovos por PCR alelo-específica para o *cqm1_{REC}*. Dez jangadas, cujos ovos foram homozigotos para o alelo, foram utilizadas para a fundação da colônia.

R2362/REC-2. Sub-colônia fundada a partir de jangadas provenientes da R2362, através de avaliação de ovos por PCR alelo-específica para o *cqm1_{REC}*. Foram utilizados para a fundação da colônia ovos de onze jangadas que não apresentaram amplificação para o alelo *cqm1_{REC}*, mas sim de outro fragmento que potencialmente correspondia ao novo alelo selecionado na colônia R2362.

GEO. Colônia altamente resistente a Bsp 2362 (>100.000) selecionada em laboratório (WIRTH et al., 2000). As amostras de larvas desta colônia, gentilmente cedidas pela Dra. Christina Nielsen-LeRoux e mantidas a -70 °C, foram utilizadas para o desenvolvimento da PCR alelo-específica. O mecanismo de resistência é semelhante ao da colônia R2362 e está associado ao alelo *cpm1*_{GEO} (DARBOUX et al., 2002).

RecLab. Colônia de *Aedes aegypti* fundada a partir de amostras de ovos coletados na RMR (MELO-SANTOS et al., 2010). O DNA de larvas desta colônia foi utilizado como controle negativo das reações de PCR para os alelos dos genes *cqm1* e *cpm1*.

7.1.2 Populações

As amostras de ovos de populações foram coletadas em diferentes áreas da RMR e mantidas no insetário sob as mesmas condições descritas no item anterior.

População tratada. A população do bairro de Água Fria (AF), localizado em Recife, Pernambuco, foi utilizada para avaliar a presença do alelo *cpm1*_{GEO}. Esta população vem sendo tratada com o biolarvicida desde março de 2003 no âmbito do programa de controle do vetor da filariose realizado pela prefeitura da cidade do Recife (SILVA-FILHA et al., 2008).

Populações não tratadas. As populações de Jaboatão dos Guararapes e Ipojuca, localizadas a 20 e 60 km respectivamente da RMR, foram selecionadas de acordo com o critério de ausência de tratamento com Bsp, informado pelo Centro de Vigilância Ambiental das respectivas Secretarias de Saúde. As amostras das populações dos bairros de Recife, Azeitona e Roda de Fogo, foram coletadas no ano de 1999, período em que estes bairros não foram alvos de tratamentos com Bsp (REGIS et al., 1995; SILVA-FILHA et al., 2001).

7.2 Avaliação da susceptibilidade *in vivo*

Os bioensaios para avaliar a susceptibilidade a Bsp 2362 das larvas das populações analisadas foram realizados no âmbito do Serviço Nacional de

Referência em Controle de Culicídeos Vetores, do Depto. de Entomologia do CPqAM/FIOCRUZ.

7.2.1 Bioensaios dose-diagnóstica

Estes bioensaios foram realizados para determinar a frequência de indivíduos susceptíveis e resistentes nas amostras analisadas após a exposição de larvas de 4^o estágio a uma concentração diagnóstica. As larvas foram tratadas em placas de 24 poços, com uma concentração final de 125 mg/L da biomassa de Bsp 2362 (lote 0448-09), que é 1.000 vezes superior àquela necessária para matar 90% das larvas após 48 h. Esta dose foi empregada para identificar larvas com alto nível de resistência a Bsp, potencialmente associada à ausência do receptor Cqm1 no *microvilli* intestinal. Foram avaliadas, no mínimo, 300 L₄ de cada população teste, além de 50 L₄ da colônia S expostas a Bsp (controle positivo) e 50 L₄ da população teste sem exposição a Bsp (controle negativo). A mortalidade foi avaliada após 48 h de exposição.

7.2.2 Bioensaios dose-resposta

Estes bioensaios informam a susceptibilidade das populações através das concentrações letais de Bsp para 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) das larvas. O método consiste em submeter larvas do 4^o estágio jovens a uma série de seis concentrações de uma suspensão aquosa do pó liofilizado padrão SPH88 (Instituto Pasteur, França) composto de cristais e esporos de Bsp cepa 2362 por 48 horas, de acordo com protocolo da ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (1985). Amostras de vinte larvas foram colocadas em recipientes contendo 100 mL de água destilada e cada amostra foi submetida a uma dentre as seis concentrações testadas, além de um grupo controle não tratado. Três replicatas foram realizadas para cada uma das concentrações testadas e para o grupo controle. Cada bioensaio foi repetido pelo menos três vezes. Os valores de CL₅₀ e CL₉₀ de Bsp para as larvas, após 48 h, foram estabelecidos através da análise de próbites usando o programa SPSS 10.0 para Windows.

7.3 PCR específica para detecção dos alelos *cpm1_{GEO}*, *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*

Neste trabalho foram desenvolvidos e/ou aplicados métodos de PCR para detecção específica de alelos de resistência do gene *cqm1*. A PCR alelo-específica para o alelo *cqm1_{REC}* foi padronizada e está descrita em CHALEGRE et al. (2009). Para o alelo *cpm1_{GEO}* a PCR alelo-específica foi padronizada, neste estudo, a partir da mutação descrita em Darboux et al. (2002). No caso do alelo *cqm1_{REC-2}*, o método de PCR específica foi desenvolvido após sua caracterização, realizada neste estudo e descrita na seção 8.4.1.

7.3.1 Extração de DNA

Para obtenção do DNA genômico, amostras de larvas individuais do 4º estágio foram homogeneizadas em DNAzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com instruções do fabricante, seguido por precipitação com etanol e ressuspensão em tampão Tris-EDTA (CHALEGRE et al., 2009). Após a extração, as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop 2000c® (Thermoscientific).

7.3.2 PCR alelo-específica

Os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações estabelecidas previamente para prevenção de contaminação por DNA exógeno (CHALEGRE, 2009). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 0,2 mM de cada dNTP, concentração de cada *primer* específico (Tabela 3), 2U da enzima Go Taq® Flexi DNA Polymerase (Promega) para o alelo *cqm1_{REC}* ou Platinum® Taq DNA Polymerase® (Invitrogen) para os alelos *cpm1_{GEO}* e *cqm1_{REC-2}*, em tampão fornecido pelo fabricante (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,4 mM), além de 12,5 ng do DNA molde extraído individualmente das larvas. Cada amostra foi amplificada em um termociclador BIOMETRA® programado para uma etapa de desnaturação a 94 °C por 3 min, seguido de quantidades de ciclos e temperaturas de anelamento de acordo com o alelo analisado, que foram 35,

36 e 40 ciclos a 55, 65 e 69 °C para os alelos *cqm1_{REC}*, *cqm1_{REC-2}* e *cpm1_{GEO}*, respectivamente, por 50 seg e 72 °C por 60 seg, e uma etapa final de 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram separados em eletroforese em gel de agarose 2,5% contendo marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder® (invitrogen). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida TBE (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e o gel, corado com brometo de etídeo, foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta (UV).

A reação de PCR para o alelo *cqm1_{REC}* foi desenvolvida e previamente descrita por Chalegre et al., (2009). Para o desenvolvimento da PCR específica para o alelo *cpm1_{GEO}* e *cqm1_{REC-2}* foram necessárias etapas incluindo o desenho e especificidade das associações de *primers* capazes de detectar as mutações pontuais de cada alelo. Para o alelo *cpm1_{GEO}* ocorre a troca de uma timina por uma adenina na posição 1706 da ORF deste gene (DARBOUX et al., 2002), e para o *cqm1_{REC-2}* a mutação pontual está descrita na seção 8.4.1. Se não houver anelamento dos *primers* nesta base responsável pela resistência, é improvável a amplificação de fragmentos específicos (NEWTON et al., 1989). Para a detecção de cada um dos alelos *cpm1_{GEO}* e *cqm1_{REC-2}* foram desenvolvidas duas reações de PCR, respectivamente, que utilizam uma associação de quatro *primers* específicos. Os *primers* foram desenhados usando o *software* disponível em http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html (SHU et al., 2001). Os desenhos dos *primers* foram baseados na especificidade das mutações contidas em cada alelo *cpm1_{GEO}* ou *cqm1_{REC-2}*, além da incorporação de uma mudança que consiste na troca de uma única base na antipenúltima posição dos *primers forward* e *reverse* (SINGH et al., 2009), a fim de conferir maior especificidade à reação (Tabela 3). Uma amostra contendo o DNA de *Ae. aegypti*, não específico para o par de *primers* utilizados, e uma amostra sem DNA molde foram os controles negativos usados em cada reação.

Para o alelo *cqm1_{REC}* foram analisados entre 200 e 500 indivíduos de cada população não tratada e para o alelo *cpm1_{GEO}* foram analisados 290 indivíduos de uma população tratada com Bsp. Já para o alelo *cqm1_{REC-2}*, foram analisados entre 60 e 115 indivíduos de cada geração das colônias mantidas em laboratório.

Devido ao elevado número de indivíduos a serem analisados neste tipo de *screening*, um dos objetivos deste estudo foi estabelecer e avaliar a sensibilidade do método de detecção dos alelos *cqm1_{REC}* e *cpm1_{GEO}* em *pools* de larvas, ao invés da

análise individual previamente descrita (CHALEGRE et al., 2009). Foram analisadas diferentes diluições do DNA molde de larvas sensíveis que possuem duas cópias do alelo *cqm1* com o DNA molde de larvas resistentes que possuem duas cópias para o alelo de resistência, seja ele o *cqm1_{REC}* ou *cqm1_{GEO}*. Para a confirmação das sequências, todos os indivíduos que apresentaram fragmentos esperados correspondentes aos alelos *cqm1_{GEO}*, *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* foram encaminhados para o sequenciamento automático no ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) do Núcleo de Plataforma Tecnológica (NPT) do CPqAM. A tabela 3 reúne as sequências dos *primers* utilizados, bem como os tamanhos dos fragmentos gerados das diferentes associações usadas para o diagnóstico dos alelos.

Tabela 3. Primers utilizados para a detecção dos alelos *cqm1*(S), *cqm1_{REC}*(REC), *cqm1_{GEO}*(GEO) e *cqm1_{REC-2}*(REC-2) em *Culex quinquefasciatus* a partir de reações em cadeia da polimerase (PCR). As bases em minúsculo e sublinhadas correspondem a troca de bases realizadas para conferir uma maior especificidade as reações de PCR.

Alelo	Primer	Concentração mM	Anelamento (°C)	Sequência (5'-3')	Associação de primers	Amplicon (pb) da PCR		
S						S		REC
REC	1. FwCqm1Rec	1,6	60	CTGGGTAGCTGGATCGCATGATCACTC	1+2	208		189
	2. RvCqm1Rec	1,6	60	GTGTTGGTACTGAACCCGGCACTGGTC	—	—		—
S*						S		GEO
GEO	1. FwConGEO	1,6	69	GAGGTGGCGCAACCGAACTCCAAGTCG	1+2	281		281
	2. RvConGEO	1,6	69	CAAAAGCTAATTACGCCAGTATCAGCC	1+4	216		—
	3. FwGEO	1,1	69	GCTGCTATCAACCTTTTCGATTGG _c TA	2+3	—		113
	4. RvSEN	2,4	69	CCTGGCCATAATCGCTAGCA _t CA	3+4	—		—
S*						S	REC	REC-2
REC	1. FconREC2	1,6	65	ACCGTCTTGTGCACGTA _c CTCACCCTCT	1+2	327	308	327
	2. RconREC2	1,6	65	GTTGATCAGGTCATGACGTTGCTGCATA	1+4	273	254	—
		1,6	65	AGCATAGTCCGGATGAACTCGGA _t CC	2+3	—	—	173
	4. RvCqm1	1,6	65	CCGGGTTTCAGTACCAACACCAACTC _a TA	3+4	—	—	—

Fonte: Elaborada pelo autor.

*PCR-Multiplex.

7.4 Clonagem e sequenciamento do gene *cqm1*

Alelos do gene *cqm1* que apresentaram polimorfismos, potencialmente, associados à resistência foram submetidos à clonagem, sequenciamento e análise *in silico*, para a confirmação de suas sequências.

O DNA total das larvas foi extraído conforme item 7.3.1 e as reações de PCR foram realizadas utilizando *primers* que permitiram a amplificação total do gene *cqm1* cuja sequência está depositada no GenBank sob o número de acesso DQ333335 (ROMÃO et al., 2006). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,05X, corado com brometo de etídeo (10 mg/ml) e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta. Após a visualização, os fragmentos foram submetidos à purificação com o Kit GFX DNA and Gel Band Purification® (GE Healthcare) e clonados no vetor plasmidial pGEM®T-Easy (Promega). O DNA plasmidial foi empregado na transformação de bactérias *Escherichia coli* quimiocompetentes (One Shot TOP 10®, Invitrogen). Colônias foram selecionadas em meio Luria-Bertani por 16 horas a 37 °C, e as células foram submetidas à extração de DNA plasmidial por lise alcalina, utilizando o QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen), segundo as recomendações do fabricante. As mini preparações foram quantificadas e encaminhadas para o sequenciamento automático no ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) do NPT-CPqAM.

Foram empregados oito *primers* a fim de obter a sequência completa do gene *cqm1*, dos quais seis são internos para o gene *cqm1*, além de dois *primers* específicos para o plasmídeo pGEM®T-Easy, (M13 *forward* e M13 *reverse*) (Tabela 4). Cada associação de *primers* permitiu amplificar fragmentos de aproximadamente 500 pb, que foram alinhados para obter a sequência completa do gene *cqm1*. Os eletroferogramas das reações foram analisados através do programa SeqMan (DNASTAR). Após o refinamento manual, as sequências foram alinhadas e a análise de possíveis polimorfismos no gene *cqm1* foi realizada através do programa MegaAlign e BioEdit. A localização dos 6 *primers* internos, bem como a sequência do *cqm1* obtida por Romão et al. (2006) estão no anexo A.

Tabela 4 – *Primers* utilizados para o sequenciamento do gene *cqm1* e seus alelos.

Primer*	Sequência (5'-3')
1	CGAGAATTCTCTCCGAGCAAGATGCGA
2	AGGGGGTGGTCCGCGAATAAT
3	ACTCCCCTCTCGCTGTATTA
4	CGCCAGGGAGCTCACATGCCGTT
5	ATGCAGAAGAATCCACAAAG
6	GCACTGCAGGGAAGTGGTGAAGGTAC

Fonte: Elaborada pelo autor.

*A localização dos *primers* na sequência do gene *cqm1* se encontra no anexo A.

7.5 Análise da expressão dos alelos *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2}

Larvas de *C. quinquefasciatus* de 4^o estágio das colônias S, R2362/REC e R2362/REC-2 foram submetidas à extração de RNA para posterior emprego nas reações de qRT-PCR em tempo real e avaliação dos níveis de expressão de seus respectivos alelos. Além disso, frações ricas em microvilosidades intestinais de larvas de cada colônia foram empregadas para avaliar a sua capacidade de ligação à toxina Bin, através de ensaios de ligação *in vitro*.

7.5.1 Extração de RNA

Para análise de transcrição e síntese de cDNA, o RNA total foi extraído de larvas individuais das colônias S, R2362/REC e R2362/REC-2, utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen). Após a obtenção do RNA, as amostras foram tratadas com DNase® (USB) a fim de garantir a remoção de resquícios de DNA genômico. A concentração e a qualidade das amostras do RNA isolado foram avaliadas por espectrofotometria nas absorvâncias de 260 e 280 nm em NanoDrop 2000c (Thermoscientific).

7.5.2 RT-PCR em Tempo Real

O nível de expressão dos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* foi determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), realizado a partir da obtenção das amostras de RNA total descrita no item anterior. Os *primers* utilizados, bem como o tamanho dos fragmentos gerados, estão descritos na Tabela 5. Para evitar amplificação proveniente de DNA genômico, além do tratamento com DNase descrito, o *primer forward* para os alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* foi desenhado para anelar na região de junção dos éxons 1 e 2.

Em cada ensaio, as reações foram realizadas em placas de 96 poços a partir de amostras individuais de RNA extraído de cinco larvas de cada colônia, em triplicata. O volume final da reação foi de 20 µL por poço com o Kit QuantiTect® SYBR Green RT-PCR® (QIAGEN) para as reações de qRT-PCR *one-step*. Após extração e quantificação, as amostras de RNA foram normalizadas para a concentração de 50 ng/µl e cada reação conteve SYBRGreen Mix, transcriptase reversa, 100 ng de RNA molde, 0,5 µM de *primer forward* e 0,5 µM de *primer reverse* para o gene alvo e para o controle endógeno, que foi o gene da subunidade ribossômica 18S. Foram realizadas três repetições de cada avaliação e os dados foram agrupados para a análise da expressão de cada alelo.

As reações de PCR em tempo-real foram realizadas no NPT-CPqAM, no equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems). Os parâmetros avaliados foram a curva de *melt* (detecção de amplificações inespecíficas) e análise de $\Delta\Delta CT$ (quantificação relativa) no programa 7500 software v.2.0.4 da Applied Biosystems® (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 5 – *Primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Gene	<i>Primers</i> (5'-3')	Amplicon (pb)
18S*	<i>Forward</i> CGCGGTAATTCCAGCTCCACTA <i>Reverse</i> GCATCAAGCGCCACCATATAGG	159
<i>cqm1</i> , <i>cqm1_{REC}</i> e <i>cqm1_{REC-2}</i>	<i>Forward</i> CGTTCCTGACGGTGCTGAACATGG <i>Reverse</i> GACCTCATTGCCCGCCTTCGACTTGG	131

Fonte: Dados do autor e *Liu et al. (2011).

7.5.3 Preparações de frações ricas em microvilli intestinal

Frações ricas em *microvilli* intestinal (BBMF) foram obtidas a partir de larvas do 4^o estágio, armazenadas a -80 °C, de acordo com o método descrito previamente por Silva-Filha, Nielsen-LeRoux e Charles (1997). As BBMFs foram submetidas à dosagem protéica pelo método Bradford, utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) (BRADFORD, 1976). A qualidade das amostras de BBMF foi avaliada através do enriquecimento da enzima α -glicosidase (EC 3.2.1.20) obtido entre a amostra inicial do extrato de larvas e a amostra rica em microvilosidades obtida ao final da preparação. Para tal, as amostras (10 μ g) foram incubadas em 1 ml do tampão citrato de sódio-fosfato 100 mM, pH 6.5, contendo 2 mM do substrato p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (Sigma) a 37 °C, durante 30 minutos. A atividade α -glicosidase foi avaliada através da variação da absorbância das amostras a 405 nm. As amostras de BBMF foram armazenadas a -70 °C até a utilização.

7.5.4 Ensaios de competição

A capacidade de interação de frações de *microvilli* de larvas das colônias S, R2362/REC e R2362/REC-2 com a toxina Bin e, conseqüentemente, a disponibilidade de receptores Cqm1 funcionais foi avaliada através da interação *in vitro*. Para tal, a toxina Bin radiomarcada (Bin-I¹²⁵) foi produzida em cultura de Bt cepa 4Q-82 e o processamento *in vitro* da toxina Bin para a forma ativa e a marcação com I¹²⁵ foi feita segundo Nielsen-LeRoux e Charles (1992). Após a iodinação foram determinadas a concentração de proteínas e a sua atividade específica (cpm/pmol de proteína). Nos ensaios a toxina Bin-I¹²⁵ (10 nM) foi incubada com 25 μ g de proteínas da BBMF de *C. quinquefasciatus* das colônias S, REC e REC-2 na ausência ou na presença de competidor (toxina Bin não marcada) em concentrações crescentes (0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 e 3000 nM). As incubações de cada ponto experimental foram feitas em um volume final de 100 μ l de tampão PBS/Az 0.02%/BSA 0.01% pH 7.4, durante 16 h à TA. Após a incubação as amostras foram centrifugadas (8.700 g, 15 minutos, 4 °C) e lavadas três vezes em tampão PBS/Az pH 7.4. O sedimento, contendo a toxina Bin-I¹²⁵ ligada à BBMF,

foi homogeneizado em líquido de cintilação (ScintiSafe Plus®) e analisado em um contador de emissão de partículas beta (Wallac-Pharmacia®). Os dados obtidos foram analisados no programa GraphPad Prism V.3.03.

7.6 Estabilidade do alelo *cqm1_{REC-2}*

A partir da caracterização da mutação que causa resistência associada ao alelo *cqm1_{REC-2}* foram realizadas diferentes análises relativas à estabilidade desde alelo, frente ao alelo *cqm1_{REC}*, em colônias de laboratório.

7.6.1 Avaliação da frequência do alelo *cqm1_{REC-2}* na colônia R2362

A presença e frequência do alelo *cqm1_{REC-2}* foram investigadas na colônia R2362 cujo genótipo caracterizado em alguns indivíduos após o processo de seleção era homozigoto para o alelo *cqm1_{REC}* (ROMÃO et al., 2006). Foi realizada uma análise das frequências dos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* através de PCR alelo-específica, descrito no item 7.3.2, em larvas de diferentes gerações ao longo do desenvolvimento da colônia R2362. Amostras de 110 a 115 larvas de 4º estágio congeladas a -70 °C das gerações F₃₅, F₃₇, F₇₄, F₇₅, F₉₈, F₁₀₇, F₁₆₃, F₁₈₂ e F₁₉₁ foram analisadas através de PCR alelo-específica para a identificação de seus genótipos.

Em relação ao histórico desta colônia, todas as gerações foram submetidas à exposição com Bsp até a geração F₄₆ quando foi registrado um alto de nível de resistência (PEI et al., 2002). Em seguida, a colônia foi exposta a Bsp de forma descontínua e sem registros precisos até a geração F₁₃₈. Entre as gerações F₁₃₈ e F₁₅₀, a pressão de seleção foi imposta a cada duas gerações e da F₁₅₀ a F₁₈₆, foram usados esquemas rotativos de exposição a cada 3 ou 5 gerações. A partir da F₁₈₇ até a geração F₁₉₄ a pressão de seleção ocorreu em todas as gerações.

7.6.2 Análise da competição entre os alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*

Para avaliar a capacidade de competição entre os alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*

foram analisadas colônias formadas por indivíduos com diferentes composições genotípicas para estes alelos que foram mantidas em laboratório sob duas condições: expostas ou não a tratamento com Bsp. No primeiro caso, as larvas foram mantidas ao longo das gerações analisadas sem nenhum tratamento com Bsp. No segundo caso, a cada geração, todas as larvas foram expostas por 48 horas a Bsp cepa 2362 (VectoLex®, formulação granular a 0,2 g/L). Esta dose é letal para 100% dos indivíduos da colônia susceptível em apenas 24 horas, segundo avaliado em ensaios prévios. Após o período de 48 horas, as larvas sobreviventes (>80%) foram transferidas para recipientes contendo apenas água e alimento.

Ensaio 1. Uma subcolônia, aqui denominada R2362/RECREC-2, foi fundada a partir do cruzamento de 400 machos da subcolônia R2362/REC com 400 fêmeas da subcolônia R2362/REC-2 e vice-versa, totalizando 1600 adultos. Após a obtenção da progênie de ambos os cruzamentos, os indivíduos foram agrupados e a colônia foi mantida sem exposição a Bsp sob as condições de laboratório descritas anteriormente. As frequências dos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* foram avaliadas por PCR a partir da análise de 60 larvas de cada geração, por 12 gerações (F₁-F₁₂).

Ensaio 2. Para avaliar o efeito da pressão de seleção na evolução da frequência dos alelos, a colônia R2362 passou a ser submetida à pressão de seleção a cada geração a partir da F₁₈₆. As frequências dos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* foram avaliadas a partir de 60 larvas a cada geração por oito gerações (F₁₈₇ a F₁₉₄) por PCR alelo-específica.

Ensaio 3. Outra forma de avaliar o efeito da pressão de seleção foi subdividindo a colônia R2362/RECREC-2, obtida no ensaio 1, e impondo a pressão de seleção com Bsp a partir da geração F₁₀. Foram analisadas 60 larvas de quatro gerações (F₁₁ a F₁₄) por PCR.

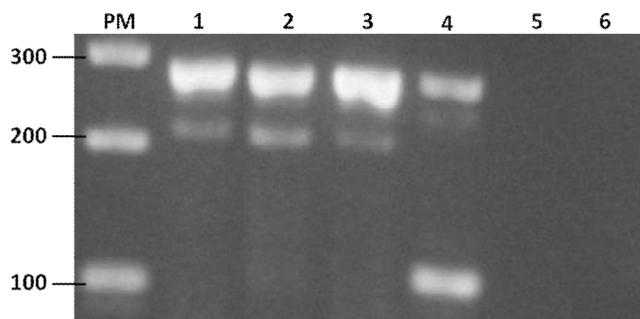
8 RESULTADOS

Os resultados foram agrupados em três blocos. O primeiro consiste na detecção de alelos de resistência já caracterizados, *cqm1_{REC}* e *cpm1_{GEO}*, em populações naturais de *Culex quinquefasciatus* tratadas e não tratadas com o *Bacillus sphaericus*. No segundo bloco, estão reunidos os dados em relação à identificação de dois novos alelos de resistência a Bsp detectados em populações naturais de *C. quinquefasciatus*. O terceiro e último bloco, apresenta os dados referentes à caracterização do alelo *cqm1_{REC-2}* identificado na colônia resistente R2362 mantida em laboratório.

8.1 *Screening* do alelo *cpm1_{GEO}* na população tratada de Água Fria

A partir das amostras de larvas de *C. pipiens* da colônia GEO armazenadas a -70 °C, foi possível desenvolver um método de PCR-multiplex para a detecção do alelo *cpm1_{GEO}*, caracterizado nesta colônia resistente oriunda da Califórnia, EUA. Foram empregados 4 *primers* na reação de PCR que permitiram a amplificação de um fragmento controle de 281 pb, a partir de todos os indivíduos avaliados, e dois fragmentos diagnósticos de 227 e 113 pb correspondentes aos alelos *cpm1* e *cpm1_{GEO}*, respectivamente (Figura 6). Após a padronização da PCR-multiplex, foram avaliados 290 indivíduos da população tratada de Água Fria e o alelo *cpm1_{GEO}* não foi identificado.

Figura 6 – Separação eletroforética de fragmentos amplificados por PCR a partir do gene *cqm1* ou *cpm1* de larvas de *Culex quinquefasciatus* ou *Culex pipens*, respectivamente, de uma colônia susceptível (1-3) e da colônia resistente GEO (4).



Fonte: Dados do autor.

Nota: Fragmento controle de 281 pb e diagnóstico de 227 pb para os indivíduos susceptíveis (1, 2 e 3); Fragmentos controle de 281 pb e diagnóstico de 113 pb para o alelo *cpm1*_{GEO} (4). Amostra controle negativo com DNA molde de *Aedes aegypti* (5); amostra controle negativo sem o DNA molde (6). PM: peso molecular em pares de bases (1 kb plus DNA Ladder/Invitrogen™).

8.2 Detecção do alelo *cqm1*_{REC} em populações naturais de *C. quinquefasciatus*

Foram analisadas amostras de quatro populações, localizadas na Região Metropolitana do Recife, coletadas em períodos que não tinham sido expostas ao biolarvicida (Bsp): Ipojuca, Jaboatão dos Guararapes, Roda de Fogo e Azeitona. Inicialmente foi realizada a análise da susceptibilidade das populações de Ipojuca e Jaboatão, enquanto que a avaliação das populações de Roda de Fogo e Azeitona não foram realizadas visto que as amostras foram armazenadas a -70°C após a sua coleta. Os bioensaios de dose-resposta mostraram que as populações de Ipojuca e Jaboatão foram susceptíveis a Bsp, e foi observada uma pequena alteração da CL₅₀, com uma razão de resistência (RR) de 3,3 e 4,3, respectivamente, e a CL₉₀ apresentou valores próximos ao da colônia de referência, S (Tabela 6). Bioensaios de dose-diagnóstica também foram realizados para avaliar se haveria larvas sobreviventes a uma alta concentração de Bsp e que poderiam, potencialmente, ser indivíduos homocigotos resistentes. Amostras de 1.680 e 720 larvas de Ipojuca e Jaboatão, respectivamente, foram expostas individualmente a Bsp e nenhum sobrevivente foi detectado após 48 horas. Larvas não tratadas dos grupos controle mostraram mortalidade de 2,9 e 1,7% para Ipojuca e Jaboatão, respectivamente, após o período de 48 horas.

Tabela 6 – Toxicidade do *Bacillus sphaericus* cepa 2362 (SPH88) para larvas de 4º estágio de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia de laboratório susceptível (S) e duas populações não tratadas (Ipojuca-IPO, Jaboatão dos Guararapes-JAB) e uma tratada (Água Fria-AF).

Amostras	No. larvas	CL ₅₀ ^a		CL ₉₀ ^a	
		Média (IC 95%) ^b	RR ^b	Média (IC 95%)	RR ^b
S	360	0,004 (0,003-0,005)	1,0	0,029 (0,019-0,049)	1,0
IPO	1480	0,013 (0,010-0,017)	3,3	0,029 (0,022-0,044)	1,0
JAB	1480	0,017 (0,013-0,020)	4,3	0,026 (0,023-0,049)	0,9
AF	1140	0,024 (0,021-0,028)	6,0	0,050 (0,042-0,059)	1,7

Fonte: Chalegre et al. (2012).

^a Concentrações Letais (mg/L) para 50% (CL₅₀) ou 90% (CL₉₀) das larvas após 48 h.

^b Intervalo de confiança ao nível de 95%.

^c Razão de Resistência: CL da população avaliada/CL da colônia de referência S.

Fonte: Chalegre et al. (2012).

A detecção do alelo *cqm1*_{REC} nestas amostras de larvas foi realizada através de PCR específica usando *primers* que anelam nas regiões que flanqueiam a deleção de 19 nucleotídeos. Após a reação, são amplificados fragmentos de tamanhos distintos de 208 pb correspondente ao alelo *cqm1*, sem deleção, e de 189 pb correspondente ao *cqm1*_{REC} devido à deleção de 19 nt (Figura 7, poços 1-3). A frequência dos alelos *cqm1* e *cqm1*_{REC}, bem como os genótipos encontrados em cada amostra, estão apresentados na Tabela 7. O alelo *cqm1*_{REC} foi detectado em todas as populações analisadas e as frequências em Ipojuca, Jaboatão e Azeitona foram de 0,003, 0,001 e 0,002, respectivamente, todas da ordem de 10⁻³ (Tabela 7). A população de Roda de Fogo apresentou perfil diferente, pois a frequência foi mais elevada, 0,017, na ordem de 10⁻² (Tabela 7). Deve ser observado que nestas quatro populações sem histórico de tratamento com Bsp, o alelo foi detectado em indivíduos heterozigotos, não sendo detectados indivíduos homozigotos para o alelo *cqm1*_{REC}.

Tabela 7 – Frequência dos alelos *cqm1*, *cqm1_{REC}*, *cqm1_{REC-D16}* e *cqm1_{REC-D25}* em larvas de *Culex quinquefasciatus* de populações da Região Metropolitana do Recife sem histórico de tratamento com o *Bacillus sphaericus* (Ipojuca, Jaboatão, Roda de Fogo e Azeitona) e de uma população tratada (Água Fria).

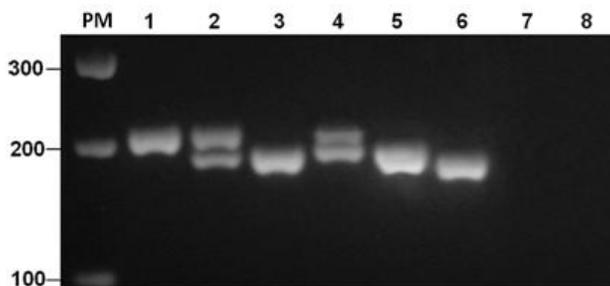
População	Ano	No. de larvas	Alelos e genótipos ^a									
			<i>cqm1</i>	<i>cqm1_{REC}</i>			<i>cqm1_{REC-D16}</i>			<i>cqm1_{REC-D25}</i>		
			SS	SR	RR	F ^b	SR	RR	F	SR	RR	F
Ipojuca	2010	501	498	3	0	0,003	0	0	0	0	0	0
Jaboatão	2010	510	507	1	0	0,001	1	1	0,003	0	0	0
R. de Fogo	1999	230	222	8	0	0,017	0	0	0	0	0	0
Azeitona	1999	240	236	1	0	0,002	3	0	0,006	0	0	0
Água Fria	2010	269	252	14	2	0,033	0	0	0	1	0	0,002

Fonte: Chalegre et al. (2012).

