

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Saúde Pública

Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo

**BASE MOLECULAR DA INTERAÇÃO DA TOXINA
BINÁRIA DO BIOLARVICIDA *Bacillus sphaericus* COM
 α -GLICOSIDASES DE LARVAS DE CULICÍDEOS
VETORES**

RECIFE

2010

TATIANY PATRÍCIA ROMÃO POMPÍLIO DE MELO

Base molecular da interação da toxina binária do biolarvicida *Bacillus sphaericus* com α -glicosidases de larvas de culicídeos vetores

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

2010

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

M528b Melo, Tatiany Patrícia Romão Pompílio de.

Base molecular da interação da toxina binária do biolarvicida *Bacillus sphaericus* com α -glicosidases de larvas de culicídeos vetores/ Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo. — Recife: T. P. Romão, 2010.

136 f.: il.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

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

1. *Bacillus sphaericus*. 2. Toxina bin. 3. Receptor. 4. *Culex*. 5. *Aedes*. I. Silva Filha, Maria Helena Neves Lobo. II. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de. III. Título.

CDU 614.449

TATIANY PATRÍCIA ROMÃO POMPÍLIO DE MELO

Base molecular da interação da toxina binária do biolarvicida *Bacillus sphaericus* com α -glicosidases de larvas de culicídeos vetores

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.

Data de aprovação: 09/07/2010

BANCA EXAMINADORA

Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
(Membro externo)

Dra. Cássia Docena
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
(Membro externo)

Dra. Cláudia Fontes
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
(Membro interno)

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

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

*Ao meu marido Osvaldo Pompílio e filhos
Caio, Lara e Luísa, amores de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu amado marido pelo amor, incentivo, companheirismo, amizade, paciência, dedicação e orientação indispensáveis a cada novo desafio em todos os nossos momentos pessoais e profissionais. Aos meus filhos queridos Caio, Lara e Luísa pela carinhosa e alegre presença em minha vida.

À minha mãe, Rosilene, meu pai, Maucílio e ao meu irmão, Tarcísio, pelo apoio e carinho.

À minha orientadora, Dra. Maria Helena, pelos ensinamentos, dedicação, paciência e exemplar e admirável orientação. Pelo comprometimento e apoio com este projeto e pela oportunidade de fazer parte da sua equipe.

À Dra. Constância Ayres e Dr. André Furtado por me introduzirem na pesquisa científica, etapa fundamental na minha formação. Serei eternamente grata.

Ao Dr. Osvaldo Pompílio, pela co-orientação e contribuição indispensáveis para o desenvolvimento da tese.

Ao MSc. Diogo Chalegre, amigo verdadeiro e irmão, pela singela presença em minha vida. Desejo-lhe sucesso em todos os momentos de sua vida.

À MSc. Lígia Ferreira, pela valiosa amizade, companheirismo e contribuição experimental, fundamental na finalização do trabalho. Desejo-lhe prosperidade e felicidade.

À estudante de iniciação científica, Maria da Conceição, pela amizade, contribuição experimental e pela oportunidade de lhe co-orientar. Desejo-lhe sorte e prosperidade no caminho que irá trilhar.

À equipe do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM, Dra. Cássia Docena e Viviane, pela contribuição com o sequenciamento das amostras de DNA utilizadas no estudo.

A todos que fazem parte do Depto. de Entomologia, pela contribuição experimental na realização desta tese e pelos momentos agradáveis no dia-a-dia de trabalho.

Aos colegas do Departamento de Microbiologia pela ajuda com os experimentos e pela disponibilização de equipamentos e materiais.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela infra-estrutura e ao CNPq, CAPES pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos membros da banca pela valiosa contribuição na avaliação da tese.

A todos que, embora não citados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta tese.

*“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente,
mas o que melhor se adapta às mudanças”*

Charles Darwin

ROMÃO, Tatiany Patrícia. **Base molecular da interação da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* cepa 2362 com α -glicosidases de larvas de culicídeos vetores.** 2010. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

RESUMO

O principal fator larvicida do *Bacillus sphaericus* (Bs) para culicídeos é a toxina binária (Bin), produzida sob a forma de um cristal, durante a esporulação. Esta toxina, ativada por meio da ação de proteases no lúmen intestinal, reconhece e liga-se a receptores específicos no intestino de larvas por meio de sua subunidade BinB, etapa crítica no seu modo de ação e essencial para a atividade larvicida. Os receptores em *Culex pipiens*, *C. quinquefasciatus* e *Anopheles gambiae*, denominados Cpm1, Cqm1, e Agm3, respectivamente, são α -glicosidases de 66 kDa ligadas à membrana apical do epitélio intestinal por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Larvas de *Aedes aegypti* expressam a α -glicosidase Aam1, ortóloga ao receptor Cqm1 que, no entanto, não apresenta capacidade de ligação à toxina Bin. O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar a base molecular da interação da toxina Bin do Bs com α -glicosidases em larvas de culicídeos vetores. Para tal, a sequência protéica de Cqm1 foi alinhada a sequências ortólogas e parálogas de *Ae. aegypti* e *An. gambiae*, o que indicou trechos mais conservados na porção N-terminal e divergentes na porção C-terminal. A análise funcional de fragmentos protéicos de 45 kDa da porção N-terminal de proteínas ortólogas e parálogas à Cqm1 sugeriu que o epitopo de ligação à toxina Bin está potencialmente localizado nesta região e que o estado conformacional nativo das proteínas é determinante para sua funcionalidade. Em seguida, foram avaliadas algumas características das α -glicosidases Cqm1 e Aam1 de 66 kDa que podem estar envolvidas na sua capacidade de ligação à toxina Bin. Os resultados mostraram que as proteínas possuem diferenças estruturais e conformacionais que podem ter um papel determinante para a interação com a toxina Bin. A análise do padrão de glicosilação das proteínas revelou que a Aam1 possui glicosilações em sua cadeia polipeptídica ao contrário da Cqm1 e que a ligação do receptor Cqm1 à toxina Bin não envolve N-glicanos. Na segunda parte do trabalho, foram investigados os motivos da subunidade BinB envolvidos na interação com o receptor Cqm1, através do estudo da funcionalidade de proteínas BinB mutantes com deleções nas regiões N- e C-terminal ou substituições de blocos de aminoácidos por alaninas. Os resultados obtidos indicam que o epitopo ¹⁴⁷FQF¹⁴⁹ da toxina é essencial a ligação ao receptor Cqm1 e que esta interação depende ainda do segmento N-terminal da BinB, compreendendo os primeiros 82 aminoácidos, uma região predita de segmentos não estruturados e de α -hélices.

Palavras-chave: *Bacillus sphaericus*, toxina Bin, receptor, *Culex*, *Aedes*.

ROMÃO, Tatiany Patrícia. **Molecular basis for the interaction of the *Bacillus sphaericus* (strain 2362) Bin toxin with α -glucosidases in larvae from culicid vectors.** 2010. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

ABSTRACT

The main insecticidal factor from *Bacillus sphaericus* (Bs) against culicid larvae, is the binary (Bin) toxin, produced as crystalline inclusions during sporulation. This toxin, activated through proteolytic processing within the midgut lumen, recognizes and binds to specific receptors on larvae midgut epithelium, a critical stage in its mode of action and essential for its insecticidal activity. The receptors in *Culex pipiens*, *C. quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae*, named Cpm1, Cqm1, and Agm3, respectively, are 66-kDa α -glucosidases bound to the apical membranes of the midgut epithelium through glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) anchors. Aam1, a Cqm1 orthologue expressed in the midgut of *Aedes aegypti* larvae, however, does not bind to the Bin toxin. The major goal of this study was to characterize the molecular basis of the interaction between Bin toxin and its culicid larvae α -glucosidases. First, the Cqm1 protein sequence was aligned to orthologue and paralogue sequences from *Ae. aegypti* and *An. gambiae*, which revealed more conservation within the N-terminal region when compared to their less conserved C-terminal segments. Functional analyses of 45 kDa recombinant protein fragments derived from the N-terminus of Cqm1 orthologues and paralogues revealed that the Bin binding motif is potentially located in this region and that proper protein folding is required for Bin toxin to bind. Next, features involved in the Bin toxin binding capacity of the native 66 kDa Cqm1 and Aam1 proteins were evaluated. The results showed that these proteins have structural and conformational differences that may have a decisive role for the Bin interaction. Deglycosylation analyses showed that native Aam1, but not Cqm1, is glycosylated and that N-glycans are not involved in the interaction capacity between Bin toxin and its Cqm1 receptor. In a second set of experiments, the motifs within the BinB subunit required to bind Cqm1 were investigated through binding studies with mutants BinB proteins containing N-terminal or C-terminal deletions or, alternatively, after site-directed mutagenesis which replaced blocks of amino acid residues with alanines. The results indicate that the epitope ¹⁴⁷FQF¹⁴⁹ is essential for BinB toxin binding to Cqm1 and that this interaction depends also on the presence of BinB's N-terminal segment, comprising its first 82 residues, a region predicted to consist of non-structured elements and α -helices.

Key Words: *Bacillus sphaericus*, Bin toxin, receptor, *Culex*, *Aedes*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<i>Página</i>
Figura 1. Ciclo biológico de culicídeos vetores	29
Figura 2. Micrografia eletrônica do <i>Bacillus sphaericus</i> em fase de esporulação	31
Figura 3. Modo de ação da toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i> em larvas de <i>Culex</i> sp.	34
Figura 4. Representação esquemática do receptor Cqm1 da toxina Bin em <i>Culex quinquefasciatus</i>	36
Figura 5. Análise de α -glicosidases presentes em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> sensíveis (S) e resistentes (R) ao <i>Bacillus sphaericus</i>	41
Figura 6. Representação esquemática da estrutura protéica da toxina Cry4Ba	42
Figura 7. Modelo do modo de ação das toxinas Cry e Cyt	43
Figura 8. Representação esquemática dos receptores da toxina Cry1A	45
Figura 9. Representação esquemática da avaliação da capacidade de ligação de α -glicosidases de culicídeos à proteína BinB da toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i>	53
Figura 10. Representação esquemática dos ensaios para determinação do motivo de ligação na proteína BinB da toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i> ao receptor Cqm1 de <i>Culex quinquefasciatus</i>	54

Figura 11. Principais procedimentos de clonagem dos fragmentos gênicos correspondentes a porção N-terminal de 45 kDa das proteínas ortólogas e parálogas à Cqm1 no plasmídeo de expressão pRSETc	61
Figura 12. Principais procedimentos de construção do cDNA do gene <i>cqm1</i> e clonagem no vetor de expressão pRSETc	62
Figura 13. Principais procedimentos de clonagem do gene <i>binB</i> no vetor de expressão pGEX4T3	67
Figura 14. Principais etapas do protocolo de mutagênese sítio dirigida da construção plasmidial gene <i>binB</i> clonado no vetor de expressão pGEX4T3 utilizando o kit de mutagênese sítio-dirigida QuikChange® (Stratagene)	69
Figura 15. Diagrama da localização dos códons de parada prematuros e sítios restrição para a endonuclease BamH I nas proteínas BinB mutantes truncadas	69
Figura 16. Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos das proteínas homólogas à α -glicosidase Cqm1, receptor da toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i> em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	77
Figura 17. Amplificação dos fragmentos gênicos <i>aam1</i> , <i>aam2</i> e <i>aam3</i> de <i>Aedes aegypti</i> e <i>agm4</i> e <i>agm5</i> de <i>Anopheles gambiae</i> e expressão das proteínas recombinantes Rec-45 kDa Cqm1, Aam1, Agm3, Aam2, Aam3, Agm4, Agm5 e da proteína controle Lm4A1 de <i>Leishmania major</i>	79
Figura 18. Ensaio de afinidade entre as proteínas recombinantes Cqm1-Rec45 de <i>Culex quinquefasciatus</i> (controle positivo), Aam1, Aam2 e Aam3-Rec45 de <i>Aedes aegypti</i> e Agm3, Agm4, Agm5-Rec45 de <i>Anopheles gambiae</i> e Lm4A1 de <i>Leishmania major</i> (controle negativo) e a subunidade BinB do <i>Bacillus sphaericus</i> , imobilizada em resina de sefarose	80

Figura 19. Proteínas Aam1- ³⁵ S e Cqm1- ³⁵ S de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> produzidas em células de lisado de reticulócito de coelho, separadas em SDS-PAGE a 10% e visualizadas por autoradiografia	82
Figura 20. Ensaio de <i>pull-down</i> entre as proteínas Cqm1- ³⁵ S e Aam1- ³⁵ S e a subunidade BinB da toxina Bin imobilizada em resina	82
Figura 21. Análise das proteínas Cqm1 e Aam1 obtidas de preparações de <i>microvilli</i> intestinal de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> e <i>Aedes aegypti</i>	83
Figura 22. Imunodeteção das proteínas Cqm1 e Aam1 em extratos-CHAPS de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> e <i>Aedes aegypti</i> tratados com a enzima PNGase F e avaliação funcional através de ensaios de <i>pull down</i>	84
Figura 23. Imunodeteção das proteínas recombinantes Cqm1-Sf9 e Aam1-Sf9 secretadas (S) e de membrana (M) expressas em células de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9) com o anticorpo anti-Cqm1	86
Figura 24. Imunodeteção dos ensaios de <i>pull-down</i> realizados entre as proteínas recombinantes Cqm1-Sf9-S e Aam1-Sf9-S e a subunidade BinB-Rec imobilizada em resina de glutationa com o anticorpo anti-Cqm1	86
Figura 25. Clonagem, expressão e avaliação de funcionalidade da proteína BinB, subunidade da toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i>	88
Figura 26. Alinhamento das sequências de aminoácidos das subunidades BinA e BinB da toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i>	89
Figura 27. Representação esquemática das proteínas mutantes da subunidade BinB do <i>Bacillus sphaericus</i> geradas por mutagênese sítio dirigida	89
Figura 28. Proteínas BinB mutantes truncadas separadas em SDS-PAGE a 10%	90

- Figura 29.** Ensaios de *pull-down* entre as proteínas mutantes BinB truncadas imobilizadas em resina e extratos-CHAPS de *Culex quinquefasciatus*, para avaliar sua capacidade de interação com o receptor Cqm1 91
- Figura 30.** Proteínas BinB mutantes em trincas de aminoácidos purificadas e dialisadas, separadas por SDS-PAGE a 10% corado com azul de comassie 92
- Figura 31.** Ensaios de *pull-down* entre as proteínas BinB mutantes em trincas de aminoácidos imobilizadas em resina e extrato-CHAPS de *Culex quinquefasciatus* com o receptor Cqm1 93
- Figura 32.** Ensaio de competição entre a toxina Bin do *Bacillus sphaericus* radiomarcada (Bin-I¹²⁵) e preparações de *microvilli* intestinal de larvas de *Culex quinquefasciatus*, na ausência ou na presença de um excesso de competidores não marcados: toxina Bin, subunidade BinB-GST, subunidades BinB contendo mutações (MutFQF, MutSKK MutRAV MutYRM MutYNL, MutTSL) 94
- Figura 33.** Curva de competição entre a toxina Bin do *Bacillus sphaericus* radiomarcada (Bin-I¹²⁵) e preparações de *microvilli* intestinal de larvas de *Culex quinquefasciatus*, na presença de concentrações crescentes de competidores não marcados: toxina Bin, subunidade BinB-Rec, e subunidade BinBMutFQF 95
- Figura 34.** Separação eletroforética dos fragmentos amplificados por PCR a partir do gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus*, em gel de agarose a 1,5% 96

LISTA DE TABELAS

	<i>Página</i>
Tabela 1. Colônias de <i>Culex</i> sp. selecionadas sob condições de laboratório (Lab) ou populações de campo expostas ao tratamento com o <i>Bacillus sphaericus</i> que apresentaram alterações na susceptibilidade a este agente	39
Tabela 2. Receptores de toxinas inseticidas Cry do <i>Bacillus thuringiensis</i> presentes no epitélio intestinal de larvas de lepidópteros	46
Tabela 3. Receptores de toxinas inseticidas Cry do <i>Bacillus thuringiensis</i> presentes no epitélio intestinal de larvas de culicídeos	46
Tabela 4. Motivos de ligação envolvidos na interação das toxinas Cry do <i>Bacillus thuringiensis</i> e seus receptores específicos em espécies de lepidópteros e dípteros	48
Tabela 5. Sequências ortólogas e parálogas à proteína Cqm1 (ABC59609.1) de <i>Culex quinquefasciatus</i> , de <i>Aedes aegypti</i> (Aam1, 2 e 3) e de <i>Anopheles gambiae</i> (Agm3, 4 e 5)	59
Tabela 6. Oligonucleotídeos desenhados a partir das sequências gênicas, ortólogas e parálogas ao receptor Cqm1 de <i>Culex quinquefasciatus</i> , de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Anopheles gambiae</i>	60
Tabela 7. Oligonucleotídeos desenhados a partir das sequências dos genes <i>cqm1</i> e <i>aam1</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i> e de <i>Aedes aegypti</i> , respectivamente	62
Tabela 8. Oligonucleotídeos desenhados a partir das sequências gênicas do receptor da toxina Bin em <i>Culex quinquefasciatus</i> (Cqm1) e de sua ortóloga (Aam1) em <i>Aedes aegypti</i> , utilizados na reação de sequenciamento	63

Tabela 9. Oligonucleotídeos desenhados a partir das construções plasmidiais dos cDNAs <i>cqm1</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i> e <i>aam1</i> de <i>Aedes aegypti</i> clonados em pGEM3Zf+ com as sequências Kosak mutagenizadas	65
Tabela 10. Associações de oligonucleotídeos e os respectivos fragmentos gênicos gerados para a expressão das proteínas Cqm1 e Aam1 solúvel (S) e de membrana (M)	66
Tabela 11. Oligonucleotídeos desenhados a partir do gene <i>binB</i> que codifica a subunidade BinB da toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i>	67
Tabela 12. Oligonucleotídeos utilizados para mutagênese sítio dirigida da proteína BinB do <i>Bacillus sphaericus</i> para obtenção de proteínas BinB recombinantes com porções das regiões N- e/ou C-terminais removidas	70
Tabela 13. Oligonucleotídeos utilizados para mutagênese sítio dirigida da proteína BinB do <i>Bacillus sphaericus</i> para a obtenção de proteínas BinB recombinantes com trinca de aminoácidos substituídas por alaninas	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aam1, 2 e 3	<i>Aedes aegypti</i> maltase 1, 2 e 3
Agm3, 4 e 5	<i>Anopheles gambiae</i> maltase 3, 4 e 5
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i> - Fosfatase alcalina
APN	Aminopeptidase-N
BB3	<i>Binding buffer</i> 3 - Tampão de ligação 3
BBMF	<i>Brush border membrane fractions</i> - Frações de membrana de <i>microvilli</i> intestinal
Bin	Binária
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> - Albumina sérica bovina
Bs	<i>Bacillus sphaericus</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i>
CADR	Caderina
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropil) dimethylammonio]-1-propanosulfonato
Cpm1	<i>Culex pipiens</i> maltase 1
cpm	Curie por minuto
Cqm1	<i>Culex quinquefasciatus</i> maltase 1
CqSF	Colônia de <i>C. quinquefasciatus</i> sensível ao Bs
CR	<i>Cadherin repeats</i> - Sequências repetitivas de caderina
Cry	Toxina do cristal
Cyt	Toxina citolítica
DDT	Dicloro-difenil-tricloro-etano
DEPC	Dimetil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucléico
E.C.	<i>Enzyme Commission</i> – Comissão de enzimas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> – Proteína fluorescente verde
GPI	Glicosilfosfatidil inositol
GS	Glutaciona sefarose
GST	Glutaciona S-transferase
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico

IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
kDa	Kilodalton
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
Mtx	<i>Mosquitocidal toxin</i> - Toxina mosquitocida
NCBI	National Center for Biotechnology Information – <i>Centro Nacional de Informação Biotecnológica</i>
NP-40	Nonidet P40 [®]
NPT	<i>Núcleo de Plataformas Tecnológicas</i>
pb	<i>Pares de bases</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Tampão fosfato salina
PCR	Polymerase Chain Reaction – <i>Reação em cadeia da polimerase</i>
PM	<i>Peso molecular</i>
PMSF	<i>Fluoreto de fenilmetanilsulfonil</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reverse-transcriptase - Polymerase Chain Reaction – <i>Reação em cadeia da polimerase utilizando a transcriptase reversa.</i>
SDS	Dodecyl sodium sulfate - <i>Dodecil sulfato de sódio</i>
SDS-PAGE	Eletoforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TA	Temperatura ambiente
TBE	<i>Tris – borate</i> – EDTA – Tris - ácido bórico – EDTA
TBS-T	<i>Tris buffered saline</i> - Tween 20 – Tampão Tris salina - Tween 20
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1 Principais doenças transmitidas por mosquitos	24
2.2 Biologia e ecologia de culicídeos vetores	27
2.3 Controle de culicídeos com bactérias entomopatógenas	29
2.4 <i>Bacillus sphaericus</i>	30
2.5 Proteínas inseticidas produzidas pelo <i>Bacillus sphaericus</i>	31
2.6 Modo de ação da toxina binária	33
2.7 Receptores da toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i>	35
2.8 Resistência ao <i>Bacillus sphaericus</i>	37
2.9 Base molecular da resistência à toxina Bin	40
2.10 <i>Bacillus thuringiensis</i>	41
2.11 Receptores de toxinas Cry do <i>Bacillus thuringiensis</i>	44
2.12 Motivos de ligação entre toxinas Cry e seus receptores	47
3 JUSTIFICATIVA	49
4 PERGUNTA CONDUTORA	50
5 HIPÓTESE	51
6 OBJETIVOS	52
6.1 Objetivo geral	52
6.2 Objetivos específicos	52
7 MATERIAL E MÉTODOS	53
7.1 Procedimentos experimentais	53
7.2 Colônias de insetos	55
7.3 Preparações de frações ricas em <i>microvilli</i> intestinal	55
7.4 Frações de proteínas de BBMF solubilizadas	56
7.5 Ensaio de atividade de α -glicosidasas em gel	56
7.6 Ensaio de imunodeteção	56
7.7 Deglicosilação das proteínas Cqm1 e Aam1 nativas	57
7.8 Amplificação de genes homólogos ao Cqm1	58

7.9 Clonagem e expressão de proteínas recombinantes	59
7.9.1 Produção de proteínas ortólogas e parálogas à Cqm1 em <i>Escherichia coli</i>	59
7.9.2 Produção das proteínas Cqm1 e Aam1 em lisado de reticulócito de coelho	61
7.9.3 Produção das proteínas Cqm1 e Aam1 em células Sf9	64
7.9.4 Produção da proteína BinB em <i>Escherichia coli</i>	66
7.10 Mutagênese do gene <i>binB</i>	67
7.11 Ensaio de interação entre proteínas de culicídeos e a toxina Bin	72
7.11.1 Ensaio de afinidade	72
7.11.2 Ensaio de <i>pull-down</i>	73
7.11.3 Ensaio de competição	73
8 RESULTADOS	75
8.1 Caracterização da interação da toxina Bin com α-glicosidases de culicídeos	75
8.1.1 Análise <i>in silico</i> de proteínas ortólogas e parálogas à Cqm1	75
8.1.2 Expressão e funcionalidade das proteínas ortólogas e parálogas à Cqm1 em <i>Escherichia coli</i>	79
8.1.3 Expressão e funcionalidade das proteínas Cqm1 e a Aam1 em lisado de reticulócito de coelho	81
8.1.4 Análise das proteínas Cqm1 e Aam1 nativas	83
8.1.5 Expressão e funcionalidade das proteínas recombinantes Cqm1 e a Aam1 em células Sf9	85
8.2 Determinação do motivo de ligação da subunidade BinB ao receptor Cqm1	87
8.2.1 Expressão e funcionalidade da proteína BinB recombinante	87
8.2.2 Funcionalidade de proteínas BinB recombinantes mutagenizadas truncadas	88
8.2.3 Funcionalidade de proteínas BinB mutagenizadas em trincas de aminoácidos	92
8.3 Resultados suplementares	95
9 DISCUSSÃO	97
10 CONCLUSÕES	106
11 PERSPECTIVAS	107

REFERÊNCIAS	108
APÊNDICE A – Artigo 1	123
APÊNDICE B – Artigo 2	129
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/CPqAM	136

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Espécies dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*, são insetos da ordem Diptera, pertencentes à família Culicidae, apresentam distribuição cosmopolita, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, e podem ser vetores de patógenos humanos responsáveis por enfermidades de elevada incidência como malária, filariose, febre amarela, encefalite e dengue. O controle de vetores é uma estratégia necessária para interromper o ciclo de transmissão destas doenças e um dos importantes métodos é a utilização de larvicidas produzidos a base de bactérias entomopatógenas do gênero *Bacillus*, que têm sido adotados com sucesso em programas de controle de culicídeos. O *Bacillus sphaericus* (Bs) e *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) são os mais estudados, estando disponíveis comercialmente para utilização em larga escala há cerca de duas décadas em vários países. Larvicidas a base do *B. sphaericus* têm sido empregados no controle de populações de *C. quinquefasciatus* em áreas endêmicas para filariose na Região Metropolitana do Recife. O *B. sphaericus* tem sido adotado por apresentar alta atividade larvicida para culicídeos, espectro de ação seletivo sendo inócuo para demais invertebrados e vertebrados, persistência em criadouros de *Culex* que possuem alto teor de matéria orgânica e finalmente pela disponibilidade de produtos comerciais. O uso dos inseticidas químicos em programas de controle de vetores apresenta desvantagens como seleção de resistência já disseminada em populações de insetos, o modo de ação inespecífico e acumulação na biosfera, e estas dificuldades têm incentivado a substituição destes produtos por agentes de controle com atividade inseticida seletiva.