^aSS: Genótipo homozigoto para o alelo *cqm1*; SR genótipo heterozigoto; RR homozigotos para os alelos *cqm1_{REC}*, *cqm1_{REC-D16}* e *cqm1_{REC-D25}*.

^bFrequência dos alelos *cqm1_{REC}*, *cqm1_{REC-D16}* e *cqm1_{REC-D25}*.

Figura 7 – Separação eletroforética de fragmentos amplificados por PCR a partir de diferentes alelos do gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Chalegre et al. (2012).

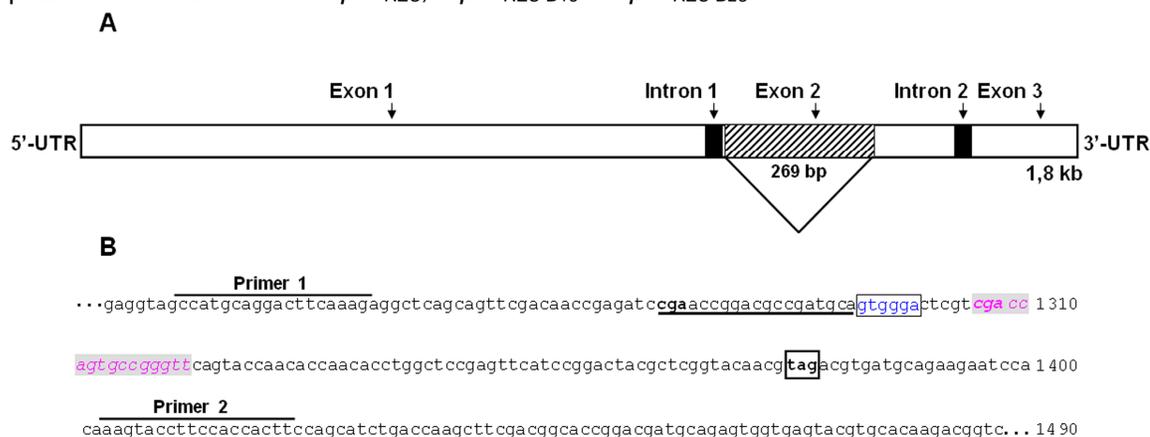
Nota: Fragmentos correspondentes a indivíduos homocigoto para *cqm1* (1), heterocigoto para *cqm1* e *cqm1_{REC}* (2), homocigoto para *cqm1_{REC}* (3), heterocigoto para *cqm1_{REC-D16}* (4), homocigoto para *cqm1_{REC-D16}* (5) e homocigoto para o *cqm1_{REC-D25}* (6). Amostra controle negativo com o DNA molde de *Aedes aegypti* (7), amostra controle negativo sem o DNA molde (8). PM: peso molecular em pares de bases (1 kb plus DNA Ladder/Invitrogen™).

8.3 Identificação de novos alelos de resistência em populações de *Culex quinquefasciatus*

Durante o *screening* para a detecção do alelo *cqm1_{REC}* foi feita a purificação e análise de sequências de todos os fragmentos menores que 208 pb, potencialmente amplificados a partir deste alelo. A maioria das sequências confirmaram a identidade do *cqm1_{REC}* e, além dele, foram detectados dois novos polimorfismos do gene *cqm1* em larvas das populações analisadas. O primeiro novo polimorfismo foi encontrado nas populações não tratadas (Jaboatão e Azeitona) e consiste de uma deleção de 16 nt (1306-1321), localizada 12 nucleotídeos após a deleção de 19 pb correspondente ao *cqm1_{REC}* (1276-1294), e este alelo foi denominado *cqm1_{REC-D16}* (Figura 8). A visualização dos fragmentos diagnósticos amplificados pela PCR alelo-específica a partir dos alelos *cqm1_{REC}* ou *cqm1_{REC-D16}* não permite uma clara distinção entre eles (Figura 7). Em Jaboatão sua frequência de 0,003, foi baseada na detecção de uma larva heterocigota e outra homocigota para este alelo dentre 510 indivíduos analisados, enquanto que a sua frequência no bairro de Azeitona foi de 0,006, definida pela detecção de apenas uma larva heterocigota dentre as 240 analisadas (Tabela 7). Em um total de 1481 larvas de todas as populações não tratadas, a frequência de cada alelo, *cqm1_{REC}* ou *cqm1_{REC-D16}*, foi de 0,004 e 0,002, respectivamente, ao passo que a frequência de ambos foi de 0,006.

As amostras de DNA extraído a partir de larvas portando o alelo *cqm1*_{REC-D16} foram utilizados para clonagem e sequenciamento, a fim de confirmar a sua identidade e avaliar outros polimorfismos, além da deleção de 16 nucleotídeos. Para este fim, 45 clones provenientes de cinco larvas foram analisados e 21 deles corresponderam ao alelo *cqm1*_{REC-D16}. A sequência final, obtida após a análise destes clones, continha os dois íntrons conhecidos de 50 e 55 pares de bases, com uma matriz aberta de leitura (ORF/Open Reading Frame) de 1727 pb. Um total de 43 polimorfismos de base única (SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms*) foi encontrado em toda a sequência, dos quais sete dão origem a substituições de aminoácidos na proteína deduzida, no entanto, os efeitos destas alterações na capacidade de ligação da toxina Bin ao receptor Cqm1 não são conhecidos (Tabela 8).

Figura 8 – Representação do gene que codifica o receptor Cqm1 em *Culex quinquefasciatus* (número de acesso no GenBank DQ333335) e localização dos polimorfismos dos alelos *cqm1*_{REC}, *cqm1*_{REC-D16} e *cqm1*_{REC-D25}.



Fonte: Chalegre et al (2012).

Nota: **A.** sequência de 1848 nucleotídeos (nt) contendo dois íntrons de 50- (1169-1218) e 55-nt (1655-1709). **B.** Região de 269 nt (1221-1490) que engloba os polimorfismos dos alelos encontrados nas populações de Recife, os quais são: deleção de 19 nt correspondendo ao alelo *cqm1*_{REC} (sublinhada); as seis bases adicionais correspondentes ao *cqm1*_{REC-D25} (azul e enquadradas); a deleção de 16 nt do alelo *cqm1*_{REC-D16}, localizada 11 bases além da deleção de 19 nt, (itálico, rosa e sombreado). As deleções iniciam com um motivo de três nucleotídeos "CGA", (negrito). O códon de terminação prematuro da tradução originado pelas deleções está enquadrado e em negrito. Para a PCR alelo-específica, os primers 1 e 2 foram utilizados para as regiões 5' e 3', respectivamente. Essas deleções foram identificadas com base no sequenciamento de um grupo de clones de DNA.

Tabela 8 – Polimorfismos encontrados na sequência nucleotídica do alelo *cqm1*_{REC-D16} em relação ao gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus* (número de acesso no GenBank DQ333335).

Posição do			Posição do		
Nucleotídeo	<i>cqm1</i>	<i>cqm1</i> _{REC-D16}	Nucleotídeo	<i>cqm1</i>	<i>cqm1</i> _{REC-D16}
7	C	A*	736	T	C*
15	A	T	1084	G	A
22	A	G*	1140	C	T
25	C	T	1262	C	T
44	T	C*	1271	A	G
120	T	C	1325	T	C
123	G	A	1328	C	A
156	T	A	1340	C	A
249	G	C	1349	A	C
252	A	G	1367	T	C
264	T	C	1391	G	A
284	C	A*	1439	T	G
288	C	T	1505	A	T
321	C	T	1506	T	C
337	T	G*	1559	C	T
357	G	A	1577	G	A
369	T	C	1619	C	T
393	C	T	1749	C	T
422	C	T	1772	C	T
438	C	T	1776	T	A
462	C	T	1839	T	C
611	C	T*	-	-	-

Fonte: Chalegre et al. (2012).

Nota: Os polimorfismos que causam alterações de aminoácidos na sequência deduzida do *cqm1* (ROMÃO et al., 2006) estão marcados (*).

O segmento de DNA em que as duas deleções de 19 e 16-nt foram encontradas pode ser um *hotspot* para este tipo de mutações já que uma terceira deleção foi detectada em um indivíduo proveniente de Água Fria, uma área tratada desde 2003. A partir da PCR alelo-específica em uma amostra de 269 larvas, o *cqm1*_{REC} apresentou uma frequência de 0,033, superior a todas aquelas detectadas nas populações não tratadas. Além disso, o alelo foi encontrado tanto em

heterozigose como em homozigose (Tabela 7). O sequenciamento dos fragmentos diagnósticos menores que 208 pb amplificados da amostra de Água Fria, demonstrou que, além dos fragmentos correspondentes ao *cqm1_{REC}*, havia um indivíduo heterozigoto para um alelo contendo uma nova deleção, de 25 nt, a qual abrange a deleção de 19 nt para o alelo *cqm1_{REC}*, além das seis bases posteriores (Figura 8). O alelo apresentando essa nova deleção, que engloba os nucleotídeos 1276-1300, denominado *cqm1_{REC-D25}*, também não permite uma distinção confiável a partir da comparação visual de seu fragmento amplificado em relação aos fragmentos gerados a partir dos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-D16}* (Figura 7).

Em relação à sequência do *cqm1_{REC-D25}*, não foi possível a amplificação total da sequência do alelo a partir do DNA genômico da larva. Várias tentativas, utilizando o par de *primers* padrão para amplificar a sequência total do gene *cqm1* e seus alelos, além de combinações de *primers* adicionais, resultaram unicamente em sequências correspondentes ao *cqm1* após a análise de mais de 100 clones. No entanto, os ensaios de PCR utilizando outro conjunto de *primers* resultou na amplificação de um fragmento de 889 nt, cuja sequência contém a deleção de 25 nt. Esta sequência corresponde a cerca de 50% do total do gene (posição 506-1419) e inclui o primeiro íntron. Ao contrário da sequência encontrada para o alelo *cqm1_{REC-D16}*, não foram identificados SNPs em comparação com a sequência descrita anteriormente do gene *cqm1* (GenBank, número de acesso DQ333335). Apesar da elevada conservação deste fragmento de 889 nt, a falha na amplificação da cópia correspondente ao tamanho total do alelo *cqm1_{REC-D25}* sugere que polimorfismos localizados em outras regiões da sua sequência podem ter impedido o anelamento dos *primers* utilizados.

Os dois eventos de deleção encontrados nos alelos *cqm1_{REC-D16}* e *cqm1_{REC-D25}* alteram quadro de leitura dos aminoácidos subsequentes e ambos originam um códon de terminação da tradução prematuro na posição 1362, que é também o mesmo códon gerado pela deleção de 19 nucleotídeos do alelo *cqm1_{REC}* (Figura 8). As sequências resultantes destes dois novos alelos caracterizados, caso traduzidas, codificariam potencialmente proteínas truncadas de 437 aminoácidos. Desta forma, as deleções de 16 e 25 nucleotídeos podem conferir resistência, em indivíduos homozigotos para qualquer um desses alelos, uma vez que não serão codificadas proteínas Cqm1 dotadas da âncora GPI, necessária para localização das proteínas

no epitélio do intestino médio. A análise comparativa dos três eventos de deleção que afetam o gene *cqm1* revelam que as deleções de 19 e 25 nucleotídeos compartilham o mesmo ponto de inserção inicial na sequência (nucleotídeo 1276) e as três deleções começam por um motivo (cga) trinucleotídico comum, (Figura 8).

8.4 Caracterização do alelo *cqm1*_{REC-2} na colônia R2362

Como descrito anteriormente, foi observado que na colônia R2362, apesar da manutenção do fenótipo de resistência, havia larvas que não apresentavam o genótipo homocigoto para o alelo *cqm1*_{REC}, caracterizado inicialmente, indicando a existência de outros polimorfismos do gene *cqm1* que também levam à resistência em indivíduos desta colônia. Estas larvas foram utilizadas para a identificação de um polimorfismo do gene *cqm1* que levasse à resistência a Bsp, diferente daquele já caracterizado. Após esta etapa, foi desenvolvida uma PCR específica para a detecção do novo alelo que foi utilizada para comparar as frequências dos alelos *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2} em diferentes colônias analisadas neste estudo.

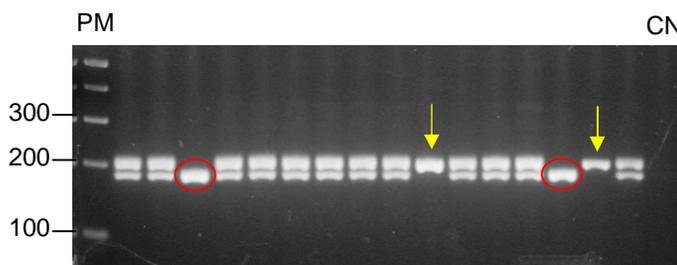
8.4.1 Identificação do polimorfismo associado à resistência do alelo *cqm1*_{REC-2}

Como descrito, análises de PCR para o alelo *cqm1*_{REC} em larvas da colônia R2362 altamente resistentes a *Bacillus sphaericus* mostraram a amplificação de diversos fragmentos de aproximadamente 208 pb, diferentemente do esperado que seriam fragmentos de 189 pb com a deleção de 19 nt correspondente ao alelo *cqm1*_{REC} em homocigose (Fig 9, setas amarelas). Foi realizada a clonagem do gene *cqm1* de três indivíduos e a análise de sequência de cinco clones de cada indivíduo da colônia R2362, que apresentavam um fragmento em homocigose que não correspondia ao alelo *cqm1*_{REC}. A partir da análise dessas sequências, foi identificada uma ORF de 1743 pb além dos dois íntrons preditos de 50 e 55 nucleotídeos, respectivamente, 40 SNPs ao longo de toda a sequência, dos quais 12 dão origem a mudanças de aminoácidos e, dentre os polimorfismos encontrados, ocorre uma mutação pontual na posição 1292 da ORF, a transição de uma guanina por uma adenina, que leva a um códon de parada prematuro (Trp431Stop) (Tabela

9; Figura 10). Desta maneira, assim como o alelo *cqm1_{REC}* e os outros dois caracterizados neste estudo em populações de campo (*cqm1_{REC-D16}* e *cqm1_{REC-D25}*), caso traduzido, o gene codificaria uma proteína truncada, sem a âncora GPI, que é essencial para a apresentação do receptor Cqm1 na superfície do epitélio intestinal das larvas e interação com a toxina Bin. A mutação que caracteriza o alelo *cqm1_{REC-2}* está localizada na mesma região de 269 nt onde foram encontrados os polimorfismos dos alelos *cqm1_{REC-D16}* e *cqm1_{REC-D25}* (Figura 10).

Este achado confirmou a existência de um segundo alelo de resistência na colônia com a capacidade de conferir um fenótipo similar aquele associado ao *cqm1_{REC}*. Após a identificação do alelo *cqm1_{REC-2}*, foi possível obter duas subcolônias a partir da parental R2362, homocigotas para cada um dos alelos responsáveis pela resistência, o *cqm1_{REC}* e o *cqm1_{REC-2}*, que foram denominadas R2362/REC e R2362/REC-2, respectivamente. Após as fundações das colônias, cerca de 90 indivíduos de cada uma foram avaliados por PCR alelo-específica e todos foram homocigotos para cada um dos alelos, o *cqm1_{REC}* ou *cqm1_{REC-2}*. Em relação ao fenótipo, foram realizados bioensaios de dose-diagnóstica com 300 larvas de cada colônia. A mortalidade após 48 horas em ambas subcolônias foi inferior a 8%, confirmando seu fenótipo altamente resistente, enquanto que na colônia susceptível, a mortalidade foi de 100% após 24 horas de exposição.

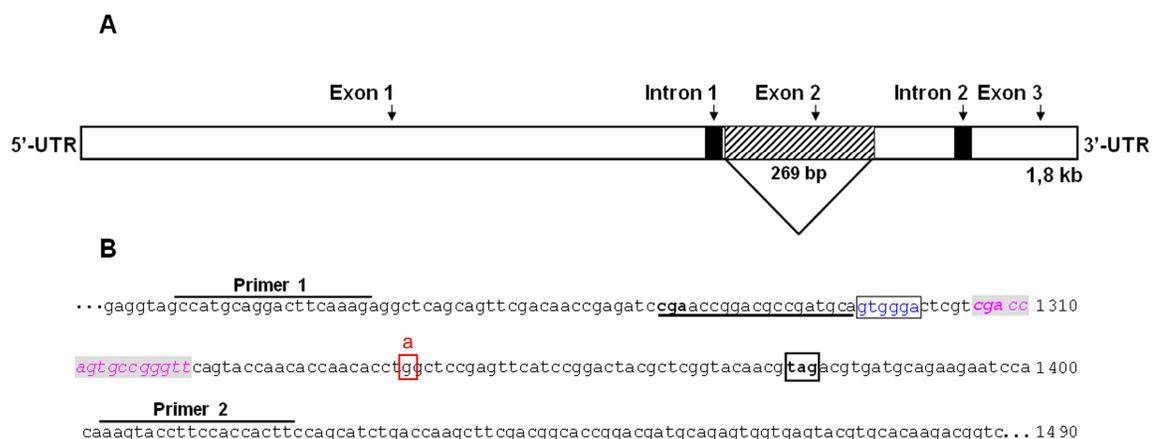
Figura 9 – Separação eletroforética de fragmentos amplificados por PCR a partir do gene *cqm1*, de larvas *Culex quinquefasciatus* da colônia R2362 resistente a *Bacillus sphaericus*.



Fonte: Dados do autor.

Nota. A primeira caracterização da base molecular da resistência da colônia R2362, descrita por Romão et al. (2006), apontou para a deleção de 19 nucleotídeos, correspondente ao alelo *cqm1*_{REC}, cujos fragmentos estão circulado em vermelho. As setas em amarelo indicam indivíduos cujo fragmento amplificado é diferente do esperado e indica que a resistência não é ligada ao alelo *cqm1*_{REC}. PM: peso molecular em pares de bases (1 kb plus DNA Ladder/Invitrogen™). CN: Controle negativo, sem DNA molde.

Figura 10 – Representação do gene que codifica o receptor Cqm1 em *Culex quinquefasciatus* (número de acesso no GenBank DQ333335) e localização dos polimorfismos dos alelos *cqm1*_{REC}, *cqm1*_{REC-D16}, *cqm1*_{REC-D25} e *cqm1*_{REC-2}.



Fonte: Chalegre et al (2012), modificado.

Nota: **A.** sequência de 1848 nucleotídeos (nt) contendo dois íntrons de 50- (1169-1218) e 55-nt (1655-1709). **B.** Região de 269 nt (1221-1490) que engloba os polimorfismos dos alelos encontrados nas populações de Recife, os quais são: deleção de 19 nt correspondendo ao alelo *cqm1*_{REC} (sublinhada); as seis bases adicionais correspondentes ao *cqm1*_{REC-D25} (azul e enquadradas); a deleção de 16 nt do alelo *cqm1*_{REC-D16} (itálico, rosa e sombreado); a mutação pontual na posição 1342 do alelo *cqm1*_{REC-2} (marcada em vermelho), identificada em larvas da colônia R2362, leva à formação de um códon de parada prematuro e portanto a proteína é secretada sem âncora GPI, no lúmen intestinal.

Tabela 9 - Polimorfismos encontrados na sequência completa de nucleotídeos do alelo *cqm1_{REC-2}* em relação ao gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus* (número de acesso no GenBank DQ333335).

Posição do Nucleotídeo	<i>cqm1</i>	<i>cqm1_{REC-2}</i>	Posição do Nucleotídeo	<i>cqm1</i>	<i>cqm1_{REC-D16}</i>
7	C	A*	736	T	C*
44	T	C*	1006	T	C*
80	C	T*	1140	T	C
120	T	C	1288	A	T*
156	T	A	1292	G	A**
192	C	T	1314	C	T
193	T	C	1341	G	A
246	G	T	1348	C	T*
252	A	G	1389	T	G
255	C	T	1396	C	T*
264	T	C	1455	A	T
351	G	C	1456	T	C
369	T	C	1536	A	T
393	C	T	1569	C	T
422	C	T*	1588	T	C*
438	C	T	1599	G	A
462	C	T	1602	G	T
532	A	C*	1605	C	A
533	C	A*	1621	G	A*
609	G	T	1734	T	C

Fonte: Dados do autor.

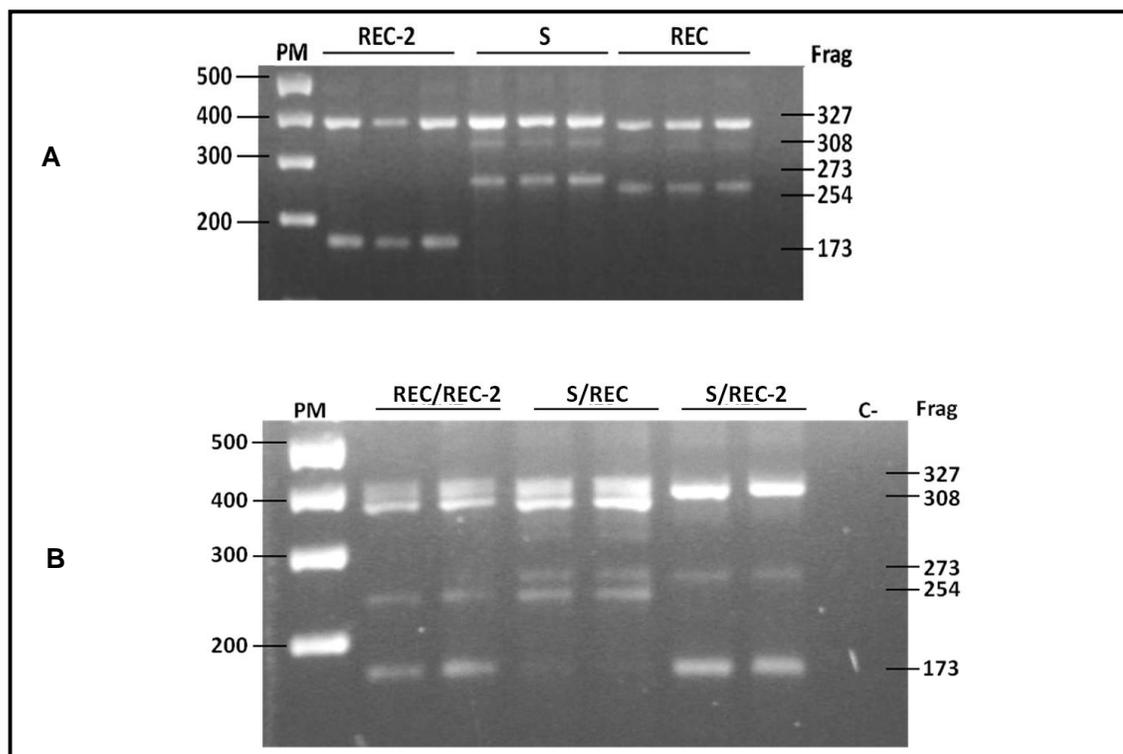
Nota: Os polimorfismos que causam alterações de aminoácidos na sequência deduzida do *cqm1* (ROMÃO et al., 2006) estão marcados (*) e o que gera o códon de parada prematuro (**).

8.4.2 Detecção dos alelos *cqm1*, *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* por PCR-multiplex

A partir da obtenção das subcolônias R2362/REC e R2362/REC-2, foi possível padronizar um método de PCR-multiplex específico capaz de detectar os alelos *cqm1*, *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*. Quatro *primers* específicos foram utilizados na reação e as associações entre eles dão origem a um fragmento controle de 327 pb amplificados a partir de todos indivíduos e fragmentos diagnósticos de 273 pb e 173

pb, para os alelos *cqm1* e *cqm1_{REC-2}*, respectivamente. Nas larvas portadoras do *cqm1_{REC}*, são amplificados fragmentos similares ao *cqm1*, fragmento controle de 308 pb e o diagnóstico de 254 pb, devido à deleção de 19 nt. A Figura 11 apresenta a visualização de indivíduos homocigotos (A) e heterocigotos (B) para os três alelos analisados. Pode-se observar um padrão bastante distinto dos indivíduos homocigotos para o alelo *cqm1_{REC-2}* quando comparado aos padrões de amplificação dos alelos *cqm1* e *cqm1_{REC}* (Figura 11A). Já a diferença entre os genótipos *cqm1cqm1* e *cqm1_{REC}cqm1_{REC}* é mais discreta, pois apenas 19 pb diferem ambos os fragmentos amplificados, controle e diagnóstico (Figura 11A). Para o padrão de indivíduos heterocigotos, as bandas diagnóstico de cerca de 273 e 254 correspondentes aos alelos *cqm1* e *cqm1_{REC}* devem ser analisadas com atenção, devido a uma intensidade mais discreta (Figura 11B).

Figura 11 – Separação eletroforética de fragmentos amplificados por PCR de alelos do gene *cqm1* de larvas de *Culex quinquefasciatus* das colônias Susceptível, R2362/REC e R2362/REC-2.



Fonte: Dados do autor em colaboração com Araújo (2012).

Nota: **A**: Indivíduos homocigotos para o alelo *cqm1*_{REC-2} (REC-2), homocigoto para o alelo *cqm1* (S) e homocigoto para o alelo *cqm1*_{REC} (REC), controle negativo sem DNA molde (C-). **B**: Indivíduos heterocigotos *cqm1*_{REC}/*cqm1*_{REC-2} (REC/REC-2), *cqm1*/*cqm1*_{REC-1} (S/REC) e *cqm1*/*cqm1*_{REC-2} (S/REC-2). PM: peso molecular em pares de bases (1 Kb Plus DNA Ladder/Invitrogen™) e Frag: tamanho dos fragmentos em pares de base.

8.5 Frequência dos alelos *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2} na colônia R2362

A partir da identificação do alelo *cqm1*_{REC-2} na colônia R2362, alguns questionamentos foram levantados em relação a sua origem, a partir de qual momento estaria presente na colônia e qual a frequência de cada alelo de resistência ao longo do desenvolvimento da colônia. Após a padronização da PCR-multiplex para detecção dos alelos *cqm1*, *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2}, a mesma foi aplicada para a análise de amostras entre 100 e 115 indivíduos provenientes de sete gerações da colônia R2362, a fim de avaliar a presença e frequência destes alelos em algumas gerações da colônia, graças à disponibilidade de amostras armazenadas a -70 °C. Nesta e na próxima seção foi convencionado usar a

nomenclatura S, REC e REC-2 para os alelos *cqm1*, *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*, respectivamente.

A tabela 10 reúne os dados de frequência e genótipos dos alelos REC, REC-2 e S encontrados ao longo das gerações analisadas da colônia R2362 realizada em colaboração com a bióloga Daniella Tavares (ARAÚJO, 2012). Ambos os alelos, REC e REC-2, co-existiam desde as primeiras gerações analisadas, F₃₄ e F₃₅, sendo REC o genótipo mais frequente, em cerca de 50% de larvas. A presença do REC-2 foi observada, sobretudo em indivíduos heterozigotos (27%) com uma frequência de homozigotos, variando de 3 a 5%. Também foi possível observar a presença de indivíduos portando o alelo S tanto em heterozigose, como em homozigose, embora a hipótese que estes fragmentos sejam correspondentes a outros alelos de resistência ainda não caracterizados não pode ser descartada. Na geração F₉₈ a predominância do genótipo RECREC é mantida, enquanto que nas gerações F₁₀₇ e F₁₆₃ o genótipo resistente heterozigoto RECREC-2 apresenta uma frequência elevada (F₁₀₇ com 72%, F₁₆₃ com 49%), embora ainda tenha sido encontrado um percentual elevado, 40%, do genótipo RECREC na geração F₁₆₃. Observa-se nas gerações 182 e 191 um claro decréscimo do genótipo inicialmente majoritário, RECREC, com um aumento do genótipo homozigoto resistente REC-2REC-2, além do heterozigoto resistente RECREC-2, resultando numa inversão da predominância dos alelos. Enquanto que na geração F₁₆₃, o alelo predominante (0,66) era o REC, nas gerações F₁₈₂ e F₁₉₁ o REC-2 predomina com 0,64 e 0,69, respectivamente (Tabela 10). Nas gerações F₁₈₂ e F₁₉₁ houve um grande aumento do genótipo REC-2REC-2 que coincide com o período em que a pressão de seleção foi estabelecida de forma regular na colônia a partir da geração F₁₃₈.

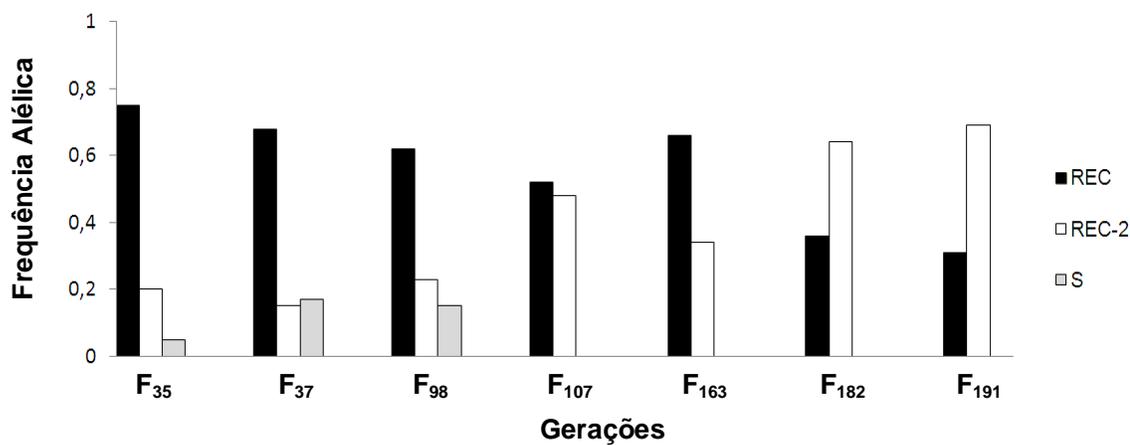
A análise da Figura 12 mostra a frequência dos alelos ao longo das gerações estudadas. O alelo REC foi claramente majoritário até a geração F₁₆₃ (66-75%), havendo um equilíbrio com o alelo REC-2 observado de forma inesperada na F₁₀₇. Nas gerações F₁₈₂ e F₁₉₁ o alelo REC-2 está presente na maioria dos genótipos analisados com frequência estimada de 64% a 69%, respectivamente.

Tabela 10 – Frequência dos genótipos a partir dos alelos *cqm1*(S), *cqm1_{REC}*(REC) e *cqm1_{REC-2}*(REC-2) em larvas de *Culex quinquefasciatus* em diferentes gerações da colônia resistente R2362, mantida em laboratório.

Geração	N	Genótipos (%)							Alelos (%)		
		RECREC	REC-2REC-2	RECREC-2	RECS	REC-2S	SS	ND	REC	REC-2	S
F ₃₅	115	56	5	27	7	3	0	2	75	20	5
F ₃₇	110	43	3	17	23	5	2	7	68	15	17
F ₉₈	110	39	7	23	22	7	0	2	62	23	15
F ₁₀₇	110	13	12	72	0	1	0	2	52	48	0
F ₁₆₃	110	40	8	49	0	0	0	3	66	34	0
F ₁₈₂	100	7	36	57	0	0	0	0	36	64	0
F ₁₉₁	110	11	52	44	0	0	0	3	31	69	0

Fonte: Dados do autor em colaboração com Araújo (2012).

Figura 12 – Frequência dos alelos *cqm1* (S), *cqm1*_{REC} (REC) e *cqm1*_{REC-2} (REC-2) em larvas de *Culex quinquefasciatus* da colônia resistente R2362 mantida em laboratório há mais de 190 gerações.



Fonte: Dados do autor em colaboração com Araújo (2012).

8.6 Competição dos alelos *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2} sob condições de laboratório

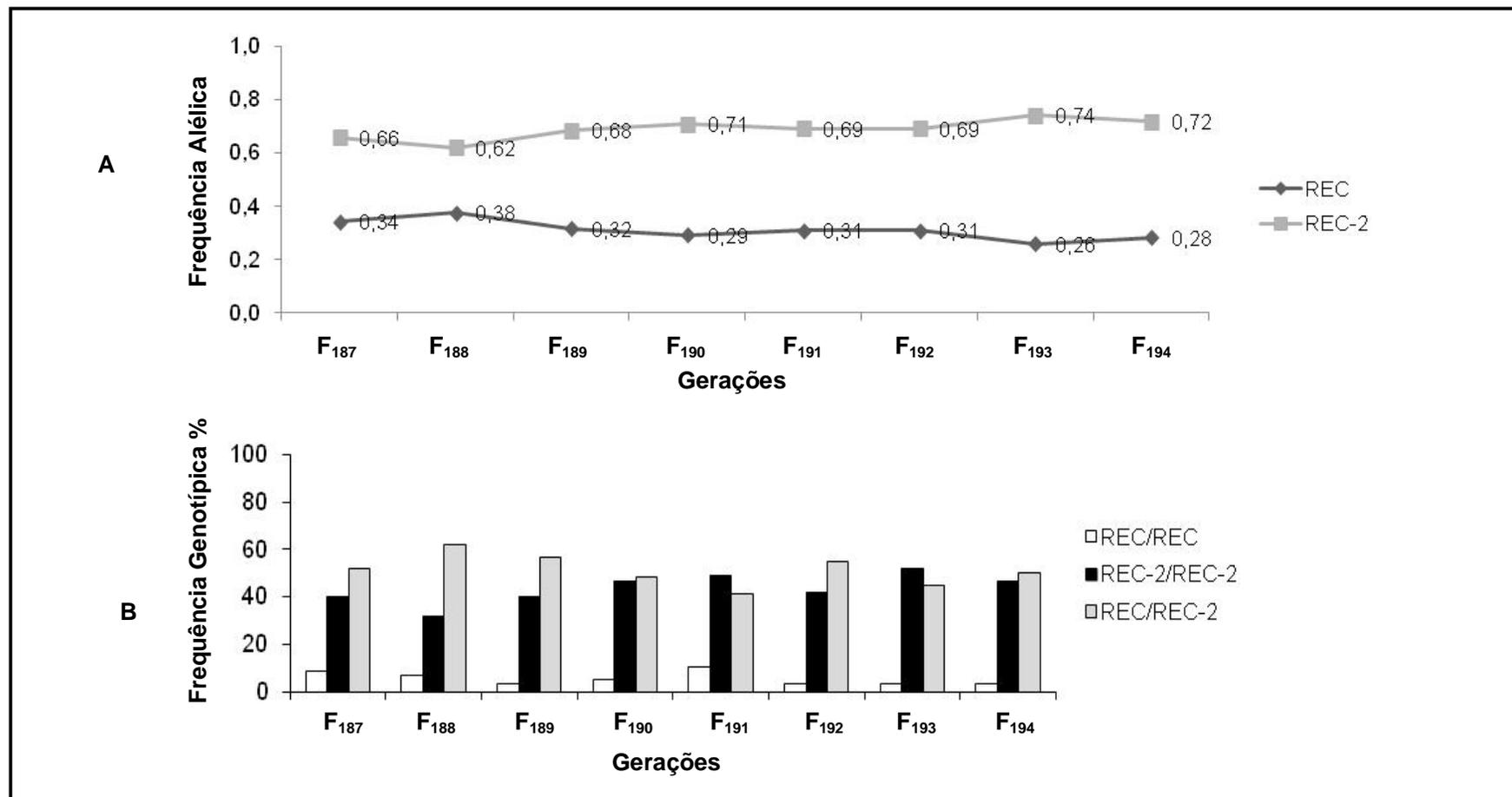
A partir dos dados das frequências dos alelos REC e REC-2 na colônia R2362 e a ausência de registros precisos em relação à pressão de seleção imposta durante a sua manutenção, o objetivo desta etapa foi avaliar a frequência destes alelos sob condições controladas em relação à pressão de seleção com Bsp. Um dos ensaios utilizados para avaliar tal parâmetro, foi manter a pressão de seleção com o biolarvicida Bsp na colônia R2362, a cada geração, a partir da F₁₈₆, e em paralelo fundar uma nova subcolônia a partir do cruzamento de indivíduos das subcolônias R2362/REC e R2362/REC-2 e mantê-la sob tratamento com Bsp. A cada geração, cerca de 60 indivíduos de cada colônia foram analisados por PCR alelo-específica para a determinação de seus respectivos genótipos para os alelos *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2}.

A análise da colônia R2362, tratada com Bsp a cada geração a partir da geração F₁₈₆, mostrou que o REC-2 manteve a predominância observada na geração F₁₈₂ (Tabela 10) com uma frequência estável entre 0,62 e 0,74, enquanto o alelo REC oscilou entre 0,26 e 0,38 ao longo das oito gerações analisadas (Figura 13A). Em relação aos genótipos, observa-se um número muito próximo e majoritário de indivíduos heterozigotos e homozigotos REC-2REC-2, enquanto o número de indivíduos homozigotos para o alelo REC é menor ou igual a 10% (Fig 13B).

A subcolônia R2362/RECREC-2 foi fundada visando iniciar os experimentos com uma frequência de 0,5 para cada um dos alelos e, diferentemente da colônia R2362, na ausência de pressão de seleção. A geração F_1 apresentou uma frequência de 0,52 para o alelo REC e 0,48 para o alelo REC-2, e até a geração F_3 , foram observadas oscilações entre as frequências. A partir da F_4 até a F_{12} o alelo REC teve a maior frequência em todas as gerações, oscilando entre 0,59 e 0,78, enquanto o alelo REC-2 oscilou entre 0,22 e 0,41 (Figura 14A). No que diz respeito aos genótipos, a partir da F_4 , predominaram os indivíduos heterozigotos e homozigotos RECREC, enquanto que se observou uma redução de larvas homozigotas REC-2REC-2, em oposição aos resultados da colônia sob pressão de seleção (Figura 14B).

Na décima geração, a subcolônia R2362/RECREC-2 foi subdividida em outra subcolônia (R2362/RECREC-2/EXP) que foi submetida a tratamento com Bsp a cada geração a fim de avaliar se haveria uma mudança nas frequências dos alelos REC e REC-2, observadas na R2362/RECREC-2. Nas quatro gerações avaliadas (F_{11} - F_{14}) desde o início da pressão de seleção, apesar de uma grande redução na frequência do REC entre as gerações F_{11} e F_{13} em relação à F_{10} , na geração F_{14} a frequência deste alelo aumentou e atingiu um valor semelhante à geração F_{10} (Figura 15A). Em relação aos genótipos, após a pressão de seleção o número de homozigotos REC-2REC-2 foi maior nas 3 gerações posteriores (F_{11} - F_{13}) em relação àquela anterior à pressão de seleção, voltando a cair na geração F_{14} , momento este em que a frequência do alelo REC atingiu seu máximo nesta geração (Figura 15A e B). Na subdivisão da subcolônia R2362/RECREC-2 na geração F_{10} , houve uma grande redução populacional e isto parece ter interferido nas frequências dos alelos dada a oscilação encontrada, devido à deriva gênica.

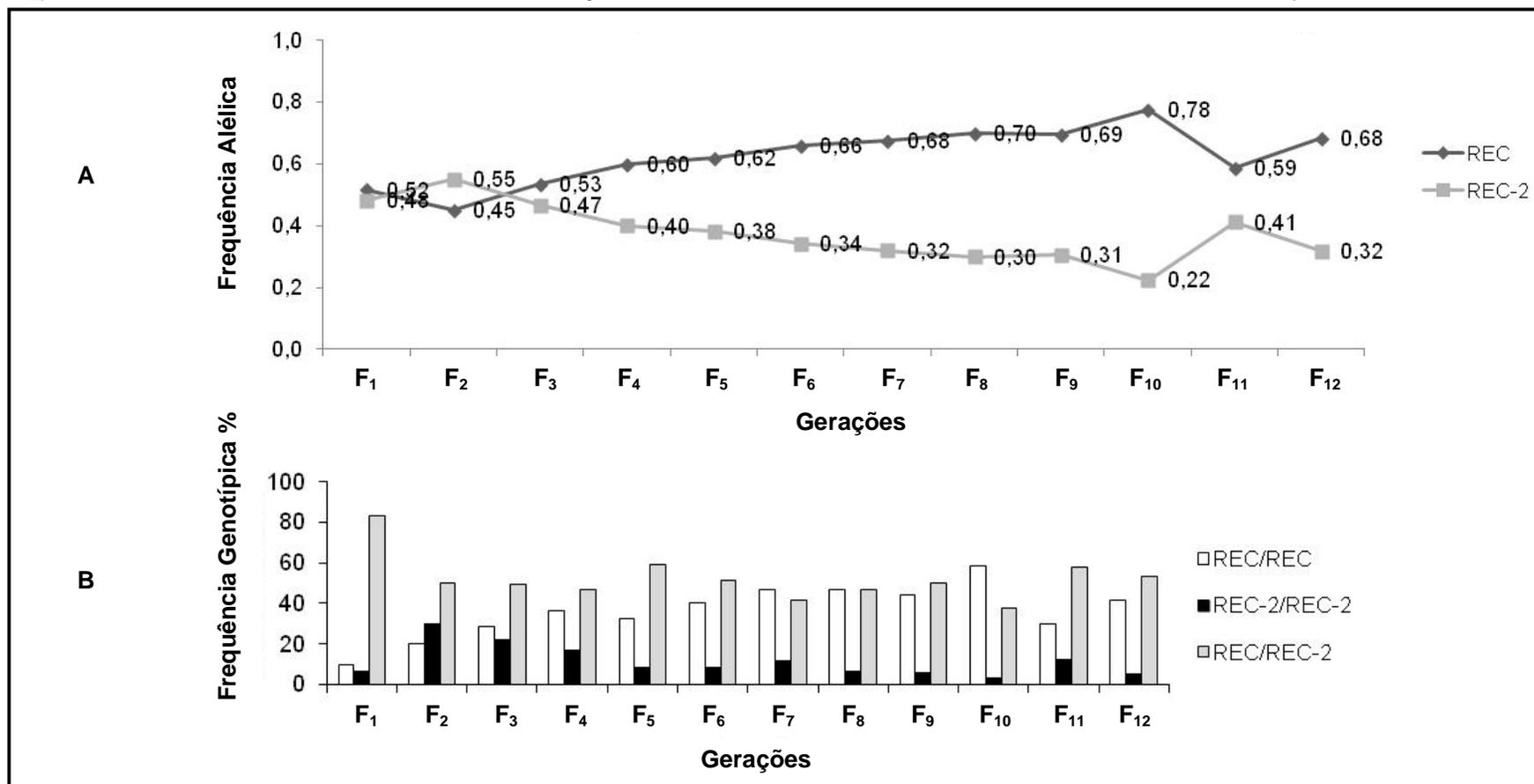
Figura 13 – Frequência alélica e genotípica do $cqm1_{REC}$ (REC) e $cqm1_{REC-2}$ (REC-2) em larvas de *Culex quinquefasciatus* de oito gerações (F₁₈₇ a F₁₉₄) da colônia R2362, mantida sob condições de laboratório e tratamento com o biolarvicida *Bacillus sphaericus* a cada geração.



Fonte: Dados do autor.

Nota: **A**: Frequência alélica. **B**: Frequência genotípica para os alelos $cqm1_{REC}$ e $cqm1_{REC-2}$.

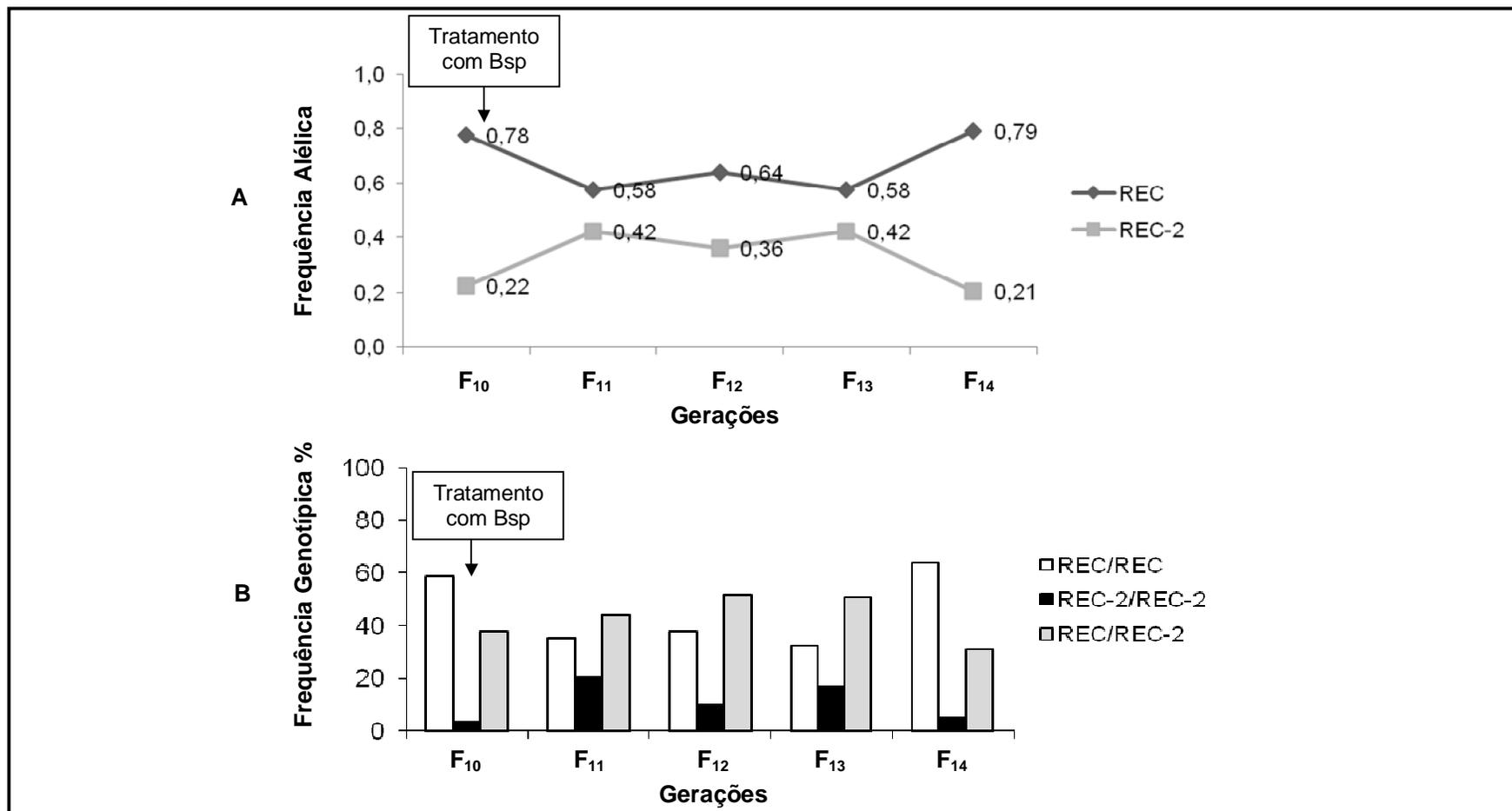
Figura 14 – Frequência alélica e genotípica do $cqm1_{REC}$ (REC) e $cqm1_{REC-2}$ (REC-2) em larvas de *Culex quinquefasciatus* de 12 gerações (F₁ a F₁₂) da colônia R2362/RECREC-2, mantida sob condições de laboratório e sem tratamento com o biolarvicida *Bacillus sphaericus*.



Fonte: Dados do autor.

Nota: **A**: Frequência alélica. **B**: Frequência genotípica para os alelos $cqm1_{REC}$ e $cqm1_{REC-2}$.

Figura 15 – Frequência alélica e genotípica do $cqm1_{REC}$ (REC) e $cqm1_{REC-2}$ (REC-2) em larvas de *Culex quinquefasciatus* de quatro gerações (F₁₁ a F₁₄) da colônia R2362/RECREC-2/EXP, mantida sob condições de laboratório e pressão de seleção com o biolarvicida *Bacillus sphaericus* (Bsp).



Fonte: Dados do autor.

Nota: **A:** Frequência alélica. **B:** Frequência genotípica para os alelos $cqm1_{REC}$ e $cqm1_{REC-2}$.

8.7 Expressão dos alelos *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2}

Um aspecto importante para a compreensão dos possíveis efeitos que podem estar associados aos alelos *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2} é avaliar se as respectivas proteínas Cqm1 truncadas seriam expressas em larvas homozigotas para estes alelos, visto que as α -glicosidases são proteínas necessárias para a digestão no inseto. A análise da expressão gênica foi realizada a partir de *primers* específicos para o gene alvo *cqm1*, e para um gene endógeno, *18S*, em triplicata, totalizando 15 indivíduos analisados por colônia. A análise das curvas-padrão mostrou que a eficiência de amplificação do gene de interesse em relação ao controle endógeno foram similares, e a curva de dissociação dos *primers* mostrou apenas um pico de *melting* para cada um dos genes, indicando um sinal específico para cada um dos alvos de amplificação (Fig 16).

Os ensaios de quantificação relativa mostraram que os CTs (*Cycle Threshold*) médios, ou seja, o número de ciclos requeridos para o sinal fluorescente ultrapassar o nível de ruído (*threshold*) para o controle endógeno foram similares (≈ 14), enquanto que para o gene alvo, *cqm1*, foram diferentes indicando padrões distintos de transcritos (21 a 28), de ordem decrescente para os alelos *cqm1*, *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2} (Tabela 11).

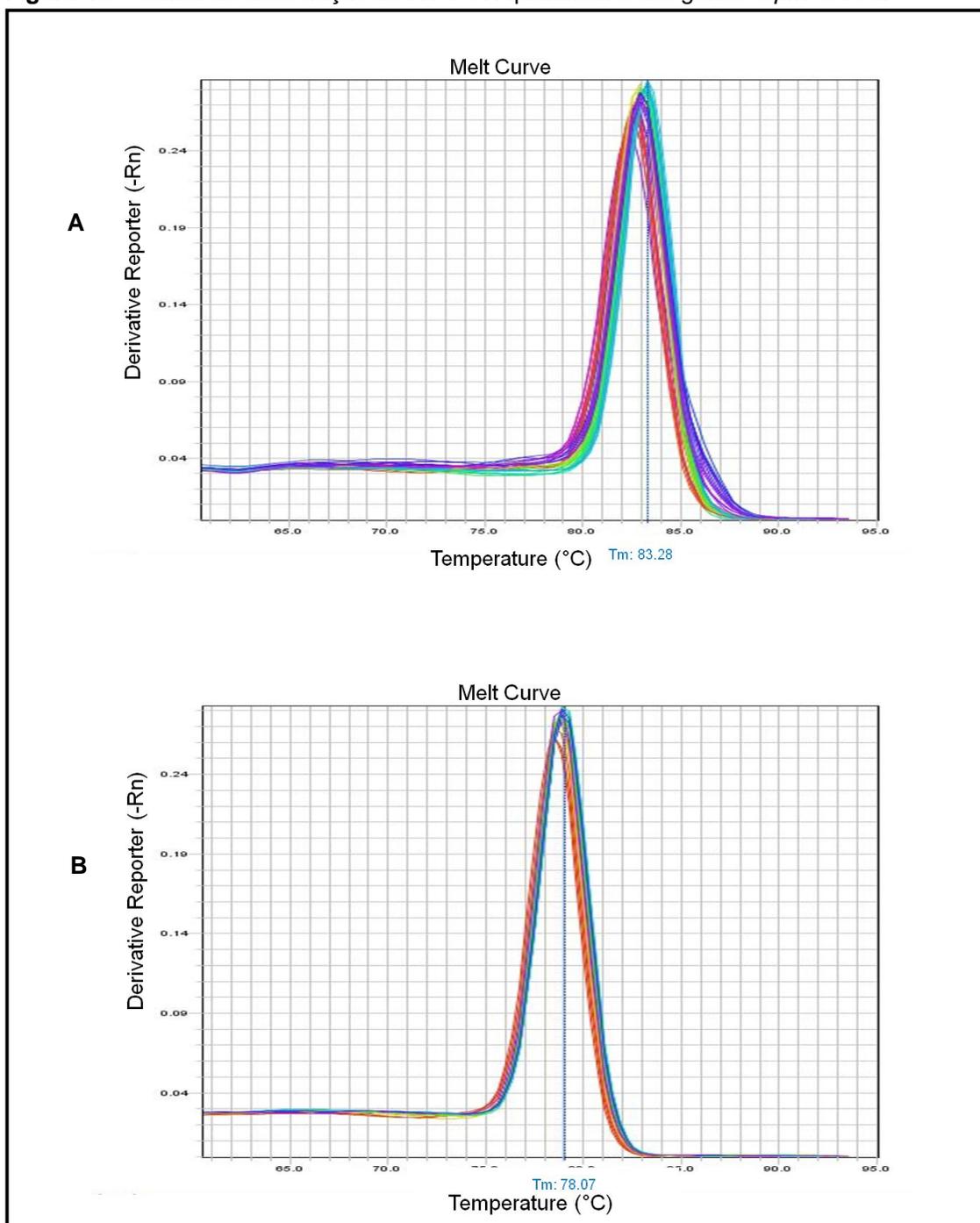
Tabela 11 – *Cycle Threshold* (CTs) médios dos genes alvo, *cqm1*, e controle endógeno, *18S*, obtidos através de PCR em tempo real de 15 larvas das colônias susceptível, e resistentes R2362/REC e R2361/REC-2.

Genes	CT médio (DV com 95% NC) ^a		
	Susceptível	R2362/REC	R2362/REC-2
<i>18S</i>	14,1566 (0,1280)	14,1816 (0,2197)	14,0279 (0,2336)
<i>cqm1</i>	21,1799 (0,9113)	25,5165 (0,4551)	28,3007 (0,2420)

Fonte: Dados do autor.

^aDesvio-padrão com 95% de nível de confiança.

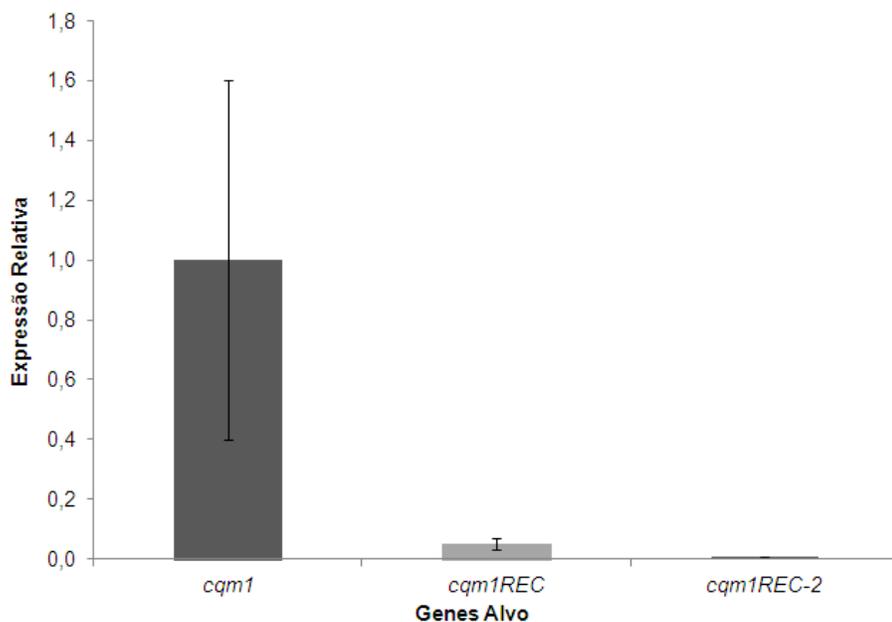
A quantificação relativa revelou níveis baixos de transcritos dos alelos de resistência *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2}, que foram em média 20 e 100 vezes menores, respectivamente, em relação ao gene susceptível *cqm1* (Figura 17). Em relação ao *cqm1*_{REC}, o alelo *cqm1*_{REC-2} é expresso cinco vezes menos (Figura 18).

Figura 16 – Curva de dissociação da RT-PCR quantitativa dos genes *cqm1* e 18S.

Fonte: Dados do autor.

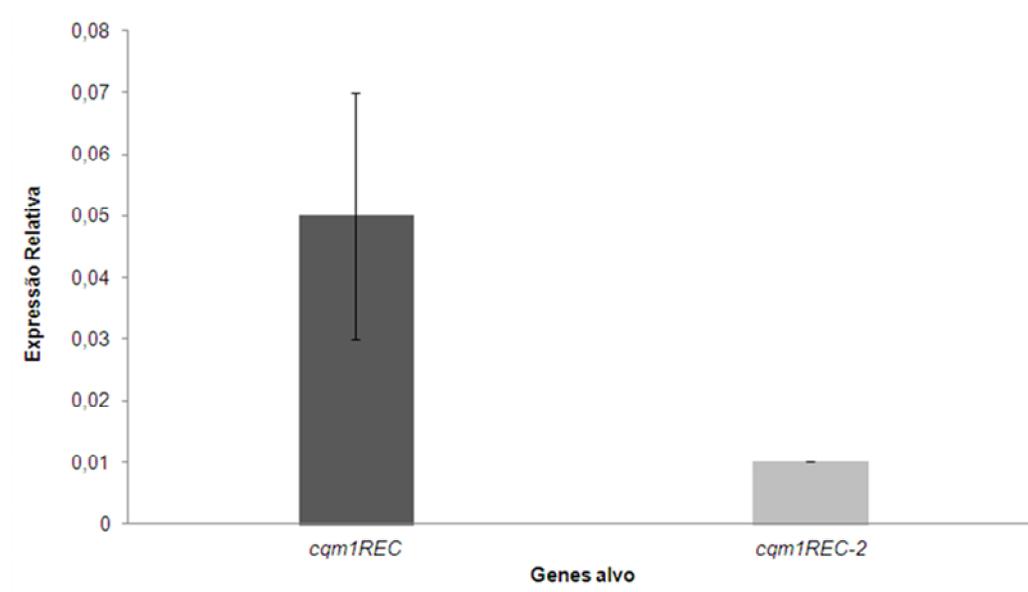
Nota: **A:** Gene *cqm1* e seus alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*. **B:** Gene 18S.

Figura 17 – Expressão relativa dos alelos de resistência $cqm1_{REC}$ e $cqm1_{REC-2}$ em relação ao gene de referência susceptível, $cqm1$.



Fonte : Dados do autor.

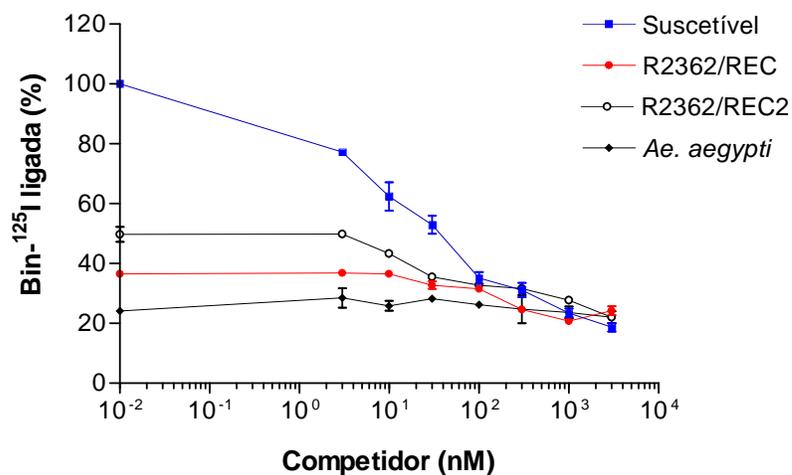
Figura 18 – Expressão relativa dos alelos de resistência $cqm1_{REC}$ e $cqm1_{REC-2}$.



Fonte : Dados do autor.

A expressão dos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* também foi avaliada através de ensaios de competição. A toxina Bin marcada (Bin-I¹²⁵) foi incubada com amostras de BBMF de larvas das colônias S, R2362/REC, R2362/REC-2 e de larvas de *Ae. aegypti*, na ausência de competidor para determinar a capacidade de ligação total e na presença de competidor (toxina Bin não marcada) em concentrações crescentes (0-3000 nM) (Figura 19). Na colônia S, a Bin-I¹²⁵ apresentou capacidade total de ligação à BBMF e foi gradualmente deslocada na presença de concentrações crescentes da toxina Bin livre (competidor), demonstrando a especificidade da ligação. A toxina Bin-I¹²⁵ apresentou uma fraca capacidade de ligação às BBMFs de larvas das colônias R2362/REC e R2362/REC-2, na ausência de competidor, denotado pelo baixo percentual de ligação observado. Além disso, a adição de concentrações crescentes da toxina Bin livre mostrou uma baixa capacidade de deslocamento da Bin-I¹²⁵ ligada, demonstrando a baixa especificidade dessas ligações, semelhante aos dados obtidos a partir de amostras de BBMF de larvas de *Ae. aegypti*, totalmente refratárias a Bsp e, portanto, sem interação específica com a toxina Bin (Figura 19).

Figura 19 – Curva de competição entre a toxina Bin de *Bacillus sphaericus* radiomarcada (Bin-I¹²⁵) e preparações de *microvilli* intestinal de larvas de *Culex quinquefasciatus* das colônias Suscetível, R2362/REC, R2363/REC2 e de larvas de *Aedes aegypti*.



Fonte: Dados do autor.

Nota : Foram incubados 25 µg de cada preparação de *microvilli* intestinal com 10 nM da Bin-I¹²⁵ na presença de concentrações crescentes (0-3.000 nM) do competidor (toxina Bin não marcada).

9 DISCUSSÃO

Bacillus sphaericus é considerado o biolarvicida que apresenta grande eficácia para o controle de espécies do complexo do mosquito *Culex pipiens* (LACEY, 2007). O alto potencial desse biolarvicida está relacionado ao seu espectro de ação seletivo e sua capacidade de se reciclar e persistir nos criadouros, que promove condições para que um nível de controle a longo prazo possa ser alcançado (LACEY, 2007; BERRY, 2012). A Região Metropolitana do Recife (RMR) ainda tem áreas endêmicas para a filariose e, dentro do programa de controle desta doença, biolarvicidas a base de Bsp tem sido utilizados para o controle do vetor *C. quinquefasciatus* (CHALEGRE et al., 2009; REGIS et al., 1995; 2000; SILVA-FILHA et al., 2001; 2008).

A detecção ou o registro de populações de *Culex* resistentes a Bsp, tanto em laboratório como em campo pode limitar o uso deste biolarvicida visto que o mesmo possui apenas um fator tóxico, a toxina Bin, que depende da interação específica com o receptor Cqm1 para levar as larvas à morte (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). Estratégias para o manejo da resistência são essenciais para o sucesso dos programas de controle de insetos e a maioria destas é baseada em modelos que assumem que a frequência inicial de alelos *r* em uma dada população é baixa (GOULD et al., 1997). Ferramentas moleculares para detecção de alelos *r* ainda são pouco utilizadas, visto que é necessária a caracterização molecular prévia destes alelos. Portanto, até o momento, a avaliação da susceptibilidade *in vivo* das populações de campo através de bioensaios é a ferramenta mais utilizada para avaliar o risco de seleção de resistência (GÉNISSEL et al., 2003; GOULD et al., 1997; SILVA-FILHA et al., 2008; TABASHNIK et al., 2000; WENES et al., 2006; ZHAO et al., 2010).