O principal fator inseticida do *B. sphaericus* é a toxina binária (Bin) produzida sob a forma de um cristal que possui ação seletiva para larvas de algumas espécies dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*. A toxina binária larvicida é composta das subunidades BinA e BinB que são produzidas em concentração equimolar no cristal e possuem ação em sinergia, sendo o componente BinB responsável pela ligação com receptores específicos presentes na membrana apical do epitélio intestinal em larvas de culicídeos, e a subunidade BinA responsável pela atividade tóxica. O modo de ação do larvicida à base de *B. sphaericus* consiste na ingestão do cristal pelas larvas, solubilização do cristal e liberação da protoxina no lúmen intestinal, seguido do processamento proteolítico para a forma de toxina ativa. A ação larvicida da toxina Bin é determinada pelo reconhecimento e interação da subunidade BinB com receptores no *microvilli* intestinal das larvas. Larvas de *Culex quinquefasciatus*, *C.*

pipiens e *Anopheles gambiae* são suscetíveis à toxina graças à disponibilidade de receptores no epitélio intestinal, enquanto que *Aedes aegypti*, é considerada uma espécie refratária, devido à ausência de interação da toxina Bin com receptores. A presença de receptores funcionais para a toxina Bin no intestino de larvas é o principal fator que determina o status de susceptibilidade de culicídeos ao *B. sphaericus*. Os receptores da toxina Bin em *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus* e *An. gambiae*, denominados respectivamente Cpm1, Cqm1, e Agm3, são α -glicosidases de 60 kDa ligadas à membrana apical do epitélio intestinal por uma âncora de glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Larvas de *Ae. aegypti* expressam grande quantidade da α -glicosidase Aam1, que é ortóloga do receptor Cqm1 de *C. quinquefasciatus* e possui 70% de identidade com esta molécula. Diferenças entre proteínas Cqm1 e Aam1 podem afetar a capacidade de reconhecimento da toxina Bin e, conseqüentemente, impedir a sua ligação aos receptores, que é uma condição necessária para a ação do *B. sphaericus*. No âmbito dos estudos que objetivam elucidar o modo de ação das proteínas inseticidas das principais bactérias entomopatógenas, o mapeamento de motivos de ligação envolvidos na interação toxina-receptor é um aspecto fundamental para a compreensão de mecanismos de resistência, bem como para desenvolver estratégias visando potencializar a ação das toxinas contra os insetos suscetíveis. A maioria dos trabalhos voltados para a base molecular da interação toxina-receptor referem-se às toxinas Cry do *B. thuringiensis* que possuem ação em insetos praga, entretanto, há uma lacuna no conhecimento sobre a base molecular da interação da toxina Bin aos seus receptores específicos em espécies de culicídeos, apesar da importante aplicação destes agentes inseticidas no controle de vetores.

O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar a base molecular da interação da toxina Bin do *B. sphaericus* com receptores intestinais de larvas de culicídeos vetores, a fim de produzir conhecimentos para subsidiar o aperfeiçoamento da utilização deste biolarvicida. Como um primeiro passo para caracterizar motivos envolvidos na ligação à toxina Bin do *B. sphaericus* na α -glicosidase Cqm1, que atua como receptor em larvas de *C. quinquefasciatus*, foram avaliadas sequências protéicas ortólogas e parálogas em *Ae. aegypti* e *An. gambiae*, as quais revelaram múltiplos trechos conservados na porção N-terminal da maioria destas α -glicosidases e alguns trechos mais divergentes na porção C-terminal. Em seguida, foram avaliadas especificamente as α -glicosidases Cqm1 de *C. quinquefasciatus* e Aam1 de *Ae. aegypti* em busca de características que estariam implicadas na sua capacidade de ligação à toxina Bin, como um modelo de estudo para a elucidação de aspectos importantes envolvidos na interação toxina-receptor. Na segunda parte do trabalho, regiões e epitopos da subunidade

BinB da toxina Bin, envolvidos na ligação ao receptor Cqm1, foram investigados através do estudo da funcionalidade de proteínas BinB mutantes que possuem diferentes deleções em suas sequências ou substituições de blocos de aminoácidos por alaninas. A região na subunidade BinB envolvida no reconhecimento dos receptores de culicídeos ainda não é conhecida e a caracterização deste epitopo bem como de características relevantes para a sua ação representam subsídios importantes para futuras abordagens de manipulação e aperfeiçoamento desta molécula inseticida.

Os objetivos concretizados nesta tese representam um avanço no campo da biologia molecular aplicada à entomologia e a contribuição científica nesta área de conhecimento é fundamental, pois os estudos do modo de ação da toxina Bin ainda são escassos e há um grande potencial de utilização deste agente em programas de controle de culicídeos no Brasil.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Principais doenças transmitidas por mosquitos

Enfermidades de elevada incidência como malária, dengue, febre amarela e filariose, constituem um grave problema de saúde pública e seus agentes etiológicos são transmitidos por algumas espécies de culicídeos pertencentes aos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*. Aproximadamente 75% de todas as espécies de mosquitos ocorrem em regiões tropicais e subtropicais (BECKER, 2003) e devido a sua habilidade de adaptação, estas espécies são extremamente bem sucedidas. Mais da metade da população mundial vive em áreas de risco de infecção devido à presença destes agentes vetoriais (BECKER, 2003).

A malária, causada pelo protozoário *Plasmodium* sp. e transmitida pelo *Anopheles* sp., está presente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Cerca de 50% da população mundial vive em áreas com risco de transmissão, resultando em aproximadamente 300 milhões de pessoas infectadas no mundo e com um número de mortes entre 1 e 1,5 milhões a cada ano. O maior foco de transmissão é na África Sub-Sahariana responsável por 90% dos casos e a maioria dos óbitos ocorrem em áreas remotas com difícil acesso aos serviços de saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). A Organização Mundial de Saúde (2009) estimou que no ano de 2008, ocorreram entre 190 e 311 milhões de casos clínicos de malária, com um milhão de mortos, dentre os quais o maior número de casos foi de crianças africanas. Na América do Sul, a transmissão ocorre principalmente na Bacia Amazônica e em 2008 foram notificados aproximadamente 315.000 casos (BRASIL, 2009b).

Cerca de 400 espécies de anofelinos ocorrem no mundo, das quais 60 podem ser vetores do *Plasmodium* sp. sob condições naturais e, dentre estas, 30 espécies são consideradas de grande importância médica (TUTEJA, 2007). A habilidade deste vetor na transmissão do protozoário *Plasmodium* sp. depende de diferenças genéticas, ecológicas e comportamentais (CONSTANTINI et al., 1999). No Brasil, a principal espécie incriminada na transmissão do parasita da malária na região Amazônica é o *An. darlingi* além de outras secundárias como o *An. albitarsis*, *An. braziliensis* e o *An. nuneztovari* (CONSOLI, 1994). O *An. gambiae*, principal vetor do *P. falciparum* na África, é alvo de vários estudos devido a sua importância epidemiológica e disponibilidade do genoma em bancos de dados.

A dengue, causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus* e transmitida pelo *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*, é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial da Saúde estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectam anualmente, em mais de 100 países, de todos os continentes, exceto na Europa. No Brasil, a partir de 1995, a dengue passou a ser registrada em todas as regiões do país e atualmente circulam os sorotipos 1, 2 e 3 (PASSOS et al., 2004). Em 2002, em decorrência da introdução do dengue vírus sorotipo 3, ocorreu um pico epidêmico com 794.219 casos (BRASIL, 2010). A Secretaria de Vigilância em Saúde do Brasil (SVS/MS) registrou no período de janeiro a julho de 2007, 438.949 casos de dengue clássica, 926 casos de febre hemorrágica da dengue e a ocorrência de 98 óbitos (BRASIL, 2010). No ano de 2008 e em 2009, foram registrados cerca de 18.000 e 6.000 casos confirmados de dengue no Brasil, respectivamente (BRASIL, 2010).

A febre amarela, causada pelo arbovírus do gênero *Flavivirus* e transmitida pelo *Ae. aegypti*, originalmente chamada de febre hemorrágica viral, foi uma das doenças mais temidas antes do desenvolvimento de uma vacina. De dezembro de 2007 a janeiro de 2008, o Ministério da Saúde do Brasil (2009a) informa ter recebido 33 notificações de casos suspeitos de febre amarela. Destes, doze casos foram oficialmente confirmados e oito evoluíram para óbito. No período de um ano, de setembro de 2008 até setembro de 2009, foram notificados 274 casos humanos suspeitos de febre amarela silvestre (FAS), com 51 casos (18,6%) confirmados. Destes, 21 evoluíram para o óbito e a taxa de letalidade foi de 41,2%.

O *Ae. aegypti* é o principal vetor do vírus da dengue, além de poder ser vetor do vírus da febre amarela em áreas urbanas. Vários fatores tornam esta espécie bem sucedida na transmissão do vírus do dengue, dentre elas podemos citar sua elevada endofilia, antropofilia e susceptibilidade aos vírus (CONSOLI, 1994). O dengue vírus é o flavivírus mais importante causador de doenças em humanos no Brasil e a presença do *Ae. aegypti* favorece o aparecimento de novos surtos da doença e a circulação dos sorotipos virais (FOCACCIA; VERONESI, 1996; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2003).

Segundo Wynd et al. (2007), “a filariose linfática é a segunda doença parasitária de transmissão vetorial mais comum depois da malária e está presente em mais de 80 países tropicais e subtropicais”. A filariose Bancroftiana, causada pelo nemátodo *Wuchereria bancrofti*, é endêmica na África, Ásia, Américas do Sul, Central e Ilhas do Pacífico. A Organização Mundial de Saúde (2007) estima que há cerca de 120 milhões de pessoas infectadas e um bilhão de pessoas residentes em áreas de risco. Ainda de acordo com a OMS, a filariose linfática é considerada a segunda causa mais comum de incapacidade em longo

prazo, depois da doença mental. No Brasil, há focos da endemia nas Regiões Metropolitanas do Recife e de Maceió (BONFIM et al., 2003; BRASIL, 2006).

O *C. quinquefasciatus* é o principal transmissor da *W. bancrofti* no Brasil e a filariose Bancroftiana ainda é uma doença endêmica no país, com distribuição urbana e nitidamente focal, sendo detectada transmissão ativa na Região Metropolitana do Recife (RMR), estimando-se em 30 mil o número de indivíduos infectados (FARID et al., 2001; BRASIL, 2007). A RMR apresenta uma alta taxa de prevalência de indivíduos infectados sendo considerada a maior área endêmica do país (MACIEL et al., 1996). O *C. quinquefasciatus* também tem sido incriminado como vetor de arboviroses, e pode ser encontrado naturalmente infectado com vírus causadores de encefalite, como o St. Louis, Oeste do Nilo (nos EUA) e Venezuelana (Panamá) (CONSOLI, 1994). No Brasil, ele é considerado o vetor secundário do vírus Oropouche em áreas do Estado do Pará e Rondônia, onde a doença já causou epidemias rurais (CONSOLI, 1994).

Muitas espécies de *Culex* foram identificadas como vetores primários do vírus do Oeste do Nilo (VNO) em regiões endêmicas do velho mundo (HAYES et al., 1989) e nos Estados Unidos (TURELL; O'GUINN; OLIVER, 2000). As espécies do complexo *Culex pipiens* são consideradas vetores do VNO na América do Norte pelos seguintes fatores: são os mosquitos mais comuns em áreas urbanas (FONSECA et al., 2004); os surtos das doenças ocorrem durante seu período de maior abundância local (SPIELMAN, 2001); apresentam competência vetorial sob condições de laboratório (TURELL et al., 2001); populações naturais foram encontradas infectadas com o vírus (BERNARD et al., 2001; KULASEKERA et al., 2001). Estudos de competência vetorial demonstraram que o *C. tarsalis*, *C. pipiens* e o *C. quinquefasciatus*, são altamente susceptíveis à infecção e podem ser vetores eficientes do VNO (GODDARD et al., 2002). Estas espécies também podem transmitir o vírus transovarianamente (DOHM; SARDELIS; TURELL, 2002; GODDARD et al., 2003). Infecções pelo VNO em humanos foram detectadas em 38 dos 50 estados dos EUA, com 722 casos confirmados e 33 óbitos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010).

2.2 Biologia e ecologia de culicídeos vetores

As espécies, *C. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* e *An. gambiae*, são insetos da ordem Díptera, pertencentes à família Culicidae e possuem importância médica pois podem ser vetores de agentes etiológicos de graves doenças, tais como filariose, dengue, febre amarela, encefalites e malária. Possuem um ciclo biológico relativamente curto, compreendendo as seguintes fases: ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (Figura 1). Os adultos têm hábito noturno ou diurno e endofílico, as fêmeas são hematófagas e necessitam fazer o repasto sanguíneo para realizar a postura dos ovos. As fêmeas realizam a hematofagia em uma grande variedade de animais, sobretudo o homem, no caso das espécies antropofílicas (CONSOLI, 1994). Cerca de 48 h após o repasto sanguíneo, as fêmeas depositam os ovos na lâmina d'água, os quais vão eclodir dando origem às larvas do 1º estádio (L₁), entre 24 e 48 h após a oviposição. As larvas L₁ sofrem mudas sucessivas e passam por mais três estádios (L₂, L₃ e L₄), cada um com duração média de 24 h, até atingir a fase de pupa. É importante ressaltar que as larvas são filtradoras e se alimentam ativamente de matéria orgânica disponível no ambiente aquático (CONSOLI, 1994). As pupas têm uma forma de vírgula e ficam paradas junto à superfície da água, embora apresentem mobilidade nesta fase. Esta etapa do desenvolvimento tem duração entre 24 e 48 h e os indivíduos não se alimentam neste período. Após a fase de pupa, ocorre a emergência dos adultos dando início à fase alada. Os adultos passam por um período de repouso para a esclerotinização da cutícula para, em seguida, realizar a cópula e a busca por alimento. A longevidade dos adultos é de um a dois meses, período em que a fêmea pode realizar entre 4 e 5 oviposições.

O mosquito *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 é conhecido popularmente como muriçoca ou pernilongo e apresenta distribuição cosmopolita, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É um mosquito amplamente encontrado no Brasil, devido às características climáticas, além de fatores como o crescimento populacional desordenado e a falta de saneamento básico que afetam a maioria das áreas urbanas do país (CONSOLI, 1994). Possui ampla diversidade de criadouros, com preferência pelos depósitos artificiais com água estagnada e rica em matéria orgânica em decomposição e detritos como os sistemas de esgoto, fossas e valetas (CONSOLI, 1994). No entanto, outros criadouros podem ser colonizados, tais como bebedouros de animais, poços e caixas d'água (CONSOLI, 1994). É uma espécie altamente antropofílica e endofílica e predomina nas áreas urbanas do Brasil, sendo encontrada com mais frequência nos meses quentes e chuvosos. As fêmeas realizam repasto sanguíneo no período crepuscular ou noturno e depositam cerca de 150 ovos agrupados sob a

forma de jangada. O vetor *Ae. aegypti* Linnaeus, 1762 é considerado uma espécie cosmopolita de ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, e foi introduzido no Brasil no final do século XV, provavelmente em embarcações com os primeiros navegantes europeus. Esta espécie ocorre, sobretudo, em áreas urbanas, geralmente no domicílio ou peridomicílio humano. Seus criadouros preferenciais são os recipientes artificiais em locais com pouca iluminação, que contenham água pobre em matéria orgânica. A densidade populacional do *Ae. aegypti* é diretamente influenciada pela presença de chuvas e densidades elevadas são encontradas nas estações com maiores índices pluviométricos. As fêmeas possuem hábitos hematofágicos diurnos, ao contrário do *C. quinquefasciatus*, porém compartilha com esta espécie a predileção pelo ambiente domiciliar, o que facilita o contato com o homem. A estratégia de oviposição do *Ae. aegypti* é diferente daquela adotada pelo *C. quinquefasciatus*, pois em cada postura as fêmeas depositam ovos isolados, distribuídos em diversos criadouros (CONSOLI, 1994). A espécie *An. gambiae* Giles, 1902 invadiu parte do nordeste brasileiro em 1930 e lá esteve até 1940, causando, entre 1938 e 1939, uma das mais graves epidemias de malária registradas no país (CONSOLI, 1994). Trata-se de um mosquito africano (África Sub-Sahariana), cujas fêmeas são altamente antropofílicas e endofílicas. Suas larvas são normalmente encontradas em pequenas coleções de águas limpas no solo, rasas, pobres em vegetação e expostas ao sol tais como poças d'água, piscinas e poços. As cacimbas, poços rasos feitos pelos nordestinos para a obtenção de água, constituíram importantes focos desse mosquito durante sua permanência no Brasil (CONSOLI, 1994). As fêmeas possuem hábitos hematofágicos crepusculares ou noturnos e depositam cerca de 50 a 200 ovos (CONSOLI, 1994). Esta espécie é considerada a mais antropofágica dentro do complexo *An. gambiae* e a mais eficiente e importante espécie vetora da malária no mundo.

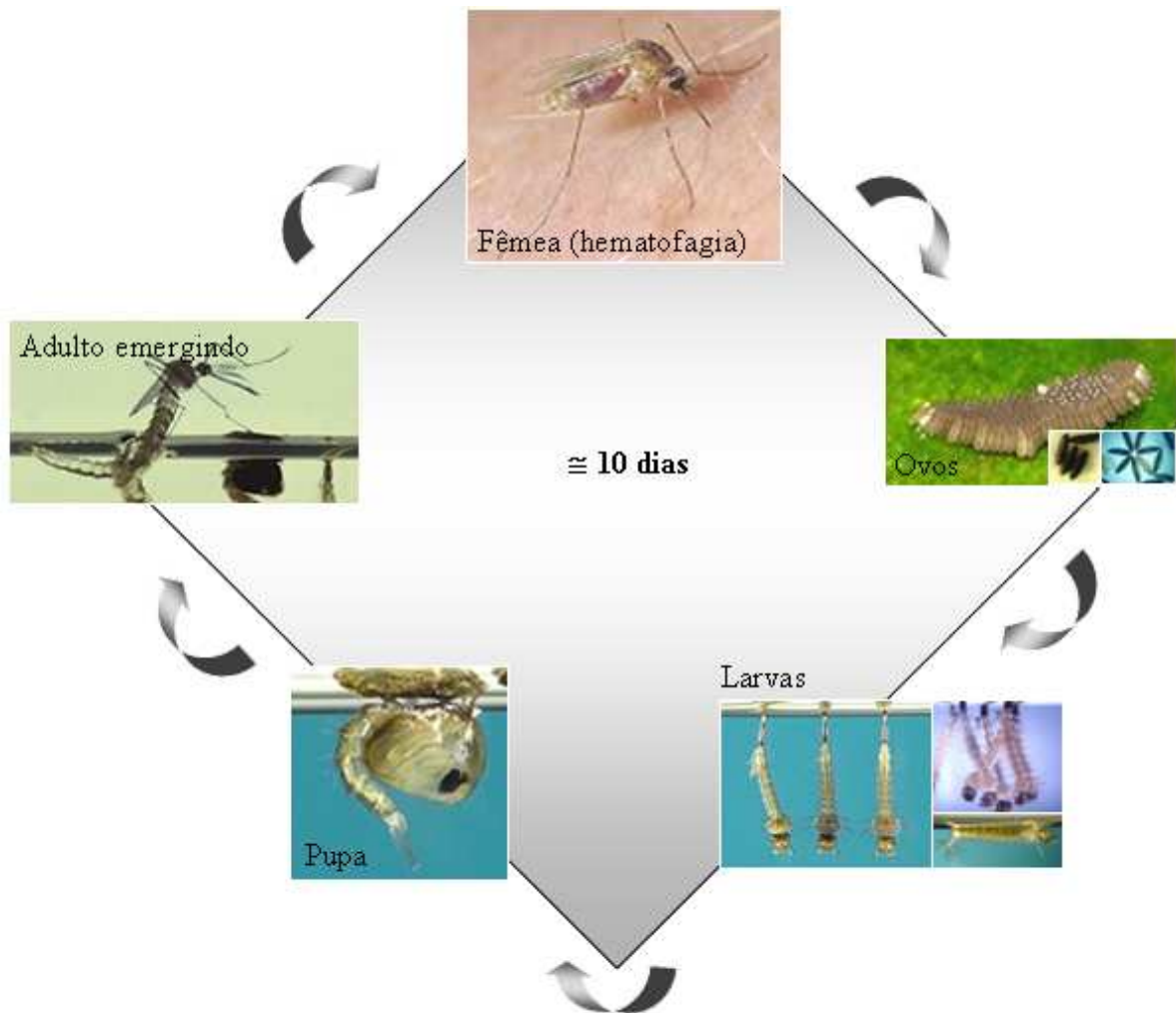


Figura 1. Ciclo biológico de culicídeos vetores.
Fonte: Elaborado pelo autor

2.3 Controle de culicídeos com bactérias entomopatógenas

A utilização indiscriminada dos inseticidas químicos para controle de vetores de doenças e sua acumulação na biosfera tornou-se um dos grandes problemas públicos em meados de 1960. A conscientização de que muitos inseticidas são tóxicos para os mamíferos, além de proporcionarem riscos para outros organismos não-alvo e desequilíbrio ambiental, foi desencadeada entre 1960 e 1970. Com o auge do movimento ambiental, os cientistas voltaram a sua atenção para o desenvolvimento de bioinseticidas seletivos e de técnicas de manejo integrado (MULLA, 1994).

As bactérias do gênero *Bacillus*, possuem ação inseticida para dípteros e têm sido consideradas agentes eficazes para o controle de culicídeos, pois possuem grande poder inseticida específico, além de apresentarem facilidades para a produção em larga escala, armazenamento, transporte e aplicação (LACEY, 2007). As duas espécies mais estudadas e utilizadas são o *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (DE BARJAC, 1978) e o *B. sphaericus* (KELLEN et al., 1965) que são bactérias Gram positivas, cosmopolitas e ocorrem em solos e em ambientes aquáticos. Durante a esporulação são capazes de produzir inclusões cristalinas que possuem protoxinas de natureza protéica com atividade larvicida para algumas espécies de dípteros. Os biolarvicidas produzidos a base destas bactérias têm como princípio ativo os cristais protéicos, que são aplicados em ambientes aquáticos que servem como criadouros das larvas. Após a ingestão dos cristais pelas larvas, as protoxinas são liberadas no lúmen intestinal e processadas em toxinas que são responsáveis pela ação letal. A ação das toxinas é específica para um grupo limitado de organismos alvo e formulações comerciais à base destas bactérias entomopatógenas já estão disponíveis no mercado.

2.4 *Bacillus sphaericus*

O *B. sphaericus* produz cristais protéicos (Figura 2) contendo a protoxina binária (Bin) (CHARLES; NIELSON-LEROUX; DELECLUSE, 1996) que possui ação larvicida decrescente para diversas espécies dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*. As características mais importantes desta bactéria são: 1- espectro de ação seletivo; 2- tempo de persistência longo em criadouros com água rica em matéria orgânica; 3- facilidades para sua produção em larga escala, armazenamento e utilização (MITTAL, 2003). A primeira cepa do *B. sphaericus* com atividade larvicida para mosquitos foi isolada por Kellen et al. (1965) e o potencial larvicida do *B. sphaericus* só foi evidenciado após o isolamento de cepas com alta toxicidade tais como a 1593 na Indonésia (SINGER, 1974), 2297 no Sri-lanka (WICKRAMASINGHE; WICKRAMASINGHE; MENDIS, 1994) e 2362 na Nigéria (WEISER, 1984).

O método de classificação do *B. sphaericus* mais utilizado é o teste de reação de aglutinação flagelar, que agrupa as cepas em diferentes sorotipos (DE BARJAC; VÉRON; COSMAO DUMANOIR, 1980). Os sorotipos mais estudados e com maior poder larvicida são: H5a5b, no qual se agrupam as cepas 1593, 2362, 1691 e C3-41; o H25, onde se encontra a cepa 2297; e H6, que engloba a cepa IAB59 (CHARLES; NIELSON-LEROUX;

DELECLUSE, 1996). As principais cepas utilizadas para a produção de biolarvicidas são a 1593, 2362 e C3-41 e os principais culicídeos alvo são espécies do complexo *C. pipiens* e anofelinos (LACEY, 2007; REGIS et al., 2001) que são altamente susceptíveis à toxina Bin, que é o principal fator inseticida presente nestas cepas.

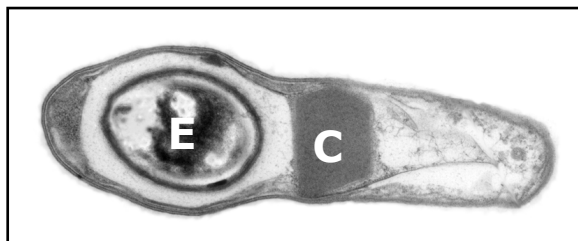


Figura 2. Micrografia eletrônica do *Bacillus sphaericus* em fase de esporulação. Fonte: Adaptado de Kalfon et al. (1984). Nota: (C), cristal que contém a toxina binária. (E), esporo.

2.5 Proteínas inseticidas produzidas pelo *Bacillus sphaericus*

Existem três grupos de toxinas com atividade larvicida que podem ser produzidas por diferentes cepas do *B. sphaericus*: a toxina binária do cristal (Bin), as toxinas Mtx e as toxinas Cry48Aa e Cry49Aa que são também produzidas sob a forma de cristais.

Três tipos de toxinas Mtx foram identificados: a Mtx1 (100 kDa), Mtx2 (31,8 kDa) e Mtx3 (35,8 kDa). Os genes das toxinas Mtx foram clonados de uma linhagem de média toxicidade SSII – 1 (LIU et al., 1996; THANABALU et al., 1991; THANABALU; PORTER, 1995). Estas toxinas são expressas somente na fase vegetativa e uma vez secretadas no meio, sofrem degradação proteolítica. Por esta razão, as toxinas Mtx não possuem ação tóxica em culturas esporuladas nativas de *B. sphaericus* (CHARLES; NIELSON-LEROUX; DELECLUSE, 1996). Por outro lado, quando expressas em *Escherichia coli*, as toxinas Mtx1 e Mtx2 recombinantes possuem alta atividade larvicida para culicídeos (WEI; CAI; YUAN, 2006; WIRTH et al., 2007).

O cristal protéico que contém a protoxina Bin está presente em todas as cepas que possuem atividade inseticida e é produzido na fase de esporulação. A protoxina binária (Bin) é um heterodímero composto por duas proteínas sintetizadas de forma equimolar e de massa molecular de 42 e 51 kDa (BERRY et al., 1989; HINDLEY; BERRY, 1988). Estes polipeptídeos foram denominados BinA e BinB, respectivamente, e devido a sua ação em

sinergia, a toxina é considerada binária (NICOLAS et al., 1993). Em larvas de *C. pipiens* foi demonstrado que o componente BinB é o responsável pela ligação com receptores específicos presentes na membrana apical do epitélio intestinal enquanto o componente BinA é o responsável pela atividade tóxica (CHARLES et al., 1997; NICOLAS et al., 1993). Os genes que codificam a toxina Bin são altamente conservados entre as diferentes cepas de *B. sphaericus* e nas linhagens 1593, 2362 e 2297 possuem localização cromossomal (AQUINO DE MURO; MITCHELL; PRIEST, 1992). Os genes *binB* e *binA* parecem estar organizados em um operon com uma região intergênica de 174-176 pb, possuem uma sequência de nucleotídeos de 1347 pb e de 1113 pb, e codificam as proteínas BinB de 448 aminoácidos e BinA de 370 aminoácidos, respectivamente (CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELÉCLUSE, 1996). Com base na avaliação das sequências de aminoácidos da toxina Bin em cepas do *B. sphaericus*, quatro tipos de toxinas foram classificadas (PRIEST et al., 1997). A toxina Bin1 é codificada pela cepa IAB59 e a Bin2 pelas cepas 2362 e 1593, e ambas são altamente tóxicas para larvas de culicídeos susceptíveis com elevada capacidade de ligação ao *microvilli* intestinal das larvas de *C. quinquefasciatus* (SILVA-FILHA et al., 2004). As toxinas Bin3 e Bin4 são produzidas pelas 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. A sequência da Bin4 possui seis diferenças e uma delas, a troca de uma leucina por uma serina na posição 93 na BinA4, é responsável pela diminuição da toxicidade da cepa LP1-G, sugerindo que este aminoácido deve ser um elemento chave na formação do complexo BinA-BinB responsável pela toxicidade do *B. sphaericus* (YUAN et al., 2001). A toxina Bin é o principal fator tóxico das principais cepas do *B. sphaericus* utilizadas para a produção de biolarvicidas comerciais.

Recentemente, duas toxinas da família Cry, produzidas sob a forma de cristais, foram identificadas na cepa IAB59: a Cry48Aa e Cry49Aa de 135 e 53 kDa (JONES et al., 2007). Estas toxinas agem em sinergia e apresentam alta toxicidade específica para *C. quinquefasciatus* quando administradas de forma purificada e em concentrações equimolares, sendo consideradas por esta razão como uma nova toxina binária do *B. sphaericus*. Porém, a contribuição da toxina Cry48Aa/Cry49Aa para a toxicidade da cepa IAB59 nativa do *B. sphaericus* não é relevante devido ao baixo nível de acumulação da Cry48Aa o que impede a concentração equimolar dos fatores requerida para a sua ação tóxica (JONES et al., 2007). A composição desta toxina binária é única, pois a subunidade Cry48Aa é uma típica toxina Cry de três domínios que, diferentemente das outras toxinas Cry desta família, necessita da presença da proteína Cry49Aa, que possui homologia com as toxinas binárias como a Bin do

B. sphaericus e a Cry35A e Cry36A (JONES et al., 2007). A avaliação do espectro larvicida da nova toxina Cry48Aa/Cry49Aa mostrou que sua ação é restrita para larvas de *Culex*, e a exemplo da toxina Bin, não possui atividade para *Ae. aegypti* (JONES et al., 2008). A toxina Cry48Aa/Cry49Aa possui ação em larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes à toxina Bin, e esta ausência de resistência cruzada demonstra que a Cry48Aa/Cry49Aa age em sítios-alvo diferentes daqueles da toxina Bin (DE MELO et al., 2008). O seu modo de ação também depende da ingestão e processamento dos cristais no intestino das larvas, que provocam uma série de eventos citopatológicos que levam à morte (DE MELO et al., 2009; JONES et al., 2007).

2.6 Modo de ação da toxina binária

A toxina Bin2, produzida pelas cepas 2362 e 1593 do *B. sphaericus*, presentes em formulações comerciais, tem sido o alvo da maioria dos estudos sobre o modo de ação da toxina Bin em larvas do complexo *C. pipiens* que possui as espécies mais susceptíveis a este agente. Os componentes BinB e BinA que compõem a toxina Bin2 agem, especificamente, como fator de ligação ao *microvilli* intestinal de larvas e fator tóxico, respectivamente (NICOLAS et al., 1993). Alguns trabalhos propõem que a região C-terminal da subunidade BinA é importante para a atividade tóxica da Bin e que ambas as regiões N- e C-terminal desta mesma proteína são requeridas para interação com a subunidade BinB (CLARK; BAUMANN, 1990; LIMPANAWAT; PROMDONKOY; BOONSERM, 2009). Em adição, também é proposto que a região N-terminal do componente BinB é crucial para a ligação ao receptor nas células intestinais de larvas de *Culex* e a sua porção C-terminal é requerida na interação com a subunidade BinA (OEI et al., 1992). Após a ingestão pelas larvas, o cristal é solubilizado em pH intestinal alcalino ($\cong 10$) e a protoxina liberada no lúmen é clivada por serina-proteases para atingir a forma de toxina ativa (BROADWELL; BAUMANN, 1987). Após a clivagem, os polipeptídeos de 42 e 51 kDa originam fragmentos de 39 e 43 kDa, respectivamente (BAUMANN et al., 1985). Esta toxina ativa interage de forma regionalizada no intestino, sobretudo no epitélio das regiões do ceco gástrico e estômago posterior da larva (DAVIDSON, 1988). As principais etapas do modo de ação da toxina Bin estão descritas na Figura 3. Neste modelo de estudo sabe-se que a toxina Bin, na sua forma ativa, liga-se a receptores específicos presentes no *microvilli* intestinal das larvas através da subunidade BinB

e os efeitos citopatológicos são observados após 30 minutos da ingestão de doses letais da toxina. Os principais efeitos avaliados nas células do intestino médio de larvas são: vacúolos citoplasmáticos, destruição das microvilosidades intestinais e danos nas mitocôndrias (CHARLES, 1987; DAVIDSON, 1981; DE MELO et al., 2008; SINGH; GILL, 1988).

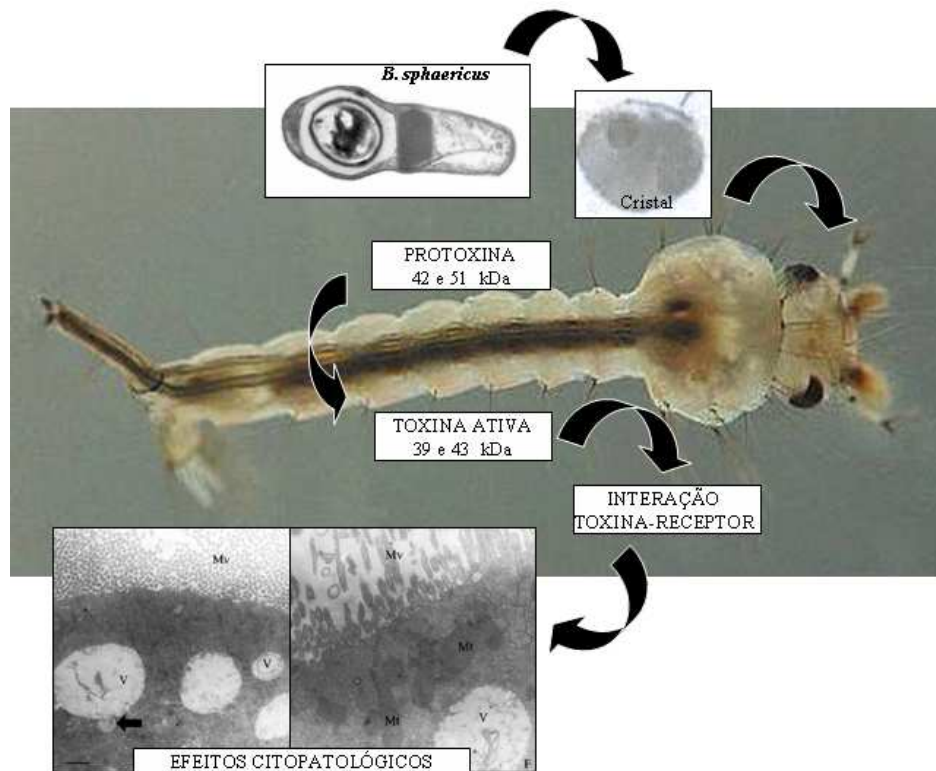


Figura 3. Modo de ação da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* em larvas de *Culex sp.*

Fonte: Adaptado de Kalfon et al. (1984) e de De Melo et al. (2008).

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

Estudos mostraram que o componente BinA da toxina Bin, tem a capacidade de formar poros em sistema de membrana artificial de vesículas lipídicas (SCHWARTZ et al., 2001). A imunolocalização da toxina Bin no interior das células epiteliais de larvas de *Culex* tratadas com uma dose letal, evidenciou uma possível internalização da toxina (SILVA-FILHA; PEIXOTO, 2003). A presença de receptores específicos no *microvilli* intestinal de larvas tem um papel essencial no modo de ação da toxina Bin. O perfil de susceptibilidade decrescente para larvas de *C. quinquefasciatus* e *An. gambiae* está diretamente relacionado com a alta e moderada capacidade de ligação da toxina Bin aos receptores intestinais, respectivamente (SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997). No caso do *Ae. aegypti*, espécie considerada naturalmente refratária a ação do *B. sphaericus*, a concentração

letal do biolarvicida é 100 vezes superior a empregada para *Culex* sp e o nível de ligação específica da toxina Bin ao *microvilli* intestinal de larvas é extremamente baixo (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992).

2.7 Receptores da toxina Bin do *B. sphaericus*

A toxina Bin do *B. sphaericus* liga-se especificamente a uma simples classe de proteínas de membrana, caracterizadas como α -glicosidases, que além de desempenhar uma função enzimática, também atuam como receptores da toxina Bin na superfície das células intestinais de larvas de culicídeos susceptíveis (CHARLES et al., 1997; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997).

As α -glicosidases possuem um importante papel na digestão dos insetos, além de terem um sítio funcional para o reconhecimento e ligação da toxina Bin. O metabolismo energético da maioria dos mosquitos depende da ingestão de glicose, sacarose, maltose e frutose. As α -glicosidases (EC 3.2.1.20) são exoenzimas hidrolizadoras de ligações glicosídicas terminais (glicosil hidrolases), liberam α -glicose da porção não-redutora da cadeia de um substrato, atuando na clivagem de oligossacarídeos que são parte importante da nutrição de mosquitos (KRASIKOV; KARELOV; FIRSOV, 2001). Na classificação moderna das glicosil hidrolases, estas enzimas estão distribuídas em 81 famílias nas quais duas famílias são constituídas pelas α -glicosidases, caracterizadas por homologia de sequências de aminoácidos conservadas nos sítios ativos destas enzimas (HENRISSAT; DAVIES, 1997). As α -glicosidases no intestino de insetos podem ser solúveis ou ligadas à membrana (SILVA; TERRA, 1995) e sua atividade relativa e distribuição é de 75% no lúmen do intestino médio posterior e 25% no intestino anterior (BILLINGSLEY; HECKER, 1991).

Estes receptores nas larvas de *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus* e *An. gambiae* são α -glicosidases (EC 3.2.1.20) de 66 kDa ligadas à membrana celular por uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (DARBOUX et al., 2001; OPOTA et al., 2008; ROMÃO et al., 2006; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999) (Figura 4). As sequências gênicas dos receptores em *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus* e *An. gambiae* possuem 1743, 1743 e 1767 pares de bases (pb), respectivamente que codificam proteínas de cerca de 580 aminoácidos denominados Cpm1 (*Culex pipiens* maltase 1), Cqm1 (*Culex quinquefasciatus*

maltase 1) e Agm3 (*Anopheles gambiae* maltase 3), as quais possuem domínios estruturais e enzimáticos característicos das maltases. O alinhamento das sequências de aminoácidos destas proteínas mostrou uma alta similaridade, e o receptor Cqm1 compartilha uma similaridade de 98% ao nível de aminoácidos em relação ao Cpm1 e de 78% e 83% com as maltases ortólogas de *An. gambiae* (Agm3) e de *Ae. aegypti* (Aam1), respectivamente (DARBOUX et al., 2001; OPOTA et al., 2008, ROMÃO et al., 2006). As α -glicosidases presentes em larvas de *C. quinquefasciatus*, através de ensaios enzimáticos em gel, parecem ser produzidas como proteínas de membrana no epitélio intestinal (ROMÃO et al., 2006). Em *An. aquasalis*, três isoformas de α -glicosidases foram caracterizadas no intestino de fêmeas adultas, sendo a α Gli1 e α Gli2 na forma secretada e ligada à membrana, enquanto a α Gli3 foi identificada exclusivamente ancorada à membrana e o padrão de expressão mostrou variação durante as fases de vida dos insetos (SOUZA-NETO et al., 2007).

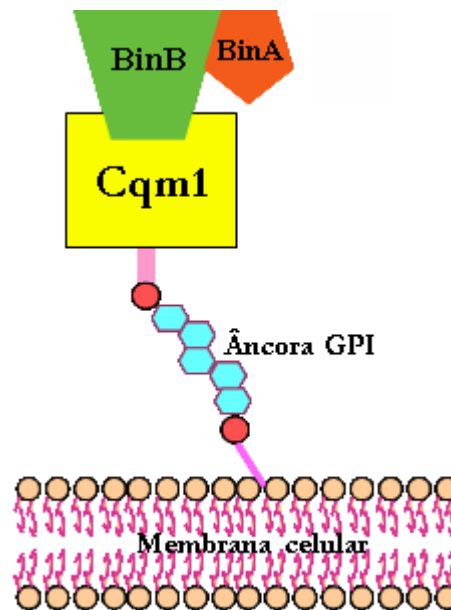


Figura 4. Representação esquemática do receptor Cqm1 da toxina Bin em *Culex quinquefasciatus*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: BinB e BinA: subunidades da toxina Bin. Cqm1: *Culex quinquefasciatus* maltase 1; GPI: Glicosil-fosfatidilinositol.

2.8 Resistência ao *Bacillus sphaericus*

Devido à alta eficácia do *B. sphaericus* sob condições de campo, produtos comerciais à base deste biolarvicida estão disponíveis e têm sido utilizados como agente de controle de mosquitos em áreas urbanas (BARBAZAN et al., 1997; HOUGARD et al., 1993; KUMAR; SHARMA; MALIK, 1996; LACEY, 2007; REGIS et al., 1995; SILVA-FILHA et al., 2001; THIÉRY, HAMON, 1998; YADAV; SHARMA; UPADHYAY, 1997). Programas piloto de controle de populações de culicídeos vetores, em zonas endêmicas para filariose bancroftiana na Região Metropolitana de Recife, comprovaram a eficácia do *B. sphaericus* para o controle populacional de larvas de *C. quinquefasciatus* (REGIS et al., 1995; 2000; SILVA-FILHA et al., 2001). Entretanto, a utilização de biolarvicidas a base de *B. sphaericus* em larga escala, também demonstrou que populações de *Culex*, submetidas à forte pressão de seleção, podem apresentar resistência a este agente. Casos de resistência foram detectados em campo na França (CHEVILLON et al., 2001; NIELSEN-LEROUX et al., 2002; SINÈGRE et al., 1994), na Índia (RAO et al., 1995), na Tailândia (MULLA et al., 2003), na Tunísia (NIELSEN-LEROUX et al., 2002), no Brasil (SILVA-FILHA et al., 1995) e na China (YUAN; ZHANG; LIU, 2000).

Georghiou et al. (1992) obtiveram a primeira colônia (GEO) de *C. pipiens* selecionada para a resistência ao *B. sphaericus* sob condições de laboratório. Esta colônia apresentou uma razão de resistência (RR) de 100.000 vezes para o *B. sphaericus*, em relação à colônia susceptível (WIRTH et al., 2000). Posteriormente, colônias de *C. quinquefasciatus* selecionadas em laboratório no Brasil e na China com as cepas 2362 e C3-41, respectivamente, também apresentaram um elevado nível de resistência (RR>100.000) (PEI et al., 2002).

Os principais mecanismos de resistência a inseticidas têm sido classificados em duas grandes categorias: a alteração do sítio alvo dos inseticidas e a detoxificação enzimática de moléculas inseticidas (RANSON; HEMINGWAY, 2005). No caso da investigação da resistência de colônias de *Culex* sp. ao *B. sphaericus*, a maioria dos mecanismos registrados até o presente são relativas à alteração do receptor da toxina Bin, destacando a importância desta molécula para a ação do *B. sphaericus* (Tabela 1). A resistência na colônia GEO, primeira colônia investigada, foi causada pela falha na etapa de ligação da toxina Bin com o receptor de membrana (NIELSEN-LEROUX et al., 1995). Este mesmo mecanismo foi observado na colônia CqRL1/2362 do Brasil e em uma população de campo resistente (BP)

do sudeste da França (CHEVILLON et al., 2001; NIELSEN-LEROUX et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004). Já nas populações de campo SPHAE da França e TUNIS da Tunísia, o mecanismo de resistência não está relacionado com a falha na ligação entre a toxina, pois larvas destas colônias possuem receptores funcionais no *microvilli* intestinal (NIELSEN-LEROUX et al., 2002). Na colônia SPHAE a detoxificação por enzimas esterases foi investigada, porém este mecanismo não estava envolvido na resistência (NIELSEN-LEROUX et al., 1997). É importante ressaltar que o mecanismo de falha no processamento proteolítico das protoxinas Cry do *B. thuringiensis*, observado para alguns insetos alvo, não foi até o presente momento reportado para a toxina Bin do *B. sphaericus*.