A primeira etapa deste trabalho foi avaliar a frequência do alelo *cqm1_{REC}*, previamente caracterizado na colônia R2362 sob condições de laboratório em populações não tratadas da RMR. As populações de campo de Ipojuca e Jaboatão foram avaliadas quanto à sua susceptibilidade a Bsp, e os valores de razão de resistência (RR) para as CL₉₀ foram similares à colônia de referência, susceptível, enquanto aqueles relacionados à CL₅₀ mostraram pequenas alterações. As variações encontradas foram semelhantes àquelas observadas em populações não tratadas descritas em outros estudos, indicando a ocorrência de variações naturais

na susceptibilidade a Bsp (CHALEGRE et al., 2009; 2012; WIRTH et al, 2001; WIRTH, 2010). As populações de Roda de Fogo e Azeitona não puderam ser avaliadas através de bioensaios, visto que suas amostras foram congeladas em 1999. É esperado que estas populações tenham susceptibilidades semelhantes, pois não há registro de uso de Bsp nestas áreas, bem como elas são isoladas geograficamente de apenas duas áreas expostas a Bsp naquela época (REGIS et al, 1995; SILVA-FILHA et al., 2001).

Sabe-se que um dos fatores determinantes no processo da seleção de resistência é a frequência inicial de alelos r , bem como seu modo de herança em populações naturais expostas ao tratamento com o biolarvicida. Um exemplo deste aspecto foi demonstrado no estudo realizado por MCGAUHEY e BEEMAN (1988), que mantiveram em laboratório cinco colônias do lepidóptero *Plodia interpunctella*, originadas de diferentes amostras de campo, sob forte pressão de seleção com o *Bacillus thuringiensis*. Após 40 gerações, a resistência em uma das colônias aumentou 250 vezes, enquanto este número foi de 15 vezes em outra linhagem, indicando que diferenças nas frequências iniciais de alelos r nestas populações seria a causa das variações de RR observadas. O diagnóstico da resistência por PCR alelo-específica tem sido considerado um método mais direto para detectar alelos r , principalmente a uma baixa frequência. Esta abordagem requer que os genes que conferem resistência sejam conhecidos e que alelos de indivíduos susceptíveis e resistentes possam ser distinguidos por variações na sequência de DNA (GAHAN et al., 2007). São várias as vantagens desta técnica em relação aos ensaios de susceptibilidade *in vivo* e a principal é a detecção de indivíduos heterozigotos em uma amostra, o que não pode ser obtido através de um bioensaio quando o modo de herança dos alelos r é recessiva ou dominante.

Em relação à detecção de alelos r selecionados em laboratório, como o *cqm1_{REC}*, sabe-se que nem sempre estes são detectados em populações de campo a exemplo dos alelos de caderinas associados à resistência à toxina Cry1Ac de Bt, cuja identificação em populações de lepidópteros não foi possível (TABASHNIK et al., 2006; GAHAN et al., 2007). No caso específico do alelo *cqm1_{REC}*, após sua identificação na colônia R2362 foi feito um *screening* em algumas populações do Estado de Pernambuco e o mesmo foi detectado (CHALEGRE et al., 2009). No presente estudo o objetivo foi ampliar a pesquisa deste alelo, especificamente em populações não tratadas, a fim de determinar a sua ocorrência e estabelecer a

frequência inicial nesta condição, em que os insetos não sofreram pressão de seleção prévia com Bsp. O alelo *cqm1_{REC}* foi detectado nas quatro populações sem histórico de tratamento com Bsp analisadas e em três delas, Ipojuca, Jaboaão e Azeitona, as frequências foram da ordem de 10^{-3} (0,001 a 0,003). Estes dados foram similares aqueles obtidos de duas populações não tratadas que foram previamente analisadas na RMR bem como aos dados de frequência de alelos *r* a Bt, que em muitos casos apresentam uma frequência inicial em áreas não expostas desta mesma ordem (BENTUR et al., 2000; BOURGUET et al., 2003; BURD et al., 2003; CHALEGRE et al., 2009; GOULD et al., 1997). No entanto, uma das populações, Roda de Fogo, apresentou uma frequência significativamente mais elevada do que as demais populações analisadas, sendo da ordem de 10^{-2} (0,017), a mesma observada na população tratada de Água Fria (CHALEGRE et al., 2009).

Estes resultados mostram que a grande variação encontrada da frequência do alelo *cqm1_{REC}* nas populações não tratadas de 0,001 até 0,017 indica diferentes níveis de risco de seleção de resistência, caso sejam submetidas ao tratamento com Bsp, principalmente quando se encontram valores como o de Roda de Fogo, que como descrito anteriormente, nunca tinha sido exposta a Bsp até o momento de sua coleta. Como Bsp não era utilizado em grande escala, a possibilidade de algum contato indireto de Roda de Fogo com o biolarvicida pode ser considerada inexistente. Recentes estudos com genes de resistência a Bt em populações de campo de lepidópteros coletadas em áreas de cultivares do algodão-Bt na China também mostrou uma grande variação de frequências, 10^{-4} a 10^{-1} (GAO et al., 2009; LIU et al., 2008; 2010; XU et al., 2009; ZHAO et al., 2010), com o último sendo considerado o primeiro aumento substancial da frequência de genes de resistência entre as áreas em estudo.

A partir do *screening* do *cqm1_{REC}* nas populações, foi realizada a análise de sua identidade e todos os fragmentos amplificados que potencialmente correspondiam ao alelo *cqm1_{REC}* (<208 pb) foram sequenciados. Durante esta investigação foi possível confirmar a identidade da maioria dos alelos como sendo *cqm1_{REC}* e também foi descoberto um novo evento na mesma região amplificada, que corresponde a uma deleção de 16 nt, aqui denominado *cqm1_{REC-D16}*, demonstrando que a região alvo da PCR pode abranger estas duas deleções ligadas à resistência. Em paralelo, em um estudo desenvolvido pela doutoranda Eloína Santos com a população de Água Fria, foi identificado um fragmento que continha

uma deleção de 25 nt. Ambos os alelos, *cqm1_{REC-D16}* e *cqm1_{REC-D25}* foram caracterizados e as deleções em questão são, potencialmente, capazes de provocar a resistência à toxina Bin de forma similar ao que ocorre no alelo *cqm1_{REC}*, *cpm1_{GEO}* e *cpm1_{BP}*, pois este evento também leva a formação de uma proteína truncada desprovida da âncora GPI (DARBOUX et al., 2002, 2007; ROMÃO et al., 2006). No entanto, o efeito fisiológico desses alelos não pode ser avaliado, visto que foram detectados em amostras populacionais e não foi possível o estabelecimento de uma colônia para esse tipo de estudo. Estes novos polimorfismos ocorrem na mesma região daquele caracterizado no *cqm1_{REC}* em uma área que parece ser um *hotspot*.

Em relação à ocorrência destes três alelos, observou-se que o alelo *cqm1_{REC}* tem uma distribuição mais ampla, pois foi detectado em todas as populações analisadas, seguido do *cqm1_{REC-D16}* que foi detectado em duas das quatro populações não tratadas analisadas e o *cqm1_{REC-D25}* foi detectado apenas na população tratada de Água Fria. Em relação à frequência destes três alelos, o *cqm1_{REC}* variou na ordem de 10^{-3} a 10^{-2} , enquanto os alelos *cqm1_{REC-D16}* e *cqm1_{REC-D25}* foram encontrados na ordem de 10^{-3} . No entanto, o achado de larvas homocigotas para o alelo *cqm1_{REC-D16}* na população de Jaboação não era esperado, pois alelos *r* em populações não tratadas são frequentemente observados em heterocigose (YANG et al., 2007; CHALEGRE et al., 2009; ZHAO et al., 2010). Os dados variáveis de distribuição e frequências destes três alelos *r* entre as populações analisadas indicam a importância do manejo da resistência antes e durante o tratamento com Bsp de criadouros de *C. quinquefasciatus*. As frequências dos alelos *cqm1_{REC}*, *cqm1_{REC-D16}* e *cqm1_{REC-D25}* encontradas neste trabalho foram semelhantes a algumas obtidas a partir de análises de F_2 *screen*, para alelos *r* das toxinas Cry do Bt em populações de lepidópteros, na ordem de 10^{-2} a 10^{-3} (GÉNISSEL et al., 2003; GOULD et al., 1997; HUANG et al., 2012; TABASHNIK et al., 2000; WENES et al., 2006). Nos dois estudos que aplicaram a PCR específica para detecção de alelos *r* em plantas Bt nas espécies de *P. gossypiella* e *H. virescens*, as frequências foram bem inferiores, na ordem de 10^{-4} a 10^{-5} , entretanto estes alelos não foram diretamente detectados e as frequências foram estabelecidas por modelos estatísticos (GAHAN et al., 2007; TABASHNIK et al., 2006).

Os resultados deste trabalho demonstraram que o gene *cqm1* possui diversos polimorfismos associados à resistência a Bsp e um panorama semelhante, envolvendo a detecção de múltiplos alelos do gene da caderina associados à

resistência à toxina Cry1Ac, foi descrito em lepidópteros pragas do algodão (GAHAN et al., 2001; MORIN et al., 2003; ZHAO et al., 2010). Até o momento, 14 alelos da caderina que causam elevados níveis de resistência, também relacionados a falhas na interação toxina-receptor, foram identificados, sendo um em uma colônia selecionada em laboratório de *Heliothis virescens*, quatro em *Pectinophora gossypiella* e nove alelos detectados em *Helicoverpa armigera*, sendo as duas últimas espécies provenientes de populações de campo (GAHAN et al., 2001; MORIN et al., 2003; 2004; XU et al., 2005; YANG et al., 2007; ZHAO et al., 2010; ZHANG et al., 2012). Do ponto de vista funcional, muitos destes alelos são considerados nulos, uma vez que são interrompidos por eventos que resultam na geração de códons de terminação da tradução prematuros, ou que geram eventos de processamento do RNA mensageiro aberrantes, codificando assim proteínas truncadas. Em todos os casos, o resultado final é a incapacidade da toxina se ligar ao seu tecido alvo, de uma forma semelhante à observada para os alelos *r* do gene *cqm1* aqui descritos, apontando que estes eventos são comuns nestes genes que codificam proteínas de função primordial os insetos e que também funcionam como receptores para toxinas inseticidas (FABRICK et al., 2011; ZHAO et al., 2010). O desenvolvimento de ferramentas moleculares para o monitoramento, no caso de *screening* de alelos *r* da caderina tem sido considerado uma tarefa complexa devido à diversidade e múltiplas localizações das mutações associadas à resistência ao longo deste gene que possui uma grande extensão (16,4 kb) (YANG et al., 2006). Em contraste, o gene *cqm1* com cerca de 1,8 kb (ROMÃO et al., 2006), e a co-localização de polimorfismos em um *hotspot*, apresenta facilidade operacional para amplificação e sequenciamento permitindo uma busca de alelos *r* em populações de campo.

Dada à existência de diferentes mutações no gene *cqm1/cpm1* que conferem resistência a Bsp, este estudo também teve por objetivo avaliar a ocorrência do alelo *cpm1_{GEO}* que foi caracterizado em uma colônia de *C. pipiens* oriunda de diferentes regiões da Califórnia (WIRTH et al., 2000). A região de Água Fria tem sido tratada com Bsp e apresenta uma maior frequência do *cqm1_{REC}* (CHALEGRE et al., 2009) e, devido a estas características, esta população foi escolhida para investigar a ocorrência do alelo *cpm1_{GEO}*. Foi obtido um método de detecção específico para larvas portando este alelo. Entretanto o alelo *cpm1_{GEO}* não foi encontrado e isto pode

ter ocorrido pelo número de indivíduos avaliados ter sido insuficiente, caso o alelo ocorra, mas tenha uma baixa frequência. Outra possibilidade seria que este alelo, caracterizado em uma população isolada geograficamente, simplesmente não ocorra na população avaliada. O estudo deve ser ampliado para chegar a uma conclusão a respeito da ocorrência deste alelo na RMR.

Neste estudo, além da caracterização dos alelos *cqm1*_{REC-D16} e *cqm1*_{REC-D25} em populações da RMR, foi identificado e caracterizado um novo alelo na colônia R2362. O segundo alelo, *cqm1*_{REC-2}, possui na sua sequência uma mutação pontual *nonsense* que gera um códon de terminação da tradução prematuro, a exemplo de outros alelos *r* caracterizados em larvas de *Culex*, como o *cpm1*_{GEO} e *cpm1*_{BP} (DARBOUX et al., 2002, 2007). Um estudo prévio de polimorfismos no gene *cqm1* mostrou a existência de pelo menos 13 substituições de aminoácidos na sequência deduzida do receptor Cqm1 obtida a partir da análise de indivíduos da população tratada de Água Fria, demonstrando o quão polimórfica é essa sequência e que podem haver outros eventos que podem levar à resistência (CHALEGRE, 2008).

O método específico de PCR para detecção dos alelos *cqm1*_{REC} e *cqm1*_{REC-2}, foi aplicado em diferentes gerações ao longo do desenvolvimento da colônia R2362 para determinar sua frequência, visto que a caracterização inicial desta colônia apontou que ela seria constituída de indivíduos homozigotos para o alelo *cqm1*_{REC} (ROMÃO et al, 2006). Os dados deste estudo demonstraram que pouco após início da fundação da colônia (F₃₅-F₃₇) ambos os alelos co-existiam, mas com uma maior frequência do genótipo *cqm1*_{REC}/*cqm1*_{REC}, o que explica o fato dos indivíduos sequenciados no momento da caracterização molecular da colônia terem apresentado este genótipo, sendo a colônia caracterizada por ser composta por indivíduos homozigotos para este alelo (ROMÃO et al., 2006). Os dados apontam um aumento da frequência do alelo *cqm1*_{REC-2} ao longo do desenvolvimento da colônia, embora com algumas flutuações, tendo atingido uma predominância a partir da geração F₁₈₂. O aumento da frequência do alelo *cqm1*_{REC-2} coincidiu com o período em que a exposição da colônia a Bsp foi realizada de uma forma regular, a partir de registros precisos, o que não pôde ser obtido de outros momentos de manutenção da colônia (C. M. F. Oliveira, dados não publicados), demonstrando que este aumento na frequência poderia estar ligado a condições de pressão de seleção com o biolarvicida.

A fundação de duas colônias compostas por indivíduos homocigotos para cada um dos alelos permitiu avaliar se a pressão de seleção seria o fator determinante na possível substituição do alelo *cqm1_{REC}* pelo *cqm1_{REC-2}*. A partir da geração F₁₈₆ a pressão de seleção na colônia R2362 foi imposta a cada geração para avaliar a evolução das frequências dos alelos e o *cqm1_{REC-2}* foi majoritário e manteve-se estável durante a avaliação. Em paralelo, na subcolônia R2362/RECREC-2, mantida sem pressão de seleção com Bsp, foi observado um crescente aumento da frequência do alelo *cqm1_{REC}* a partir da geração F₃, o qual continuou predominante nas nove gerações subsequentes, em contraste com o observado na colônia R2362. A fim de avaliar se este panorama mudaria na presença de Bsp, foi imposta na geração F₁₀ desta subcolônia uma forte pressão de seleção. Foi possível avaliar quatro gerações, cujas frequências dos alelos oscilaram bastante, com uma queda inicial do *cqm1_{REC}*, mas que na geração F₁₄ atingiu valores semelhantes àqueles encontrados na subcolônia sem pressão de seleção. Apesar da hipótese de que com pressão de seleção, o alelo *cqm1_{REC-2}* seria predominante não ter sido confirmada a partir deste último modelo, talvez pelo tempo de análise ter sido insuficiente, o conjunto de resultados obtidos, a partir das outras avaliações, indica que os alelos *cqm1_{REC-2}* e *cqm1_{REC}* predominam, respectivamente, sob condições de exposição e na ausência de tratamento com o biolarvicida.

Uma das explicações para a maior frequência do alelo *cqm1_{REC-2}* poderia estar ligada a um menor custo biológico, em caso de maior pressão de seleção, do que o alelo *cqm1_{REC}*, inicialmente selecionado e caracterizado na população. São necessários estudos adicionais que possam fornecer resultados para compreender as vantagens/desvantagens associadas a estes alelos, visto que os dados deste trabalho sugerem que tem havido um fenômeno de sucessão destes alelos na colônia. Labbé et al. (2009) descrevem uma situação semelhante em uma população de *C. pipiens* no sul da França, em que foi identificado uma substituição envolvendo três alelos do mesmo gene de resistência à químicos, denominado *Ester*, e este processo parece estar relacionado à capacidade adaptativa dos alelos de acordo com o ambiente e pressão de seleção aos quais as populações foram submetidas.

Sabe-se que o fenótipo de resistência conferido por estes dois alelos é o mesmo visto que o receptor Cqm1, se expresso, estaria ausente do *microvilli*, condição essencial para a ação da toxina Bin. Além disso, bioensaios com alta dose

diagnóstica confirmaram que larvas homozigotas para cada um dos alelos são resistentes a Bsp. Uma das avaliações realizadas foi a verificação da expressão do RNA mensageiro desses alelos, já que, em virtude do *cqm1_{REC-2}* parece ter um ganho no que diz respeito ao *fitness* do inseto, talvez isto estivesse relacionado a uma expressão da proteína truncada Cqm1. No entanto, após as avaliações, foi observada uma expressão significativamente menor de ambos os alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* em relação ao *cqm1*, com uma queda mais acentuada do *cqm1_{REC-2}* e, talvez, este parâmetro *per se* não cause efeitos no custo biológico do inseto. Ensaios de interação entre a toxina Bin e amostras de *microvilli* intestinal (BBMF) de larvas das subcolônias R2362/REC e R2362/REC-2 mostraram que, em relação à BBMF susceptível, a ligação de ambas foi muito reduzida e a competição de ligação praticamente inexistente por sítios específicos, com um perfil semelhante aquele observado a partir da BBMF de *Ae. aegypti*, espécie refratária. Estes dados confirmam que receptores Cqm1 funcionais nas colônias resistentes não estão sendo expressos nos níveis encontrados para a colônia susceptível, corroborando os dados de bioensaios e aqueles obtidos por PCR em tempo-real.

As avaliações da expressão dos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}* indicam que pode haver outros fatores relacionados à predominância destes alelos nas situações observadas. Dentre eles está a via *nonsense mediated decay* (NMD) que é responsável pela degradação do RNAm aberrante codificando potencialmente para produtos protéicos menores ou não funcionais como um sistema de sobrevivência, sendo detectado em diversos organismos eucarióticos (CULBERTSON; LEEDS, 2003; GONZALEZ et al., 2001; WAGNER; LYKE-ANDERSEN, 2002; WILKINSON; SHYU, 2002). Este mecanismo pode ser o responsável pela expressão reduzida dos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*, visto que por ter um códon de parada prematuro gerado pela deleção de 19 nt ou pela mutação pontual, entre dois íntrons, os RNA mensageiros seriam potencialmente degradados (ROMÃO et al., 2006). Em contraste, o alelo *cpm1_{GEO}* tem níveis de transcritos semelhantes ao alelo susceptível *cpm1*. Isto pode ser devido à mutação que leva ao códon de terminação prematuro ser localizada já no final da sequência (T1706A) o que não ativaria a via NMD (DARBOUX et al., 2002).

Outra hipótese que pode estar relacionada às predominâncias dos alelos em diferentes condições é que a via NMD parece não apenas estar envolvida na degradação de RNAm aberrantes, mas também pode estar relacionada à regulação

da expressão de um grande número de genes em diversos organismos, embora o papel biológico desse mecanismo ainda não esteja claro e poucos alvos evolutivamente conservados tenham sido identificados (RAYSON et al., 2012).

Para avaliar o custo biológico relacionado a estes alelos, ainda são necessários mais estudos, relacionados diretamente à expressão do receptor Cqm1 ou a possíveis genes relacionados ao desenvolvimento que possam ser regulados via NMD. Embora a resistência em indivíduos da colônia R2362 tenha sido relacionada a uma discreta redução de alguns parâmetros biológicos (OLIVEIRA et al., 2003), esta colônia foi mantida em laboratório por mais de dez anos, e dados recentes têm demonstrado que o alelo *cqm1_{REC}* é capaz de competir com o alelo susceptível *cqm1*, pelo menos sob condições de laboratório (AMORIM et al., 2010). De uma maneira semelhante, os genes da caderina e seus alelos nulos associados à resistência à Cry1Ac não parecem ser essenciais para a sobrevivência de *H. virescens*, *P. gossypiella* e *H. armigera* (GAHAN et al., 2001; MORIN et al., 2003; ZHAO et al., 2010). Dados sobre a caracterização bioquímica da proteína Cqm1 são escassos, embora se saiba que em larvas de *C. quinquefasciatus* foram identificadas cinco α -glicosidases ligadas ao epitélio intestinal, dentre elas a Cqm1 (ROMÃO et al., 2006). No entanto, as características destas moléculas e qual o efeito fisiológico causado pela perda de uma delas na digestão de carboidratos e no desempenho geral dos insetos ainda são desconhecidos.

Os achados deste trabalho de novas mutações no gene *cqm1* relacionadas à resistência a Bsp, que foram mapeadas na mesma região de outros polimorfismos já caracterizados, sugerem que este trecho do gene pode ser um *hotspot* para tais eventos. Além dos quatro alelos caracterizados na Região Metropolitana do Recife, a mesma região contém as mutações que caracterizam os alelos *cpm1_{BP}* e *cpm1_{BP-del}* que coexistem em populações de *C. pipiens* na França (DARBOUX et al., 2007). O único alelo que apresenta uma mutação localizada fora dessa região é o *cpm1_{GEO}* caracterizado em uma colônia oriunda de populações de *C. pipiens* do Estado da Califórnia, EUA (DARBOUX et al., 2002). Do ponto de vista molecular, estudos adicionais são necessários para entender a razão de tais eventos estarem concentrados nessa região do gene *cqm1*, além do impacto que eles podem causar no desenvolvimento do inseto.

As frequências dos alelos encontradas neste trabalho em populações não tratadas com Bsp, principalmente a de Roda de Fogo, bem como a identificação de

três novos alelos *r* reforçam a importância e a viabilidade da aplicação dos métodos moleculares para o monitoramento de seleção de resistência.

10 CONCLUSÕES

- a) Nas populações de *Culex quinquefasciatus* da Região Metropolitana do Recife circulam, pelo menos, três alelos de resistência a *Bacillus sphaericus* ($cqm1_{REC}$, $cqm1_{REC-D16}$ e $cqm1_{REC-D25}$).
- b) Dentre os alelos observados nas populações da RMR, o $cqm1_{REC}$ tem uma importância estratégica no manejo da resistência, visto que foi detectado em todas as populações analisadas e com maior variação na frequência.
- c) As mutações dos alelos $cqm1_{REC}$, $cqm1_{REC-D16}$, $cqm1_{REC-D25}$ e $cqm1_{REC-2}$ ocorrem em uma região específica do gene $cqm1$, permitindo um fácil desenvolvimento de ferramentas moleculares para seu diagnóstico.
- d) Um novo alelo, $cqm1_{REC-2}$, foi co-selecionado na colônia resistente de laboratório R2362 e parece ter ocorrido um fenômeno de sucessão de alelos nesta colônia.
- e) Os alelos $cqm1_{REC-2}$ e $cqm1_{REC}$ tem características adaptativas diferentes visto que predominam, respectivamente, em condições com e sem pressão de seleção com o biolarvicida *Bacillus sphaericus*.
- f) A expressão dos alelos $cqm1_{REC}$ e $cqm1_{REC-2}$ é muito reduzida e a repercussão biológica no inseto, devido à ausência da α -glicosidase Cqm1, não pôde ser determinada visto que não são conhecidos os fatores que conferem vantagem para cada um dos alelos nas situações analisadas.
- g) O monitoramento destes alelos de resistência deve ser realizado em populações alvo de tratamentos com Bsp, cuja utilização deve ser associada a outros agentes de controle, como Bti, a fim de evitar a seleção destes alelos *r*.

REFERÊNCIAS

AMORIM, L. B. et al. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure. **Biol. Control**, San Diego, v. 42, n. 2, p. 155-160, 2007.

_____. Stability of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* evaluated by molecular tools. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 40, n. 4, p.311-316, 2010.

ANDERSON, et al. Control of mosquitoes in catch basins in Connecticut with *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Bacillus sphaericus*, and Spinosad. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 27, n. 1, p. 45-55, 2011.

ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N. F2 screen for rare resistance alleles. **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 9, p. 572-578, 1998.

ANDOW, D. A. et al. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in an Iowa population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 93, n. 1, p. 26-30, 2000.

ANDREADIS, S. S. et al. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in Greek and Spanish population of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 100, n. 1, p. 195-201, 2007.

ANILKUMAR, K. J.; PUSZTAI-CAREY, M.; MOAR, W. J. Fitness costs associated with Cry1Ac-resistant *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): a factor countering selection for resistance to Bt cotton? **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 101, n. 4, p. 1421-1431, 2008.

AQUINO-DE-MURO, M.; PRIEST, F. G. A colony hybridization procedure for the identification of mosquitocidal strains of *Bacillus sphaericus* on isolation plates. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 63, p. 310-313, 1994.

ARAÚJO, D. A. T. **Detecção molecular de alelos de resistência a *Bacillus sphaericus* em populações e colônias de *Culex quinquefasciatus***. Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, 2012. 67p.

BARBOSA, R. M. R. **Aperfeiçoamento e avaliação de armadilha de oviposição BR-OVT para *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae)**. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2007, 160 p.

BAUMANN, L.; BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 170, p. 2045-2050, 1988.

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

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

BENTUR, J. S. et al. Frequency of alleles conferring resistance to a *Bacillus thuringiensis* toxin in a Philippine population of *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae). **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 93, n. 5, p. 1515-1521, 2000.

BERROCAL, L. et al. West Nile virus; ecology and epidemiology of an emerging pathogen in Colombia. **Rev. Salud Publica**, Bogotá, v. 8, n. 2, p. 218-228, 2006.

BERRY, C. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 109, p. 1-10, 2012.

BILLINGSLEY, P. F.; HECKER, H. Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): activity and distribution of trypsin, aminopeptidase, and alpha-glucosidase in the midgut. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 28, n. 6, p. 865-871, 1991.

BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 53, p. 1333-1337, 1987.

BOONSERM, P. et al. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 9, p. 3391-3401, 2006.

BOURGUET, D. et al. Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Theor. Appl. Genet.**, Berlin, v. 106, n. 7, p. 1225-1233, 2003.

BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 53, p. 1333-1337, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BURD, A. D. et al. Estimated frequency of nonrecessive Bt resistance genes in bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) in eastern North Carolina. **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 96, n. 1, p. 137-142, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **West Nile Virus**. Atlanta, 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/niosh/topics/westnile/>>. Acesso em: 14 dez. 2012.

CHARLES, J.-F. Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. **Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.**, Paris, v. 138, p. 471-484, 1987.

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

CHARLES, J.-F.; NIELSEN-LEROUX, C. Les bactéries entomopathogènes: mode d'action sur les larves de moustiques et phénomènes de résistance. **Ann. Inst. Pasteur/Actualités**, Paris, v. 7, p. 233-245, 1997.

CHALEGRE, K. D. **Diagnóstico da resistência do vetor *Culex quinquefasciatus* ao biolarvicida *Bacillus sphaericus***. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ), Recife, 107 p., 2008.

CHALEGRE, K. D. et al. Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1044-1049, 2009.

_____. Novel mutations associated with resistance to *Bacillus sphaericus* in a polymorphic region of the *Culex quinquefasciatus* cqm1 gene. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 78, n. 16, p. 6321-6326, 2012.

CHEVILLON, C. et al. Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): interaction between recessive mutants and evolution in southern France. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 38, p. 657-664, 2001.

CONSOLI, R. A. G. D.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**, 20 ed. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 1994, 228p.

COUSTAU, C.; CHEVILLON, C.; FFRENCH-CONSTANT, R. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? **Trends Ecol. Evol.**, Amsterdam, v. 15, n. 9, p. 378-382, 2000.

CULBERTSON, M. R.; LEEDS, P. F. Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 13, p. 207-214, 2003.

DARBOUX, I. et al. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 99, p. 5830-5835, 2002.

_____. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v.31, p. 981-990, 2001.

_____. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Cell Microbiol.**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 2022-2029, 2007.

DAVIDSON, E. W. et al. Enzymatic activation of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxin. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 50, p. 40-44, 1987.

DAVIDSON, E. W.; YOUSTEN, A. A. The mosquito larval toxin of *Bacillus sphaericus*. In: BARJAC, H.; SUTHERLAND, D. J. **Bacterial control of mosquitoes and blackflies**, New Brunswick: Ed. Rutgers University, 1990. p. 237-255.

DE BARJAC, H. et al. Serological classification of *Bacillus sphaericus* strains in relation with toxicity in mosquito larvae. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 21, p. 85-90, 1985.

DE MELO, J. V. et al. Cytopathological effects of *Bacillus sphaericus* Cry48Aa/Cry49Aa toxin on binary toxin-susceptible and -resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 75, n. 14, p. 4782-4789, 2008.

DOWNES, S.; MAHON, R. Evolution, ecology and management of resistance in *Helicoverpa* spp. to Bt cotton in Australia. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 110, p. 281–286, 2012.

DRITZ, D. A. et al. Control of mosquito larvae in seasonal wetlands on a wildlife refuge using Vectomax™ CG. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 27, n. 4, p. 398-403, 2011.

FABRICK, J. A. et al. Insertion of an intact CR1 retrotransposon in a cadherin gene linked with Bt resistance in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella*. **Insect Mol. Biol.**, Oxford, v. 20, p. 651–665, 2011.

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

FFRENCH-CONSTANT, R. H. et al. Cyclodiene insecticide resistance: from molecular to population genetics. **Ann. Rev. Entomol.**, Palo Alto, v. 45, p. 449-466, 2000.

FFRENCH-CONSTANT, R. H. The molecular and population genetics of cyclodiene insecticide resistance. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 24, p. 335-345, 1994.

_____. Which came first: insecticides or resistance? **Trends Genet.**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 1-4, 2007.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 40, n. 2, p. 224-229. 2007.

FISHER, R. A. The possible modification of the responses of wild type to recurrent mutations. **Am. Nat.**, Chicago, v. 62, p. 115-126, 1928.

_____. **The genetical theory of natural selection**. 2^a ed: New York, Ed.Dover, 1958, 291p.

GAHAN, L. J. et al. A polymerase chain reaction screen of field populations of *Heliothis virescens* for a retrotransposon insertion conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 100, n. 1, p. 187-194, 2007.

_____. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. **Science**, New York, v. 293, p. 857-860, 2001.

GAO, Y. et al. Frequency of Bt resistance alleles in *Helicoverpa armigera* during 2006–2008 in Northern China. **Environ. Entomol.**, College Park, v. 38, p. 1336–1342, 2009.

GASSMANN, A. J.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B. E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Ann. Rev. Entomol.**, Palo Alto, v. 54, p. 147-163, 2009.

GÉNISSEL, A. et al. Initial frequency of alleles conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* poplar in a field population of *Chrysomela tremulae*. **Proc. Royal Soc. Lond. Ser. B, Biol. Sci.**, London, v. 270, n. 1517, p. 791-797, 2003.

GEORGHIOU, G. P.; LAGUNES-TEJEDA, A. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. **Food Nutr. Agric.**, Roma, 1991, p. 335.

GONZALEZ, C.I. et al. Nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene** v. 274, p. 15–25, 2001.

GOULD, F. et al. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 94, n. 8, p. 3519-3523, 1997.

GROVES, R. L.; MEISCH, M. V. Laboratory and field plot bioassay of *Bacillus sphaericus* against Arkansas mosquito species. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 12, p. 220-224, 1996.

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

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Ann. Rev. of Entomol.**, Palo Alto, v. 45, p. 371–391, 2000.

HIRE, R. S. et al. Purification and characterization of mosquitocidal *Bacillus sphaericus* BinA protein. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 101, p. 106–111, 2009.

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

HU, X. et al. Complete genome sequences of the mosquitocidal bacterium *Bacillus sphaericus* C3–41 and comparisons with closely related *Bacillus* species. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 190, p. 2892–2902, 2008.

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2008. **ISAAA Brief n. 39, ISAAA**, Ithaca, New York, 2008.

JONES, G. W. et al. A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. **FASEB J.**, Bethesda, v. 21, n. 14, p. 4112-4120, 2007.

_____. The Cry48Aa-Cry49Aa binary toxin from *Bacillus sphaericus* exhibits highly restricted target specificity. **Environ. Microbiol.**, College Park, v. 10, n. 9, p. 2418-2424, 2008.

KALFON, A. et al. Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297: an electron microscope study of crystal-like inclusions biogenesis and toxicity to mosquito larvae. **J. Gen. Microbiol.**, London, v. 130, p. 893-900, 1984.

KELLEN, W. et al. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 7, p. 442-448, 1965.

KRAZIKOV, V. V.; KARELOV, D. V.; FIRSOV, L. M. Alpha-glucosidases. **Biochemistry**, Moscou, v. 66, n. 3, p. 267-281, 2001.

LABBÉ, P. et al. Resistance gene replacement in the mosquito *Culex pipiens*: Fitness estimation from long-term cline series. **Genetics**, Austin, v. 182, p. 303-312, 2009.

LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 23, n. 2, p. 133-163, 2007.

LACEY, L. A. et al. Mosquito host range and field activity of *Bacillus sphaericus* isolate 2297 (serotype 25). **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 4, p. 51-56, 1988.

LIU, F. et al. Resistance allele frequency to Bt cotton in field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in China. **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 101, p. 933–943, 2008.

LIU, N. et al. Multiple Cytochrome P450 Genes: Their Constitutive Overexpression and Permethrin Induction in Insecticide Resistant Mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 6, n. 8, e23403, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LUNA, E. J. A.; PEREIRA, L. E.; SOUZA, R. P. Encefalite do Nilo Ocidental: nossa próxima epidemia? **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, DF, v. 12, n. 1, p. 7-19, 2003.

MACIEL, A. et al. A. Epidemiological study of bancroftian filariasis in Recife, northeastern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 4, p. 449-455, 1996.

MARQUES-FILHO, C. A. M. et al. Controle biológico de *Culex quinquefasciatus* com *Bacillus sphaericus* no Rio Pinheiros – São Paulo – SP. **Anais do XII Simpósio de Controle Biológico**, São Paulo, p. 27, 2011.

MCGAUGHEY, W. H.; BEEMAN, R. W. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 81, n. 1, p. 28-33, 1988.

MELO-SANTOS, M. A. et al. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Trop.**, Basel, v. 113, n. 2, p. 180-189, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Esclarecimentos sobre a Febre do Nilo Ocidental, a detecção de anticorpos em animais e as recomendações para a Vigilância no Brasil**, Brasília, 2011. Disponível em <http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_28_2011_febre_do_nilo_2011_revisada_2.pdf>. Acesso em: 17 dez, 2011.

MORALES, M. A. et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 12, n. 10, p.1559-1561, 2006.

MORIN, S. et al. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 100, p. 5004-5009.

MULLA, M. S. et al. Emergence of resistance and resistance management in field populations of tropical *Culex quinquefasciatus* to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 19, n. 1, p. 39-46, 2003.

NEIDE, E. Botanische Beschreibung einiger sporebildenden bacterien. **Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.**, Stuttgart, Abt. 12, p. 337-352. 1904.

NENE, V. et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, New York, v. 316, p. 1718e1723, 2007.

NEWTON, C. R. et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucleic Acids Res.**, London, v. 17, n. 7, p. 2503-2516, 1989

NICOLAS, L., DARRIET, F., HOUGARD, J.-M. Efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 against larvae of *Anopheles gambiae* under laboratory and field conditions in West Africa. **Med. Vet. Entomol.**, Oxford, v. 1, p. 157-162, 1987.

NICOLAS, L. et al. Respective role of the 42- and 51-kDa component of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 106, p. 275-280, 1993.

NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J.-F. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 210, p. 585-590, 1992.

NIELSEN-LEROUX, C., et al. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west-Mediterranean countries. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 39, p. 729-735, 2002.

_____. Resistance in a laboratory population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 228, p. 206-210, 1995.

_____. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* mosquito larvae (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 34, p. 321-327, 1997.

_____. Various levels of cross-resistance to *Bacillus sphaericus* strains in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) colonies resistant to *Bacillus sphaericus* strain 2362. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 67, n. 11, p. 5049-5054, 2001.

NISHIWAKI, H. et al. Cloning, functional characterization, and mode of action of a novel insecticidal poreforming toxin, Sphaericolysin, produced by *Bacillus sphaericus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 73, p. 3404–3411, 2007.

OLIVEIRA, C. M. F. et al. Biological fitness of a *Culex quinquefasciatus* population and its resistance to *Bacillus sphaericus*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 19, n. 2, p. 125-129, 2003.

_____. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* from China and Brazil (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 41, p. 58-64, 2004.

OPOTA, O. et al. *Bacillus sphaericus* binary toxin elicits host cell autophagy as a response to intoxication. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 6, n. 2, e14682, 2011.

_____. 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.**, Oxford, v. 149, n. 3, p. 419-427, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Eliminate filariasis: attack poverty**. Geneva, 2000, 41p.

_____. **Elimination of lymphatic filariasis as a public health problem**. Agenda item 20, In: WHA50/1997/REC/1, Geneva, 1997.

_____. **Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as microbial larvicide**. Washington, 1985, 24p.

_____. **Lymphatic filariasis: the disease and its epidemiology**, Geneva, 2012. Disponível em <http://www.who.int/lymphatic_filariasis/epidemiology/en/>. Acesso em: 13 dez. 2012.

_____. **Report on the workshop on the large scale-use of *Bacillus sphaericus* to control *Culex quinquefasciatus* in urban environments.** Maroua, p. 19-24, 1994.

_____. **WHO position statement on integrated vector management.** Geneva, 2008, 4p.

PARTRIDGE, R. M.; BERRY, C. Insecticidal activity of the *Bacillus sphaericus* Mtx1 toxin against *Chironomus riparus*. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 79, p. 135-136, 2002.

PAUCHET, Y. et al. Effects of a mosquitocidal toxin on mammalian epithelial cell line expressing its target receptor. **Cell Microbiol.**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 1335-1344, 2005.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 4, p. 467-474, 2011.

PEI, G. F. et al. A strain of *Bacillus sphaericus* causes a slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 68, n. 6, p. 3003-3009, 2002.

PRIEST, F. G. et al. Distribution and characterization of mosquitocidal toxin genes in some strains of *Bacillus sphaericus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 63, n. 4, p. 1195- 1198, 1997.

RAO, D. R. et al. Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 11, p. 1-5, 1995.

RAYSON, S. et al. A role for nonsense-mediated mRNA decay in plants: pathogen responses are induced in *Arabidopsis thaliana* NMD mutants. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 7, n. 2, e31917, 2012.

REGIS, L., et al. Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control the filariasis *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Olinda, Brazil. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 98, p. 488-492, 2000.

_____. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, p. 115-119, 1995.

_____. Integrated control of the filariasis vector with community participation in an urban area of Recife, Pernambuco, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 4, p. 473-482, 1996.

RIGBY, M. C.; HECHINGER, R. F.; STEVENS, L. Why should parasite resistance be costly? **Trends in Parasitol.**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 116-1120, 2002.

ROCHA, A. et al. Programa de controle e eliminação da filariose linfática: Uma parceria da Secretária de Saúde de Olinda/PE, Brasil, com o Serviço de Referência Nacional em Filarioses. **Rev. Patologia Tropical**, Goiânia, v. 39, p. 233-249, 2010.

ROCHA, E. M. M.; FONTES, G. Bancroftian filariasis in Brazil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 32, p. 98-105, 1998.

RODCHAROEN, J.; MULLA, M. S. Biological fitness of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) susceptible and resistant to *Bacillus sphaericus*. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 34, n. 1, p. 5-10, 1997.

_____. Resistance development in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to the microbial agent *Bacillus sphaericus*. **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 87, p. 1133-1140, 1994.

RODRIGUES, I. B. et al. Controle da malária: eficácia de formulados de *Bacillus sphaericus* 2362 contra larvas de espécies de *Anopheles* em criadouros artificiais-tanques de piscicultura e criadouros de Olaria. **Rev. Patologia Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 2, p. 161-176, 2008.

ROMÃO, T. P. Base molecular da interação da toxina binária do biolarvicida *Bacillus sphaericus* com α -glicosidases de larvas de culicídeos vetores. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2010, 136p.

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

_____. The N-terminal third of the BinB subunit from *Bacillus sphaericus* binary toxin is sufficient for its interaction with midgut receptors in *Culex quinquefasciatus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 321, n. 2, p. 167-174, 2011.

SCHWARTZ, J. L. et al. Permeabilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitocidal binary toxin and its individual components. **J. Membr. Biol.**, New York, v. 184, p. 171-183, 2001.

RECIFE. Secretaria de Saúde do Recife. **Filariose quase extinta no Recife-Notificações de casos**, Recife, 2011. Disponível em:

<www.recife.pe.gov.br/2011/2012/Filariose_quase_extinta_no_recife_180091.php>
Acesso em: 16 dez. 2012.

_____. **PCR apresenta novas estratégias de controle da filariose**, Recife, 2008. Disponível em:

<http://www.recife.pe.gov.br/2008/10/31/pcr_apresenta_novas_estrategias_de_controle_da_filariose_164478.php>. Acesso em: 25 fev. 2011.

SHELDON, B. C; VERHULST, S. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. **Trends Ecol. Evol.**, Amsterdam, v. 11, n. 8, p. 317-321, 1996.

SHU, Y. et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphism. **Nucleic Acids Res.**, Londres, v. 29, n. 17, p.1-8, 2001.

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, n. 3, p. 754-761, 1997.

_____. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* binary toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 711-721, 1999.

SILVA-FILHA, M. H. N. L. et al. *Culex quinquefasciatus* populations submitted to *Bacillus sphaericus* treatments did not display high resistance levels. **Biol. Control**, San Diego, v. 424, n. 2, p. 227-234, 2008.

_____. Impact of a 26-month *Bacillus sphaericus* trial on the pre-imaginal density of *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Recife, Brazil. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 17, n. 1, p. 45-50, 2001.

_____. Low level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 88, n. 3, p. 525-530, 1995.

_____. Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut receptor binding site: implications for resistance of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) larvae. **FEMS microbiol. lett.**, Amsterdam, v. 241, n. 2, p. 185-191, 2004.

SILVA-FILHA, M. H.; PEIXOTO, C. A. Immunocytochemical localization of the *Bacillus sphaericus* binary toxin components in *Culex quinquefasciatus*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, New York, v. 77, p. 138-146, 2003.

SILVA-FILHA, M. H. N. L.; REGIS, L. Reversal of a low-level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from an urban area of Recife, Brazil. **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 90, p. 299-303, 1997.

SILVA, C. P.; TERRA, W. R. An α -glucosidase from perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) midgut cells. Purification and properties. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 25, p. 487-494, 1995.

SINÈGRE, G. et al. First field occurrence of *Culex pipiens* resistance to *Bacillus sphaericus* in southern France. **Abstracts** of the VIIIth Eur. Meet. Society of Vector Ecology, Barcelona, September 5-8, 1994, p. 17, 1994.

SINGER, S. Insecticidal activity of recent bacterial isolates and their toxins against mosquito larvae. **Nature**, London, v. 244, p. 110-111, 1973.

_____. Isolation and development of bacterial pathogens in vectors. In: **BIOLOGICAL REGULATION OF VECTORS**, 1977, Bethesda. **Reports**. Bethesda: National Institutes of Health, 1977. p. 3-18.

SINGH, G. J. P.; GILL, S. S. An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 52, p. 237-247, 1988.

SINGH, O. P. et al. PCR-based methods for the detection of L1014 kdr mutation in *Anopheles culicifacies* sensu lato. **Mal. J.**, Londres, v. 8, p. 154. 2009.

SINGKHAMANAN, K. et al. Identification of amino acids required for receptor binding and toxicity of the *Bacillus sphaericus* binary toxin. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 303, p. 84–91, 2010.

SKOVMAND, O.; BAUDUIN, S. Efficacy of a granular formulation of *Bacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* in West African countries. **J. Vector Ecol.**, Santa Ana, v. 22, p. 43-51, 1997.

SOUTHGATE, B. A. Intensity and efficiency of transmission and the development of microfilaraemia and disease: their relationship in lymphatic filariasis. **J. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 95, n. 1, p. 1-12, 1992.

TABASHNIK, B. E. et al. DNA screening reveals pink bollworm resistance to Bt cotton remains rare after a decade of exposure. **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 99, n. 5, 1525-1530, 2006.

_____. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 97, n. 24, p. 2980-2984, 2000.

TABASHNIK, B. E.; GOULD, F.; CARRIÈRE, Y. Delaying evolution of insect resistance to transgenic crops by decreasing dominance and heritability. **J. Evol. Biol.**, Basel, v. 17, n. 4, p. 904-912, 2004.

TANGSONGCHAROEN, C. et al. Functional characterization of truncated fragments of *Bacillus sphaericus* binary toxin BinB. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 106, p. 230–235, 2011.

THANABALU, T.; BERRY, C.; HINDLEY, J. Citotoxicity and ADP-ribosylating activity of the mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1: possible roles of the 27- and 70- kDa peptides. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, p. 2314-2320, 1993.

THANABALU, T. et al. Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100- kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 173, p. 2776-2785, 1991.

WAGNER, E.; LYKKE-ANDERSEN, J. mRNA surveillance: the perfect persist. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 3033–3038, 2002.

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.**, Honolulu, v. 43, n. 4, p. 726-730, 2006.

WENES, A. L. et al. Frequency and fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Heredity**, Edinburgh, v. 97, n. 2, p. 127- 134, 2006.

WEISER, J. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. **Zentralbl. Mikrobiol.**, Jena, v. 139, p. 57-60, 1984.

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

WILKINSON, M. F.; SHYU, A. B. RNA surveillance by nuclear scanning? **Nat. Cell. Biol.** v. 4, p. 144–147, 2002.

WIRTH, M. C. et al. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 37, p. 534-540, 2000.

_____. Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 73, n. 19, p. 6066-6071, 2007.

XU, X. et al. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac {delta}-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 71, p. 948 –954, 2005.

XU, Z. et al. Using an F(2) screen to monitor frequency of resistance alleles to Bt cotton in field populations of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Manag. Sci.**, West Sussex, v. 65, p. 391–397, 2009.

YANG, Y. et al. Identification and molecular detection of a deletion mutation responsible for a truncated cadherin of *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 36, p. 735–740, 2006.

_____. Mutated cadherin alleles from a field population of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. **App. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 73, p. 6939–6944, 2007.

YUAN, Z. M. et al. Identification and molecular structural prediction analysis of a toxicity determinant in the *Bacillus sphaericus* crystal larvicidal toxin. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 268, n. 9, 2751-2760, 2001.

YUAN, Z. M.; ZHANG, Y. M; LIU, E. Y. High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. **Biocontrol Sci. Technol.**, Abingdon, v. 10, p. 43-51, 2000.

ZHANG, H. et al. Diverse genetic basis of field-evolved resistance to Bt cotton in cotton bollworm from China. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 109, n. 26, p. 10275-10280, 2012.

ZHANG, Y. M. et al. Isolation of two high toxic *Bacillus sphaericus* strains. **Insecticidal Microorg.**, v. 1, p. 98-99, 1987.

ZHAO, J. Z. et al. Examination of the F2 screen for rare resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxins in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 95, n. 1, p. 14-21, 2002.

_____. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. **Nat. Biotechnol.**, New York, v. 21, n. 12, p. 1493-1497, 2003.

_____. Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 40, p. 113–118, 2010.

ANEXO A

Sequência do gene *cqm1* (N. de acesso no GenBank DQ333335) e localização dos 6 primers internos (Tabela 4) utilizados no sequenciamento dos alelos *cqm1*_{REC-D16}, *cqm1*_{REC-}

D25 e *cqm1*_{REC-2}.

```

gaaagtttcaatcgagctgctctccgagcaagatgagaccgctgggagctttgagcctagctcgtctgtggcgatgaccgtcaacgggc 90
M R P L G A L S L V A L L A M T V N G 19
tagcgattcgcaaccggactcgaaggactggtatcagcacgcgacgcttaccagatctatccgaggtcgtttttggacagcaacggcg 180
L A I R E P D S K D W Y Q H A T F Y Q I Y P R S F L D S N G 49
atgggattggtgatttggcgggatcacctccaagatgaagtacttggcggatattgggattgacgcgacgtggttgagcccgccgttca 270
D G I G D L A G I T S K M K Y L A D I G I D A T W L S P P F 79
agtcaccgctgaaagactttgggtatgatgtgtcggatttctacgctatccagccggagtacgggaatttgacggattttgacaagtgg 360
K S P L K D F G Y D V S D F Y A I Q P E Y G N L T D F D K L 109
tggaggaatcgcaagaatgggatcaagetgatgctgattttattccgaaccactcgagtaccagcacgagtggtttgtgaagtctg 450
V E E S H K N G I K L M L D F I P N H S S D Q H E W F V K S 139
tggcgggatccggagtacagtgacttttatgtgtggagaccccgccaggggggtggccgccaataaattggatctcgttatttg 540
V A R D P E Y S D F Y V W R P P A T G G G P P N N W I S V F 169
gagggctcggctggacataataacagcagaggggagtgactatctgcaccagtttaccgctcagcagccggatttgaactaccggaatc 630
G G S A W T Y N T A R G E Y Y L H Q F T P Q Q P D L N Y R N 199
cgaaggtgctggcggagatgaccaagatggttctctcgttggaccgtggagtggatgggttccggttgagcgtatcaaccacatgt 720
P K V L A E M T K M L F P W L D R G V D G F R L D A I N H M 229
tcgaggatgagcagttccgggatgagccgttgtctgggtgggacagtcgggagtagcattctttggatcacatttataccaaggaca 810
F E D E Q F R D E P L S G W G Q S G E Y D S L D H I Y T K D 259
tcccgatgtgtatgatggtttacaactggcgggatcagatcagataagatttccgaggagaaggccgactatcattctgatgacgg 900
I P D V Y D V V Y N W R D Q M D K Y S A E K G R T I I L M T 289
aagcgtattcagcagcaggggaacgatgctgtactacgagatgctggaccggaagcggccagggagctcacatgcccgttcaactccage 990
E A Y S S I E G T M L Y Y E S A D R K R Q G A H M P F N F Q 319
tgatctatgactttaagaaggagcagaacccggttgggctgaagagttcgactcgactggtggatgaacaacatgcccgtctgacacactc 1080
L I Y D F K K E Q N A V G L K S S I D W W M N N M P A R H T 349
caagctgggtagctggatcgatgatcactcgggttagcgtcacgagttggactagatcgggttgatcaggtcatgacgttctgtgcata 1170
P S W V A G S H D H S R V A S R V G L D R V D Q V M T L L H 379
ccctccgggactagttattacgtattaccggtgaagaggttagccatgcaggacttcaaagggtccagcagttcgacaaccgagatccga 1260
T L P G T S I T Y Y G E E V A M Q D F K E A Q Q F D N R D P 409
accggacccgatgagtgaggactcgtcgaccagtgccgggttcagtaaccaaccaaacctggctccgagttcatccggactacgctc 1350
N R T P M Q W D S S T S A G F S T N T N T W L R V H P D Y A 439
ggtacaacgtagcgtgatgcagaagaatccacaagtagcttccaccacttccagcatctgaccaagcttcgacggcaccggacgatgc 1440
R Y N V D V M Q K N P Q S T F H H F Q H L T K L R R H R T M 469
agagtggtgagtagctgcacaagacggtcggaaccaaggtgtacgcattgctgagggaaactccgtggtgaggttcgttccctgacgggtgc 1530
Q S G E Y V H K T V G T K V Y A L L R E L R G E D S P L T V 499
tgaacatggccggagcagaggataccgtggatctgggagatttcgtgaatctccgcagaagatcggagtcgaggtggcgcaaccggaact 1620
L N M A G A E D T V D L G D F V N L P Q K M R V E V A Q P N 529
ccaagtcgaaggcggcaatgaggtcgacatcggcaagttgacgctgggaccgtacgattcgggttctgctgagagcaacggtttctgctgg 1710
S K S K A G N E V D I G K L T L G P Y D S V V L R A T V S S 559
cagctgctatcaacctttcattgattgctgctagcattatggccaggtatattttcgtgtagtcataaattaccggtcagctgcatgg 1800
A A A I N L S I G L L L A I M A R Y I F V . 580
ctgatcacggcgttaattagcctttgtaacataaaaactctcttatcaacc 1851

```

Nota: Blocos conservados de domínios catalíticos de α -glicosidasas (enquadrados); deleção de 19 nt do alelo *cqm1*_{REC} (enquadrada); Códon de terminação da tradução prematuro gerado pela deleção (negrito e enquadrado); Sítios de poliadenilação (setas).

Fonte: Romão et al. (2006), modificado.

APÊNDICE A – Considerações éticasCentro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES

FIOCRUZ

Ministério da Saúde

Recife, 16 de Agosto de 2012

À Coordenação do Doutorado em Saúde Pública - CPqAM:

Venho através desta informar que o projeto de Doutorado intitulado "**Caracterização e detecção molecular de alelos de resistência ao biolarvicida *Bacillus sphaericus* em *Culex quinquefasciatus***" do aluno Karlos Diogo de Melo Chalegre Turma 2009-2013 (Matrícula DSP 100/09), não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.

Dr. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Pesquisador Adjunto/Departamento de Entomologia
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ-PE

Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Pesquisadora - Depto. de Entomologia
Mat. SIAPE 1218430
CPqAM/FIOCRUZ

APÊNDICE B – Artigo 1

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Feb. 2009, p. 1044–1049

0099-2240/09/\$08.00+0 doi:10.1128/AEM.02032-08

Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 75, No. 4

Detection of an Allele Conferring Resistance to *Bacillus sphaericus* Binary Toxin in *Culex quinquefasciatus* Populations by Molecular Screening[∇]Karlos Diogo de Melo Chalegre,¹ Tatiany Patrícia Romão,¹ Liliane Barbosa Amorim,¹ Daniela Bandeira Anastacio,¹ Rosineide Arruda de Barros,¹ Cláudia Maria Fontes de Oliveira,¹ Lêda Regis,¹ Osvaldo Pompílio de-Melo-Neto,² and Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha^{1*}Department of Entomology¹ and Department of Microbiology,² Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife-PE 50670-420, Brazil

Received 2 September 2008/Accepted 15 December 2008

The activity of the *Bacillus sphaericus* binary (Bin) toxin on *Culex quinquefasciatus* larvae depends on its specific binding to the Cqm1 receptor, a midgut membrane-bound α -glucosidase. A 19-nucleotide deletion in the *cqm1* gene (*cqm1*_{REC}) mediates high-level resistance to Bin toxin. Here, resistance in nontreated and *B. sphaericus*-treated field populations of *C. quinquefasciatus* was assessed through bioassays as well as a specific PCR assay designed to detect the *cqm1*_{REC} allele in individual larvae. Resistance ratios at 90% lethal concentration, gathered through bioassays, were close to 1 and indicate that the selected populations had similar levels of susceptibility to *B. sphaericus*, comparable to that of a laboratory colony. A diagnostic PCR assay detected the *cqm1*_{REC} allele in all populations investigated, and its frequency in two nontreated areas was 0.006 and 0.003, while the frequency in the *B. sphaericus*-treated population was significantly higher. Values of 0.053 and 0.055 were detected for two distinct sets of samples, and homozygote resistant larvae were found. Evaluation of Cqm1 expression in individual larvae through α -glucosidase assays corroborated the allelic frequency revealed by PCR. The data from this study indicate that the *cqm1*_{REC} allele was present at a detectable frequency in nontreated populations, while the higher frequency in samples from the treated area is, perhaps, correlated with the exposure to *B. sphaericus*. This is the first report of the molecular detection of a biolarvicide resistance allele in mosquito populations, and it confirms that the PCR-based approach is suitable to track such alleles in target populations.

Bacillus sphaericus Neide is considered the most successful microbial larvicide to date for the control of mosquito species from the *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) complex (20). *B. sphaericus* biolarvicides commercially available are based on highly toxic strains characterized by their ability to express the binary (Bin) protoxin, a crystal protein produced in large amounts during sporulation (7). This heterodimer is formed by the BinA (42-kDa) and BinB (51-kDa) subunits that act in synergy to produce larvicidal activity upon *Culex* larvae (3, 23). The BinB subunit is responsible for the recognition and binding of the toxin to specific receptors on the midgut epithelium surface, while BinA is primarily responsible for the toxic effects, but first the crystal has to be ingested by the larvae and the protoxin must be processed into toxin by the midgut (7). The Bin toxin receptor in *C. pipiens* (Cpm1) and *Culex quinquefasciatus* (Cqm1) is a 60-kDa α -glucosidase attached to the epithelial cell membrane by a glycosylphosphatidylinositol anchor (9, 30, 31). The action of the Bin toxin on *Culex* larvae relies on its specific binding to those membrane-bound receptors (24). Disruption of the interaction between the toxin and the midgut is the major mechanism underlying resistance, and it has already been reported from different laboratory- or field-selected colonies (25, 26, 27, 33). Unrelated mechanisms may

also be involved in resistance, but they have not been characterized so far (25, 27).

Molecular studies revealed that mutations in the genes *cpm1* and *cqm1*, which prevent the production of functional membrane-bound receptors, are the main reasons behind the lack of binding of the Bin toxin to the midgut epithelium. Four *cpm1/cqm1* resistance alleles were found in *Culex* populations of different origins. The *cpm1*_{GEO} allele, detected in a *C. pipiens* laboratory-selected colony (GEO) from California, contains a nonsense mutation leading to the synthesis of a truncated protein lacking the glycosylphosphatidylinositol anchor and is therefore not able to localize to the apical membrane of the midgut epithelium (11, 38). A 19-nucleotide deletion in the gene *cqm1*, here named *cqm1*_{REC}, was associated with the resistance of a *C. quinquefasciatus* laboratory colony (CqRL1/2362) originating from the city of Recife (Brazil), and this mutation prevents the expression of Cqm1 on the midgut brush border membranes (28, 29, 30). Two alleles were found in the *C. pipiens* BP population from France (8). The *cpm1*_{BP} allele had a single nucleotide mutation that prevented the expression of a membrane-bound protein, while the *cpm1*_{BP-del} allele involves transposon-mediated resistance and codes for a mutant membrane-bound protein that is unable to interact with the Bin toxin (10).

The elucidation of mutations conferring resistance to the Bin toxin is essential for the development of molecular tools to detect alleles containing such mutations in mosquito populations. The bioassay is the most widely used method to evaluate insect susceptibility; however, when resistance alleles are re-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE 50670-420, Brazil. Phone: 55-81-21012553. Fax: 55-81-21012516. E-mail: mhneves@cpqam.fiocruz.br.

[∇] Published ahead of print on 19 December 2008.

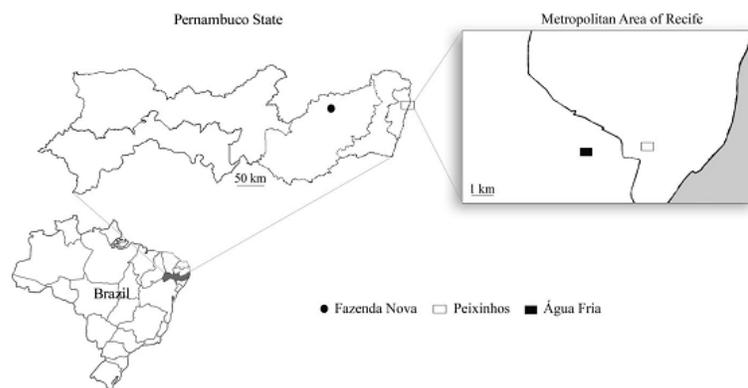


FIG. 1. *Culex quinquefasciatus* samples were collected in three areas of Pernambuco state, located in northeastern Brazil. Fazenda Nova is a nontreated rural district located 180 km from the RMA; both the nontreated area of Peixinhos and the *Bacillus sphaericus*-treated area of Água Fria are located in the RMA.

cessively inherited, heterozygote larvae cannot be identified and detection of resistant homozygotes is difficult. This is a critical issue since the evolution of resistance in populations subjected to selection pressure depends on the initial frequency of resistance alleles. The development of diagnostic PCR methods, or DNA-based kits, has opened new perspectives in the molecular monitoring of resistance (14, 18, 36).

The Recife Metropolitan Area (RMA), located in the state of Pernambuco in northeastern Brazil, has been subjected to a vector control program to reduce *C. quinquefasciatus* density in districts where filariasis is endemic (32). Among other control measures, *B. sphaericus*-based larvicides have been used, and one of the major concerns regarding their use as a microbial larvicide is monitoring the susceptibility of populations under selection. The *cqm1_{REC}* allele was identified in a *C. quinquefasciatus* colony derived from the RMA (30), and it is believed that this mutation may be present and subjected to *B. sphaericus* selection in field populations. Here we report the development of a diagnostic PCR approach based on the detection of *cqm1_{REC}* and its use to investigate the frequency of resistance in nontreated and treated *C. quinquefasciatus* populations.

MATERIALS AND METHODS

Mosquito laboratory colonies. Three colonies were used in this study: CqSF is a *C. quinquefasciatus* colony susceptible to *B. sphaericus* which was established from egg rafts collected in districts located in the RMA; the CqRL1/2362 colony was derived from the CqSF colony by laboratory selection with *B. sphaericus* strain 2362 and displays a high level of resistance (>100,000-fold) to this entomopathogen (29); ReCL is an *Aedes aegypti* colony established from egg samples collected in the RMA. All colonies have been maintained in the insectarium of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ), Brazil, for more than 5 years. Larvae were reared in dechlorinated tap water and fed with cat biscuits. The adults were fed on 10% sucrose solution, and females were also fed with chicken blood. Insects were maintained at $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 70% humidity, and a photoperiod of 12 h of light and 12 h of darkness.

***Culex quinquefasciatus* field populations.** Three field populations from the state of Pernambuco (Brazil), two of them from a nontreated area and one from a *B. sphaericus*-treated area, were investigated (Fig. 1). The nontreated areas were Fazenda Nova, a rural district located 180 km from Recife, and Peixinhos, located in the RMA. The treated area of Água Fria is located in the RMA, 3 km away from Peixinhos, and has been subjected to the Filariasis Control Program, carried out by the municipality's Department of Health (32). The vector control subprogram includes the utilization, since 2003, of *B. sphaericus*-based larvicides in *Culex* breeding sites mapped in that area. Previous analysis of Água Fria larva susceptibility to *B. sphaericus* did not indicate the development of resistance (32) (Table 1). Samples in Peixinhos and Água Fria consisted of egg rafts collected using oviposition traps (4) randomly placed in households within the two neigh-

TABLE 1. Toxicity of *Bacillus sphaericus* strain 2362 (standard powder SPH88) against *Culex quinquefasciatus* fourth-instar larvae from susceptible laboratory colony (CqSF), field populations of Fazenda Nova (FN) and Peixinhos (PX), and a *B. sphaericus*-treated population of Água Fria (AF)

Colony ^a	No. of treatments	No. of larvae	LC ₅₀ ^b		LC ₉₀ ^b	
			Mean (95% confidence interval)	RR ^c	Mean (95% confidence interval)	RR ^c
CqSF	0	2,580	0.003 (0.002–0.004)	1.0	0.038 (0.021–0.114)	1.0
FN	0	1,080	0.011 (0.005–0.028)	3.7	0.022 (0.015–0.072)	0.6
PX	0	1,020	0.012 (0.009–0.017)	4.0	0.025 (0.020–0.036)	0.6
AF	13 ^d	960	0.008 (0.004–0.013)	2.7	0.020 (0.015–0.036)	0.5
	24	1,140	0.026 (0.015–0.030)	8.6	0.044 (0.035–0.067)	1.2

^a Field sampling was performed in December 2007 (FN), May 2007 (PX), May 2005 (AF, 13 treatments), and April 2007 (AF, 24 treatments).

^b Lethal concentrations (mg/liter) for 50% (LC₅₀) or 90% (LC₉₀) of larvae treated after 48 h.