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> ⁵	Forma de herança ⁴	Referência
GEO ¹	EUA	Lab	>100.000	Não	<i>cpmI_{GEO}</i>	R/A	NIELSEN-LEROUX et al. (1995)
CqRL1/2362 ¹	Brasil	Lab	>100.000	Não	<i>cqmI_{REC}</i>	R/A	OLIVEIRA et al. (2004); ROMÃO et al. (2006)
CqRL2/IAB59 ¹	Brasil	Lab	≈40.000	Não	<i>cqmI_{REC}</i>	R/A	AMORIM et al. (2007)
RLCq1/C3-41 ¹	China	Lab	>100.000	Não	ND	R/A	OLIVEIRA et al. (2004)
Kochi ¹	Índia	Campo	≈150	ND	ND	ND	RAO et al. (1995)
Coque ¹	Brasil	Campo	≈10	Sim	ND	ND	SILVA-FILHA et al. (1995)
SPHAE ²	França	Campo	>20.000	Sim	ND	R/S	NIELSEN-LEROUX et al. (1997)
RFCq1 ¹	China	Campo	>20.000	ND	ND	ND	YUAN; ZHANG; LIU (2000)
TUNIS ²	Tunísia	Campo	≈750	Sim	ND	R/S	NIELSEN-LEROUX et al. (2002)
BP ²	França	Campo	>5.000	Não	<i>cpmI_{BP}</i> <i>cpmI_{BP-del}</i>	R/S	NIELSEN-LEROUX et al. (2002)
Wat Pikul ¹	Tailândia	Campo	>125.000	ND	ND	ND	MULLA et al. (2003)

Fonte: Adaptado de Chalegre (2008).

Nota:

¹*C. quinquefasciatus*

²*C. pipiens*

³Razão entre a concentração letal do *Bacillus 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

⁵Alelo de resistência

ND: não determinado

2.9 Base molecular da resistência à toxina Bin

A resistência de duas colônias de laboratório e uma população de campo teve sua base molecular elucidada. A análise da sequência do gene do receptor na colônia GEO de *C. pipiens*, revelou que este alelo (*cpm1_{GEO}*) apresentou uma mutação pontual, a troca de uma timina por uma adenina na posição 1706, que promove a substituição de uma leucina-569 por um códon de terminação da tradução prematuro. Este códon gera a expressão de uma proteína truncada sem a sequência de aminoácidos hidrofóbicos na porção C-terminal que sinaliza a ancoragem via GPI. Esta mutação causa a resistência das larvas uma vez que a proteína é expressa na forma secretada no lúmen intestinal, impossibilitando a interação da toxina Bin com as células do epitélio (DARBOUX et al., 2002).

A análise do mecanismo molecular da resistência da colônia de *C. quinquefasciatus* CqRL1/2362 mostrou que as larvas não possuem o receptor funcional no *microvilli* intestinal (OLIVEIRA et al., 2004). Nesta colônia foi detectado o alelo de resistência *cqm1_{REC}* que apresenta uma deleção de 19 nucleotídeos (1257-1275), geradora de uma mudança na fase de leitura de 28 aminoácidos e de um códon de término da tradução prematuro. Esta mutação levaria a formação de um mRNA anormal codificador de uma proteína truncada em cerca de 452 aminoácidos desprovida do segmento C-terminal e da âncora GPI, a exemplo do que ocorre na colônia GEO (ROMÃO et al., 2006) (Figura 5). A proteína truncada de 452 aminoácidos que seria codificada pelo alelo *cqm1_{REC}* não foi detectada em preparações de *microvilli* intestinal de larvas resistentes, a partir de ensaios de imunodeteção, indicando que esta proteína possivelmente não é expressa nas larvas da colônia CqRL1/2362. Neste estudo, foi produzida em *E. coli*, a proteína recombinante de 45 kDa da região N-terminal do receptor Cqm1, ao invés de 66 kDa, que mostrou capacidade de ligação com a toxina Bin sugerindo que o epitopo de ligação estaria localizado nesta região (ROMÃO et al., 2006).

No caso da população de *C. pipiens* de campo BP da França, foi caracterizada a ocorrência de dois alelos de resistência denominados *cpm1_{BP}* e *cpm1_{BP-del}*. O alelo *cpm1_{BP}* possui uma mutação “*non-sense*” (Q396Stop) que leva à formação de um códon de terminação prematuro, e ocasiona a síntese de uma proteína truncada com 395 aminoácidos, desprovida de âncora GPI, a exemplo do que ocorre nas colônias GEO e CqRL1/2362. No alelo *cpm1_{BP-del}*, foi identificada a inserção de um elemento transponível no segundo éxon, que levou a uma alteração no processamento do mRNA e a uma deleção interna de 198 pb. Este alelo codifica uma proteína dotada de âncora GPI, pois não ocorre mudança na fase de

leitura do gene, porém a proteína apresenta 514 aminoácidos, havendo uma perda de 66 aminoácidos devido à deleção, que resulta na sua incapacidade de se ligar à toxina Bin (DARBOUX et al., 2007). Até o momento, a forma de herança da resistência avaliada a partir da progênie resultante de cruzamento entre indivíduos susceptíveis e resistentes, mostra que estes alelos são recessivos.

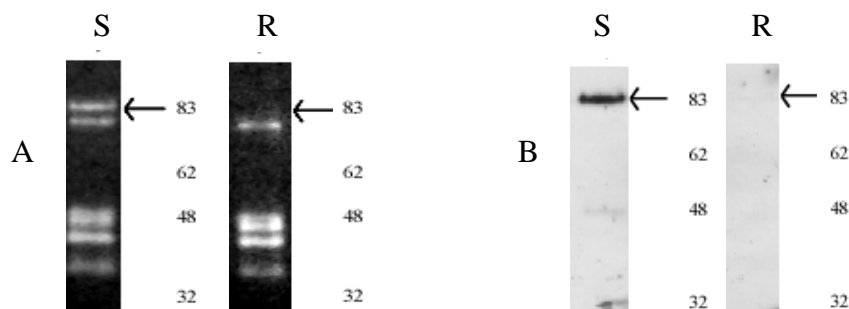


Figura 5. Análise de α -glicosidases presentes em larvas de *Culex quinquefasciatus* sensíveis (S) e resistentes (R) ao *Bacillus sphaericus*.

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

Nota: (A) Ensaio *in gel* de α -glicosidases foram realizados com amostras de extrato total de larvas de 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.

2.10 *Bacillus thuringiensis*

O *B. thuringiensis* (Bt), assim como o *B. sphaericus*, também produz proteínas inseticidas na forma de um cristal e há mais de 70 sorovariedades com ação larvicida, sobretudo para lepidópteros, coleópteros e dípteros (CRICKMORE, N., 2010). Os cristais do *B. thuringiensis* podem conter uma ou mais toxinas denominadas Cry e algumas sorovariedades, com ação seletiva para dípteros, podem apresentar também uma toxina citolítica (Cyt). As toxinas Cry são alvo de vários estudos sobre os mecanismos que envolvem a interação toxina-receptor, devido à ampla utilização de biolarvicidas a base de *B. thuringiensis* e de plantas transgênicas que expressam essas toxinas (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). A ação das toxinas Cry também depende da interação com receptores específicos nas células do epitélio intestinal das larvas de insetos e, após a ligação aos receptores, ocorre a inserção da toxina na membrana, o que leva à formação de poros nas células apicais (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). A maioria das toxinas Cry é

caracterizada por uma estrutura protéica de três domínios (DE MAAGD et al., 2003) (Figura 6). O domínio I é uma região formada por sete α -hélices correspondentes à região N-terminal, o domínio II e III são formados por folhas β e alças expostas (BOONSERM; ELLAR; LI, 2003). Nestas proteínas, o domínio I está relacionado à inserção e formação de poros na membrana (BOONSERM et al., 2005, 2006; GALITSKY et al., 2001; GROCHULSKI et al., 1995; LI; CARROLL; ELLAR, 1991; MORSE; YAMAMOTO; STROUD, 2001). O domínio II, através de alças expostas (α , β), é responsável pelo reconhecimento do receptor e, portanto, pela especificidade da toxina para o inseto-alvo. O domínio III parece estar envolvido com o reconhecimento do receptor e relacionado à estabilidade da toxina (RAJAMOHAN; LEE; DEAN, 1998). Aproximadamente 120 sequências de toxinas do *Bt* dentre as 150 identificadas carregam uma estrutura comum composta por três domínios (CRICKMORE, 2005).

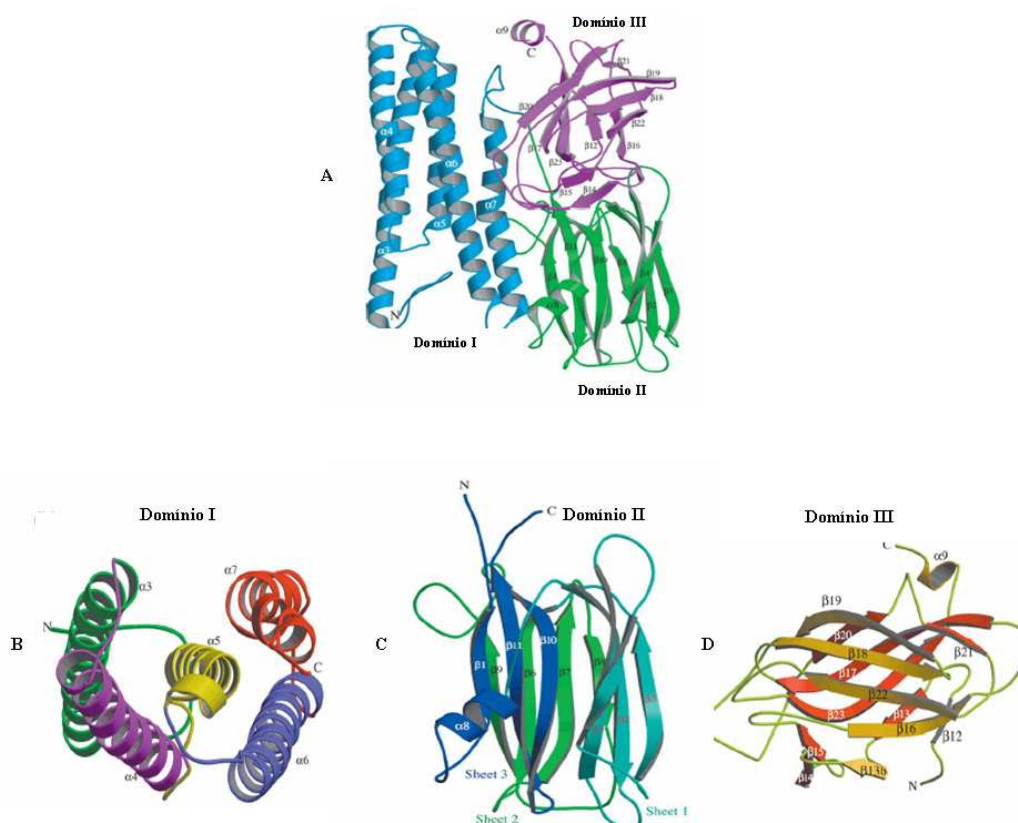


Figura 6. Representação esquemática da estrutura protéica da toxina Cry4Ba.

Fonte: Adaptado de Boonserm et al. (2005).

Nota: A toxina Cry4Ba é composta de três domínios (A) e detalhe dos domínios I formado por 7 α -hélices (B), II formado por 3 folhas- β e uma α -hélice (C) e III formado por 2 folhas- β e uma α -hélice (D).

O modelo de ação das toxinas Cry1A proposto atualmente possui várias etapas (Figura 7A). 1- As protoxinas Cry, de cerca de 130 kDa, são ingeridas pelas larvas, solubilizadas no lúmen intestinal e clivadas por proteases na forma de toxina monomérica ativa de 60 kDa. 2- A toxina ativa se liga a receptores presentes na superfície celular intestinal de larvas. Em algumas larvas de lepidópteros, uma proteína caderina funciona como receptor primário e possui alta afinidade de ligação com a toxina (GÒMEZ et al., 2002). 3- A ligação da toxina monomérica à caderina induz mudanças conformacionais que promovem a clivagem proteolítica da α -hélice 1 na região N-terminal. 4- A clivagem por sua vez induz a formação de uma forma oligomérica da toxina que tem maior afinidade de ligação aos receptores secundários que são proteínas ligadas à membrana celular intestinal através de âncoras GPI. 5- Ocorre a inserção da toxina na membrana e formação do poro (BRAVO et al., 2004; JIMÉNEZ-JUÁREZ et al., 2007; SCHNEPF et al., 1998). No modelo de ação alternativo proposto para as toxinas Cry que possuem toxicidade para dípteros, uma outra toxina, a Cyt, atua como receptor primário que induz as mudanças conformacionais nas toxinas Cry aumentando sua afinidade de ligação aos receptores secundários e formação do oligômero (Figura 7B) (PÉREZ et al., 2007).

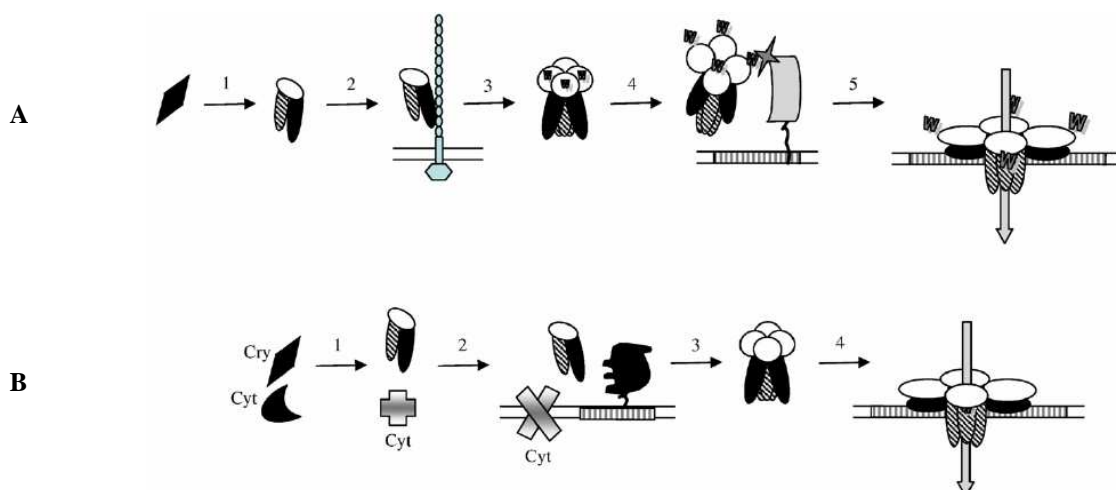


Figura 7. Modelo do modo de ação das toxinas Cry e Cyt.

Fonte: Bravo, Gill, Soberón (2007).

Nota: Interação sequencial das toxinas Cry com diferentes receptores em larvas de lepidópteros (A). 1: solubilização e ativação da toxina; 2: ligação da toxina monomérica no primeiro receptor, caderina ou glicoconjugado (CADR ou GCR), respectivamente, que induz mudanças conformacionais e clivagem da α -hélice 1; 3: formação do oligômero; 4: ligação do oligômero ao segundo receptor, aminopeptidase ou fosfatase alcalina com GPI (GPI-APN ou GPI-ALP), respectivamente; 5: inserção da toxina oligomérica na membrana celular e formação de poro. Papel da toxina Cyt na intoxicação de larvas de dípteros (B). 1: toxinas Cry e Cyt são solubilizadas e ativadas; 2: a toxina Cyt se insere na membrana e a Cry toxina se liga a um receptor de membrana ou a própria Cyt; 3: a oligomerização da toxina Cry é induzida; 4: o oligômero se insere na membrana resultando na formação do poro.

2.11 Receptores de toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis*

Estudos do modo de ação das toxinas Cry do *B. thuringiensis* em lepidópteros e dípteros são pioneiros e diversos receptores para as toxinas já foram caracterizados (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). De forma similar à resistência de culicídeos à toxina Bin do *B. sphaericus*, estudos demonstraram que a diminuição ou ausência de receptores no *microvilli* intestinal de lepidópteros está relacionada ao desenvolvimento de resistência ao *B. thuringiensis*, demonstrando a importância da interação toxina Cry-receptor (JURAT-FUENTES et al., 2004). Os receptores da toxina Cry presentes no epitélio intestinal de larvas dos insetos alvo pertencem a cinco categorias de moléculas (Figura 8): caderinas (CADR), aminopeptidases (APN) com âncora GPI, fosfatases alcalinas (ALP) com âncora GPI, glicoconjugados (GCR) (KNIGHT; CRICKMORE; ELLAR, 1994; JURAT-FUENTES et al., 2004; VADLAMUDI et al., 1995; VALAITIS et al., 2001) e uma α -amilase com âncora GPI (FERNANDEZ-LUNA et al., 2010). As caderinas representam uma ampla família de glicoproteínas transmembranares envolvidas nos processos de adesão e sinalização celular e possuem um domínio citoplasmático e um ectodomínio extracelular composto de sequências repetitivas de caderinas (CR) expostas na superfície celular (Figura 8B). Em lepidópteros como *Manduca sexta* e *Bombyx mori*, caderinas são os receptores da toxina Cry1A (GÓMEZ et al., 2007). Em *Ae. aegypti* e em *An. gambiae*, algumas caderinas também servem como receptores das toxinas Cry11Aa e Cry4Ba do *Bti*, respectivamente (CHEN et al., 2009; HUA et al., 2008). As aminopeptidases estão principalmente localizadas no epitélio intestinal de insetos e exercem funções essenciais na digestão de proteínas. Algumas aminopeptidases foram caracterizadas como receptores das toxinas Cry1Aa, Cry1Ac e Cry1Ab nos lepidópteros *B. mori*, *Helicoverpa armigera*, *Heliothis virescens* e *M. sexta*, respectivamente (HUA et al., 1998; INGLE et al., 2001; KNIGHT; CRICKMORE; ELLAR, 1994; LUO; TABASHNIK; ADANG, 1997; SANGADALA et al., 1994). Em espécies de anofelinos, duas outras aminopeptidases também foram identificadas como receptores das toxinas Cry do *Bti* (HUA et al., 1998; LEHNINGER; NELSON; COX, 1993; REED; CHANDLER; SANDEMAN, 1999; ZHANG et al., 2008; WANG; ZHANG; ZHANG, 2005) (Tabela 3). O receptor da toxina Cry11Aa do *Bti* em *Ae. aegypti* foi caracterizado como uma fosfatase alcalina de 65 kDa (FERNANDEZ et al., 2006). Esta molécula se localiza predominantemente em células intestinais, nas regiões do ceco gástrico e intestino posterior das larvas, e está ligada à membrana por uma âncora GPI (FERNANDEZ et al., 2006) (Tabela 4). As toxinas

Cry1Aa e Cry1Ab se ligam a glicoconjugados em *Lymantria dispar* (VALAITIS et al., 2001). Estudos recentes revelaram que uma α -amilase serve como receptor das toxinas Cry11Aa e Cry4Ba em *An. albimanus* (FERNANDEZ-LUNA et al., 2010). Os principais receptores de toxinas Cry do *B. thuringiensis* em larvas de lepidópteros e dípteros estão descritos nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

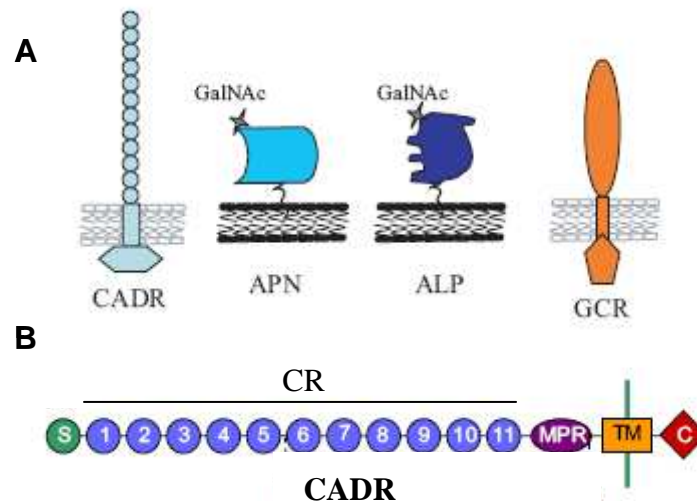


Figura 8 - Representação esquemática dos receptores da toxina Cry1A.

Fonte: Adaptado de Bravo; Gill; Soberon (2007).

Nota: (A) CADR-caderina; APN-aminopeptidase-N; ALP-fosfatase alcalina; GCR-glicoconjugados. (B) Estrutura da caderina BT-R1, contendo ectodomínio extracelular (S), regiões de repetição da caderina (CR 1-11), região proximal à membrana (MPR), domínio transmembranar (TM), domínio citoplasmático (C).

Tabela 2. Receptores de toxinas inseticidas Cry do *Bacillus thuringiensis* presentes no epitélio intestinal de larvas de lepidópteros.

Espécie	Toxina	Receptores	Peso (kDa)	Referência
<i>Bombix mori</i>	Cry1Aa	CADR ¹ (Bt-R ₁₇₅)	175	NAGAMATSU et al. (1999)
		APN ²	110	HUA et al. (1998)
<i>Helicoverpa armigera</i>	Cry1Ac	APN	120	INGLE et al. (2001)
<i>Heliothis virescens</i>	Cry1Ac	APN	170	LUO; TABASHNIK; ADANG (1997)
		ALP ³	68	JURAT-FUENTES et al. (2004)
		CADR	210	JURAT-FUENTES; ADANG (2006)
<i>Lymantria dispar</i>	Cry1Aa	Glicoconjugado	270	VALAITIS et al. (2001)
	Cry1Ab	APN		JENKINS et al. (2000)
	Cry1Ac			
<i>Manduca sexta</i>	Cry1Ac	APN	120	KNIGHT; CRICKMORE; ELLAR (1994)
	Cry1Ab	CADR (Bt-R ₁)	210	VADLAMUDI et al. (1995)
<i>Pectinophora gossypiella</i>	Cry1Ac	CADR (BtR)	ND ⁴	FABRICK; TABASHNIK (2007)

Fonte: Adaptado de Ferreira, 2009.

Nota: ¹CADR - Caderina; ²APN - Aminopeptidase; ³ALP - Fosfatase alcalina; ⁴ND - Não determinado.

Tabela 3. Receptores de toxinas inseticidas Cry do *Bacillus thuringiensis* presentes no epitélio intestinal de larvas de culicídeos.

Espécie	Toxina	Receptores	Peso (kDa)	Referência
<i>Aedes aegypti</i>	Cry11Aa	ALP ¹	65	FERNANDEZ et al. (2006)
	Cry11Aa	CADR ⁴	250	CHEN et al. (2009)
<i>Anopheles albimanus</i>	Cry11Aa Cry4Ba	α -amilase	70	FERNANDEZ-LUNA et al. (2010)
<i>Anopheles gambiae</i>	Cry11Ba	APN ³	106	ZHANG et al. (2008)
	Cry4Ba	CADR (AgCad1)	200	HUA et al. (2008)
<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	Cry11Ba	APN	100	ABDULLAH; VALAITIS; DEAN (2006)

Fonte: Adaptado de Ferreira, 2009.