^c RR between the LC toward the field population studied and the LC toward the CqSF colony.

^d Data for sampling after 13 treatments were obtained from the work of Silva-Filha et al. (32).

borhoods. In Fazenda Nova, large samples of egg rafts and larvae were directly collected from breeding sites. Between 50 and 300 egg rafts per population were used to establish subcolonies that were maintained under laboratory conditions, as described above. Larvae from F1 or F2 progenies were evaluated through bioassays, and fourth-instar larva samples were stored at -70°C for diagnostic PCR and enzymatic analysis, as described in the following sections.

Bioassays. *C. quinquefasciatus* susceptibility to *B. sphaericus* was analyzed through bioassays using early fourth-instar larvae, according to standard procedures (41). Larvae were exposed to serial dilutions of spore crystal lyophilized standard powder from *B. sphaericus* 2362 (SPH88; Pasteur Institute, France), for 48 h. Cups held 20 larvae in 100 ml of bacterial suspensions in water, and three replicates were performed for the six concentrations tested per bioassay. A control group, tested on water only, was run in each experiment, and the bioassay was repeated at least three times. The mean lethal concentrations for 50% (LC_{50}) and 90% (LC_{90}) of exposed larvae during 48 h were estimated through probit analysis using the program SPSS 10.0 for Windows. Resistance ratios (RR) for each population analyzed were calculated by comparing their LC values to that of the susceptible CqSF colony, used as a reference.

Diagnostic PCR. For DNA isolation, individual fourth-instar larvae were homogenized in DNAzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), as recommended by the manufacturer, followed by precipitation with ethanol and resuspension in Tris-EDTA buffer. PCR was performed using specific primers flanking the 19-nucleotide deletion in the *cqm1_{REC}* allele (5' primer, Cpq2F, 5'-CGAGAA TTC ATG CAG GAC TTC AAA GAG-3'; 3' primer, Cpq1R, 5'-GCA CTG CAG GGA AGT GGT GGA AGG TAC-3'). The reactions were carried out with the Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) for 35 cycles with an annealing temperature of 55°C , using a Biometra thermocycler (Goettingen, Germany). Amplification products were separated in electrophoresis on 2.5% agarose gels. Each assay included no-DNA samples and *A. aegypti* DNA as negative controls. Selected PCR products were subjected to automatic sequencing to confirm the identity of the fragments. The statistical analysis to compare the proportions of *cqm1_{REC}* found in field populations was performed through the chi-square test with significance at 5%, using the program R-2.6.2 (www.r-project.org).

α -Glucosidase (EC 3.2.1.20) assays. The α -glucosidase assay was performed essentially as described previously (30). Individual larvae were homogenized in phosphate-buffered saline buffer and solubilized in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide sample buffer, lacking 2-mercaptoethanol, followed by electrophoresis on 8% acrylamide gels. The gels were then incubated three times for 15 min in a 2.5% Triton X-100 aqueous solution, followed by incubation for 20 min at 37°C with a 100 mM sodium citrate-phosphate buffer, pH 6.5, containing 2 mM 4-methylumbelliferyl- α -D-glucoside (Sigma, St. Louis, MO), under gentle agitation. Catalytic bands, including the Cqm1 α -glucosidase receptor, were visualized under UV light. Samples of 150 to 500 larvae from each population were analyzed.

RESULTS

Selected field populations of *C. quinquefasciatus* never exposed to *B. sphaericus*, or samples from a treated area, were first compared through bioassays to assess their susceptibilities to this bacterium. The LC_{50} s derived from the nontreated populations of Fazenda Nova and Peixinhos were similar, producing resistance ratios (RRs) for both populations, compared to that of the susceptible laboratory colony CqSF, of equal to or near 4. The RRs at LC_{90} for these populations were less than 1, indicating that natural variations in susceptibility can be found in field populations that have not been exposed to *B. sphaericus* (Table 1). An initial evaluation of the treated population of Água Fria, performed in a previous study, after 13 rounds of *B. sphaericus* treatment produced an RR value at LC_{50} of 2.7 (32). Here, the evaluation performed after 24 treatments indicated an RR at LC_{50} close to 9 (Table 1). Nevertheless, these larvae had RR values at LC_{90} comparable to those of the CqSF larvae at both times analyzed, indicating that there were no statistical differences in susceptibility between the two populations, according to this parameter.

The identification of the *cqm1_{REC}* variation provided the tools for the development of an approach to monitor the se-

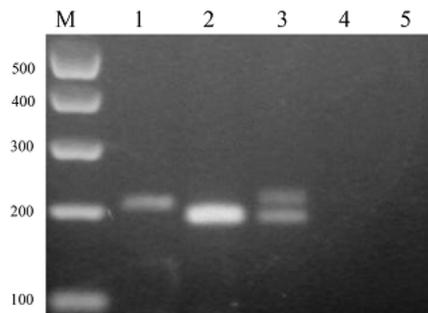


FIG. 2. DNA fragments amplified from the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* and *cqm1_{REC}* alleles of susceptible and *Bacillus sphaericus*-resistant larvae, respectively. The diagnostic PCR produces distinct profiles for susceptible homozygote, resistant homozygote, and susceptible heterozygote larvae (lanes 1, 2, and 3, respectively). No fragments were amplified from the samples with *Aedes aegypti* DNA or without DNA (lanes 4 and 5, respectively). On the left, molecular size (M) markers are shown in base pairs.

lection of resistance associated with this allele. A diagnostic PCR procedure was devised which consisted of the amplification of a DNA fragment encompassing the deleted segment. This assay was first performed using larvae from the *B. sphaericus*-susceptible (CqSF) and -resistant (CqRL1/2362) colonies, consisting of individuals homozygous for the *cqm1* and *cqm1_{REC}* alleles, respectively, to evaluate its reliability. Using a single pair of primers, two distinct fragments, of 208 and 189 bp, were amplified from the susceptible and the resistant alleles of the *cqm1* gene, respectively (Fig. 2, lanes 1 and 2). Single fragments of the expected sizes were amplified from DNA samples from each reference colony, and sequencing of selected samples confirmed their identity as products of the *cqm1* gene. Amplification of both fragments was observed in heterozygote larvae, obtained from the cross between susceptible and resistant individuals from these colonies (Fig. 2, lane 3), and no fragments were amplified in samples with *A. aegypti* DNA or those without DNA, used as negative controls (Fig. 2, lanes 4 and 5).

A second approach to evaluate the susceptibility of individual *C. quinquefasciatus* larvae to *B. sphaericus* was performed using an in-gel α -glucosidase assay. Susceptible larvae from the CqSF colony showed a reproducible profile of four catalytic bands, and the Cqm1 α -glucosidase migrated with an apparent molecular mass of 83 kDa, under semidenaturing conditions (Fig. 3, S). Resistant larvae from the CqRL1/2362 colony, which are homozygotes for the *cqm1_{REC}* allele, were characterized by the lack of the catalytic band corresponding to Cqm1 (Fig. 3, R). Analysis of individual larva samples, using different body parts for both PCR and α -glucosidase assays, confirmed the correlation between genotype and phenotype (data not shown).

Both the PCR and the α -glucosidase assays were then used to investigate individual larvae from the populations tested with the bioassays. Using PCR, the *cqm1_{REC}* resistance allele was detected in samples from all field populations analyzed. In Fazenda Nova, an area without a previous history of *B. sphaericus* utilization, three larvae out of 504 analyzed were het-

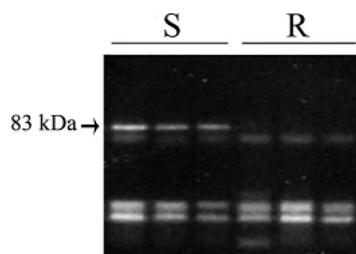


FIG. 3. Analysis of α -glucosidases from susceptible (S) and *Bacillus sphaericus*-resistant (R) *Culex quinquefasciatus* larvae. In-gel assays were performed using crude extracts from individual larvae. Samples were separated by 8% semidenaturing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and submitted to enzymatic detection. Catalytic bands were visualized under a UV transilluminator, and the arrow indicates the 83-kDa band corresponding to the Cqm1 α -glucosidase.

erozygotes for *cqm1_{REC}* and its frequency was 0.0029 (Table 2). The frequency in the nontreated population of Peixinhos was 0.0061 based on the detection of six heterozygote individuals among 492 larvae analyzed. This frequency, although not significantly different from that observed in the Fazenda Nova sample, showed a twofold increase (Table 2). All larvae tested from the two nontreated populations displayed expression of Cqm1, as observed by the in-gel α -glucosidase assay, and this finding was in agreement with the PCR screening data with no homozygotes for the *cqm1_{REC}* allele (Table 2).

Screening of the treated area from Água Fria revealed a different scenario, and the *cqm1_{REC}* frequency was significantly higher than those found in nontreated populations. In samples collected after 13 treatments with *B. sphaericus*, the frequency was 0.053, and within 499 larvae tested both heterozygote and homozygote larvae for *cqm1_{REC}* were found (Table 2). After 24 treatments, 16 heterozygotes and one homozygote larva for this allele were detected within 162 individuals and the frequency remained high (Table 2). Sequencing of selected fragments of both sizes confirmed their identity and assured us of the reliability of the PCR assay. With respect to the Cqm1 expression, larvae lacking expression of Cqm1 were detected in both evaluations performed and confirmed the presence of resistant larvae in that population, as indicated by the allelic frequency (Table 2).

DISCUSSION

The detection of the *cqm1_{REC}* allele within *C. quinquefasciatus* populations from the state of Pernambuco, Brazil, constitutes the first report of an allele conferring resistance to biolarvicides in mosquito field populations, assessed through a DNA screening procedure. This assay showed that the same resistance-inducing allele is present in populations without a previous history of *B. sphaericus* exposure, Fazenda Nova and Peixinhos, although at this stage it is possible that the slightly higher *cqm1_{REC}* frequency detected in Peixinhos could result from indirect exposure to *B. sphaericus*, favored by the proximity with the treated area of Água Fria. The PCR-based approach also demonstrated that the frequency of the *cqm1_{REC}* allele in the treated area of Água Fria was higher than that in the nontreated populations. This was further corroborated by the presence in Água Fria of individual resistant larvae, homozygotes for the *cqm1_{REC}* allele and not expressing the Cqm1 α -glucosidase.

Resistance genes of lepidopteran and coleopteran populations exposed to *Bacillus thuringiensis* spraying or to Bt-transgenic crops have been investigated, and the frequency ranges from 10^{-5} to 10^{-1} (1, 2, 5, 6, 14, 16, 19, 35, 36). Global monitoring data on resistance have shown that the frequency of resistance alleles has not increased in pest insects from Bt crop areas, and it is likely that the high-dose refuge strategy has contributed to delaying resistance (21, 34). Most studies used the F2 screen to estimate the frequency of resistance alleles, which is a method based on the bioassay of F2 neonates obtained from isofemale lineages. Recently the first DNA screening for mutants of the cadherin gene associated with Bt cotton resistance of the pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) was performed, but those alleles were not present in a sample of 5,571 insects from Arizona (36). A similar screening of a retrotransposon insertion in the cadherin gene (*HevCaLP*) associated with *B. thuringiensis* resistance of the lepidopteran *Heliothis virescens* did not detect this insertion among 7,000 individuals, and its frequency was estimated to be 7×10^{-5} (13, 14). The *cqm1_{REC}* allele analyzed in this study was successfully detected through PCR screening in a *C. quinquefasciatus* population without a record of *B. sphaericus* exposure and geographically isolated from those populations that have been exposed, with a frequency of 3×10^{-3} . This finding is in agreement with the previous evidence that genes for resistance to bacterial toxins can be present at detectable frequencies in nontreated populations (12). For instance, the

TABLE 2. Frequencies of *cqm1/cqm1_{REC}* alleles and expression of the Cqm1 receptor in *Culex quinquefasciatus* larvae from nontreated populations of Fazenda Nova (FN) and Peixinhos (PX) and the *Bacillus sphaericus*-treated population of Água Fria (AF)^a

Colony	No. of treatments	No. of larvae with <i>cqm1</i> genotype				<i>cqm1_{REC}</i> frequency	No. of larvae and Cqm1 expression status		
		Total	<i>cqm1/cqm1</i>	<i>cqm1/cqm1_{REC}</i>	<i>cqm1_{REC}/cqm1_{REC}</i>		Total	Positive	Negative
FN	0	504	501	3	0	0.0029	507	507	0
PX	0	492	486	6	0	0.0061	374	374	0
AF	13	499	452	41	6	0.053	325	323	2
	24	162	145	16	1	0.055	162	161	1

^a Genotypes for the *cqm1* gene and the Cqm1 expression profile were determined by diagnostic PCR and in-gel α -glucosidase assays, respectively.

frequency of an allele conferring resistance to Bt poplars in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations that have been not exposed to widespread use of *B. thuringiensis* ranged from 0.011 to 0.0037 (15, 37). A recent work also detected mutations associated with malathion resistance in specimens of the fly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), collected between 1930 and 1949, before the introduction of this insecticide in 1950 (17). The *cqm1_{REC}* frequencies in Água Fria samples collected after 13 and 24 treatments were similar, despite additional treatments performed on the second sample and the fact that the bioassay data showed that the RR values at LC₅₀ shifted from 2.7 to 8.4 between the two samples. In this particular case, the RR values do not seem to ensure the increase of selection pressure or indicate resistance, since a previous study of Água Fria has shown similar variations in this parameter (2.7, 7.3, and 4.7), despite the progressively higher numbers of treatments performed (32). It is then possible that the selection pressure has not actually increased during the interval between the collection of the 13- and 24-treatment samples, perhaps due to other factors which can also influence the efficiency of this process, such as the coverage of treatment cycles, updating of new breeding sites, mosquito density, and climatic and other environmental factors. Nevertheless, our approach was not designed to directly evaluate the effect of *B. sphaericus* treatment upon the frequency of the *cqm1_{REC}* allele, since samples of the Água Fria population before and after treatment were not available. At this stage it is not possible to infer if the higher frequency observed for the *cqm1_{REC}* allele in the treated population is a response to treatment or a reflection of natural variations between different mosquito populations.

Novel approaches are needed to provide information for the management of resistance to bacterial toxins. The knowledge of the initial frequency of resistance alleles in field populations, particularly for those that are inherited recessively, is essential to establish strategies to delay resistance (14, 36, 37). In such cases, heterozygous individuals that emerge gradually in the population under selection cannot be identified by bioassays and resistance allele frequency can increase without being detected. Bioassays are further limited in that they demand large sample size and maintenance of F1 or F2 progenies in the laboratory and assays should be performed under specific conditions to provide reliable data. In the context of *Culex* resistance to *B. sphaericus*, the improvement in DNA screening is needed to track other resistance alleles already described (10, 11), since the PCR used in the study is specific for the *cqm1_{REC}* allele. The α -glucosidase in-gel assay can also be useful to detect individuals not expressing Cqm1 whose resistance can be associated with alleles other than *cqm1_{REC}*, although this assay is able to detect only homozygous resistant larvae. Both methodologies, despite some limitations, proved to be suitable to screen for *B. sphaericus* resistance, and its association with diagnostic bioassays can increase the ability to detect the frequency of resistant individuals.

Bin toxin constitutes an important resource from the arsenal of environmentally safe insecticidal molecules available. Selection of resistance can be largely minimized through the coordinated use of Bin toxin with other insecticidal proteins, in mixtures or in rotation, in the scope of integrated control programs (22, 39, 40). Monitoring of population susceptibility,

particularly focusing on the frequency of resistance alleles, is essential, and this study demonstrates the effectiveness of molecular tools to determine such frequency in *Culex* natural populations.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by grants from the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq Brazil, 471911/2006-2) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE Brazil, APQ 0060-2.02/07).

We thank field teams from FUNASA and CVA (Recife's Department of Health), Frederico Abath (in memoriam), and Eduardo Henrique Rodrigues for advice on diagnostic PCR; Vladimir Silveira Filho for map drawings; and George Diniz for statistical analysis.

REFERENCES

1. Andow, D. A., D. H. Olson, R. L. Hellmich, D. N. Alstad, and W. D. Hutchison. 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in an Iowa population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* **93**:26–30.
2. Andreadis, S. S., F. Alvarez-Alfageme, I. Sánchez-Ramos, T. J. Stodola, D. A. Andow, P. G. Milonas, M. Savopoulou-Soultani, and P. Castániera. 2007. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in Greek and Spanish population of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* **100**:195–201.
3. Arapinis, C., F. de la Torre, and J. Szulmajster. 1988. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *Bacillus sphaericus* 1593M gene encoding a 51.4 kD polypeptide which acts synergistically with the 42 kD protein for expression of the larvicidal toxin. *Nucleic Acids Res.* **16**:7731.
4. Barbosa, R. M., A. Souto, A. E. Eiras, and L. Regis. 2007. Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102**:523–529.
5. Bentur, J. S., D. A. Andow, M. B. Cohen, A. M. Romena, and F. Gould. 2000. Frequency of alleles conferring resistance to a *Bacillus thuringiensis* toxin in a Philippine population of *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* **93**:1515–1521.
6. Bourguet, D., J. Chauvaux, M. Séguin, C. Buisson, J. L. Hinton, T. J. Stodola, P. Porter, G. Cronholm, L. L. Buschman, and D. A. Andow. 2003. Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. *Theor. Appl. Genet.* **106**:1225–1233.
7. Charles, J. F., C. Nielsen-LeRoux, and A. Delécluse. 1996. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annu. Rev. Entomol.* **41**:451–472.
8. Chevillon, C., C. Bernard, M. Marquine, and N. Pasteur. 2001. Resistance to *Bacillus sphaericus* (Diptera: Culicidae): interaction between recessive mutants and evolution in Southern France. *J. Med. Entomol.* **38**:657–664.
9. Darboux, I., C. Nielsen-LeRoux, J.-F. Charles, and D. Pauron. 2001. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**:981–990.
10. Darboux, I., J.-F. Charles, Y. Pauchet, S. Warot, and D. Pauron. 2007. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cell. Microbiol.* **9**:2022–2029.
11. Darboux, I., Y. Pauchet, C. Castella, M. H. Silva-Filha, C. Nielsen-LeRoux, J.-F. Charles, and D. Pauron. 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:5830–5835.
12. Ffrench-Constant, R. H. 2007. Which came first: insecticides or resistance? *Trends Genet.* **23**:1–4.
13. Gahan, L. J., F. Gould, and D. G. Heckel. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* **293**:857–860.
14. Gahan, L. J., F. Gould, J. D. López, S. Micinski, and D. G. Heckel. 2007. A polymerase chain reaction screen of field populations of *Heliothis virescens* for a retrotransposon insertion conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Econ. Entomol.* **100**:187–194.
15. Génissel, A., S. Augustin, C. Courtin, G. Pilate, P. Lorme, and D. Bourguet. 2003. Initial frequency of alleles conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* poplar in a field population of *Chrysomela tremulae*. *Proc. Biol. Sci.* **270**:791–797.
16. Gould, F., A. Anderson, A. Jones, D. Sumerford, D. G. Heckel, J. D. Lopez, S. Micinski, S. R. Leonard, and M. Laster. 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3519–3523.
17. Hartley, C. J., R. D. Newcomb, R. J. Russell, C. G. Young, J. R. Stevens, D. K. Yeates, J. La Salle, and J. G. Oakeshott. 2006. Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:8757–8762.

18. Hemingway, J., B. J. Beaty, M. Rowland, T. W. Scott, and B. L. Sharp. 2006. The Innovative Vector Control Consortium: improved control of mosquito-borne diseases. *Trends Parasitol.* **22**:308–312.
19. Huang, F., B. R. Leonard, S. H. Moore, D. R. Cook, J. Baldwin, K. V. Tindall, and D. R. Lee. 2008. Allele frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab corn in Louisiana populations of sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* **101**:492–498.
20. Lacey, L. A. 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **23**:133–163.
21. Moar, W., R. Roush, A. Shelton, J. Ferré, S. MacIntosh, B. R. Leonard, and C. Abel. 2008. Field-evolved resistance to *Bt*-toxins. *Nat. Biotechnol.* **16**:1072–1074.
22. Mulla, M. S., U. Thavara, A. Tawatsin, J. Chomposri, and T. Su. 2003. Emergence of resistance and resistance management in field populations of tropical *Culex quinquefasciatus* to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **19**:39–46.
23. Nicolas, L., C. Nielsen-LeRoux, J.-F. Charles, and A. Delécluse. 1993. Respective role of the 42- and 51-kDa component of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**:275–280.
24. Nielsen-LeRoux, C., and J.-F. Charles. 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to specific receptor on brush-border membranes. *Eur. J. Biochem.* **210**:585–590.
25. Nielsen-LeRoux, C., F. Pasquier, J.-F. Charles, G. Sinègre, B. Gaven, and N. Pasteur. 1997. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* larvae. *J. Med. Entomol.* **34**:321–327.
26. Nielsen-LeRoux, C., J.-F. Charles, I. Thiery, and G. P. Georghiou. 1995. Resistance in the laboratory population of *Culex quinquefasciatus* to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. *Eur. J. Biochem.* **228**:206–210.
27. Nielsen-LeRoux, C., N. Pasteur, J. Prêtre, J.-F. Charles, H. B. Sheikh, and C. Chevillon. 2002. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of West-Mediterranean countries. *J. Med. Entomol.* **39**:729–735.
28. Oliveira, C. M., M. H. Silva-Filha, C. Nielsen-LeRoux, G. Pei, Z. Yuan, and L. Regis. 2004. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* from China and Brazil (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **41**:58–64.
29. Pei, G., C. M. Oliveira, Z. Yuan, C. Nielsen-LeRoux, M. H. Silva-Filha, J. Yan, and L. Regis. 2002. A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3003–3009.
30. Romão, T. P., K. D. de Melo Chalegre, S. Key, C. F. Ayres, C. M. Fontes de Oliveira, O. P. de-Melo-Neto, and M. H. Silva-Filha. 2006. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its α -glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS J.* **273**:1556–1568.
31. Silva-Filha, M. H., J.-F. Charles, and C. Nielsen-LeRoux. 1999. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* binary toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens*. *J. Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**:711–721.
32. Silva-Filha, M. H., K. D. M. Chalegre, D. B. Anastacio, C. M. F. Oliveira, S. B. Silva, R. V. Acioli, S. Hibi, D. C. Oliveira, E. S. M. Parodi, C. A. M. M. Filho, A. F. Furtado, and L. Regis. 2008. *Culex quinquefasciatus* populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. *Biol. Control* **44**:227–234.
33. Silva-Filha, M. H. N. L., C. M. F. Oliveira, L. Regis, Z. Yuan, C. M. Rico, and C. Nielsen-LeRoux. 2004. Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut receptor binding site: implications for resistance of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) larvae. *FEMS Microbiol. Lett.* **241**:185–191.
34. Tabashnik, B. E., A. J. Gassmann, D. W. Crowder, and Y. Carrière. 2008. Insect resistance to *Bt*-crops: evidence versus theory. *Nat. Biotechnol.* **26**:199–202.
35. Tabashnik, B. E., A. L. Patin, T. J. Dennehy, Y. B. Liu, Y. Carrière, M. A. Sims, and L. Antilla. 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:12980–12984.
36. Tabashnik, B. E., J. A. Fabrick, S. Henderson, R. W. Biggs, C. M. Yafuso, M. E. Nyboer, N. M. Manhardt, L. A. Coughlin, J. Sollome, Y. Carrière, T. J. Dennehy, and S. Morin. 2006. DNA screening reveals pink bollworm resistance to *Bt* cotton remains rare after a decade of exposure. *J. Econ. Entomol.* **99**:1525–1530.
37. Wenes, A. L., D. Bourguet, D. A. Andow, C. Courtin, G. Carre, P. Lorme, L. Sanchez, and S. Augustin. 2006. Frequency and fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Heredity* **97**:127–134.
38. Wirth, M. C., G. P. Georghiou, J. I. Malik, and G. H. Abro. 2000. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. *J. Med. Entomol.* **37**:534–540.
39. Wirth, M. C., J. A. Jannino, B. A. Federici, and W. E. Walton. 2004. Synergy between toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *J. Med. Entomol.* **41**:935–941.
40. Wirth, M. C., Y. Yang, W. E. Walton, B. A. Federici, and C. Berry. 2007. Mx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:6066–6071.
41. World Health Organization. 1985. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as microbial larvicide. TDR/BCV/SPHAERICUS/85.3.1-24. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

APÊNDICE C – Artigo 2

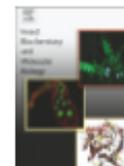
Insect Biochemistry and Molecular Biology 40 (2010) 311–316



Contents lists available at ScienceDirect

Insect Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibmb

Stability of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* evaluated by molecular tools

Liliane Barbosa Amorim, Rosineide Arruda de Barros, Karlos Diogo de Melo Chalegre, Cláudia Maria Fontes de Oliveira, Lêda Narcisa Regis, Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha*

Departament of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE 50670-420, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 October 2009
Received in revised form
9 February 2010
Accepted 15 February 2010

Keywords:
Binary toxin
Cqm1
 α -Glucosidase
Resistance allele
PCR
Fitness cost

ABSTRACT

Bacillus sphaericus binary toxin action on *Culex quinquefasciatus* larvae relies on the binding to Cqm1 α -glucosidases, which act as midgut receptors. Resistance of two laboratory-selected colonies is associated with the allele *cqm1_{REC}* that prevents Cqm1 expression as membrane-bound molecules. This study evaluated stability of resistance after the interruption of selection pressure and introduction of susceptible individuals in these colonies. Bioassays showed that frequency of resistant larvae did not decrease throughout 11 generations, under these conditions, and it was associated to a similar frequency of larvae lacking the Cqm1 α -glucosidase receptor, detected by *in gel* enzymatic assays. Direct screening of the *cqm1_{REC}* allele, by specific PCR, showed that its frequency remained stable throughout 11 generations. Parental resistant colony did not display biological costs regarding fecundity, fertility and pupal weight and data from susceptibility assays, enzymatic assays and PCR screening showed that *cqm1_{REC}* was not disfavored in competition with the susceptible allele and persisted in the progenies, in the lack of selection pressure. Characterization of molecular basis of resistance is essential for developing diagnostic tools and data have relevant implication for the establishment of strategies for resistance management.
© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bacillus sphaericus Neide is the most successful microbial larvicide for controlling species from the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae). Its insecticidal action is due to the binary (Bin) protoxin which is an heterodimer formed by BinA (42-kDa) and BinB (51-kDa) subunits, produced as crystalline inclusions during bacterial sporulation (Lacey, 2007). For its action, crystals have to be ingested by larvae, solubilized in alkaline intestinal pH, followed by cleavage of BinA and BinB into active components, by serine-proteases (Baumann et al., 1985; Broadwell and Baumann, 1987). Action of Bin toxin on *Culex quinquefasciatus* larvae depends on the recognition and binding of BinB subunit to specific receptors named Cqm1, which are 60-kDa α -glucosidases located on the apical membrane of midgut epithelium cells by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (Silva-Filha et al., 1999; Romão et al., 2006). Toxin binding to Cqm1 receptors is followed by major cytopathological effects on the epithelium, and it is likely the toxin is able to form pores on cell membrane, although larval death occurs by mechanisms that are still

unknown (Charles, 1987; Singh and Gill, 1988; Schwartz et al., 2001; de Melo et al., 2008).

Availability of Cqm1 receptors on the midgut is crucial for larvicidal action of Bin toxin and its alteration, or absence, can lead to high levels of *B. sphaericus* resistance (Nielsen-Leroux et al., 1995; Darboux et al., 2002; Oliveira et al., 2004; Romão et al., 2006). Four alleles of the receptor gene were found to display mutations which prevent the production of functional membrane-bound proteins and, therefore, binding of Bin toxin to midgut epithelium (Darboux et al., 2002, 2007; Romão et al., 2006). One of those alleles, named *cqm1_{REC}*, confers Bin toxin resistance in two *C. quinquefasciatus* colonies, CqRL1/2362 and CqRL2/IAB59, originated from Recife Metropolitan Area (RMA) in Brazil and laboratory-selected with *B. sphaericus* strains 2362 and IAB59, respectively (Pei et al., 2002; Amorim et al., 2007). Resistance in these colonies is associated to the *cqm1_{REC}* allele in homozygosis that provokes the absence of Cqm1 α -glucosidases on midgut microvilli (Romão et al., 2006). This allele contains a deletion of 19 nucleotides from 1257 to 1275, in the open reading frame of 1740 base pairs, which originates a premature stop codon. The resulting sequence encodes a truncated 437 amino acids protein unable to localize on the midgut due to the lack of GPI-anchor, instead of a 580 amino acids GPI-anchored protein (Oliveira et al., 2004; Silva-Filha et al., 2004; Romão et al., 2006). Knowledge on the

* Corresponding author. Tel.: +55 81 21012553; fax: +55 81 21012586.
E-mail address: mhneves@cqam.fiocruz.br (M.H.N.L. Silva-Filha).

molecular mechanism that underlies resistance on those colonies allowed the assessment of larvae genotype for *cqm1* and *cqm1_{REC}* alleles, besides the expression of Cqm1 receptor in larvae through in gel α -glucosidase assays (Romão et al., 2006; Chalegre et al., 2009). CqRL2/IAB59 colony also displays resistance to the two-component toxin Cry4BAa/Cry49Aa, which is other insecticidal factor produced by strain IAB59, whose resistance has not been elucidated yet (Jones et al., 2007, 2008).

Development of strategies for resistance management depends on the knowledge of mechanisms and assessment of factors that promote susceptibility recovery. In models whose resistance is recessively inherited, introduction of susceptible individuals is a factor that can reduce resistant genotypes in population (Roush, 1993). Interruption of selection pressure can also disfavor such alleles due to biological fitness costs and evolution of resistance depends on the capacity of *r* alleles to be maintained in the population (Gassmann et al., 2009). The main goal of this study was to evaluate *B. sphaericus* resistance stability in two *C. quinquefasciatus* colonies submitted to the introduction of susceptible individuals in the absence of selection pressure, under laboratory conditions. Colonies were assessed by susceptibility assays as well as by biochemical and PCR tools, that were developed based on molecular characterization of resistance previously described (Romão et al., 2006; Chalegre et al., 2009).

2. Materials and methods

2.1. Mosquito colonies

Five *C. quinquefasciatus* reference laboratory colonies were used in this study: CqSF a susceptible colony used for fitness cost assessment; VR and PX susceptible colonies originated from Varadouro and Peixinhos districts of RMA, respectively; CqRL1/2362, here named R2362, a highly *B. sphaericus* resistant colony originated from CqSF and laboratory-selected with strain 2362 (Pei et al., 2002); CqRL2/IAB59, here named RIAB, a highly *B. sphaericus* resistant colony originated from CqSF and laboratory-selected with strain IAB59 (Amorim et al., 2007). Resistant colonies have been subjected to *B. sphaericus* exposure for 48 h during larval stage, at intervals of five generations, for assuring the maintenance of the high level of resistance. An *Aedes aegypti* colony (Rec-L) was used to obtain DNA control samples for PCR assays. All colonies have been maintained in the insectarium of Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ (Brazil), as previously described (Pei et al., 2002; Beltrão and Silva-Filha, 2007).

2.2. *C. quinquefasciatus* reversal colonies

Two colonies were established to investigate the effects of the introduction of susceptible individuals in the absence of selection pressure. Rev2362 colony was obtained from the cross of around 700 individuals from VR and R2362 at a 1:9 ratio, comprising an equal proportion of females and males from each parental colony. RevIAB colony was established from the cross of around 1300 individuals from PX and RIAB at a 1:1 ratio, under the same conditions. Each generation was composed by at least 10,000 1st instar larvae that were reared to adults. Rev2362 and RevIAB colonies were maintained in the insectarium, as described above, during 16 and 11 generations, respectively, without selection pressure. Rev2362 was first established and analyzed only through bioassays, while RevIAB colony was evaluated by three approaches to obtain more complete data. Bioassays were performed using larvae from the generations that were available from each experimental set.