Nota: ¹ALP - Fosfatase alcalina; ² α -Gli - α -Glicosidase; ³APN - Aminopeptidase; ⁴CADR - Caderina

2.12 Motivos de ligação envolvidos na interação toxinas Cry e seus receptores

Além da caracterização de receptores vários avanços têm sido alcançados em relação ao mapeamento de domínios de ligação envolvidos na interação das toxinas Cry do *B. thuringiensis* a seus receptores específicos em larvas de lepidópteros e dípteros (Tabela 4). A interação da toxina Cry1Ab com seus receptores em *M. sexta*, a caderina BT-R1 e uma aminopeptidase, ocorre através da interação de diferentes alças do domínio II com diferentes regiões repetitivas da caderina BT-R1 CR7, 11 e 12 (GÓMEZ et al., 2001, 2002; GÓMEZ et al., 2003; GRIKO et al., 2007; HUA; JURAT-FUENTES; ADANG, 2004; JENKINS et al., 2000). A toxina Cry1Ac, nos lepidópteros *H. virescens* e *Pectinophora gossypiella*, liga-se ao seu receptor, uma caderina BtR, através do domínio II em múltiplos sítios na região extracelular como CR8, CR9, CR10, CR11, CR12 e na região proximal de membrana (MPR). A toxina Cry1Ac liga-se a APN de *M. sexta* e *L. dispar* especificamente no motivo N-acetilgalactosamina (GalNAc) através dos domínios II e III, ao contrário da Cry1Aa e Cry1Ab que não apresentam capacidade de ligação ao GalNAc (MASSON et al., 1995). Alguns casos de resistência nestes lepidópteros estão relacionados a alterações na glicosilação das proteínas intestinais envolvidas na ligação (GRIFFITTS et al., 2001, 2005). Atsumi et al. (2005) evidenciaram a interação do domínio III (folhas β 16 e β 22) da toxina Cry1Aa com uma aminopeptidase (APN) em *B. mori*. As regiões de alça α -8, folha β -4 e alça 3 do domínio II na Cry1Aa estão envolvidas no reconhecimento da fosfatase alcalina (ALP) que serve como receptor no *microvilli* intestinal de *Ae. aegypti* (FERNÁNDEZ et al., 2005, 2006). Em relação às proteínas Cry do *Bt* Cry4A e Cry4B com ação em larvas de mosquitos sabe-se que as regiões de alça do domínio II, estão implicadas com a especificidade e interação da toxina ao seu receptor no *microvilli* intestinal de larvas alvo (ABDULLAH et al., 2003). A caracterização dos domínios de ligação envolvidos na interação toxina-receptor tem trazido uma grande contribuição para o desenvolvimento de estratégias que visam o aperfeiçoamento das toxinas e de sua aplicação no controle de insetos (PARDO-LÓPEZ et al., 2009).

Tabela 4 – Motivos de ligação envolvidos na interação das toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* e seus receptores específicos em espécies de lepidópteros e dípteros. Os receptores pertencem às famílias das caderinas (CADR), aminopeptidases N (APN) e fosfatases alcalinas (ALP).

Toxina Cry	Domínios de ligação na toxina	Espécie-alvo	Receptor	Motivos de ligação no receptor	Referência
Cry1Ab	II, alça 2 ($\beta 6$ - $\beta 7$)	<i>Manduca sexta</i>	CADR (BT-R1)	CR7 ^a (865-875)	GÓMEZ et al. (2001), (2002)
Cry1Ab	II, alça $\alpha 8$ ($\alpha 8a$ e $\alpha 8b$) e alça 2	<i>Manduca sexta</i>	CADR (BT-R1)	CR11 (1331-1342)	GÓMEZ et al. (2003)
Cry1Ab	II	<i>Manduca sexta</i>	CADR (BT-R1)	CR12 (1363-1464)	HUA; JURAT-FUENTES; ADANG (2004)
Cry1Ab	ND	<i>Manduca sexta</i>	CADR (BT-R1)	CR12	GRIKO et al. (2007)
Cry1Ac	II, alça 3 ($\beta 10$ - $\beta 11$)	<i>Heliothis virescens</i>	CADR	CR12 (1423-1431)	XIE et al. (2005)
Cry1Ac	ND	<i>Pectinophora gossypiella</i>	CADR (BtR)	CR8, 9, 10, 11 e MPR	FABRICK; TABASHNIK (2007)
Cry1Aa	III ($\beta 16$ - $\beta 22$)	<i>Bombix mori</i>	APN	Resíduos 135-198	ATSUMI et al. (2005) NAKANISHI et al. (2002)
Cry1Ab	II, alças 2 e 3	<i>Manduca sexta</i>	APN	ND	JENKINS et al. (2000)
Cry1Ac	III	<i>Manduca sexta</i>	APN	Motivo GalNAc ^b	MASSON et al. (1995)
Cry1Ac	III e II	<i>Lymantria dispar</i>	APN	Motivo GalNAc	JENKINS et al. (2000)
Cry11Ba	ND	<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	APN	ND	ABDULLAH; VALAITIS; DEAN (2006)
Cry11Aa	II, alça $\alpha 8$ e III, $\beta 18$ e $\beta 19$	<i>Aedes aegypti</i>	ALP	R59-G102 e N257-I296	FERNÁNDEZ et al. (2006), (2009)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota:

^a CR – Domínio repetitivo da porção extracelular da caderina; MPR – Região proximal à membrana;

^b GalNAc - Motivo N-acetilgalactosamina da aminopeptidase N; ND: não determinado.

3 JUSTIFICATIVA

As bactérias entomopatógenas podem ser utilizadas como agentes de controle efetivos e viáveis operacionalmente, com ação seletiva e portanto seguros para espécies não-alvo. O *B. sphaericus*, devido à alta toxicidade contra larvas do *C. quinquefasciatus* e sua boa persistência em água poluída, tem sido considerado um bom agente de controle para esses mosquitos em áreas urbanas e testes em campo já comprovaram a sua efetividade em vários países. O controle populacional de vetores, previsto nos planos de erradicação das principais enfermidades do nosso país como a filariose, dengue e malária, é considerado essencial para interrupção do ciclo de transmissão destas doenças. A revelação de aspectos moleculares ainda desconhecidos da interação toxina Bin do *Bacillus sphaericus* ao seu receptor em *C. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* e *An. gambiae* é essencial para a compreensão do seu modo de ação nestas espécies e criação de novas estratégias que visem o aperfeiçoamento do seu espectro biolarvicida e aplicação adequada. O *Bacillus sphaericus* já tem uma importância fundamental no âmbito de controle do *Culex* na cidade do Recife e seu uso pode ser ampliado para o controle de outras espécies de vetores em todo Brasil.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Qual a base molecular da interação da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* com receptores intestinais em larvas de culicídeos vetores de doenças?

5 HIPÓTESE

A interação da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* com o receptor Cqm1 em larvas de *Culex quinquefasciatus* ocorre através de domínios e epitopos de ligação de alta afinidade conservados tanto na subunidade BinB da toxina como no receptor Cqm1.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

Caracterizar a base molecular da interação da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* com receptores intestinais de larvas de culicídeos vetores, a fim de produzir conhecimentos para subsidiar o aperfeiçoamento da utilização deste biolarvicida.

6.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a conservação do motivo de ligação da toxina Bin na proteína Cqm1 em proteínas ortólogas e parálogas de *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*;
- b) Avaliar os fatores que influenciam a ligação específica do receptor Cqm1 de *Culex quinquefasciatus* à toxina Bin, em relação à proteína Aam1 de *Ae. aegypti*;
- c) Identificar na subunidade BinB da toxina, motivos envolvidos na ligação ao receptor Cqm1 de *C. quinquefasciatus*.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Procedimentos experimentais

Na primeira etapa deste estudo foram avaliadas características das α -glicosidases Cqm1 e Aam1, que podem estar implicadas na sua capacidade de ligação a toxina Bin. As sequências gênicas que codificam fragmentos recombinantes de 45 kDa de proteínas ortólogas e parálogas à Cqm1 (Cqm1-Rec45, Aam1-Rec45, Aam2-Rec45, Aam3-Rec45, Agm3-Rec45, Agm4-Rec45, Agm5-Rec45) e as sequências de cDNA que codificam as proteínas recombinantes Cqm1 e Aam1 foram clonadas para a sua produção em sistemas de expressão procarioto e eucarioto. As proteínas foram avaliadas quanto a sua capacidade de ligação à toxina Bin através de ensaios de afinidade. Em seguida, as proteínas Cqm1 e Aam1 nativas, obtidas a partir de preparações de *microvilli* intestinais de larvas, foram analisadas em relação ao padrão de glicosilação e capacidade de ligação através de ensaios de *pull-down* (Figura 9).

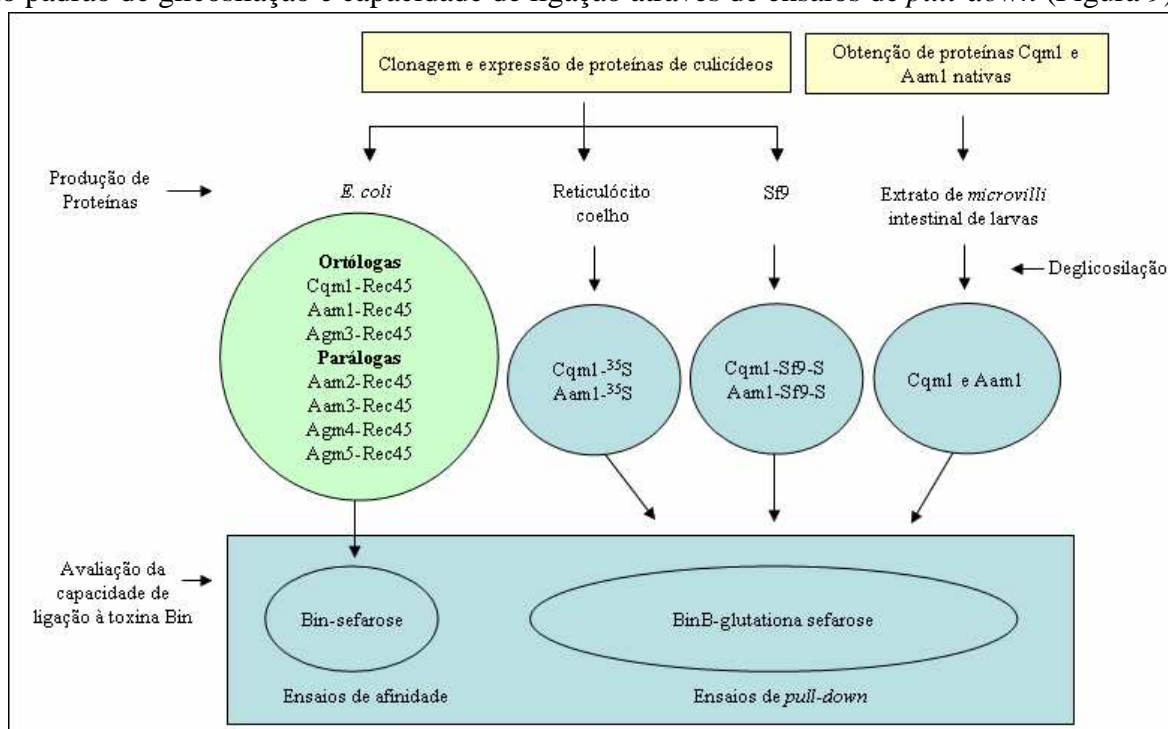


Figura 9. Representação esquemática da avaliação da capacidade de ligação de α -glicosidases de culicídeos à proteína BinB da toxina Bin do *Bacillus sphaericus*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Os fragmentos de 45 kDa das proteínas ortólogas ou parálogas de *Culex quinquefasciatus* (Cqm1-Rec45), *Aedes aegypti* (Aam1, Aam2 e Aam3-Rec45) e *Anopheles gambiae* (Agm3, Agm4 e Agm5-Rec45) e proteínas Cqm1 e Aam1 sob as formas recombinantes (reticulócito de coelho, Sf9) e nativas foram submetidas a ensaios de funcionalidade.

Na segunda etapa, foram investigadas regiões ou epítopos da proteína BinB envolvidos na ligação ao receptor Cqm1. O gene que codifica a proteína BinB foi clonado e a construção plasmidial foi submetida a reações de mutagêneses sítio-dirigidas para gerar novas construções que codificam proteínas BinB mutantes truncadas, com diferentes trechos deletados na porção N-terminal e C-terminal, além de proteínas mutantes contendo a substituição de trincas selecionadas de aminoácidos por alaninas. A avaliação da capacidade de interação das proteínas BinB mutantes com extratos protéicos de larvas de *C. quinquefasciatus* contendo o receptor específico Cqm1, foi realizada através de ensaios de *pull-down* (Figura 10).

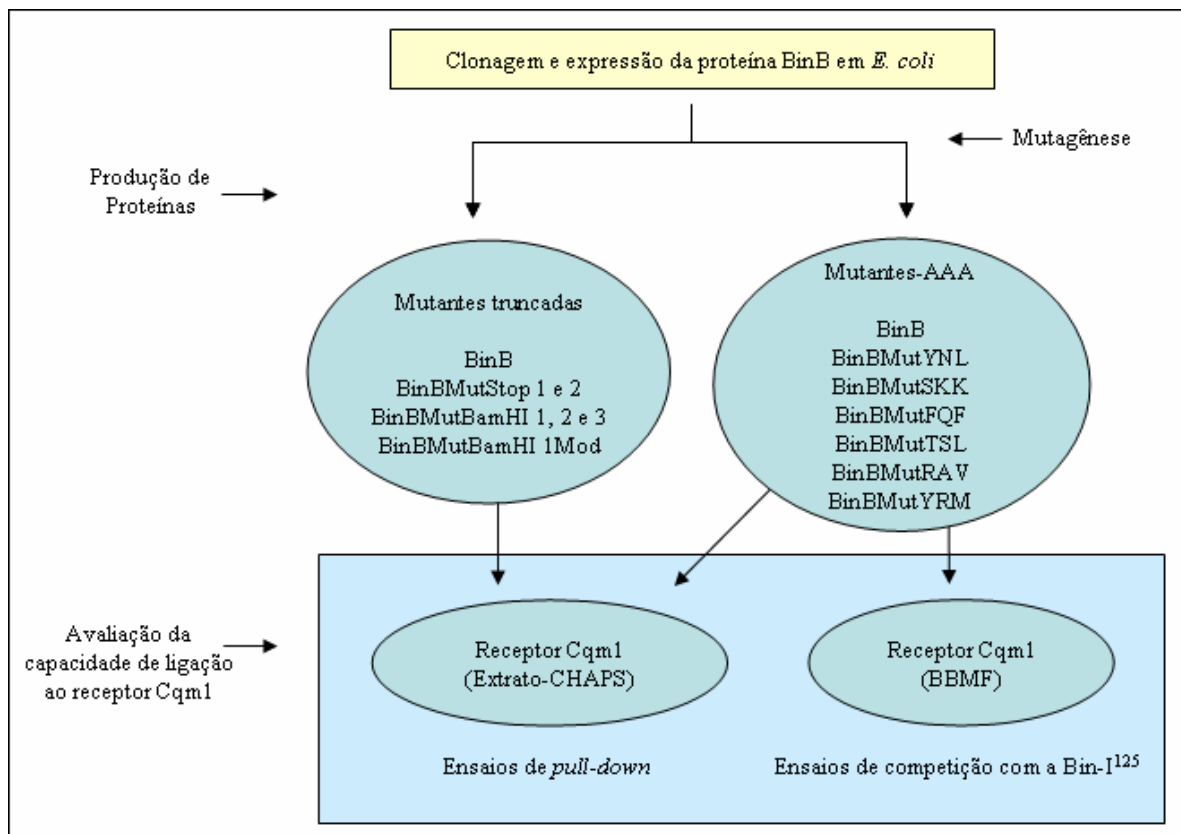


Figura 10. Representação esquemática dos ensaios para determinação do motivo de ligação na proteína BinB da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* ao receptor Cqm1 de *Culex quinquefasciatus*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: A proteína BinB recombinante (BinB) e as proteínas mutantes derivadas (BinBMuts) foram submetidas a ensaios de ligação ou ensaios de competição para avaliar sua capacidade de interação com o receptor nativo Cqm1 em preparações de *microvilli* intestinal de larvas (extrato-CHAPS, BBMF).

7.2 Colônias de insetos

Foram utilizadas larvas das colônias de *C. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* mantidas no insetário do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), a $26 \pm 1^\circ \text{C}$, umidade relativa entre 65-85% e fotoperíodo 12:12 h (dia/noite). Os adultos foram alimentados em solução de sacarose a 10%, e as fêmeas fizeram repasto sanguíneo em *Gallus* sp. As larvas foram mantidas em cubas com água deionizada e alimentadas com ração para gatos. Os adultos de *An. gambiae* utilizados nesta tese, foram cedidos pelo Centro de Produção e Infecção de Anofelinos (CEPIA) do Instituto Pasteur (Paris). Larvas ou adultos foram utilizados em procedimentos de extração de DNA e RNA e larvas de 4º estágio foram utilizadas para obter preparações de frações de *microvilli* intestinal.

7.3 Preparações de frações ricas em *microvilli* intestinal

As frações ricas em *microvilli* intestinal (BBMF) foram obtidas a partir de larvas do 4º estágio, armazenadas a -80°C , segundo Silva-Filha, Nielsen-LeRoux e Charles (1997). A dosagem de proteínas foi mensurada segundo o método de Bradford, utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) (BRADFORD, 1976). A qualidade das amostras de BBMF foi avaliada através da determinação do enriquecimento da enzima α -glicosidase (EC 3.2.1.20), comparando 10 μg de proteínas da amostra inicial do extrato de larvas, com uma amostra de microvilosidades obtida ao final da preparação. Para tal, as amostras foram incubadas em um volume final de 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.

7.4 Frações de proteínas de BBMF solubilizadas

Frações de *microvilli* intestinal das larvas, solubilizadas com detergente CHAPS (extrato-CHAPS) foram obtidas segundo Silva-Filha, Nielsen-LeRoux e Charles (1999). As amostras de BBMF foram centrifugadas a 100.000 g, a 4 °C, por 14 minutos e o sedimento foi incubado com o tampão TBSEA (Tris 19 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5) com CHAPS a 1%, sob agitação lenta, por 1 h a 4 °C. Após a solubilização, as preparações foram centrifugadas a 100.000 g, 4 °C, durante 14 min. O sobrenadante contendo as proteínas solubilizadas (extrato-CHAPS) foi avaliado através da dosagem de proteínas e da atividade α -glicosidase, antes e após a solubilização, conforme descrito no item 7.3. As amostras de extrato-CHAPS foram armazenadas a -70 °C até a utilização

7.5 Ensaio de atividade de α -glicosidases em gel

No ensaio de atividade enzimática em gel, previamente descrito em Romão et al. (2006), foram utilizadas amostras de extrato total e/ou BBMF solubilizadas em tampão de Laemmli 2X (LAEMMLI, 1970), sem o agente redutor 2-mercaptoetanol e sem aquecimento. As amostras protéicas (15 μ g) foram submetidas à SDS-PAGE 8% a 4 °C e, após a migração eletroforética, o gel foi equilibrado três vezes em uma solução aquosa de Triton X-100 a 2.5% por 10 minutos, à TA. Em seguida, o gel foi incubado em tampão citrato de sódio-fostato a 100 mM pH 6.5 contendo 2 mM do substrato 4-metilumbeliferil α -D-glicosídeo (SIGMA), por 20 minutos a uma temperatura de 37 °C, sob agitação leve. A visualização do perfil de bandas catalíticas das α -glicosidases foi feita em transiluminador de luz ultravioleta (UV).

7.6 Ensaio de imunodeteção

As amostras de proteínas, nativas ou recombinantes, a serem analisadas foram submetidas à separação eletroforética por SDS-PAGE a 10 ou 8% e as proteínas do gel foram

transferidas para uma membrana de nitrocelulose ECL® (GE Healthcare), para posterior imunodeteção. Neste procedimento a membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5% em tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.2 %, pH 7,4) por 1 h à temperatura ambiente (TA) e, em seguida, foi incubada com o anticorpo policlonal primário anti-Cqm1 obtido por Romão et al. (2006), (1:100/produzido em coelhos) por 16 h a 4 °C, ou com o anti X-press™ (Invitrogen) (1:5.000/produzido em camundongo) por 1 h a TA. Em seguida foi feita uma incubação com um anticorpo secundário anti IgG de coelho para o primário anti-Cqm1 (1:10.000) (Amersham) ou anti IgG de camundongo para o primário anti X-press (1: 10.000) (Invitrogen) conjugados à peroxidase. Entre as incubações foram realizadas lavagens da membrana com o tampão TBS-T e a imunodeteção foi realizada pelo sistema de quimioluminescência ECL® (GE Healthcare) ou Immobilon™ Western (Millipore). O anticorpo anti-Cqm1 reconhece de forma específica o receptor Cqm1 e suas proteínas ortólogas (ROMÃO et al., 2006). O anticorpo policlonal anti-Cqm1 foi produzido no Laboratório de Entomologia do CPqAM e submetido ao procedimento de imunoabsorção (MINSHAL; STANDARD, 2004), com a finalidade de melhorar a sua especificidade. O anticorpo anti X-press™ (Invitrogen) reconhece uma sequência de aminoácidos (DLYDDDDKD) inserida na porção N-terminal de todas as proteínas clonadas em vetores de expressão pRSET - Novagem®, no caso as proteínas de 45 kDa produzidas em *Escherichia coli* neste estudo.

7.7 Deglicosilação das proteínas Cqm1 e Aam1 nativas

As proteínas Cqm1 e Aam1 nativas foram tratadas com enzimas com atividade de endoglicosidase a fim de avaliar o efeito das glicosilações sobre a estrutura protéica e a capacidade de ligação com a toxina Bin. Os extratos-CHAPS obtidos de *C. quinquefasciatus* e de *Ae. aegypti* foram tratados com a enzima N-glicosidase F (PNGase F- New England Biolabs) que possui a capacidade de hidrolizar vários N-glicanos de glicoproteínas e com a enzima Endo H que é mais específica e cliva estruturas complexas de manose. O procedimento foi realizado segundo as recomendações do fabricante, cerca de 10-20 µg de proteínas de extratos-CHAPS e 2U de PNGase F ou Endo H foram incubados a 37 °C por 1 hora, em duplicata. Extratos protéicos incubados sem a enzima sob as mesmas condições citadas foram utilizados como controle. As amostras tratadas e não tratadas foram avaliadas

através de SDS-PAGE seguida de imunodeteção com o anticorpo anti-Cqm1. A capacidade de ligação das proteínas tratadas com a toxina BinB foi avaliada através de ensaios de *pull-down* como descrito no item 7.11.2.

7.8 Amplificação de genes homólogos ao Cqm1

As sequências gênicas correspondentes às proteínas ortólogas de *Ae. aegypti* (Aam1-XP_001660909.1) e *An. gambiae* (Agm3-ABW98683.1) e parálogas (Aam2-XP_001656785.1, Aam3-XP_001649784.1, Agm4-XP_320159.3 e Agm5-XP_320155.3), disponíveis no *GeneBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov), foram utilizadas para o desenho de oligonucleotídeos específicos que flanqueiam a região gênica que codifica a porção N-terminal localizada entre os aminoácidos Q32 ao L320, com massa molecular esperada de \cong 45 kDa (Tabela 5). Esta região foi caracterizada no receptor Cqm1 de *C. quinquefasciatus* por possivelmente conter o motivo de ligação à toxina Bin (ROMÃO et al., 2006). Nas reações de PCR foram utilizadas amostras de DNA total extraídas de larvas de 4º estágio das respectivas espécies, segundo Ayres et al., (2002), e as reações de PCR para amplificação dos fragmentos gênicos selecionados foram realizadas segundo Romão et al. (2006). Cada amostra foi amplificada em um termociclador BIOMETRA® programado para uma etapa de desnaturação a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 50 seg, 55 °C por 50 seg e 72 °C por 120 seg, e uma etapa final de 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,05X (Tris 8.9 mM; ácido bórico 8.9 mM; EDTA 2 mM), corado com brometo de etídeo e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta. Os fragmentos gênicos amplificados foram purificados com o kit “*GFX DNA and Gel Band Purification*®” (GE Healthcare), antes da etapa de clonagem.

Tabela 5. Sequências ortólogas e parálogas à proteína Cqm1 (ABC59609.1) de *Culex quinquefasciatus*, de *Aedes aegypti* (Aam1, 2 e 3) e de *Anopheles gambiae* (Agm3, 4 e 5). ^a Identidade de aminoácidos das sequências protéicas em relação a sequência Cqm1.

Nome	Identidade ^a	Código de acesso no <i>GeneBank</i>	Categoria
Aam1	74%	XP_001660909.1	ORTÓLOGA
Aam2	43%	XP_001656785.1	PARÁLOGA
Aam3	<40%	XP_001649784.1	PARÁLOGA
Agm3	67%	ABW98683.1	ORTÓLOGA
Agm4	<40%	XP_320159.3	PARÁLOGA
Agm5	<40%	XP_320155.3	PARÁLOGA

Fonte: Elaborado pelo autor.

7.9 Clonagem e expressão de proteínas recombinantes

As clonagens necessárias para gerar as principais construções plasmidiais utilizadas na produção de proteínas recombinantes em diferentes sistemas de expressão, estão descritas nesta seção. As preparações de DNA plasmidial foram submetidas à reação de sequenciamento automático no ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), realizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM, com o intuito de avaliar a identidade e integridade das sequências a serem clonadas.

7.9.1 Produção de proteínas ortólogas e parálogas à Cqm1 em *Escherichia coli*

Foram desenhados oligonucleotídeos com sítios de restrição específicos (Pst I e Hind III) que permitiram a amplificação e clonagem de fragmentos do gene do receptor Cqm1 e das demais proteínas ortólogas e parálogas selecionadas neste estudo (Tabela 6). Os fragmentos gênicos correspondentes a porção N-terminal das proteínas ortólogas e parálogas da Cqm1 foram purificados como descrito no item 7.8 e clonados em vetores plasmidiais de expressão pRSETc- Novagem® (Figura 11). Os plasmídeos pRSETc contendo os respectivos genes foram utilizados para a transformação de células competentes de *E. coli* cepa BL21 *star*, a fim de obter a expressão das proteínas recombinantes. Após a transformação, as células foram mantidas em meio de cultura Luria-Bertani (LB) suplementado com ampicilina (100 µg/ml).

Uma colônia da placa foi selecionada para a sua propagação em meio LB líquido e a expressão das proteínas foi induzida pela adição de isopropiltiogalactosídeo (IPTG), segundo Romão et al. (2006). Alíquotas da cultura, antes e após a indução com o IPTG, foram coletadas, centrifugadas a 5.000 g por 10 min a 4° C, e as amostras foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE a 10% para avaliar a expressão das proteínas. Para a obtenção das proteínas recombinantes sob a forma solúvel e posterior utilização em ensaios de ligação, o sedimento das culturas contendo as células foi ressuspensão em tampão PBS (NaH₂PO₄ 2.1 mM, Na₂HPO₄ 14 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4), e as células foram lisadas em um sonicador (*Ultrasonic Homogenizer* – Cole Parmer®), através de 6 pulsos de 30 s, um intervalo de 1 minuto entre os pulsos e com uma amplitude de 50. Após a lise, a amostra foi acrescida de Triton X-100 a 1% e centrifugada a 5.000 g por 10 min a 4° C. O sobrenadante obtido foi utilizado na purificação protéica por cromatografia de afinidade, utilizando a resina de agarose Ni-NTA® (Qiagen) como suporte sólido. As proteínas recombinantes ligadas à resina foram eluídas conforme ROMÃO et al. (2006) e as amostras de cada eluato foram submetidas à SDS-PAGE a 10%, para avaliar a qualidade das proteínas purificadas.

Tabela 6. Oligonucleotídeos desenhados a partir das sequências gênicas, ortólogas e parálogas ao receptor Cqml de *Culex quinquefasciatus*, de *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. *Letras em negrito indicam sítios de restrição na sequência dos oligonucleotídeos para as enzimas Pst I (CTGCAG) e Hind III (AAGCTT)

Gene alvo	Oligonucleotídeo	Sequência
<i>aam1</i>	Aam1 1F	5'-CAACTGCAGCAACATGCGACCTTCTATCAG-3'
<i>aam1</i>	Aam1 1R	5'-GAAAAGCTTTAGCTGGAAGTTGAACGGCAT-3'
<i>aam2</i>	Aedes3434_Aam2 1F	5'-CAACTGCAGGAAAAGGCGGGATTCTATCAA-3'
<i>aam2</i>	Aedes3434_Aam2 1R	5'-GAAAAGCTTCTTCAAATCATTGATCATCCC-3'
<i>aam3</i>	Aedes667_Aam3 1F	5'-CAACTGCAGCAGCAGCAGCCAACTTCTATCAG-3'
<i>aam3</i>	Aedes667_Aam3 1R	5'-GCGGAATTCGTTACTCAGAACTTCAAAG-3'
<i>agm3</i>	Agm3 1F	5'-GCACTGCAGCAGCATGCCACGTTCTATCAG-3'
<i>agm3</i>	Agm3 1R	5'-GAAAAGCTTCAGCTGAAAGTTGAACGGCATG-3'
<i>agm4</i>	Ang 8953_Agm4 1F	5'-CAACTGCAGTCAGCTGTATTCTATCAAATC-3'
<i>agm4</i>	Ang 8953_Agm4 1R	5'-GAAAAGCTTGAAATGAAAATTGAACGGAAT-3'
<i>agm5</i>	Ang 00181_Agm5 1F	5'-GCACTGCAGCAGCATGCCAACTTTTATCAG-3'
<i>agm5</i>	Ang 00181_Agm5 1R	5'-GAAAAGCTTAAGGACCTCGAAGTTGAACGG-3'

Fonte: Elaborado pelo autor.

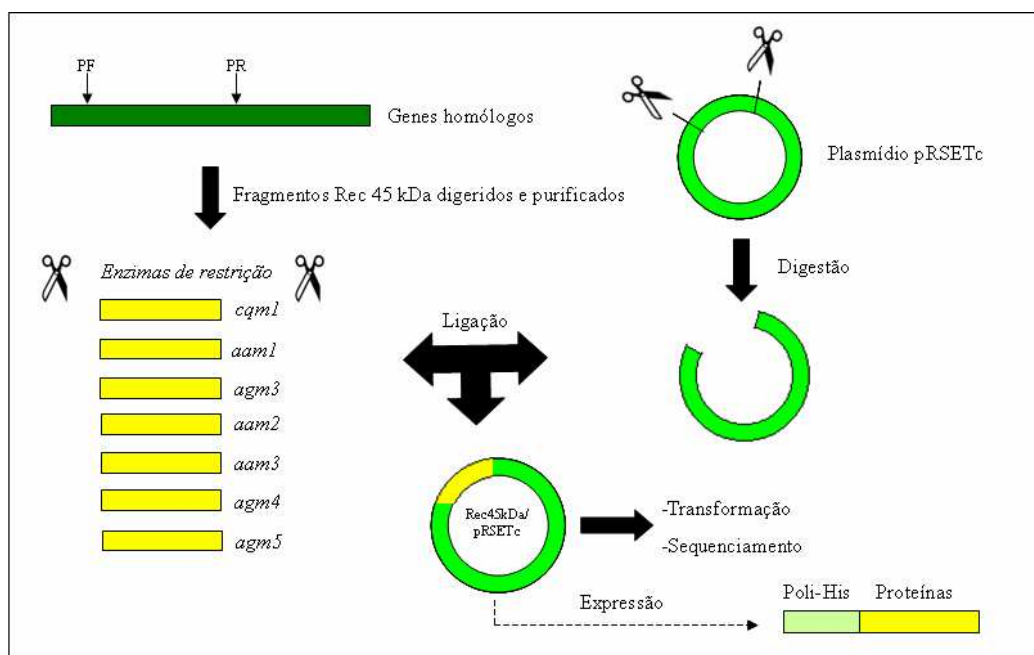


Figura 11. Principais procedimentos de clonagem dos fragmentos gênicos correspondentes a porção N-terminal de 45 kDa das proteínas ortólogas e parálogas à Cqm1 no plasmídeo de expressão pRSETc.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: PF: Oligonucleotídeo *forward*. PR: Oligonucleotídeo reverso. Poli-His: sequência de poli histidinas.

7.9.2 Produção das proteínas Cqm1 e Aam1 em lisado de reticulócito de coelho

Foram desenhados oligonucleotídeos para amplificação e clonagem dos cDNAs *cqm1* e *aam1* que codificam as proteínas Cqm1 e Aam1 em vetores plasmidiais de expressão (Tabela 7). Duas construções plasmidiais, obtidas em ROMÃO et al. (2006) através da técnica de *GeneRacer*®, foram utilizadas para montagem dos fragmentos 5' e 3' da proteína Cqm1 no 4-TOPO vetor (Figura 12). A localização dos sítios de restrição Pst I e Sac I no vetor que continha o fragmento que codifica para porção N-terminal de Cqm1 possibilitou sua subclonagem em outra construção que continha a região C-terminal. A nova construção plasmidial que continha o cDNA *cqm1* completo foi submetida a reações de PCR com oligonucleotídeos específicos que permitiram a amplificação e clonagem do fragmento inteiro no vetor pRSETc. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento interno dos cDNAs *cqm1* e *aam1* estão descritas na Tabela 8. O cDNA do gene *aam1* foi obtido a partir de RT-PCRs de RNA total de um *pool* de larvas de *Ae. aegypti*, segundo Romão et al. (2006). As reações de PCR levaram à amplificação de um fragmento que inicialmente foi clonado no vetor pGEM®T-easy. As construções plasmidiais *cqm1*/pRSETc e *aam1*/pGEM®T-easy foram utilizadas na transformação de células de *E. coli* cepa DH10B

eletrocompetentes a fim de obter maxi-preparações de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina, descrito em Ausbel et al. (1992). Os DNAs plasmidiais foram digeridos a 37 °C com as endonucleases de restrição Pst I e Hind III para *aam1* e Pst I e Nco I para *cqm1* e os fragmentos liberados foram purificados e subclonados no vetor plasmidial pGEM3zf+® (Promega), para a expressão das proteínas em ensaios de transcrição e tradução *in vitro* neste sistema.

Tabela 7. Oligonucleotídeos desenhados a partir das seqüências dos genes *cqm1* e *aam1* de *Culex quinquefasciatus* e de *Aedes aegypti*, respectivamente. *Letras em negrito indicam sítios de restrição na seqüência dos oligonucleotídeos para Pst I (CTGCAG), Nco I (CCATGG) e Hind III (AAGCTT).

Gene alvo	Oligonucleotídeo	Seqüência
<i>cqm1</i>	Cpq1F New	5'-CGACTG CAG TCTCCGAGCAAGATGCGA-3'
<i>cqm1</i>	Cpq2R New	5'-GCAC CA TGGATTACGCCTGTATCAGCC-3'
<i>aam1</i>	Aam1F	5'-GCA CTG CAGAGTTCGGCTGACGAGATG-3'
<i>aam1</i>	Aam1R	5'-GAAA AGCTT CTACTAAGAAATACTT-3'
<i>cqm1</i>	KosakMutCqm1 1F	5'-CGACCTGCAGTCTCCGGCCACCATGCGACCGCTGGGAG-3'
<i>cqm1</i>	KosakMutCqm1 1R	5'-CTCCCAGCGGTTCGCATGGTGGCCGGAGACTGCAGGTTCG-3'
<i>cqm1</i>	HindIIIMutCqm1 1F	5'-CA CTT CCAGCATCTGACCAA ACT CCGACGGCACCG 3'
<i>cqm1</i>	HindIIIMutCqm1 1R	5'-CGGTGCCGTCGGAGTTTGGTCAGATGCTGGAAGTG-3'
<i>aam1</i>	KosakMutAam1 1F	5'-CTGCAGAGTTCGGCTGCCGCCATGCGGCTGTGTAGTG-3'
<i>aam1</i>	KosakMutAam1 1R	5'-CA CT ACACAGCCGCATGGCGGCAGCCGA ACT TCTGCAG-3'

Fonte: Elaborado pelo autor.

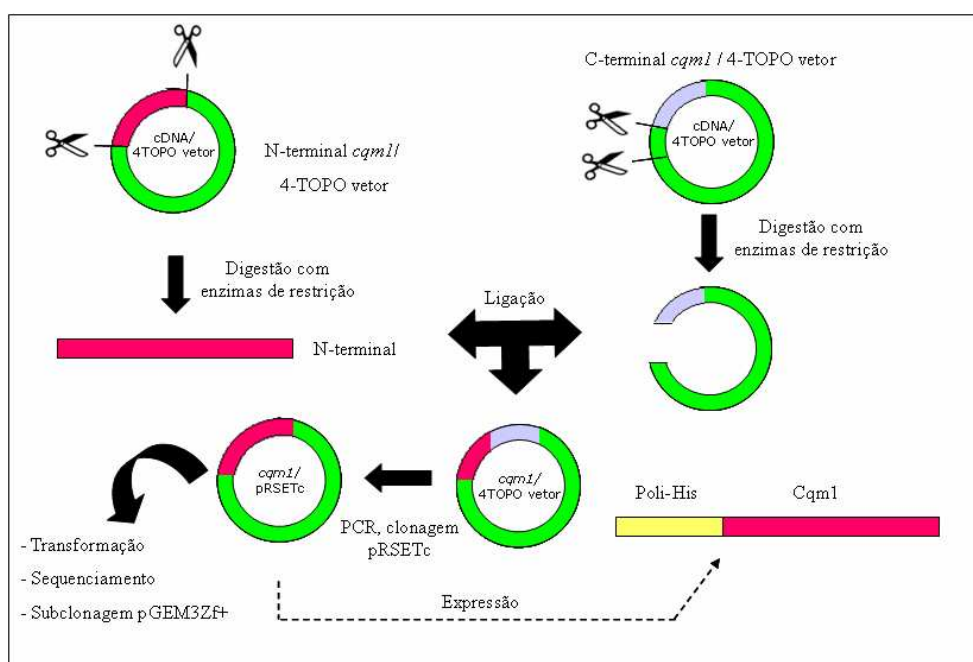


Figura 12. Principais procedimentos de construção do cDNA do gene *cqm1* e clonagem no vetor de expressão pRSETc.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Poli-His: seqüência de poli histidinas.

Tabela 8. Oligonucleotídeos desenhados a partir das sequências gênicas do receptor da toxina Bin em *Culex quinquefasciatus* (Cqm1) e de sua ortóloga (Aam1) em *Aedes aegypti*, utilizados na reação de sequenciamento das construções plasmidiais.

Gene alvo	Primer	Sequência
<i>cqm1</i>	Primer 6 F	5'-CGCCAGGGAGCTCACATGCCGTT-3'
<i>cqm1</i>	Seqprimer2F	5'-ATGCAGAAGAATCCACAAAG-3'
<i>cqm1</i>	Seqprimer1F	5'-AGGGGGTGGTCCGCCGAATAAT-3'
<i>cqm1</i>	Cpq1R	5'-GGAAGTGGTGGGAAGGTAC-3'
<i>cqm1</i>	Primer 3 R	5'-CAGCTGGAAGTTGAACGGCAT-3'
<i>cqm1</i>	Seqprimer1R	5'-ACTCCCCTCTCGCTGTATTA-3'
<i>aam1</i>	Seq_aam1_1F	5'-CATGAAGGCCGCCAGGAGTT-3'
<i>aam1</i>	Seq_aam1_1R	5'-ACACCGCTGGATTACGATAGTTC-3'
<i>aam1</i>	Seq_aam1_2F	5'-AACCGGGTGGAGCAAATGATGA-3'
<i>aam1</i>	Seq_aam1_2R	5'-GATTCCTCGCCATAGTAAGTT-3'

Fonte: Elaborado pelo autor.

A reação de transcrição *in vitro* para a produção dos mRNAs das proteínas Cqm1 e Aam1, foi realizada a partir dos respectivos cDNAs contidos no vetor pGEM3Zf+ linearizados com a enzima de restrição Hind III. Aproximadamente 3 µg de cada DNA plasmidial linearizado foi transcrito *in vitro* com 5 µl do tampão de transcrição (Tris-HCl 200 mM/MgCl₂ 30 mM/espermidina 10 mM/NaCl 50 mM), 2 µl de T7 RNA polimerase 5 U/µl (Amersham Biosciences), 0,5 µl de cada rNTP (UTP, ATP, GTP e CTP) a 100 mM, 0,5 µl de DTT 1 M, 1,5 µl do inibidor de RNase, 10 mM do nucleotídeo 7-metilguanossina (CAP) para conferir maior estabilidade ao mRNA na célula, e água para completar o volume final de 50 µl. A reação foi incubada a 37° C por 90 minutos e, após a incubação, foram adicionados 50 µl de tampão TE (Tris 10 mM/EDTA 1 mM) para interromper a reação. A partir do volume final da reação de transcrição (100 µl), 1 µl dos transcritos foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, e visualizado em transiluminador de luz UV.

Os mRNAs obtidos foram extraídos com fenolclorofórmio e recuperados com 30 µl de tampão TE. Uma alíquota de 1 µl dos RNAs purificados (\cong 1 µg/µl) foi utilizada no procedimento de tradução *in vitro* em sistema de lisado de reticulócitos de coelho (*Rabbit Reticulocyte Lysate*[®], Promega) (2,5 µl), suplementado com metionina marcada com ³⁵S (2,5 µCi/reação). A reação foi realizada em um termociclador BIOMETRA[®] a uma temperatura de 30 °C, durante 90 minutos. Após a tradução, uma alíquota de 5 µl de cada amostra foi submetida a eletroforese SDS-PAGE a 10%, o gel foi corado com azul de Comassie e

submetido à secagem a 65 °C durante 1 h. Para a visualização das proteínas, um filme autoradiográfico Hiperfilm® (Amershan) foi exposto ao gel durante 12 h à TA para a detecção das proteínas marcadas com ³⁵S (Cqm1-³⁵S e Aam1-³⁵S). As proteínas Cqm1-³⁵S e Aam1-³⁵S foram submetidas a ensaios de *pull-down*, para avaliar a sua capacidade de interação com a toxina Bin.

Neste procedimento, o melhoramento da expressão das proteínas radioativas se deu através da mutagênese sítio-dirigida QuikChange® (Stratagene) da sequência KOSAK de cada cDNA em seu plasmídeo. O sítio de restrição interno para a enzima Hind III na sequência gênica de *cqm1* também foi removido com intuito de facilitar posteriores subclonagens e as sequências dos oligonucleotídeos utilizados na reação de mutagênese estão descritas na Tabela 7.

7.9.3 Produção das proteínas Cqm1 e Aam1 em células Sf9

A produção das proteínas recombinantes no sistema de expressão heterólogo de linhagem de células de tecido ovariano pupal do lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (Sf9) foi realizada através do Kit InsectSelect™Glow System (Invitrogen), segundo as recomendações do fabricante. O vetor de expressão utilizado, o pIZT/V5-His, contém as seguintes características: um promotor de células eucarióticas para expressão constitutiva do gene de interesse; gene de resistência a zeocina™ fusionado ao gene GFP (*green fluorescent protein*) para seleção e detecção de linhagens de células estáveis; um peptídeo C-terminal fusionado à proteína recombinante contendo o epitopo V5; cauda de histidinas para detecção e purificação da proteína recombinante. Foram desenhados oligonucleotídeos com sítios de restrição específicos (Kpn I e Xba I) que possibilitaram a amplificação e clonagem dos cDNAs de *cqm1* e *aam1*, com sequências Kosak mutagenizadas, previamente clonados no pGEM3Zf+, no vetor pIZT/V5-His® (Invitrogen) (Tabelas 9 e 10). Os cDNAs foram amplificados e purificados como descrito no item 7.8 e clonados no vetor plasmidial pGEM®T-easy para a posterior subclonagem no plasmídeo pIZT/V5-His®. A digestão das construções plasmidiais contendo os cDNAs *cqm1* e *aam1* clonados no pGEM®T-easy com as enzimas de restrição específicas Kpn I e Xba I possibilitou a liberação de fragmentos digeridos que foram subclonados no vetor pIZT/V5-His. Os cDNAs *cqm1-S* e *aam1-S* codificam as proteínas sob a

forma solúvel (S) pois não possuem em sua sequência gênica o trecho que codifica os 19 últimos aminoácidos correspondentes a porção hidrofóbica C-terminal responsável pela ancoragem da proteína na membrana. Em compensação, nestas proteínas é acrescentada uma sequência de aminoácidos do epítipo V5 que confere sua imunodeteção alternativa com o anticorpo anti-V5® (Invitrogen) e cauda de histidinas. Já os cDNAs *cqm1-M* e *aam1-M* codificam as proteínas na forma ligada à membrana que possuem a porção hidrofóbica responsável pela sinalização da âncora GPI. As mini-preparações e maxi-preparações plasmidiais pIZT/V5-His contendo os insertos *cqm1-S* e *M* e *aam1-S* e *M* foram purificadas através do QIAGEN® Plasmid Purification Maxi Kit e utilizadas em ensaios de transfecção mediado por lipídeos em células Sf9, usando o reagente celfectina® (Invitrogen), segundo as instruções do Kit InsectSelect™Glow System (Invitrogen). As linhagens celulares transfectadas foram selecionadas em meio de cultura suplementado com o antibiótico zeocina®.

Para a análise da expressão das proteínas recombinantes Cqm1-Sf9-S e Aam1-Sf9-S, o meio de cultura das linhagens transfectadas foi coletado, as proteínas precipitadas pelo ácido tricloroacético (TCA), e as amostras submetidas à SDS-PAGE 10% e à imunodeteção com o anticorpo anti-Cqm1. Para análise funcional das proteínas secretadas, 1 a 2 ml do meio de cultura foi utilizado em ensaios de *pull-down* com a proteína BinB recombinante, conforme descrito no item 7.1.1.2. Para a avaliação da expressão das proteínas de membrana Cqm1-Sf9-M e Aam1-Sf9-M, foram realizadas preparações de membranas celulares de cada linhagem transfectada segundo Pauchet et al. (2005) e ensaios de imunodeteção destas frações celulares com o anticorpo anti-Cqm1. Linhagens celulares transfectadas com o plasmídeo pIZT/V5-His sem inserto foram utilizadas como controle negativo em todas as avaliações.

Tabela 9. Oligonucleotídeos desenhados a partir das construções plasmidiais dos cDNAs *cqm1* de *Culex quinquefasciatus* e *aam1* de *Aedes aegypti* clonados em pGEM3Zf+ com as sequências Kosak mutagenizadas.

Primer	Sequência
Culex pIZT/Sf9 1F	5'-CAGGGTACCTCTCCGGCCACCATGCGA-3'
Culex pIZT/Sf9 1R	5'-CAGTCTAGAGCAGCTGCCGACGAAACCGT-3'
Culex pIZT/Sf9 2R	5'-CAGTCTAGACTACACGAAAATATACCTG-3'
Aedes pIZT/Sf9 1F	5'-CAGGGTACCAGTTCGGCTGCCGCCATGCGG-3'
Aedes pIZT/Sf9 1R	5'-CAGTCTAGAGCAGCTGCCGATGAAGCTCT-3'
Aedes pIZT/Sf9 2R	5'-CAGTCTAGACTACACTAAGAAATACTTG-3'

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: *Letras em negrito indicam sítios de restrição na sequência dos oligonucleotídeos para Kpn I (GGTACC) e Xba I (TCTAGA).