2.3. Fitness cost assessment

Fecundity, fertility and pupal weight of resistant RIAB and susceptible CqSF colony were compared. Eggs rafts were collected and larvae were reared without *B. sphaericus* exposure. Batches of egg rafts from the first gonadotrophic cycle laid by the females were collected randomly and fecundity was determined as the mean number of eggs per raft, using 44 egg rafts per colony. Each egg raft was placed individually in water for hatching and fertility was determined as the mean number of 1st instar larvae hatched per egg raft, until 48 h after the oviposition. Larvae were reared until pupation and the humid weight was measured in 10 and 20 pools of 25 living females and males pupae, respectively. Differences between the averages were determined by Student's *t*-test with $P \geq 0.05$.

2.4. Multiple concentration bioassays

C. quinquefasciatus susceptibility to *B. sphaericus* 2362 was analyzed through multiple concentration bioassays using early 4th instar larvae, according to the standard procedure (WHO, 1985). A batch of humid biomass from *B. sphaericus* 2362 (sample 0448/09) stored at -20°C , kindly provided by NECTAR-Bioticom (Recife, Brazil), was used. Each assay was performed using at least three replicates of groups of 20 larvae placed in 100 ml of distilled water in recipients treated with serial dilutions of the bacterial suspensions comprising six concentrations, besides a control group tested on water only. Each bioassay was repeated at least three times and the mean lethal concentrations of *B. sphaericus* 2362 for 50% (LC₅₀) exposed larvae during 48 h, were estimated through Probit analysis using the program SPSS 10.0 for Windows. Resistance ratios (RR) between the LC values to larvae from a susceptible colony, used as a reference, and the LC values to larvae from a sample under analysis were determined.

2.5. Diagnostic dose bioassays

Assays were performed to discriminate susceptible and highly resistant individuals based on the exposure of individual 4th instar larvae to a diagnostic concentration. Larvae were treated with 125 mg/L, a concentration 1000-fold higher than the LC₅₀ towards CqSF susceptible larvae, in a final volume of 2 mL of distilled water using 24-well plates. An average number of 240 treated larvae and 24 non-treated larvae were run in each assay and mortality was recorded after 48 h exposure. Replicates of bioassay were done in different dates.

2.6. α -Glucosidase in gel assays

Enzymatic assays were performed as previously described by Romão et al. (2006). Individual larvae were homogenized in PBS buffer and solubilized in SDS-PAGE sample buffer, without 2- β -mercaptoethanol and were not subjected to boiling. Samples were separated in 8% SDS-PAGE gels and submitted to α -glucosidase (EC 3.2.1.20) detection using the substrate 4-methylumbelliferyl α -D-glucoside (Sigma, St. Louis, MO, USA). Catalytic bands were visualized under UV light and susceptible larvae were characterized by the presence of a 83-kDa catalytic band corresponding to the Cqm1 α -glucosidase while *B. sphaericus* resistant larvae, whose resistance is associated with the *cqm1_{REC}* allele, did not display this band (Romão et al., 2006).

2.7. PCR for the *cqm1_{REC}* allele

DNA was isolated from individual 4th instar larvae using DNAzol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), as recommended by the

manufacturer, followed by precipitation with ethanol and resuspension in 50 μ l of TE[®] buffer (Invitrogen). PCR was performed using specific primers flanking the 19-nucleotide deletion in the *cqm1_{RBC}* allele, designed to amplify fragments of 208 and 189 base pairs (bp) from the *cqm1* and *cqm1_{RBC}* alleles respectively, as described (Chalegre et al., 2009). Amplification products were separated on 2.5% agarose gels and visualized under UV. Each assay included samples without DNA and with *Ae. aegypti* DNA template, as negative controls.

3. Results

3.1. Biological fitness of resistant RIAB colony

Biological performance of resistant RIAB individuals regarding fecundity, fertility and pupal weight was compared to susceptible CqSF, before the establishment of RevIAB reversal colony. Fecundity of RIAB showed a discrete reduction with an average number of 166.5 eggs per raft against 170.8 of CqSF colony, however, this difference was not statistically significant (Table 1). All egg rafts produced by resistant females were viable, indicating successful mating among individuals, and fertility was similar to CqSF with an average of 160 1st instar larvae per raft (Table 1). Pupal weight showed similar average 0.04 and 0.07 g per pool of 25 males and females, respectively (Table 1). RIAB individuals had no biological disadvantages compared to CqSF, considering the parameters here analyzed.

3.2. Susceptibility to *B. sphaericus*

Rev2362 and RevIAB reversal colonies, maintained without selection pressure, were monitored for *B. sphaericus* 2362 susceptibility by multiple concentration bioassays. Evaluation of those parental colonies confirmed the high resistance of R2362 (RR = 29,000-fold) and RIAB (RR = 9000-fold) colonies, compared to the susceptible ones (Table 2). LC₅₀ towards the progenies showed a decrease, and RR for RevIAB larvae from F7 and F9 fall down to 3-fold, while RR for Rev2362 larvae from F3 and F6 were lower, however it did not show the same level of reduction (Table 2). It is important to point out that the increase of LC₅₀ towards F6 progeny compared to F3, seemed to be due to the heterogeneous composition of susceptible and resistant larvae in samples, which was confirmed by the subsequent analysis.

Diagnostic bioassay determined the frequency of susceptible and resistant larvae in samples. Parental colonies of Rev2362 showed the expected profile (Table 3) and status of susceptibility of VR colony was determined by PCR screening which showed that 99.6% of larvae from this sample displayed susceptible homozygous genotype (data not shown). Frequency of resistant larvae in Rev2362 was 0.79 in F6 and remained high, with variations, until

Table 1
Fecundity, fertility and pupal weight of *Culex quinquefasciatus* from a susceptible (CqSF) and a *Bacillus sphaericus* resistant colony (RIAB).

Colony	Fecundity Eggs/raft		Fertility 1st instar larvae/raft		Pupal weight (g) ^a	
	N	X ± DP	N	X ± DP	♂	♀
CqSF	7514	170.8 ± 27.4	7103	161.4 ± 30.2	0.044 ± 0.003	0.07 ± 0.007
RIAB	7328	166.5 ± 29.6	7026	159.7 ± 30.3	0.043 ± 0.003	0.07 ± 0.005
P ^b		0.49		0.79	0.16	0.30

^a Weight was determined in pools of 25 pupae, 20 and 10 pools were analyzed for males and females pupae, respectively.

^b P ≥ 0.05 the mean of each parameter is not significantly different, for Student's t-test.

Table 2
Toxicity of *Bacillus sphaericus* 2362 against *Culex quinquefasciatus* 4th instar larvae from susceptible colonies (VR, PX), *Bacillus sphaericus* resistant colonies (R2362, RIAB) and the progenies (F) from the crosses between VR × R2362 (Rev2362) and PX × RIAB (RevIAB) individuals at 1:9 and 1:1 ratios, respectively.

Colony	Samples	No. assays	No. larvae	LC ₅₀ ^a (Fiducial limits 95%)	RR ^b
Rev2362	Parental VR	3	1080	0.014 (0.011–0.023)	1
	Parental R2362	3	1080	400 (ND) ^c	28,571
	F3	3	1080	0.6 (0.13–1.21)	43
	F6	3	1260	2.71 (1.04–18.59)	194
RevIAB	Parental PX	3	1140	0.032 (0.016–0.066)	1
	Parental RIAB	2	560	280.9 (85.1–585.6)	8778
	F7	2	600	0.086 (0.03–0.2)	3
	F9	2	600	0.067 (0.03–0.1)	3

^a Lethal concentrations (mg/L) for 50% of larvae after 48 h exposure.

^b Resistance ratio between the LC₅₀ towards the susceptible and the resistant colonies.

^c Not determined.

the last evaluation in F16 that was 0.86 (Table 3). PX and RIAB parental colonies of RevIAB displayed 100 and 4% mortality, respectively, as expected. Frequency of resistant larvae in RevIAB progeny varied between 0.45 and 0.55, throughout five generations analyzed until the F11 (Table 3).

3.3. Analysis of *Cqm1*α-glucosidase and *cqm1_{RBC}* allele

Resistance of RevIAB colony was also analyzed through the expression of *Cqm1*α-glucosidase and detection of *cqm1_{RBC}* allele that were performed in individual larvae by *in gel* enzymatic assays (Fig. 1A) and specific PCR (Fig. 1B), respectively. All 374 larvae from PX susceptible parental colony showed a catalytic band corresponding to *Cqm1*, while this band was absent in 97% of RIAB larvae (Table 4). In all generations analyzed, frequency of individuals lacking the *Cqm1* catalytic band varied between 0.47 and 0.58, except in F3 whose frequency was higher (Table 4). Data from diagnostic bioassay and α-glucosidase assay were correlated and indicated that, despite some variations, each generation from RevIAB colony was composed of around 50% of resistant larvae (Table 3) lacking *Cqm1* receptor (Table 4).

Table 3
Frequency of *Bacillus sphaericus* susceptible (S) and resistant (R) *Culex quinquefasciatus* 4th instar larvae determined through diagnostic dose bioassays in samples of susceptible colonies (VR, PX), resistant colonies (R2362, RIAB) and the progenies (F) derived from the crosses of VR × R2362 (Rev2362) and PX × RIAB (RevIAB) individuals at 1:9 and 1:1 ratios, respectively.

Colony	Samples	No. larvae	<i>B. sphaericus</i> susceptibility status	
			S	R
Rev2362	VR	ND ^a	ND	ND
	R2362	840	0.01	0.99
	F6	1176	0.21	0.79
	F10	1032	0.12	0.88
	F13	1248	0.17	0.83
	F16	1008	0.14	0.86
RevIAB	PX	720	1	0
	RIAB	576	0.04	0.96
	F3	648	0.45	0.55
	F5	617	0.54	0.46
	F7	624	0.53	0.47
	F9	657	0.50	0.50
	F11	576	0.55	0.45

^a Not determined by diagnostic bioassay; PCR for the *cqm1_{RBC}* allele showed that 99.6% of larvae displayed susceptible homozygous genotype (data not shown).

314

L.B. Amorim et al. / Insect Biochemistry and Molecular Biology 40 (2010) 311–316

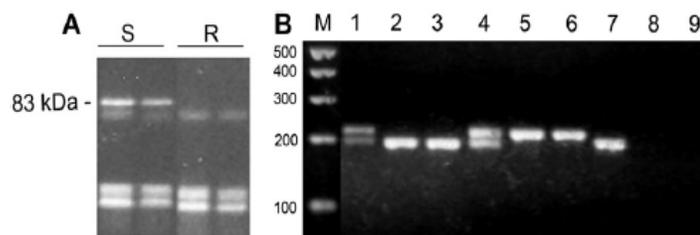


Fig. 1. Analysis of *Culex quinquefasciatus* susceptibility to *Bacillus sphaericus*, by molecular assays. **A.** In gel α -glucosidase (EC 3.2.1.20) assay using crude extracts of individual larva separated in semi-denaturing 8% SDS-PAGE and submitted to detection with 2 mM 4-methylumbelliferyl α -D-glucoside. Catalytic bands were visualized under UV, arrow indicates the Cqm1 α -glucosidase (83-kDa) present in susceptible larvae (S) and absent in resistant larvae (R). **B.** DNA fragments in base pairs (pb) amplified from the *cqm1* (208 bp) and *cqm1_{REC}* (189 bp) alleles from homozygous susceptible (lanes 5, 6) and *B. sphaericus* resistant larvae (lanes 2, 3, 7), respectively. Heterozygous larvae showed both fragments (lanes 1, 4). No fragments were amplified from *Aedes aegypti* DNA (lane 8) or without DNA (lane 9). Molecular weight markers (M) in pb.

Screening of the *cqm1_{REC}* resistance allele showed that the majority of larvae from PX and RIAB parental colonies were homozygous for *cqm1* and *cqm1_{REC}* alleles, respectively (Fig. 2). RevIAB progenies showed a frequency of resistant larvae between 0.47 and 0.58, throughout six generations between F1 and F11, except for F3 that showed a higher frequency similarly to Cqm1 evaluation described above (Table 4). Heterozygous for *cqm1_{REC}* accounted for the majority of susceptible individuals recorded in all generations (Fig. 2, Table 4). Frequency of *cqm1_{REC}* declined from 0.99 in parental RIAB to 0.70 in F1 and was stable throughout the generations until F11, when the frequency was similar to F1 (Table 4). PCR and α -glucosidase assays of RevRIAB progenies were performed using body parts from the same larvae and correlation between genotype for *cqm1* locus and phenotype of Cqm1 expression was 82%. Most of inconsistencies were larvae with resistant genotype and presence of Cqm1 catalytic band, while the minority was heterozygous larvae that lacked Cqm1 band (data not shown). Those samples were not included in Table 4 and will be further investigated.

4. Discussion

High level of *B. sphaericus* resistance of *C. quinquefasciatus* larvae from RIAB colony was not associated with biological disadvantages in terms of fecundity, fertility and pupal weight, which is in agreement with a previous evaluation of the R2362 resistant colony which did not displayed fecundity and fertility costs (Oliveira et al., 2003). However, R2362 colony displayed an increased pre-imaginal developmental time suggesting that other parameters should be investigated in order to provide a broader view of the biological

performance of those colonies (Oliveira et al., 2003). Most cases of insect resistance have been associated to biological costs and such disadvantages may have implications for the successful establishment of resistant populations, a factor countering for field resistance selection (Janmaat and Myers, 2003; Berticat et al., 2004; Bourguet et al., 2004; Anilkumar et al., 2008; Gassmann et al., 2009). Although the biological cost of *Culex* resistance to Bin toxin has not been fully evaluated, data obtained in this study, associated with successful maintenance of this colony under laboratory conditions, strongly suggest that RIAB colony does not exhibit critical disadvantages, differently from most resistance cases recorded in the literature (Rodcharoen and Mulla, 1997; Amorim et al., 2007; Anilkumar et al., 2008; Gassmann et al., 2009).

Reversal colonies obtained from crosses among resistant and susceptible individuals were first analyzed regarding their in vivo susceptibility. Bioassays of Rev2362 progeny indicated the persistence of resistant individuals introduced at 1:9 ratio and led to the investigation of RevIAB colony which had a higher proportion of susceptible individuals (1:1) and was analyzed through biochemical and PCR assays, which provided a detailed view of resistance stability initially detected in Rev2362.

Multiple concentration bioassays showed a sharp reduction of *B. sphaericus* LC₅₀ towards progenies of both reversal colonies, which was a direct effect provoked by the introduction of susceptible individuals and the recessive inheritance of *cqm1_{REC}* allele (Oliveira et al., 2004; Amorim et al., 2007). Higher decrease of the RR towards the RevIAB progenies is likely to be due to the presence of around 50% of susceptible individuals in samples, while this was observed in lesser extent in Rev2362 since frequency of resistant individuals in these progenies was much higher, as shown by diagnostic bioassays. Nevertheless evaluation of resistance based on values of lethal concentrations showed limitations due to the heterogeneous composition of larvae in the reversal colonies and did not represent with accuracy the susceptibility status, compared to data obtained from homogeneous parental colonies. Diagnostic bioassays were performed to overcome this constraint, and, conversely, it not only discriminated susceptible and resistant larvae but also demonstrated that frequency of resistant individuals has not decreased along the generations analyzed, in despite of the introduction of susceptible individuals at 1:9 or 1:1 ratios in Rev2362 and RevIAB colonies, respectively. This bioassay was suitable for screening resistant individuals in samples, whose presence could not be directly detected by multiple concentrations assays and it is an important tool for monitoring *B. sphaericus* resistance since alleles already studied in this model showed to be recessively inherited (Nielsen-LeRoux et al., 2002; Oliveira et al., 2004; Amorim et al., 2007).

Frequency of Cqm1-lacking larvae throughout progenies of RevIAB colony was correlated with that of resistant individuals detected by diagnostic bioassays. In gel α -glucosidase assays can be

Table 4

Analysis of *Culex quinquefasciatus* 4th instar larvae regarding detection of the α -glucosidase Cqm1 and genotypes for *cqm1/cqm1_{REC}* alleles performed by in gel enzymatic assays and specific PCR, respectively. Individual larvae samples were from a susceptible (PX) colony, a *B. sphaericus* resistant (RIAB) colony and the progeny (F1–F11) derived from the cross between individuals from these colonies at 1:1 ratio.

Samples	Cqm1 expression			<i>cqm1</i> genotypes				Frequency <i>cqm1_{REC}</i>
	N	+	-	N	<i>cqm1</i>	<i>cqm1_{REC}</i>	<i>cqm1_{REC}</i>	
PX	374 ^a	1	0	492 ^a	486	6	0	0.0061
RIAB	287	0.03	0.97	106	0	1	105	0.99
F1	159	0.53	0.47	159	10	75	74	0.70
F3	149	0.32	0.68	149	9	38	102	0.81
F5	144	0.44	0.56	144	19	44	81	0.73
F7	152	0.49	0.51	152	29	46	77	0.66
F9	128	0.42	0.58	128	14	40	74	0.73
F11	142	0.44	0.56	142	13	50	79	0.73

^a Data from Chalegre et al. (2009).

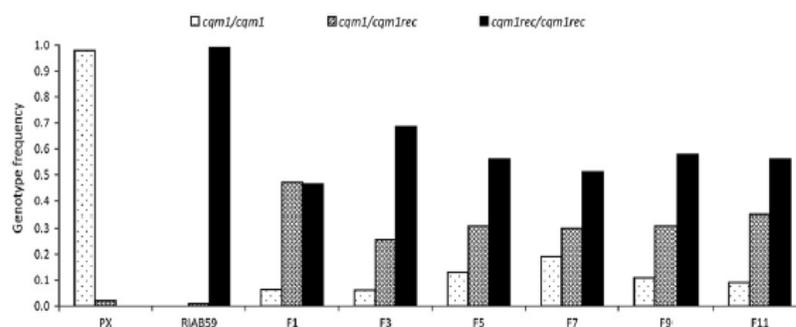


Fig. 2. Genotype frequency for *cqm1* and *cqm1_{REC}* alleles in *Culex quinquefasciatus* larvae from a susceptible (PX) colony, a *Bacillus sphaericus* resistant (RIAB) colony and a progeny (F1–F11) derived from the cross among individuals from these colonies at 1:1 ratio.

a suitable tool to evaluate the involvement of receptor alteration, which is an important mechanism of resistance reported to insecticidal toxins from entomopathogenic bacteria and in particular to *B. sphaericus* (Darboux et al., 2002, 2007; Ferré and Van Rie, 2002; Romão et al., 2006; Heckel et al., 2007). The limitation of this method regarding the detection of heterozygous larvae was overcome by the PCR screening of *cqm1_{REC}* allele. Specific PCR revealed genotypes and frequency of *cqm1_{REC}* allele, which is an issue of particular relevance since early detection of such alleles is essential to introduce management strategies aiming to avoid evolution of selection process (Roush, 1993; Tabashnik et al., 2000; Nielsen-LeRoux et al., 2002; Génissel et al., 2003; Wenes et al., 2006).

In our study, *cqm1_{REC}* frequency dropped from 0.99 in RIAB parental colony to 0.70 in F1, which was a direct effect of the introduction of susceptible individuals, and it remained stable throughout 11 generations, carried by heterozygous and resistant homozygous larvae. The *cqm1_{REC}* allele was not disfavored in the absence of selection pressure, unlike other studies in which resistance alleles have their frequency reduced, mainly due to biological costs (Tabashnik et al., 1994; Bourguet et al., 2004; Wilson et al., 2007; Anilkumar et al., 2008; Gassmann et al., 2009; Hardstone et al., 2009). Frequency of resistance allele was demonstrated by specific PCR which is an advantage over studies whose frequency have been indirectly estimated (Gassmann et al., 2009; Hardstone et al., 2009).

Absence of biological costs of RIAB resistant individuals towards three parameters here analyzed also corroborates the persistence of *cqm1_{REC}* allele in ReVIAB colony. *In gel* α -glucosidase profile showed other catalytic bands in larvae and it is likely that lack of Cqm1 could not be critical due to the redundancy of molecules involved in this physiological function. A previous work showed that total α -glucosidase activity in samples of susceptible and resistant R2362 *C. quinquefasciatus* larvae were similar suggesting that Cqm1 absence could be compensated by other α -glucosidases (Romão et al., 2006). This finding reinforces the hypothesis that some resistance alleles may occur and can be maintained in population as balanced polymorphisms since selection, for and against the allele, would be equal (Ffrench-Constant, 2007). Such alleles would not be necessarily associated with crucial adverse effects on biological performance and this model seems different from those based on the premise that resistance alleles have fitness cost and the population tends to revert to susceptibility in the absence of selection (Roush and McKenzie, 1987; Gassmann et al., 2009). A previous screening showed the *cqm1_{REC}* allele at detectable frequency in a field population of *C. quinquefasciatus* with no history of *B. sphaericus* and geographically isolated from treated areas (Chalegre et al., 2009). The present study demonstrated that the *cqm1_{REC}* allele can remain in the absence of selection pressure,

if no appropriate strategies for the reduction of its frequency are introduced. Further characterization of mechanisms and molecules involved in resistance is essential for developing diagnostic tools to prevent the progression of resistance.

Acknowledgments

We thank the team from the insectarium of the Department of Entomology (CPqAM-FIOCRUZ) for the technical support, Eugênia Rios from NECTAR-Bioticom for kindly providing *B. sphaericus* samples, André Furtado for critical reading of the manuscript and the Program for Technological Development in Tools for Health PDTIS-FIOCRUZ for using its facilities. This work was supported by Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq Brazil, grant 471911/2006-2) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE Brazil, grant APQ 0060–2.02/07), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ Brazil, grant PAPES IV 400336/2006-5).

References

- Amorim, L.B., Oliveira, C.M.F., Rios, E.M., Regis, L., Silva-Filha, M.H.N.L., 2007. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure. *Biol. Control* 42, 155–160.
- Anilkumar, K.J., Pusztai-Carey, M., Moar, W.J., 2008. Fitness costs associated with Cry1Ac-resistant *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): a factor countering selection for resistance to Bt cotton? *J. Econ. Entomol.* 101, 1421–1431.
- Baumann, P., Unterman, B.M., Baumann, L., Broadwell, A.H., Abene, S.J., Bowditch, R.D., 1985. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. *J. Bacteriol.* 163, 738–747.
- Beltrão, H.B.M., Silva-Filha, M.H.N.L., 2007. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. *FEMS Microbiol. Lett.* 266, 166–169.
- Berticat, C., Duron, O., Heyse, D., Raymond, M., 2004. Insecticide resistance genes confer a predation cost on mosquitoes, *Culex pipiens*. *Genetic Resour.* 83, 189–196.
- Bourguet, D., Guillemaud, T., Chevillon, C., Raymond, M., 2004. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution* 58, 128–135.
- Broadwell, A.H., Baumann, P., 1987. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1333–1337.
- Chalegre, K.D., Romão, T.P., Amorim, L.B., Anastacio, D.B., de Barros, R.A., de Oliveira, C.M., Regis, L., de Melo-Neto, O.P., Silva-Filha, M.H., 2009. Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1044–1049.
- Charles, J.F., 1987. Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 138, 471–484.
- Darboux, I., Charles, J.F., Pauchet, Y., Warot, S., Pauron, D., 2007. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cell Microbiol.* 9, 2022–2029.
- Darboux, I., Pauchet, Y., Castella, C., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Pauron, D., 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5830–5835.

- de Melo, J.V., Vasconcelos, R.H., Furtado, A.F., Peixoto, C.A., Silva-Filha, M.H., 2008. Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. *Micron* 39, 1342–1350.
- Ferré, J., Van Rie, J., 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 501–533.
- Ffrench-Constant, R.H., 2007. Which came first: insecticides or resistance? *Trends Genet.* 23, 1–4.
- Gassmann, A.J., Carriere, Y., Tabashnik, B.E., 2009. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 147–163.
- Génissel, A., Augustin, S., Courtin, C., Platte, G., Lorme, P., Bourguet, D., 2003. Initial frequency of alleles conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* poplar in a field population of *Chrysomela tremulae*. *Proc. Biol. Sci.* 270, 791–797.
- Hardstone, M.C., Lazzaro, B.P., Scott, J.G., 2009. The effect of three environmental conditions on the fitness of cytochrome P450 monooxygenase-mediated permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus*. *BMC Evol. Biol.* 9, 42.
- Heckel, D.G., Gahan, L.J., Baxter, S.W., Zhao, J.Z., Shelton, A.M., Gould, F., Tabashnik, B.E., 2007. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.* 95, 192–197.
- Janmaat, A.F., Myers, J., 2003. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proc. Biol. Sci.* 270, 2263–2270.
- Jones, G.W., Nielsen-Leroux, C., Yang, Y., Yuan, Z., Dumas, V.F., Monnerat, R.G., Berry, C., 2007. A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. *FASEB J.* 21, 4112–4120.
- Jones, G.W., Wirth, M.C., Monnerat, R.G., Berry, C., 2008. The Cry48Aa-Cry49Aa binary toxin from *Bacillus sphaericus* exhibits highly restricted target specificity. *Environ. Microbiol.* 10, 2418–2424.
- Lacey, L.A., 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23, 133–163.
- Nielsen-Leroux, C., Charles, J.F., Thiery, I., Georghiu, G.P., 1995. Resistance in a laboratory population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. *Eur. J. Biochem.* 228, 206–210.
- Nielsen-Leroux, C., Pasteur, N., Pretre, J., Charles, J.F., Sheikh, H.B., Chevillon, C., 2002. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west Mediterranean countries. *J. Med. Entomol.* 39, 729–735.
- Oliveira, C.M., Filho, F.C., Beltran, J.E., Silva-Filha, M.H., Regis, L., 2003. Biological fitness of a *Culex quinquefasciatus* population and its resistance to *Bacillus sphaericus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 19, 125–129.
- Oliveira, C.M., Silva-Filha, M.H., Nielsen-Leroux, C., Pei, G., Yuan, Z., Regis, L., 2004. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. *J. Med. Entomol.* 41, 58–64.
- Pei, G., Oliveira, C.M., Yuan, Z., Nielsen-Leroux, C., Silva-Filha, M.H., Yan, J., Regis, L., 2002. A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3003–3009.
- Rodcharoen, J., Mulla, M.S., 1997. Biological fitness of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) susceptible and resistant to *Bacillus sphaericus*. *J. Med. Entomol.* 34, 5–10.
- Romão, T.P., de Melo Chalegre, K.D., Key, S., Ayres, C.F., Fontes de Oliveira, C.M., de Melo-Neto, O.P., Silva-Filha, M.H., 2006. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its alpha-glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS J.* 273, 1556–1568.
- Roush, R.T., 1993. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. *Parasitol. Today* 9, 174–179.
- Roush, R.T., McKenzie, J.A., 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 32, 361–380.
- Schwartz, J.L., Potvin, L., Coux, F., Charles, J.F., Berry, C., Humphreys, M.J., Jones, A.F., Bernhart, I., Dalla Serra, M., Menestrina, G., 2001. Permeabilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitocidal binary toxin and its individual components. *J. Membr. Biol.* 184, 171–183.
- Silva-Filha, M.H., Nielsen-Leroux, C., Charles, J.F., 1999. 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.* 29, 711–721.
- Silva-Filha, M.H., Oliveira, C.M., Regis, L., Yuan, Z., Rico, C.M., Nielsen-Leroux, C., 2004. Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut receptor binding site: implications for resistance of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) larvae. *FEMS Microbiol. Lett.* 241, 185–191.
- Singh, G.J., Gill, S.S., 1988. An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 52, 237–247.
- Tabashnik, B.E., Finson, N., Groeters, F.R., Moar, W.J., Johnson, M.W., Luo, K., Adang, M.J., 1994. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Phutella xylostella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4120–4124.
- Tabashnik, B.E., Roush, R.T., Earle, E.D., Shelton, A.M., 2000. Resistance to Bt toxins. *Science* 287, 42.
- Wenes, A.L., Bourguet, D., Andow, D.A., Courtin, C., Carre, G., Lorme, P., Sanchez, L., Augustin, S., 2006. Frequency and fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Heredity* 97, 127–134.
- WHO, 1985. Informal Consultation on the Development of *Bacillus sphaericus* as Microbial Larvicide. TDR/BCV/SPHAERICUS/85.3. 1–24. WHO.
- Wilson, M., Moshitzky, P., Laor, E., Ghanim, M., Horowitz, A.R., Morin, S., 2007. Reversal of resistance to pyriproxyfen in the Q biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: aleyrodidae). *Pest Manag. Sci.* 63, 761–768.

Apêndice D – Artigo 3

Novel Mutations Associated with Resistance to *Bacillus sphaericus* in a Polymorphic Region of the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* GeneKarlós Diogo de Melo Chalegre,^a Tatiany Patrícia Romão,^a Daniella Aliny Tavares,^a Eloína Mendonça Santos,^a Lígia Maria Ferreira,^a Cláudia Maria Fontes Oliveira,^a Osvaldo Pompílio de-Melo-Neto,^b and Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha^aDepartment of Entomology^a and Department of Microbiology,^b Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Recife-PE, Brazil

Bin toxin from *Bacillus sphaericus* acts on *Culex quinquefasciatus* larvae by binding to Cqm1 midgut-bound receptors, and disruption of the *cqm1* gene is the major cause of resistance. The goal of this work was to screen for a laboratory-selected resistance *cqm1*_{REC} allele in field populations in the city of Recife, Brazil, and to describe other resistance-associated polymorphisms in the *cqm1* gene. The *cqm1*_{REC} allele was detected in the four nontreated populations surveyed at frequencies from 0.001 to 0.017, and sequence analysis from these samples revealed a novel resistant allele (*cqm1*_{REC-D16}) displaying a 16-nucleotide (nt) deletion which is distinct from the 19-nt deletion associated with *cqm1*_{REC}. Yet a third resistant allele (*cqm1*_{REC-D25}), displaying a 25-nt deletion, was identified in samples from a treated area exposed to *B. sphaericus*. A comparison of the three deletion events revealed that all are located within the same 208-nt region amplified during the screening procedure. They also introduce equivalent frameshifts in the sequence and generate the same premature stop codon, leading to putative transcripts encoding truncated proteins which are unable to locate to the midgut epithelium. The populations analyzed in this study contained a variety of alleles with mutations disrupting the function of the corresponding Bin toxin receptor. Their locations reveal a hot spot that can be exploited to assess the resistance risk through DNA screening.

The utilization of biolarvicides based on *Bacillus sphaericus* requires monitoring strategies which can predict or prevent potential resistance selection among exposed mosquito populations. The binary (Bin) crystal toxin, which is the major active insecticidal factor found in commercial *B. sphaericus* strains, acts on mosquito larvae after ingestion, processing and binding to specific receptors located on the midgut epithelium (5, 24). Bin toxin displays high activity against larvae of the *Culex pipiens* complex and *B. sphaericus* has an excellent persistence under field conditions, which make this an effective biolarvicide for controlling these species in urban areas (17). However, the mode of action of Bin toxin relies entirely on its binding to a single class of midgut receptors which are glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored α -glucosidases named Cpm1 and Cqm1 for *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus*, respectively (7, 29, 30). Failure of toxins to bind to their midgut receptors has been described, in a wide range of target insects, as the primary resistance mechanism to insecticidal proteins from entomopathogenic bacteria (11, 16, 25). In the case of *B. sphaericus*, this is a critical aspect since resistance cases have also been reported after laboratory selection or field exposure (2, 25, 27, 36, 38, 44).