Tabela 10. Associações de oligonucleotídeos e os respectivos fragmentos gênicos gerados para a expressão das proteínas Cqm1 e Aam1 solúvel (S) e de membrana (M).

Oligonucleotídeos	Fragmentos gênicos
Culex pIZT/Sf9 1F – Culex pIZT/Sf9 1R	<i>cqm1-S</i>
Culex pIZT/Sf9 1F – Culex pIZT/Sf9 2R	<i>cqm1-M</i>
Aedes pIZT/Sf9 1F – Aedes pIZT/Sf9 1R	<i>aam1-S</i>
Aedes pIZT/Sf9 1F – Aedes pIZT/Sf9 2R	<i>aam1-M</i>

Fonte: Elaborado pelo autor.

7.9.4 Produção da proteína BinB em *Escherichia coli*

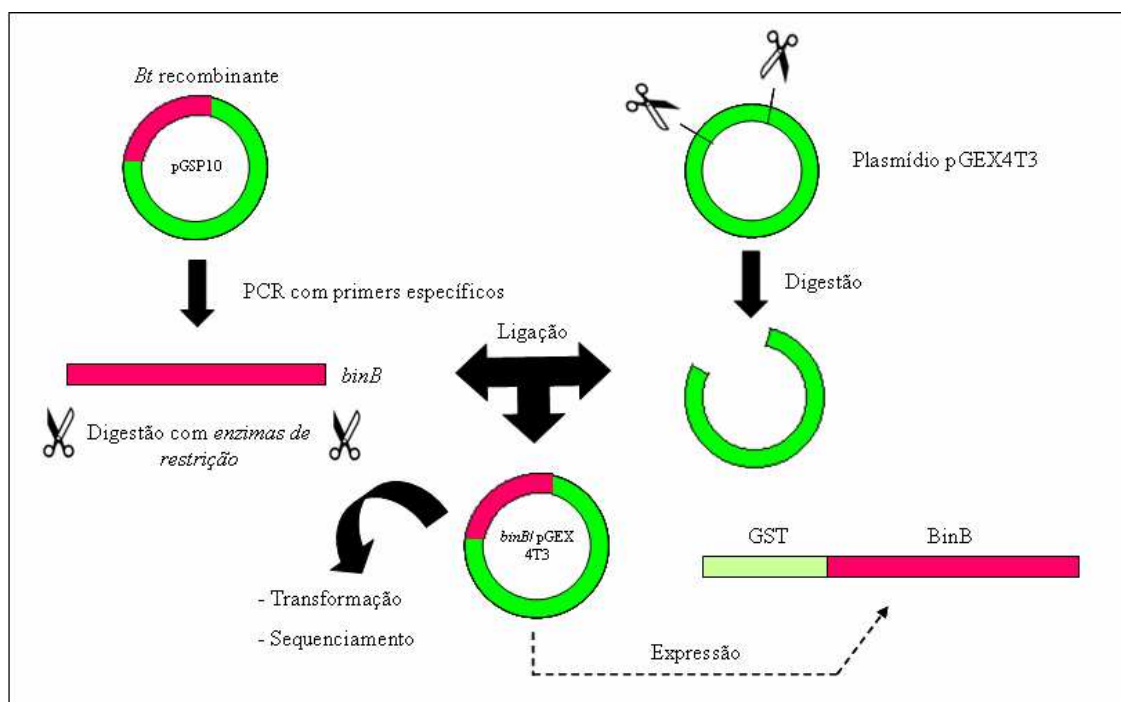
O gene da subunidade BinB de 51 kDa da toxina Bin do *B. sphaericus* foi amplificado a partir do plasmídeo pGSP10 que contém o gene que codifica a toxina Bin (BOURGOUIN et al., 1990). O fragmento gênico *binB* foi amplificado, purificado e clonado no vetor plasmidial pGEM[®]T-easy utilizando oligonucleotídeos específicos com sítios de restrição inicial para BamH I e Xho I (Tabela 11). Após a digestão da construção plasmidial *binB*/pGEM[®]T-easy com as enzimas BamH I e Xho I, o fragmento gênico liberado foi subclonado no plasmídeo de expressão pGEX4T3 (Amersham) (Figura 13). A construção plasmidial *binB*/pGEX4T3 foi utilizada para a transformação de células competentes de *E. coli* cepa BL21 *star*, para a expressão da proteína recombinante, conforme descrito no item 7.9.1. A purificação da proteína BinB fusionada a uma sequência de GST foi realizada de acordo com De Melo Neto, Standart e Martins de Sá (1995) e Dhalia et al. (2005). A construção plasmidial permitiu a expressão da proteína recombinante BinB fusionada a uma sequência de Glutathione-S-Transferase (GST). Após a purificação e diálise (Na₂HPO₄ 40 mM, NaH₂PO₄ 5 mM, NaCl 50 mM, Triton X-100 0,1%, glicerol 5%) durante 3 horas a 4 °C, a proteína BinB recombinante (BinB-Rec) foi utilizada em todos os ensaios de *pull-down* com extratos-CHAPS de *C. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*, ou proteínas Cqm1 e Aam1 recombinantes conforme descrição na seção 7.10.2

Tabela 11. Oligonucleotídeos desenhados a partir do gene *binB* que codifica a subunidade BinB da toxina Bin do *Bacillus sphaericus*.

Primer	Sequência
P51Bs1FNew	5'- CAC GGATCC ATGTGCGATTCAAAAGACAATTC -3'
P51BS 1R	5'- CAC CTCGAG CTGGTTAATTTTAGGTATTAATTC -3'

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: *Letras em negrito indicam sítios de restrição na sequência dos oligonucleotídeos para BamH I (GGATCC) e Xho I (CTCGAG).

**Figura 13.** Principais procedimentos de clonagem do gene *binB* no vetor de expressão pGEX4T3.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: *Bt*: *Bacillus thuringiensis*. GST: glutathione S-transferase.

7.10 Mutagênese do gene *binB*

A finalidade desta etapa foi mapear motivos na proteína BinB envolvidos na ligação ao receptor Cqm1 e identificar aminoácidos responsáveis por esta interação. Os procedimentos de mutagênese foram realizados com o Kit de mutagênese sítio-dirigida QuikChange® (Stratagene) e através de oligonucleotídeos específicos, segundo instruções do

fabricante (Figura 14). Foram realizadas três etapas de mutagênese utilizando como molde a construção plasmidial do gene *binB* clonado no plasmídeo pGEX4T3. Na primeira etapa foi feita a inserção de códons de parada prematuros em diferentes regiões do gene, a qual leva à remoção de trechos de aminoácidos na porção C-terminal das proteínas mutantes expressas (BinBMutStop1 e 2) (Figura 15). Ainda nesta etapa, foram inseridos sítios de restrição para a endonuclease BamH I em diferentes posições no gene para a construção de proteínas BinB mutantes que possibilitaram a remoção de diferentes porções N-terminais (BinBMutBamHI 1, 2 e 3) (Figura 15). As regiões de aminoácidos deletadas foram escolhidas com base na análise de trechos hidrofílicos na sequência protéica original da toxina BinB, através do programa *Protean* do DNASTar, deixando-os mais expostos em cada proteína mutante gerada (CLARK; BAUMANN, 1990; ELANGO VAN et al., 2000). Os oligonucleotídeos utilizados nesta primeira etapa de mutagênese possibilitaram seis diferentes construções plasmidiais que codificam seis proteínas BinB mutantes (Tabela 12 e Figura 27A). As construções plasmidiais que tiveram sítios de restrição para a endonuclease BamH I inseridos em diferentes posições no gene, foram submetidas a uma etapa de digestão com esta mesma enzima, a 37 °C durante 1 hora, seguida de ligação com a T4 DNA ligase, possibilitando a remoção de fragmentos gênicos de 246 pb, 474 pb e 873 pb na porção N-terminal de cada construto que codificam as proteínas mutantes BinBMutBamHI 1, 2 e 3, respectivamente. A construção plasmidial que codifica a proteína mutante BinBMutBamHI 1 foi submetida a uma segunda etapa de mutagênese utilizando o oligonucleotídeo BinBMutStop3. A inserção de um códon de parada prematuro nesta construção plasmidial gerou um fragmento protéico menor sem as regiões N- e C-terminais, mantendo apenas a região central (BinBMutBamHI 1Mod) (Tabela 12 e Figura 27A).

Na terceira etapa, a construção plasmidial inicial *binB*/pGEX4T3 foi utilizada em reações de mutagênese nas quais blocos de 3 aminoácidos foram substituídos por blocos de alanina em diferentes pontos na sua sequência protéica total. Os seis diferentes blocos de aminoácidos selecionados para mutagênese, ³²YNL³⁴, ³⁸SKK⁴⁰, ¹⁴⁷FQF¹⁴⁹, ²⁰⁷TSL²⁰⁹, ²³¹RAV²³³ e ³⁸⁷YRM³⁸⁹, foram escolhidos de acordo com dados de literatura (CLARK; BAUMANN, 1990; ELANGO VAN et al., 2000; SINGKHAMANAN et al., 2009) e hidrofiliidade das regiões analisadas pelo programa *Protean* do DNASTar (Tabela 13 e Figura 27B). Os perfis de expressão das proteínas BinB mutantes foram verificados em SDS-PAGE e a sua capacidade de ligação com a proteína Cqm1 de *Culex* foi avaliada através de ensaios de *pull-down* e de competição homóloga, descritos nos itens 7.10.2 e 7.10.3, respectivamente.

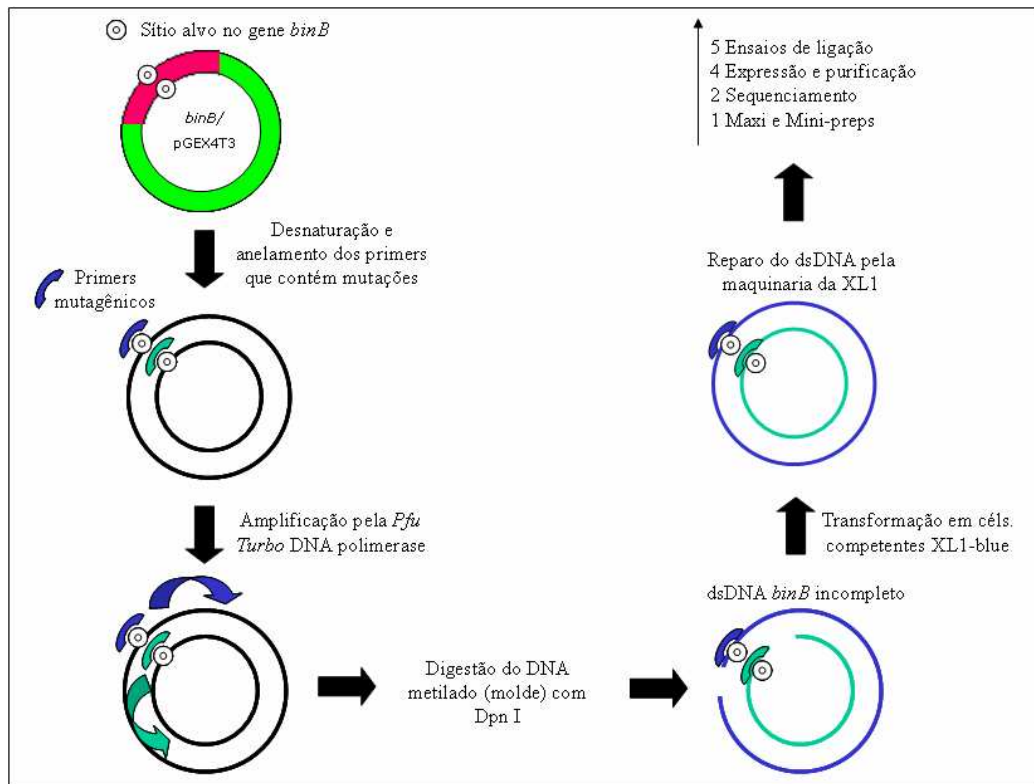


Figura 14. Principais etapas do protocolo de mutagenese sítio dirigida da construção plasmidial gene *binB* clonado no vetor de expressão pGEX4T3 utilizando o kit de mutagenese sítio-dirigida QuikChange® (Stratagene).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: dsDNA: DNA dupla-fita. *DpnI*: enzima de restrição. XL1-blue: linhagem de *E. coli* eletrocompetente.

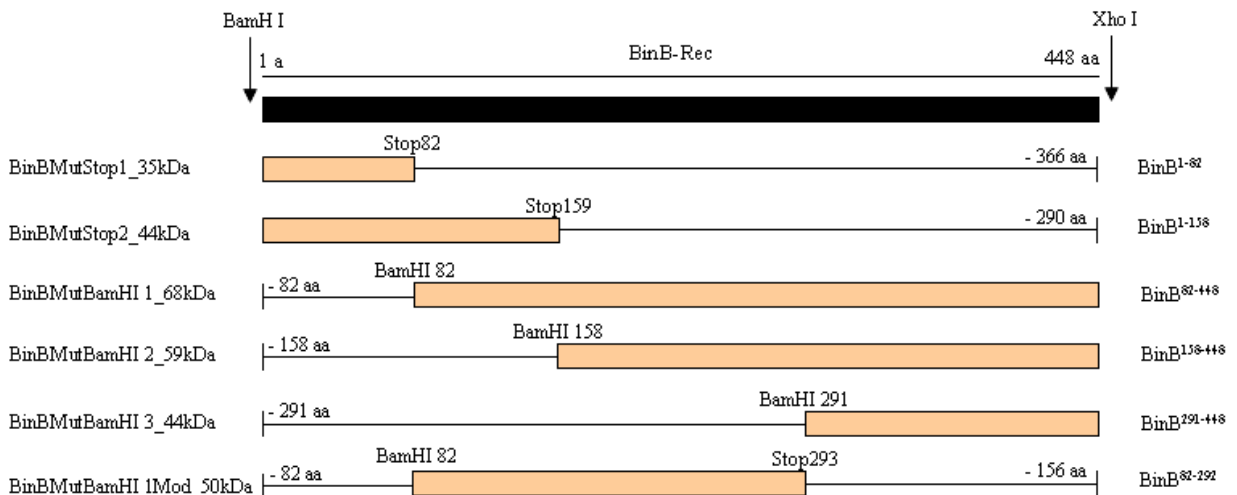


Figura 15. Diagrama da localização dos códons de parada prematuros e sítios restrição para endonuclease BamH I nas proteínas BinB mutantes truncadas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Os sítios de restrição BamH I e Xho I flanqueiam o gene *binB* clonado no vetor pGEX4T3. As barras indicam as sequências de aminoácidos conservadas em cada proteína mutante. O número de aminoácidos removidos (-) em cada proteína mutante está descrito acima de cada linha.

Tabela 12. Oligonucleotídeos utilizados para mutagênese sítio dirigida da proteína BinB do *Bacillus sphaericus* para obtenção de proteínas BinB recombinantes com porções das regiões N- e/ou C-terminais removidas.

Oligonucleotídeo	Mutação	Posição ^a no plasmídeo pGSP10	Tamanho (pb)	Sequência relevante ^b	Estratégia
MUTBinBStop1_1F	c742t	713-771	59	739-5' CCTCGATTCTTG 3'-750 T	Fragmento de 82 aminoácidos N-terminais com a deleção de 366 aminoácidos C-terminais, mudança de 82Arg (R) para códon de parada depois do códon de iniciação Met.
MUTBinBStop1_1R				739-3' GGAGCTAAGAAC 5'-750 A	
MUTBinBBamHI.1_1F	c742g_t746c	715-773	59	739-5' CCTCGATTCTTG 3'-750 G C	Deleção de 82 aminoácidos N-terminais, mudança de 82Arg (R) para Gly (G) e de 83Phe (F) para Ser (S), novo sítio de BamH I depois do códon de iniciação Met.
MUTBinBBamHI.1_1R				739-3' GGAGCTAAGAAC 5'-750 C G	
MUTBinBStop2_1F	c974g	955-993	39	967-5' GTATTGTCAAAT 3'-978 G	Fragmento de 158 aminoácidos N-terminais com a deleção de 290 aminoácidos C-terminais, mudança de 159Ser (S) para códon de parada depois do códon de iniciação Met.
MUTBinBStop2_1R				967-3' CATAACAGTTTA 5'-978 C	
MUTBinBBamHI.2_1F	t970g_t971g_g972a_a975c	944-1001	58	967-5' GTATTGTCAAAT 3'-978 GGA C	Deleção de 158 aminoácidos N-terminais, mudança de 158Leu (L) para Gly (G), novo sítio de BamH I depois do códon de iniciação Met.
MUTBinBBamHI.2_1R				967-3' CATAACAGTTTA 5'-978 CCT G	
MUTBinBStop3_1F	g1375t	1352-1398	47	1366-5' GGAATATCTGAA 3'-1377 T	Fragmento de 292 aminoácidos N-terminais com a deleção de 156 aminoácidos C-terminais, mudança de 293Glu (E) para códon de parada depois do códon de iniciação Met.
MUTBinBStop3_1R				1366-3' CCTTATAGACTT 5'-1377 A	
MUTBinBBamHI.3_1F	a1369g_t1370g_t1374c	1343-1400	58	1366-5' GGAATATCTGAA 3'-1377 GG C	Deleção de 291 aminoácidos N-terminais, mudança de 291Ile(I) para Gly (G), novo sítio de BamH I depois do códon de iniciação Met.
MUTBinBBamHI.3_1R				1366-3' CCTTATAGACTT 5'-1377 CC G	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota:

^a Refere-se a posição da primeira e última base do oligonucleotídeo na sequência do gene da toxina BinB no plasmídeo pGSP10 de 4.822 pb.

^b Sequência de interesse em cada primer que foi mutada neste estudo, a sequência original está na parte superior e os nucleotídeos modificados localizados abaixo da mesma.

Tabela 13. Oligonucleotídeos utilizados para mutagênese sítio dirigida da proteína BinB do *Bacillus sphaericus* para a obtenção de proteínas BinB recombinantes com trinca de aminoácidos substituídas por alaninas.

Oligonucleotídeo	Mutação	Posição ^a no plasmídeo pGSP10	Tamanho (pb)	Sequência relevante ^b	Estratégia
MUT YNL_AAA_1F	T592g_a593c_a595g_a596c_c598g_t599c	562-633	72	592-5' TATAACCTT 3'-600 GC GC GC	Substituição dos aminoácidos 32YNL34 por Alaninas.
MUT YNL_AAA_1R				592-3' ATATTGGAA 5'-600 CG CG CG	
MUT SKK_AAA 1F	t610g_a613g_a614c_a616g_a617c	586-648	63	610-5' TCAAAAAA 3'-618 G GC GC	Substituição dos aminoácidos 38SKK40 por Alaninas.
MUT SKK_AAA 1R				610-3' AGTTTTTTT 5'-618 C CG CG	
MUT FQF_AAA 1F	T937g_t938c_c940g_a941c_t943g_t944c	904-972	69	937-5' TTTCAATTC 3'-945 GC GC GC	Substituição dos aminoácidos 147FQF149 por Alaninas.
MUT FQF_AAA 1R				937-3' AAAGTTAAG 5'-945 CG CG CG	
MUT TSL_AAA 1F	A1117g_t1120g_t1123g_t1124c	1093-1145	53	1117-5' ACATCCTTA 3'-1125 G G GC	Substituição dos aminoácidos 207TSL209 por Alaninas.
MUT TSL_AAA 1R				1117-3' TGTAGGAAT 5'-1125 C C CG	
MUT RAV_AAA 1F	A1189g_g1190c_t1196c	1166-1219	54b	1189-5' AGAGCAGTT 3'-1197 GC C	Substituição dos aminoácidos 231RAV233 por Alaninas.
MUT RAV_AAA 1R				1189-3' TCTCGTCAA 5'-1197 CG G	
MUT YRM_AAA 1F	t1657g_a1658c_c1660g_g1661c_a1663g_t1664c	1624-1690	67	1657-5' TATCGAATG 3'-1665 GC GC GC	Substituição dos aminoácidos 387YRM389 por Alaninas.
MUT YRM_AAA 1R				1657-3' ATAGCTTAC 5'-1665 CG CG CG	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota:

^a Refere-se a posição da primeira e última base do oligonucleotídeo na sequência do gene da toxina BinB no plasmídeo pGSP10 de 4.822 pb.

^b Sequência de interesse em cada primer que foi mutada neste estudo, a sequência original está na parte superior e os nucleotídeos modificados localizados abaixo da mesma.

7.11 Ensaios de interação entre proteínas de culicídeos e a toxina Bin

Os ensaios tiveram o objetivo de avaliar a interação entre proteínas de culicídeos e toxinas Bin em relação a duas abordagens. A primeira consistiu em avaliar a sua capacidade de ligação de diferentes proteínas de culicídeos, nativas e recombinantes, (proteína-teste) em relação à proteína BinB (proteína-referência), através de ensaios de afinidade ou *pull-down*. Na segunda etapa as proteínas BinB mutantes (proteína-teste) foram avaliadas em relação a sua capacidade de ligação com o receptor Cqm1 nativo (proteína-referência), obtido de preparações de *microvilli* intestinal, através de ensaio de *pull-down* e de competição. Os ensaios estão descritos nas seções a seguir.

7.11.1 Ensaios de afinidade

Os ensaios foram realizados segundo Silva-Filha, Nielsen-LeRoux e Charles (1999) e são baseados na incubação da toxina Bin imobilizada sobre microesferas de resina (CNBr-activated Sepharose4B®, Amersham) com as proteínas recombinantes de interesse (2 µg), na ausência e na presença de um excesso (40 µg) da toxina Bin livre, usada como competidor. As incubações foram feitas em um volume final de 100 µl de tampão PBS/Azida 0.02%, pH 7.4, durante 2 h à TA. Após a incubação, as microesferas-Bin foram lavadas com PBS/Az, recuperadas por centrifugação (20.000 g, 4 °C, 15 minutos), separadas por SDS-PAGE 10%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetidas à imunodeteção, conforme descrito no item 7.6. A toxina Bin utilizada nestes ensaios foi produzida em culturas de *B. thuringiensis* cepa 4Q-82 transformada com o plasmídeo pGSP10, contendo o gene que codifica a toxina Bin (BOURGOUIN et al., 1990), e foi processada *in vitro* para a forma ativa segundo Nielsen-LeRoux e Charles (1992).

7.11.2 Ensaios de *pull-down*

Os ensaios de *pull-down* foram adaptados a partir do protocolo descrito em Dhalia et al. (2005) e têm o mesmo princípio metodológico dos ensaios de afinidade que é avaliar a ocorrência de interação entre a proteína BinB recombinante (selvagem ou suas mutantes), imobilizada em resina de glutathiona sefarose 4B[®] (GS) (Amersham) e as proteínas nativas ou recombinantes de culicídeos. A proteína BinB (2 µg), produzida em células de *E. coli*, que tem fusionada a sua sequência a proteína glutathiona S-transferase (GST), foi imobilizada na resina GS (10 µl) e incubada com proteínas Cqm1 ou Aam1 de preparações nativas (20 µg), ou recombinantes produzidas em lisado de reticulócito de coelho (2 µg) ou recombinantes produzidas em células Sf9 e secretadas em meio de cultura (40 µg) a 4 °C, durante 2 h, sob agitação em um volume final de 200 µl de tampão BB3 (KCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 50 mM, NP40 0,2%, glicerol 5%). Para avaliar a especificidade da ligação, foram feitas incubações controle com a proteína GST imobilizada sobre a resina (GST-GS) e também com a resina de glutathiona bloqueada com BSA (BSA-GS). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (1.500 g, 2 min a 4 °C), e o sedimento foi submetido a SDS-PAGE 8 a 10%, transferência para membrana e imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1, conforme descrito no item 7.6.