Investigation of the *B. sphaericus* resistance mechanisms has confirmed the essential role for the binding of Bin toxin to its receptors, since mutations within the *cpm1/cqm1* genes, which are recessively inherited, are the major causes leading to the absence of functional receptors in the midgut and consequent high resistance levels (36). Resistance cases unrelated to receptor binding failure were reported; however, the mechanisms involved were not elucidated to date (25). On the other hand, molecular characterization of resistance linked to *cpm1/cqm1* genes, performed in two laboratory-selected colonies and one field population, revealed four distinct alleles associated with this phenotype: *cpm1*_{GEO} and *cqm1*_{REC}, laboratory-selected alleles in California (GEO colony) and in Recife, Brazil (CqRL1/2362 colony), respectively, and *cpm1*_{BP} and *cpm1*_{BP-del}, both character-

ized in a field population from the south of France (6, 8, 29). Each allele displays distinct resistance-associated mutations which result in potential transcripts for truncated soluble proteins lacking the GPI anchor (*cpm1*_{GEO}, *cqm1*_{REC}, *cpm1*_{BP}) or for truncated GPI-anchored proteins which are still unable to bind Bin toxin due to the loss of 66 amino acids (*cpm1*_{BP-del}). The CqRL1/2362 colony, derived from eggs collected in the Recife Metropolitan Area (RMA; Brazil) and laboratory selected, displays high levels of resistance (resistance ratio [RR], >100,000) due to the failure of Bin toxin binding to microvillus receptors, and larvae from this colony were found to be homozygous for the *cqm1*_{REC} allele (26, 27). Characterization of this allele showed a 19-nucleotide (nt) deletion which changes the frame of the protein coding sequence and originates a premature stop codon. The resulting predicted protein coded by this allele lacks part of its C-terminal end, including the GPI-anchor site. As a consequence, in individuals found to be homozygous for the *cqm1*_{REC} allele, no functional polypeptide is present as a midgut membrane-bound receptor, a condition essential for Bin toxin binding (29). The characterization of this mutation allowed the development of a PCR amplification assay, which upon screening for *cqm1*_{REC} in larva samples from RMA field populations, showed the presence of the associated deletion in a frequency on the order of 10⁻³ and 10⁻² in nontreated and treated areas, respectively (4).

Utilization of *B. sphaericus* biolarvicides in RMA has been an

Received 13 April 2012 Accepted 25 June 2012

Published ahead of print 6 July 2012

Address correspondence to Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha, mhneves@cpqam.fiocruz.br.

Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.01199-12

Chalegre et al.

important tool for controlling *C. quinquefasciatus*, which is the exclusive vector of the nematode *Wuchereria bancrofti* in Brazil (32). In view of the strategic role of this biolarvicide in RMA and the advantage provided by the knowledge available on the molecular basis of resistance, the goal of this work was to provide data on the frequency of the *cqm1_{REC}* allele through DNA screening, as well as to describe novel polymorphisms of the *cqm1* gene which can disrupt the expression of the Cqm1 protein as a target site for Bin toxin. The search for new resistance-mediating events is a key step for the development and continuous improvement of molecular methods for resistance monitoring, since most alleles identified are recessively inherited and cannot be directly tracked through bioassays.

MATERIALS AND METHODS

Mosquito colonies. Three colonies were used in this study: CqSF, a *Culex quinquefasciatus* colony susceptible to *Bacillus sphaericus* that was established from egg rafts collected in the Recife Metropolitan Area (RMA) in Brazil; CqRL1/2362, a *C. quinquefasciatus* colony derived from CqSF and laboratory selected with *B. sphaericus* strain 2362 that displays a high level of resistance (>100,000-fold) to this entomopathogen (27); and RecLab, an *Aedes aegypti* colony established from egg samples also collected in RMA (21). Colonies have been maintained in the insectarium of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ), under controlled conditions, for at least 8 years. Larvae were reared in dechlorinated tap water and fed with cat biscuits. Adults were fed on 10% sucrose solution, and females were also fed with chicken blood. Insects were maintained at $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 70% humidity, and a photoperiod of 12 h of light and 12 h of darkness.

***Culex quinquefasciatus* population.** Four nontreated populations and one treated population from RMA were investigated. Nontreated areas were Ipojuca (IPO) and Jaboatão (JAB), located 60 and 20 km from Recife, respectively, and Roda de Fogo (ROD) and Azeitona (AZE), districts within the city. Samples from IPO and JAB consisted of egg rafts, collected in 2010, using around 30 oviposition traps (3) randomly placed in households within each area. Samples from ROD and AZE, consisting of larva batches collected directly from breeding sites in these areas in 1999, were stored at -70°C . The treated area of Água Fria (AGU) has been exposed to *B. sphaericus* since 2003 (32), and egg rafts were collected in 2010 according to the methodology described above. Eggs were used to establish subcolonies maintained under laboratory conditions, and larvae from F1 or F2 progenies were stored at -70°C until use.

Bioassays. Multiple concentration bioassays were performed to establish the lethal concentrations of the *B. sphaericus* 2362 lyophilized powder SPH-88 (Institut Pasteur), after 48 h, for 50% (LC_{50}) and 90% (LC_{90}) of exposed larvae according to the standard procedure (35). Lethal concentrations were determined through probit analysis using the software SPSS 10.0 for Windows. Diagnostic dose bioassays were performed to discriminate susceptible and highly resistant individuals based on the exposure of individual fourth-instar larva samples to a high concentration of *B. sphaericus* 2362 for 48 h (1). Briefly, larvae were treated with 125 mg/liter of the biomass sample (sample no. 0448/09; CPqAM-FIOCRUZ) stored at -20°C , at a concentration more than 1,000-fold higher than the LC_{90} to the CqSF-susceptible colony, in a final volume of 2 ml of distilled water in 24-well plates. This high diagnostic dose was chosen based on the fact that all *cqm1* resistance alleles already characterized confer total refractoriness to Bin toxin (25, 27, 38, 44).

AS-PCR. For DNA isolation, individual fourth-instar larva samples were homogenized in DNAzol (Invitrogen), as recommended by the manufacturer, followed by precipitation with ethanol and DNA recovering in Tris-EDTA buffer. Allele-specific PCR (AS-PCR) was performed using specific primers, described in Chalegre et al. (4), and reactions were carried out for 35 cycles with an annealing temperature of 60°C using a Biometra thermocycler. Amplification products were separated by elec-

TABLE 1 Toxicity of *B. sphaericus* strain 2362 against larvae^a

Sample	No. of larvae	LC_{50}		LC_{90}	
		Mean (95% fiducial limits)	RR	Mean (95% fiducial limits)	RR
CqSF	360	0.004 (0.003–0.005)	1.0	0.029 (0.019–0.049)	1.0
IPO	1,480	0.013 (0.010–0.017)	3.3	0.029 (0.022–0.044)	1.0
JAB	1,480	0.017 (0.013–0.020)	4.3	0.026 (0.023–0.049)	0.9
AGU	1,140	0.024 (0.021–0.028)	6.0	0.050 (0.042–0.059)	1.7

^a Larvae were fourth-instar *Culex quinquefasciatus* from a susceptible laboratory colony (CqSF), two nontreated populations (IPO, JAB), and one treated population exposed to *B. sphaericus* (AGU). Shown are lethal concentrations (mg/liter) for 50% (LC_{50}) or 90% (LC_{90}) of larvae after 48 h. RR, resistance ratio; LC for the population tested/LC for the CqSF reference colony.

trophoresis on 2.5% agarose gels, and each assay included no-DNA samples and *A. aegypti* DNA samples as negative controls. All AS-PCR products potentially amplified from the *cqm1_{REC}* allele (fragments of less than 208 bp were expected due to the 19-nt deletion) and some fragments amplified from *cqm1* (standard fragments of 208 bp) were subjected to automatic sequencing in an ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) to confirm their identity.

Cloning and sequencing of *cqm1* alleles. Genomic DNA from fourth-instar larvae was extracted as described, and PCRs were carried out with primers flanking the full-length coding sequence of *cqm1* (see Table S1 in the supplemental material) using Platinum *Taq* high-fidelity DNA polymerase (Invitrogen). To obtain the partial sequence of the *cqm1_{REC-D25}* allele described in this study, a second set of primers were also used (see Table S1). PCR products were purified with the GFX DNA and gel band purification (GE Healthcare) kits. They were then ligated into the vector pGEM-T Easy (Promega) and subsequently transformed into the One Shot TOP10 chemically competent *Escherichia coli* cells (Invitrogen). Twelve clones from each sample were subjected to minipreplications in Luria-Bertani medium supplemented with ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and further purified with the QIAprep spin miniprep kit (Qiagen). After purification, the DNA samples were quantified and submitted for automatic sequencing. Alignment and assembly of the resulting nucleotide and amino acid sequences were performed with the DNASTAR software package, and manual refinement was done when needed.

RESULTS

Available data on the frequency of resistance alleles in field populations without a history of previous spraying remain scarce, and the lack of baseline information is one of the most limiting factors to evaluate resistance selection and to introduce management strategies. For this reason, an AS-PCR assay for the detection of *cqm1_{REC}*, designed and evaluated previously (4), was applied to identify genotypes of *C. quinquefasciatus* larvae from nontreated populations of RMA. First, *B. sphaericus* susceptibility was investigated in field populations from IPO and JAB using *in vivo* bioassays. Multiple dose-response assays showed that larvae from both samples were susceptible since only a discrete increase in the LC_{50} , with a resistance ratio (RR) around 3- and 4-fold for IPO and JAB, respectively, was observed and the LC_{90} showed similarities with the reference colony (Table 1). Diagnostic dose bioassays were also performed in an attempt to identify larva survivors from a high concentration of *B. sphaericus* that could potentially be homozygous-allele-resistant individuals. Samples of 1,680 and 720 larvae for IPO and JAB, respectively, were individually exposed, and there was no detection of survivors from these bioassays. Full mortality was already achieved after 24 h of *B. sphaericus* exposure in the treated groups, while the nontreated larvae from

TABLE 2 Frequency of *cqm1* alleles determined by PCR^a

Sample	Yr	Total no. of larvae	No. of larvae with genotype and frequency of each allele											
			<i>cqm1</i>			<i>cqm1_{REC}</i>			<i>cqm1_{REC-D16}</i>			<i>cqm1_{REC-D25}</i>		
			SS	SR	RR	F	SR	RR	F	SR	RR	F		
IPO	2010	501	498	3	0	0.003	0	0	0	0	0	0	0	
JAB	2010	510	507	1	0	0.001	1	1	0.003	0	0	0	0	
ROD	1999	230	222	8	0	0.017	0	0	0	0	0	0	0	
AZE	1999	240	236	1	0	0.002	3	0	0.006	0	0	0	0	
AGU	2010	269	252	14	2	0.033	0	0	0	1	0	0.002	0.002	

^a Frequency of *cqm1* alleles in *Culex quinquefasciatus* larvae from four nontreated populations (IPO, JAB, ROD, AZE), as well as one treated population exposed to *B. sphaericus* (AGU). SS, homozygous for *cqm1*; SR and RR, heterozygous or homozygous for one of the resistance (*r*) alleles, respectively; F, allele frequency.

the control groups showed 2.9 and 1.7% mortality for IPO and JAB, respectively, after the standard period of 48 h of exposure. ROD and AZE larva susceptibilities were not analyzed since these samples were collected in 1999 and stored at -70°C without further evaluation.

The AS-PCR performed in this study is based on the fact that according to the size of the DNA fragment amplified, using two primers flanking the 19-nt deletion which characterizes the *cqm1_{REC}* allele, it is possible to identify fragments derived from either *cqm1* or the *cqm1_{REC}* resistant allele, corresponding to 208 or 189 bp, respectively (4). Here we define *cqm1* as all alleles other than *cqm1_{REC}*, taking into account that it is not possible to exclude the existence of unknown resistance mutations which are located outside the region under evaluation or do not alter the size of the amplified fragment. All populations analyzed here, which had no history of *B. sphaericus* spraying, nonetheless showed the presence of the *cqm1_{REC}* allele. Frequencies of 0.003, 0.001, and 0.002 were detected in IPO, JAB, and AZE, respectively, whereas ROD showed a higher frequency of 0.017 (Table 2). In these populations, the *cqm1_{REC}* allele was always found in heterozygous individuals, whereas most individuals were homozygous for the *cqm1* allele (Fig. 1; Table 2).

Screening for the *cqm1_{REC}* allele involved sequencing of all amplified diagnostic fragments (<208 bp) potentially corresponding to this allele in order to confirm their identity. The analysis of the resulting sequences revealed not only the targeted *cqm1_{REC}* 19-nt deletion but also a second deletion located in the same region encompassed by the amplified fragment. The new polymorphism found in these nontreated populations consists of a 16-nt deletion

(nt 1306 to 1321), located 12 nucleotides downstream of the *cqm1_{REC}* deletion (nt 1276 to 1294), and this allele was denominated *cqm1_{REC-D16}* (Fig. 2). Visual inspection of diagnostic fragments provided by AS-PCR does not allow a reliable distinction between products amplified from *cqm1_{REC}* or *cqm1_{REC-D16}* alleles (Fig. 1). The *cqm1_{REC-D16}* allele was detected in both JAB and AZE samples. In JAB, its frequency of 0.003 was based on the finding of one heterozygote and one homozygote larva sample for this allele detected among 510 individuals analyzed, whereas in AZE, its frequency was 0.006, carried by only one heterozygous larva sample found among 240 larva samples (Table 2). The frequency of each *cqm1_{REC}* or *cqm1_{REC-D16}* allele in 1,481 larva samples from all nontreated populations was 0.004 or 0.002, respectively, while the frequency of both was 0.006.

The DNA segment where the two deletions described above were found may be a hot spot for these kinds of mutations since a third deletion was detected in individuals from AGU, a treated area exposed to *B. sphaericus*. Resistance ratios for AGU larvae were 6- and 1.7-fold at LC₅₀ and LC₉₀, respectively. The AS-PCR screening based on a sample of 269 larvae showed a frequency of 0.033 for *cqm1_{REC}*, and this allele was carried by heterozygous and homozygous larvae. The sequence analysis of the set of smaller-sized diagnostic fragments amplified from this AGU sample showed, besides the fragments containing the 19-nt deletion, one heterozygous individual for an allele containing a 25-nt deletion encompassing the 19-nt deletion for the *cqm1_{REC}* allele, plus the six subsequent bases (Fig. 2). The allele presenting this new deletion, comprising nucleotides 1276 to 1300, was denominated *cqm1_{REC-D25}*, and visual inspection of the corresponding fragment generated by AS-PCR also does not allow a reliable distinction compared to alleles containing the *cqm1_{REC}* or *cqm1_{REC-D16}* deletion (Fig. 1).

The DNA extracted from larvae carrying the *cqm1_{REC-D16}* allele was used for cloning and sequencing of the entire *cqm1* coding sequence in order to confirm its identity and analyze the whole sequence. For this purpose, 45 clones from 5 larva samples were analyzed, and among them, 21 were positive for the *cqm1_{REC-D16}* allele. The final sequence from the individuals carrying such a copy contained the two known introns of 50 and 55 bp, with an open reading frame of 1,727 bp in length. A total of 43 other single nucleotide differences were found throughout the sequence. Among them, 7 led to amino acid substitutions in the deduced protein (see Table S2 in the supplemental material); however, none of these is known to be associated with the capacity of Cqm1 to bind Bin toxin. The full-length sequence of the *cqm1_{REC-D25}* allele could not be amplified from

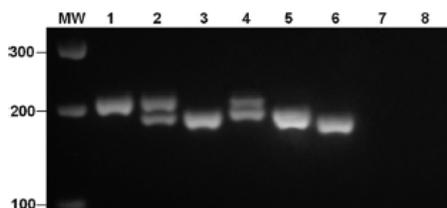


FIG 1 Fragments amplified from alleles of the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* gene. PCR produces profiles of homozygous for *cqm1* (lane 1), heterozygous for *cqm1_{REC}* (lane 2), homozygous for *cqm1_{REC}* (lane 3), heterozygous for *cqm1_{REC-D16}* (lane 4), homozygous for *cqm1_{REC-D16}* (lane 5), and homozygous for *cqm1_{REC-D25}* (lane 6). No fragments were amplified from samples with *Aedes aegypti* DNA (lane 7) or without DNA (lane 8). Molecular size markers (molecular weight [MW]) in base pairs are shown on the left.

Chalegre et al.

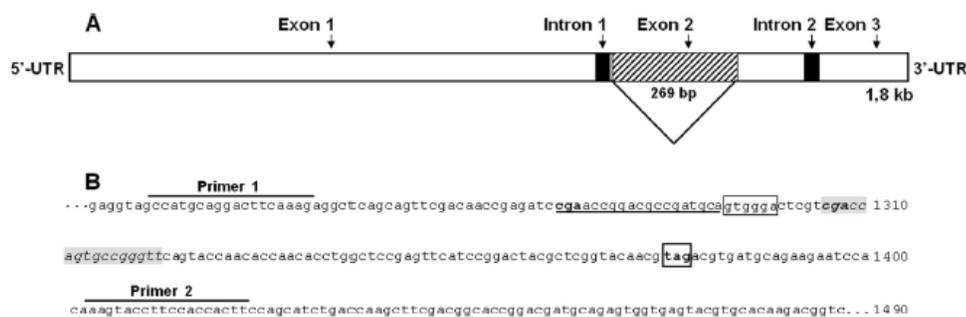


FIG 2 Representation of the *cqm1* gene encoding the Cqm1 receptor in *Culex quinquefasciatus* larvae (GenBank accession number DQ333335). (A) Full-length sequence of 1,848 nucleotides (nt) containing two introns of 50 nt (nt 1169 to 1218) and 55 nt (nt 1655 to 1709). (B) Nucleotide sequence from the region (nt 1221 to 1490) encompassing the polymorphisms found in alleles from Recife populations are indicated as follows: deletion of 19 nt corresponding to the *cqm1*_{REC} allele is underlined; the six extra bases corresponding to the *cqm1*_{REC-D25} are boxed; and the 16-nt deletion from the *cqm1*_{REC-D16} allele, located 11 bases beyond the 19-nt deletion, is in italics and shaded in gray. Deletions start with a CGA trinucleotide motif in bold. The premature translation stop codon originating from the deletions described here is boxed in bold. For the allele-specific PCR, primers 1 and 2 were used for the 5' and 3' ends, respectively. These deletions were identified based on the sequencing of one strand of multiple DNA clones, which yielded identical results.

the same larva genomic DNA which originally generated the PCR fragment of 183 nt containing the 25-nt deletion. Despite extensive trials using the primers available for amplifying the full-length sequence, and even additional primers designed for this purpose (see Table S1 in the supplemental material), only the wild-type *cqm1* sequences without any deletions were found after analyzing the sequences of over 100 clones. Nevertheless, PCR assays using yet another set of primers (see Table S1, primers F4 and R4) resulted in the amplification of an 889-nt fragment whose sequence contained the 25-nt deletion. This sequence corresponded to about 50% of the full-length gene (positions 506 to 1419) and included the first intron; however, contrary to the sequence established for the *cqm1*_{REC-D16} allele, single nucleotide polymorphisms compared to the previously described *cqm1* sequence (GenBank accession number DQ333335) were not found. Despite the high conservation of this 889-bp fragment, the failure to amplify a full-length copy of the *cqm1*_{REC-D25} allele suggests the existence of polymorphisms in other regions of its sequence which would prevent annealing of the available primers.

The two deletion events found in the *cqm1*_{REC-D16} and *cqm1*_{REC-D25} alleles change the reading frame of the succeeding amino acids, and both originate a premature stop codon at position 1362, which is also the same stop codon created by the 19-nt deletion from the *cqm1*_{REC} allele (Fig. 2). The resulting sequence from *cqm1*_{REC-D16} and *cqm1*_{REC-D25} alleles potentially encodes a truncated (437 amino acids long) protein. Both the 16- and 25-nt deletions can confer resistance, in homozygous individuals for any of these alleles, since they will not code for full GPI-anchored Cqm1 proteins, available in the midgut epithelium for the Bin toxin to bind. Comparative analysis of the three deletion events affecting the *cqm1* gene highlighted the fact that while the 19- and 25-nt deleted segments share the same initial insertion point in the sequence (at nucleotide 1276), all three also start with a common CGA trinucleotide motif.

DISCUSSION

In this study, a DNA screening was performed to detect the *cqm1*_{REC} allele in populations of *C. quinquefasciatus* from the Re-

cife Metropolitan Area (RMA). Susceptibility to *B. sphaericus* in two nontreated populations of IPO and JAB showed that RR values at the LC₅₀ were similar to that of the reference colony, and the slight variations in RRs found at the LC₅₀ are comparable to previous RRs reported for other nontreated mosquito populations, which have demonstrated the existence of natural variations in their *B. sphaericus* susceptibilities (4, 20, 34, 36, 37). The status of two other nontreated populations of ROD and AZE could not be analyzed; nevertheless, they were expected to be susceptible since *B. sphaericus* had not been used in these areas and they were also geographically isolated from the only two exposed areas in RMA at the time the samples were collected (28, 31). The *cqm1*_{REC} allele was found in all nontreated populations analyzed, despite being originally identified in a laboratory-selected colony (4, 29), highlighting the strategic importance of monitoring for this allele in RMA. This result contrasts with those observed for laboratory-selected cadherin alleles associated with Cry1Ac resistance and whose screening in field populations has not led to a positive detection (13, 33). The frequency of the *cqm1*_{REC} allele found among the populations analyzed, which was on the order of 10⁻³ (0.001 to 0.003), is consistent with the previous screening of two nontreated RMA populations (4) and with studies on *Bacillus thuringiensis* (Bt) resistance genes in Lepidoptera that have estimated the initial frequency of such alleles in nonexposed populations as 0.0015 (15). However, the higher frequency observed for the ROD population indicates that variations in pretreatment frequency can occur and should be taken into account for evaluating the resistance risk prior to spraying. Recent surveys of Bt resistance genes in lepidopteran field populations from Bt cotton areas in China also showed a wide range of frequencies from 10⁻⁴ to 10⁻¹ (14, 18, 19, 40, 45), with the latter being considered the first substantial increase in resistance gene frequency among the areas under study. The treated population of AGU evaluated here showed a higher *cqm1*_{REC} frequency than those from the nontreated populations, which is consistent with *B. sphaericus* exposure in that area. However, this frequency has not increased compared to previous screenings performed in AGU (4, 32), suggesting that the selection pressure might be low. This could be related with the introduction of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (*B. thurin-*

giensis subsp. *israelensis*) to replace *B. sphaericus* in certain stages of this control program (C. M. F. Oliveira, personal communication). Considering that *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* does not display cross-resistance with *B. sphaericus* and it is able to eliminate resistant genotypes (27, 36, 43), this could be one reason for reducing the selection pressure in that area.

Molecular biology-based methods can be useful for monitoring early selection of resistance in field populations since known resistance alleles carried by heterozygous individuals can be directly identified. Screening performed in this study revealed two novel polymorphisms in the *cqm1* gene, 16- and 25-nt deletions found at the same region which encompasses the 19-nt deletion originally found in *cqm1*_{REC}. The finding of one homozygous larva sample for *cqm1*_{REC-D16} in the JAB population was not expected, considering its status of being a nontreated population, since data from a previous screening of *B. sphaericus* and Bt resistance alleles have shown such alleles only in heterozygous individuals under such conditions (4, 42, 45). The resistance phenotype conferred by *cqm1*_{REC-D16} and *cqm1*_{REC-D25} alleles could not be experimentally confirmed; nevertheless, the functional effect of these deletions on larva susceptibility is likely similar to that of *cqm1*_{REC} since they all provoke frameshifts and introduce the same premature stop codon in the sequence, which prevents the expression of full-length GPI-anchored proteins (6, 8, 29). Regardless of the fact that the Bin binding epitope on the Cqm1 protein is still unknown, the loss of the GPI anchor prevents its location on the midgut epithelium and, consequently, its function as the Bin toxin receptor.

A comparable situation, involving a wide range of polymorphisms, has been investigated in Lepidoptera cotton pests which display multiple cadherin alleles associated with Cry1Ac toxin resistance (12, 22, 45). To date, 12 cadherin alleles were found to be genetically linked to Cry1Ac toxin resistance, one from a laboratory-selected strain of *Heliothis virescens*, three from *Pectinophora gossypiella*, and eight alleles detected in *Helicoverpa armigera* (the last two species are from field populations) (12, 22, 23, 39, 42, 45). From the functional point of view, many of them are considered null alleles since they are disrupted by events which result in the generation of premature stop codons or aberrant splicing events in their sequences, expected to encode truncated proteins lacking toxin binding sites or the transmembrane domain (39, 42, 45). In these cases, the final result is an inability of the toxin to bind to its target tissue in a fashion similar to that observed for the *cqm1* resistance alleles described here (10, 45). In terms of monitoring tools, DNA screening of cadherin alleles has been considered a complex task due to the diversity and multiple locations of events found over genes that can be as large as 16 kb, as was seen for *H. armigera* (41). In contrast, the *cqm1* gene is around 1.8 kb (29), a size which facilitates its amplification and sequencing and allows DNA screening of coexisting, resistance-linked alleles in field populations.

The finding of novel events in the *cqm1* gene associated to *B. sphaericus* resistance and mapped to the same region where other resistance mutations have been identified suggests the existence of a hot spot for such events. Aside from the polymorphisms recorded in RMA in Brazil, the same gene region is also the target of the mutations which characterize the *cpm1*_{BP} and *cpm1*_{BP-del} resistance alleles, which were found to coexist in a *C. pipiens* population from France (6). Overall, five of six resistance alleles characterized in *cpm1/cqm1* genes have mutations located within this region, and only a single nonsense mutation (T1706A), from the

*cpm1*_{GEO} allele (California), is mapped outside (8). From the evolutionary point of view, further studies are needed in order to clarify the mechanisms responsible for the rise of such events in this specific region of the *cqm1* gene, as well as the impact of these alleles on the biological performance of the targeted insects. Although resistance in individuals from the CqRL1/2362 colony was related to a discrete reduction of some biological parameters (9), this colony has been maintained in the laboratory for more than 10 years and recent data have shown that the *cqm1*_{REC} allele is able to compete with *cqm1*, at least under laboratory conditions (1). Similarly, cadherin genes, in view of null alleles found associated with Cry1Ac resistance, do not seem to be essential for the survival of *H. virescens*, *P. gossypiella*, and *H. armigera* (12, 22, 45). In conclusion, the findings from this work indicate a diversity of polymorphisms for the *cqm1* gene which can lead to a loss of function as the receptor for the *B. sphaericus* Bin toxin. The events behind these polymorphisms, detected in individuals from field populations of RMA, are nevertheless located in a specific region of the *cqm1* gene, which allows for easy screening of the multiple events and is useful for assessing the resistance risk.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by "Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (PAPES)" from Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq Brazil, grant 403488/2008-7), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE Brazil, grant APQ 0427-2.13/08).

We thank Andréa Neves Guedes de Souza and Liliane Barbosa Amorim (CPqAM-FIOCRUZ) for the insectarium support and the Program for Technological Development in Tools for Health PDDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities.

REFERENCES

- Amorim LB, et al. 2010. Stability of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* evaluated by molecular tools. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40:311–316.
- Amorim LB, Oliveira CMF, Rios EM, Regis L, Silva-Filha MHNL. 2007. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure. *Biol. Control* 42:155–160.
- Barbosa RM, Souto A, Eiras AE, Regis L. 2007. Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102:523–529.
- Chalegre KD, et al. 2009. Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1044–1049.
- Charles JF, Nielsen-LeRoux C, Delecluse A. 1996. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 451–472.
- Darboux I, Charles JF, Pauchet Y, Warot S, Pauron D. 2007. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cell. Microbiol.* 9:2022–2029.
- Darboux I, Nielsen-LeRoux C, Charles JF, Pauron D. 2001. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31:981–990.
- Darboux I, et al. 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:5830–5835.
- de Oliveira CM, Filho FC, Beltran JE, Silva-Filha MH, Regis L. 2003. Biological fitness of a *Culex quinquefasciatus* population and its resistance to *Bacillus sphaericus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 19:125–129.
- Fabrick JA, Mathew LG, Tabashnik BE, Li X. 2011. Insertion of an intact CR1 retrotransposon in a cadherin gene linked with Bt resistance in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella*. *Insect Mol. Biol.* 20:651–665.
- Ferré J, Van Rie J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47:501–533.

Chalegre et al.

12. Gahan LJ, Gould F, Heckel DG. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293:857–860.
13. Gahan LJ, Gould F, Lopez JD, Jr, Micinski S, Heckel DG. 2007. A polymerase chain reaction screen of field populations of *Heliothis virescens* for a retrotransposon insertion conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Econ. Entomol.* 100:187–194.
14. Gao Y, Wu K, Gould F. 2009. Frequency of Bt resistance alleles in *H. armigera* during 2006–2008 in Northern China. *Environ. Entomol.* 38:1336–1342.
15. Gould F, et al. 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:3519–3523.
16. Heckel DG, et al. 2007. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.* 95:192–197.
17. Lacey LA. 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23:133–163.
18. Liu F, et al. 2008. Resistance allele frequency to Bt cotton in field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in China. *J. Econ. Entomol.* 101:933–943.
19. Liu F, et al. 2010. Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. *Pest Manag. Sci.* 66:155–161.
20. Liu H, Cupp EW, Guo A, Liu N. 2004. Insecticide resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus*. *J. Med. Entomol.* 41:946–952.
21. Melo-Santos MA, Araujo AP, Rios EM, Regis L. 2009. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. *Biol. Control* 49:186–191.
22. Morin S, et al. 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:5004–5009.
23. Morin S, et al. 2004. DNA-based detection of Bt resistance alleles in pink bollworm. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34:1225–1233.
24. Nielsen-Leroux C, Charles JF. 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.* 210:585–590.
25. Nielsen-Leroux C, et al. 2002. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west Mediterranean countries. *J. Med. Entomol.* 39:729–735.
26. Oliveira CM, et al. 2004. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. *J. Med. Entomol.* 41:58–64.
27. Pei G, et al. 2002. A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3003–3009.
28. Regis L, et al. 1995. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90:115–119.
29. Romão TP, et al. 2006. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its alpha-glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS J.* 273:1556–1568.
30. Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF. 1999. 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.* 29:711–721.
31. Silva-Filha MH, Regis L, Oliveira CM, Furtado AE. 2001. Impact of a 26-month *Bacillus sphaericus* trial on the preimaginal density of *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Recife, Brazil. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 17:45–50.
32. Silva-Filha MHNL, et al. 2008. *Culex quinquefasciatus* field populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. *Biol. Control* 44:227–234.
33. Tabashnik BE, et al. 2006. DNA screening reveals pink bollworm resistance to Bt cotton remains rare after a decade of exposure. *J. Econ. Entomol.* 99:1525–1530.
34. Vasquez MI, Violaris M, Hadjivassilis A, Wirth MC. 2009. Susceptibility of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) field populations in Cyprus to conventional organic insecticides, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and methoprene. *J. Med. Entomol.* 46:881–887.
35. WHO. 1985. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. TDR/BCV/SPHAERICUS/85.3.1–24. WHO, Geneva, Switzerland.
36. Wirth MC. 2010. Mosquito resistance to bacterial larvicidal toxins. *Open Toxinology J.* 3:101–115.
37. Wirth MC, Ferrari JA, Georghiou GP. 2001. Baseline susceptibility to bacterial insecticides in populations of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from the Mediterranean Island of Cyprus. *J. Econ. Entomol.* 94:920–928.
38. Wirth MC, Georghiou GP, Malik JI, Abro GH. 2000. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. *J. Med. Entomol.* 37:534–540.
39. Xu X, Yu L, Wu Y. 2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac [delta]-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:948–954.
40. Xu Z, et al. 2009. Using an F(2) screen to monitor frequency of resistance alleles to Bt cotton in field populations of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag. Sci.* 65:391–397.
41. Yang Y, Chen H, Wu S, Xu X, Wu Y. 2006. Identification and molecular detection of a deletion mutation responsible for a truncated cadherin of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36:735–740.
42. Yang Y, Chen H, Wu Y, Wu S. 2007. Mutated cadherin alleles from a field population of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6939–6944.
43. Yuan ZM, Pei GF, Regis L, Nielsen-Leroux C, Cai QX. 2003. Cross-resistance between strains of *Bacillus sphaericus* but not *B. thuringiensis israelensis* in colonies of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Med. Vet. Entomol.* 17:251–256.
44. Yuan ZM, Zhang YM, Cai QX, Liu EY. 2000. High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. *Biocontrol Sci. Technol.* 10:41–49.
45. Zhao J, Jin L, Yang Y, Wu Y. 2010. Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40:113–118.