7.11.3 Ensaios de competição

A toxina Bin radiomarcada (Bin-I¹²⁵) utilizada nestes ensaios foi produzida em cultura de *Bt* cepa 4Q-82, anteriormente descrita, 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 o procedimento de iodinação foram determinadas a concentração de proteínas e a sua atividade específica (cpm/pmol de proteína). No ensaio de competição a toxina Bin-I¹²⁵ (10 nM) foi incubada com preparações de BBMF (25 µg) de *C. quinquefasciatus*, contendo o receptor Cqm1, na ausência e na presença de um excesso (1.000 nM) de diferentes competidores não marcados que foram a toxina Bin, a proteína BinB e as respectivas mutantes. As curvas de competição foram feitas na presença de concentrações crescentes (0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000

e 3000 nM) dos competidores não marcados. As incubações de cada ponto experimental foram feitas em um volume final de 100 µl 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 três vezes. 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®).

8 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram agrupados em dois blocos, sendo o primeiro a caracterização da interação da toxina Bin com as α -glicosidases de culicídeos e o segundo a identificação do motivo envolvido na ligação ao receptor Cqm1 em larvas de *Culex quinquefasciatus* na subunidade BinB.

8.1 Caracterização da interação da toxina Bin com α -glicosidases de culicídeos

Estudos *in silico* revelaram proteínas ortólogas e parálogas à Cqm1, e algumas destas foram selecionadas para investigar uma região no receptor Cqm1, que potencialmente conteria o motivo de ligação à subunidade BinB. Foram produzidos fragmentos protéicos recombinantes para analisar a sua capacidade de interação com a toxina BinB. A análise comparativa do receptor nativo Cqm1 com a proteína ortóloga Aam1 expressa em *Ae. aegypti*, espécie naturalmente refratária ao *Bacillus sphaericus*, revelou características peculiares de cada proteína, importantes para determinar a sua função como receptor da toxina Bin.

8.1.1 Análise *in silico* de proteínas ortólogas e parálogas à Cqm1

Foram realizadas buscas no *GeneBank* de sequências gênicas de *Ae. aegypti* e de *An. gambiae* que codificam proteínas ortólogas e parálogas ao receptor Cqm1, para avaliar sua conservação em outras espécies de culicídeos. As proteínas ortólogas são aquelas cujas sequências possuem o mais alto grau de semelhança ou identidade com a sequência de interesse e que provavelmente executam funções equivalentes. As parálogas possuem sequências com menor identidade de aminoácidos do que as ortólogas, mas também têm funções equivalentes. A análise mostrou que várias α -glicosidases de insetos têm homologia com a Cqm1 e algumas destas foram selecionadas para este estudo (Tabela 5). Dentre estas proteínas há α -glicosidases ortólogas, que sabidamente possuem o sítio de ligação da toxina Bin, pois já foram descritas como receptores funcionais da toxina em *C. quinquefasciatus*

(Cqm1), *C. pipiens* (Cpm1) e *An. gambiae* (Agm3). Há α -glicosidases parálogas que possivelmente não devem possuir o motivo de ligação, além de uma ortóloga em *Ae. aegypti*, a Aam1, que sabidamente não desempenha o papel de receptor visto que esta espécie é refratária ao *B. sphaericus*. Estes dados apontam que o motivo de ligação à toxina Bin pode estar presente em sequências protéicas ortólogas de *Culex* e *Anopheles* e ausente em sequências parálogas, bem como na ortóloga Aam1.

O alinhamento da sequência do receptor Cqm1 às sequências correspondentes ortólogas e parálogas de *C. pipiens*, *Ae. aegypti*, *An. gambiae* revela múltiplos trechos conservados na porção N-terminal da grande maioria das α -glicosidases e alguns segmentos mais divergentes na porção C-terminal (Figura 16). A região de 45 kDa do receptor que vai da Q32 até a L320 é bastante conservada entre as sequências gênicas que codificam para as proteínas ortólogas e parálogas à Cqm1 selecionadas para este estudo, além de não possuir íntrons em seu interior possibilitando uma facilidade operacional. Além disso, a região de 45 kDa N-terminal (Rec-45 kDa) do receptor Cqm1 (Q32 até L320) em *C. quinquefasciatus* foi apontada previamente pelo nosso grupo como a potencial região do motivo de ligação à toxina Bin (ROMÃO et al., 2006). A partir destas evidências foi feita uma avaliação funcional de fragmentos de 45 kDa de algumas proteínas ortólogas e parálogas à Cqm1.

```

gi | 84621561 | gb | ABC59609.1 | Cqm1  ---MRPLGALSLVALL--AMTVNGLAIREPDSKDWYQHATFYQIYPRSFLLDSNGDGIGDLAIGITSKMKYLA-DIGIDATWLSPPFKSPLKDFGYDVSDFY
gi | 126009678 | gb | ABN64094.1 | Cpm1  ---MRPLGALSLVALL--ATTVNGLAIREPDSKDWYQHATFYQIYPRSFLLDSNGDGIGDLAIGITSKMKYLA-DIGIDATWLSPPFKSPLKDFGYDVSDFY
gi | 157126497 | ref | XP_001660909.Aam1  ---MR-LCSAGLLVTL--AVFASSFDIREPEQKDWYQHATFYQIYPRSFKDSGDGIGDLAIGITSKMSYLA-DIGIDATWLSPPFKSPLRDFGYDVSDFY
gi | 159792926 | gb | ABW98683.1 | Agm3  MKFYRPLVTVSLTVALLSACALQAAEVREPDEKDWYQHATFYQIYPRSFQDSNGDGIGDLKGITARMEYLA-GIGIDATWLSPPFVSPADFGYDVAIFY
gi | 157136230 | ref | XP_001656785.Aam2  -----MVLTPRVVPGIILLTLLAVVSCVLDLRTDWEKAGFYQIYPRSFKDSGDGIGDLNGITSKLSYLK-EIGVRAFWMSPINTSPMVDGYDIDSYR
gi | 157107450 | ref | XP_001649784.Aam3  -----MGRKAVLVFIFGFVIGLVASV---DEHWWQHANFYQIYPRSFKDSGDGIGDLRGTIMEKVSYLKDLGLDAIWLSPIFKSPMADFGYDISNFT
gi | 118792106 | ref | XP_320159.3 | Agm4  -----WWSAVFYQIYPRSFMDSDNGDGIGDLCGITSRLLGYLD-LHNTIGFWLSPIFASPMADFGYDIDSYV
gi | 118792103 | ref | XP_320155.3 | Agm5  -----MWSTVILLGLVLLIVPSLLA-----DEHWWQHANFYQIYPRSFKDSGDGIGDLRGTIMEKVPYLRRELGLDAIWLSPIFKSPMADFGYDIADFR

```

```

gi | 84621561 | gb | ABC59609.1 | Cqm1  AIQPEYGNLTFDFDKLVEESHKNCIKLMLDFIENHSSDQHEWFVKSVARDPEYSDFYVWRP----PA--TGGG-PPNNWISVFCGSAWYNTARGEYYLHQ
gi | 126009678 | gb | ABN64094.1 | Cpm1  DIQPEYGNLTFDFDKLVEESHKNCIKLMLDFIENHSSDQHEWFVKSVLRDPEYSDFYVWRP----PA--TGGG-PPNNWISVFCGSAWYNTARGEYYLHQ
gi | 157126497 | ref | XP_001660909.Aam1  DIQPEYGTLESFDELVQEAHKNCIKMLDFIENHSSDEHDFVKSAPERNETKDFYVWHHPGRQNAE--TKGLDPPNNWISVFCGPAWYTHEGRQEFYLLHQ
gi | 159792926 | gb | ABW98683.1 | Agm3  DIQPEYGTIADMEELIABAHRHCIKMLDFIENHSSDEHDFVQSAANGVAKRYDYIWRPGRQNSQ--TGALBPPNNWISVFCGPAWYDERGRQEFYLLHQ
gi | 157136230 | ref | XP_001656785.Aam2  EIQPEYGTIVDFENLVKBAKRVCLKVIIMDFVPHSSDQHEWFVKSEDRVVEGEBDYVWHHDGVENPQ--GCRKLPSPNWLQAFRKSAAQWSEKROQYYLHQ
gi | 157107450 | ref | XP_001649784.Aam3  DIHHEFGTITADLENLAEBCRQNLKLIILDFVPHSSDQHEHDFYFKSEKREAGYEDYVWHHEGKVLAN---GTRVPPSNWISVFRGSAMKWSVRRYYLHQ
gi | 118792106 | ref | XP_320159.3 | Agm4  KIQPEYGTIVDFENLVKBAKRVCLKVIIMDFVPHSSDQHEHDFYFKSEKREAGYEDYVWHHEGKVLAN---GTRVPPSNWISVFRGSAMKWSVRRYYLHQ
gi | 118792103 | ref | XP_320155.3 | Agm5  DIHSEFGTITADLEALATACNAECLKLIILDFVPHSSDSEWELFKSVQKDPYSDYVWHHPKTLAN---GTRVPPSNWISVFRGSAMWVNDVRKYYLHQ

```

```

gi | 84621561 | gb | ABC59609.1 | Cqm1  FTPQOPDLNRYRNPQVLAEMTKMLFFWLDRGVDGFRDLAINHMFEDQ-----FRDEPLSGWGQ-SEGYDSDLHIYTKDIPDVYDVVYNWRDQMDKYSAEK
gi | 126009678 | gb | ABN64094.1 | Cpm1  FTPQOPDLNRYRNPQVLAEMTKMLFFWLDRGVDGFRDLAINHMFEDQ-----FRDEPLSGWGQ-PCGYDSDLHIYTKDIPDVYDVVYNWRDQMDKYSAEK
gi | 157126497 | ref | XP_001660909.Aam1  FTDKQOPDLNRYRNPQVLAEMTKMLFFWLDRGVDGFRDLAINHMFEDPE-----LRDEPSSGWSL-PGKYDSDLHIYTKDVEDVYKVVYDWRDLMDTYSKEN
gi | 159792926 | gb | ABW98683.1 | Agm3  FTTKQADLNRYRNPQVVAEMTKMLSFWLEKGVDFRDLAINHMFEDAQ-----LRDEPP-GWGA-PGTDELHIYTKDNPDTYNVYVQWRQLCDDFGRRM
gi | 157136230 | ref | XP_001656785.Aam2  FTVQOPDLNRYRNPQVQEMKDVLTFWLDRGVDGFRVDAVFPFLYEVLP-TNGSFPDEPRSGLTNDPDDDFLHLYTQNPETLDMVYQWRRELVNYSQKH
gi | 157107450 | ref | XP_001649784.Aam3  FVDKQOPDLNRYRSTKVVEMDKDVLRFWLERGVIFGRVDAIPYLYENKT-VNGVYPDEPKSNSDTPDPNPAYLLEHYTONLDETFDMVYQWRRELVDEFKSSK
gi | 118792106 | ref | XP_320159.3 | Agm4  FSVKQOPDLNRYRNPQVVAEMKDVMTFRGVAEFRIDAVPTLVEPRADGQYFDEPLSGTNDPDDPGYLWHLYTQDRNETLDMVYQWRRELVDEFQOQY
gi | 118792103 | ref | XP_320155.3 | Agm5  FLVKQOPDLNRYRNPQVEMKDVMTFWLDRGVDGFRIDAVPYLFEVSLP-VNGVYPDEEKSGETDTPDPNPAYLLEHYTONLDETFDMVYQWRRELVDEFKQQT

```

```

gi | 84621561 | gb | ABC59609.1 | Cqm1  --GRTIILMTEAYSSIEGTMLYYESADRKRQGAHMPFNFQLIYDFKKEQNAVGLKSSIDWWMNMP--ARHTPSWVAGSHDHSRVASRVGLDRVDQVMTL
gi | 126009678 | gb | ABN64094.1 | Cpm1  --GRTIILMTEAYSSIEGTMLYYESADRKRQGAHMPFNFQLIYDFKKEQNAVGLKNSIDWWMNMP--ARHTPSWVAGSHDHSRVASRVGLDRVDQVMTL
gi | 157126497 | ref | XP_001660909.Aam1  --GRTIILMTEAYSSIEGTMLYYENARTROGAHMPFNFQLIYDFKDIQNAVGLKQSIDWWMNMP--ARHTPSWVAGSHDHSRVASRVGLDRVDQVMTL
gi | 159792926 | gb | ABW98683.1 | al Agm3  --NKTIIIMTEAYASIENTMLYEDATGTRQGAHMPFNFQLIYDFRHDQNAIGLQSIDFWLNHMP--ARHTASWVAGSHDHSRVASRVGLDRVDQVMTL
gi | 157136230 | ref | XP_001656785.Aam2  GGETR-VLMTGEGYTSLELRKYVYSAGG-RLGSHMPFNFQGMINDLIGSKAEDFVNVVQSWMDIVP--ARHAANVVMGNHDRPRVGRFGRKBERIDAMNMI
gi | 157107450 | ref | XP_001649784.Aam3  GLQEDLVLMTEAYTPLENIRLYVYKGD--RKGAQIPFNFQEVLSNIYKIDSTAKDFYTYVMRFYALP--QGQFANVVLGNHDKRVSASRLGVARADLVNIA
gi | 118792106 | ref | XP_320159.3 | Agm4  GVRER-IIMAEITYSPIDIVMKYVYNET--VPGAQIPFNFHFLIDLSKIDSTAQDFLNTINYWIDHMPMDSVVFNWVLCGNHDKRVSASRFGEMLDMSNMNI
gi | 118792103 | ref | XP_320155.3 | Agm5  -QSEDIIVLMAEAYTPLLNIIRLFGNEV--SEGAHIPPNFQEVLSNTFTKDTTGQFYDNIKRWLDVVP--ENRFSNWVLCGNHDKRVSASRLGVARADLVYQIA

```

```

gi | 84621561 | gb | ABC59609.1 | Cqm1  LHTLPGTISITYYGEEVAMQDF-----KEAQQFDNRDPNRTPMOWDSSISAGFSTNTNTWLRVHPDYARYNVDMQ-KNPOSFTHHFQOHL
gi | 126009678 | gb | ABN64094.1 | Cpm1  LHTLPGTISITYYGEEVAMQDF-----KEAQQFDNRDPNRTPMOWDSSISAGFSTNTNTWLRVHPDYARYNVDMQ-KNPOSFTHHFQOHL
gi | 157126497 | ref | XP_001660909.Aam1  LHTLPGTISITYYGEEIGMLDY-----KEAQTVDGRDPNRTPMOWDGTTSAGFSTNATWLRVHPDYASLVNVDLQQ-NAEKSHFHHFRAL
gi | 159792926 | gb | ABW98683.1 | Agm3  LHTLPGTISITYYGEEIGMLDF-----KDAQLDNRDPNRTPMOWDSSISAGFSTNRTWLRVHPDYPTRNVAHQE-AAEKSTLKHFRAL
gi | 157136230 | ref | XP_001656785.Aam2  ILSLPGATVITYGEEIGMDDVHISWEETKDPACNAGEGLYAEKSRDPCRTPEFQWDDSTLAGFTNGSTWLRVCPDYRSVNVKIEEN-GLEKSHLKVYKAM
gi | 157107450 | ref | XP_001649784.Aam3  LNTLPGIAVTYNGDELAMEDVYISWEDTVDPACNSNPRDFMQYSRDPVRAPEFQWDDSVSAGFSSNPKTWLPVSPYKQNNYKLOK-SAPRSHVKIKKSL
gi | 118792106 | ref | XP_320159.3 | Agm4  MSLSPGVAVTYNGEEIGMDDVVISYNDTVDPACNAGPDRYQYVTRDPERTPEFQWDDSSKNAGFSTANHTWLPVSPNYTLVNVKQLVEYEHSHLHVRSR
gi | 118792103 | ref | XP_320155.3 | Agm5  LNVLPGVAVTYNGDELAMEDVYISWEDTVDPACNSNPKDYLLYSRDPVRAPEFQWDDSVSAGFSTNRTWLPVASNYKTLNKAQK-AAAPRSHVKIKKAL

```

```

gi | 84621561 | gb | ABC59609.1 | Cqm1   TKLRRRHRIMQSGEYVHKTVGTKVYALLRELRGEDSFLIVLNMAGAEDTVDLGDFVN-LPQKMRVEVAQPNSKSKAGNEVDIGKLTLPYDSVVLRAIVSS
gi | 126009678 | gb | ABN64094.1 | Cpm1   TKLRQHRIMQSGEYVHKTVGTKVYALLRELRGEDSFLIVLNMAGAEDTVDLGDFVN-LPQKMRVEVAQPNSKSKAGNEVDISKLTLPYDSVVLRAIVSS
gi | 157126497 | ref | XP_001660909.Aam1   TSLRRRHEIMQNGDFLHRITVGTHTVYALLRELQGRDSFLIVLNVADKQYDADLDFVN-LPEKMTVQVAQSNSTLKAGDVVEISKVTLGPYDSIVLRA--SS
gi | 159792926 | gb | ABW98683.1 | Agm3         TALRRRHPILVHGEFKHRTVGPDVYAFSRELHGEDTLVIVLNMATSSRTVDLDFVN-LPARLTVETIAQPMNSNYKAGDEVDIHQVTLQHDSVVLRAVVS
gi | 157136230 | ref | XP_001656785.Aam2   MRLLRESKTFQHGFSVKARAVKDNVFAIVRELQNYNTYITLVNLSGSSIEVIDGIALASHLP SKLRFVGVVNSHHIRGGAVATNDILLPHESEFVLRVAVSP
gi | 157107450 | ref | XP_001649784.Aam3   VRLRKQRIILRECTFEIKLV DENLLVYKRELADVSTIVVILNLFHKSARTVNLSEAFGGLPLEFETITSSLQNTNYIDGTVVDRDQIVLPADAAIVLEGNLKN
gi | 118792106 | ref | XP_320159.3 | Agm4         VRMK-----
gi | 118792103 | ref | XP_320155.3 | Agm5   VRLRKQRIILRRN-----DGNVAVGRR-----

```



```

gi | 84621561 | gb | ABC59609.1 | Cqm1   AAAINLSIGLLLAIMARYIFV
gi | 126009678 | gb | ABN64094.1 | Cpm1   AAAINLSIGLLLAIMARYIFV
gi | 157126497 | ref | XP_001660909.Aam1   AAATQLSLSVVIALIVKYFLV
gi | 159792926 | gb | ABW98683.1 | Agm3   ASVVRSLIVALLAAVEHLF-
gi | 157136230 | ref | XP_001656785.Aam2   VDRLQESLCETWLEQ-----
gi | 157107450 | ref | XP_001649784.Aam3   GV-----
gi | 118792106 | ref | XP_320159.3 | Agm4   -----
gi | 118792103 | ref | XP_320155.3 | Agm5   -----

```

Figura 16. Alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos das proteínas homólogas à α -glicosidase Cqm1, receptor da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Traço em vermelho delimita a região N-terminal de 45 kDa das proteínas. Traço em verde delimita a região da deleção de uma proteína mutante Cpm1_{BP-del}, não funcional, descrita em Darboux et al. (2007). As proteínas ortólogas à Cqm1 de *Culex pipiens* (Cpm1), *Aedes aegypti* (Aam1) e *Anopheles gambiae* (Agm3) e os seus números de acesso no NCBI estão em azul. As proteínas parálogas de *Aedes aegypti* (Aam2 e Aam3) e de *Anopheles gambiae* (Agm4 e Agm5) selecionadas para o estudo estão em preto. Alguns resíduos conservados nas proteínas ortólogas e divergentes nas parálogas estão em vermelho. As caixas azuis marcam os sítios de glicosilação preditos em Cqm1, Cpm1, Aam1 e Agm3.

8.1.2 Expressão e funcionalidade das proteínas ortólogas e parálogas à Cqm1 em *Escherichia coli*.

Os fragmentos do gene do receptor Cqm1 e das demais ortólogas e parálogas selecionadas, correspondentes à porção N-terminal de 45 kDa, foram amplificados a partir do DNA genômico de larvas de *C. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* e *An. gambiae*. As associações de primers utilizadas geraram os seguintes fragmentos gênicos: *aam1* \cong 882 pb, *aam2* \cong 912 pb, *aam3* \cong 906 pb, *agm4* \cong 900 pb, *agm5* \cong 897 pb que foram clonados em pRSETc (Figura 17A). As construções plasmidiais correspondentes a região de 45 kDa da proteína Cqm1 de *C. quinquefasciatus* e da Agm3 de *An. gambiae* geraram fragmentos gênicos de 867 e 879 pb, respectivamente, e foram obtidos anteriormente por Romão et al. (2006) e Ferreira (2007). Os fragmentos gênicos foram utilizados na clonagem e produção de proteínas recombinantes de 45 kDa, correspondente à região entre a Q32 e L320 (Figura 17B)

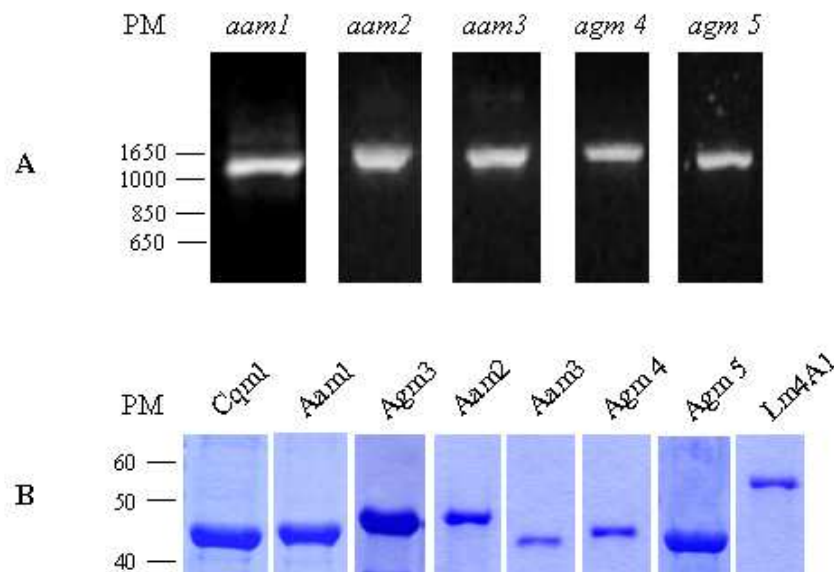


Figura 17. Amplificação dos fragmentos gênicos *aam1*, *aam2* e *aam3* de *Aedes aegypti* e *agm4* e *agm5* de *Anopheles gambiae* e expressão das proteínas recombinantes Rec-45 kDa Cqm1, Aam1, Agm3, Aam2, Aam3, Agm4, Agm5 e da proteína controle Lm4A1 de *Leishmania major*.

Nota: (A) Fragmentos gênicos amplificados por PCR a partir dos genes homólogos *aam1*, *aam2* e *aam3* de *Aedes aegypti* e dos genes *agm4* e *agm5* de *Anopheles gambiae*, separados por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os fragmentos gênicos amplificados possuem 882, 912, 906, 900 e 897 pares de bases (pb) respectivamente. (B) Expressão das proteínas recombinantes Cqm1, Aam1, Agm3, Aam2, Aam3, Agm4 e Agm5 de \cong 45 kDa e da proteína Lm4A1 utilizada como controle negativo, separadas em SDS-PAGE a 10% e coradas com azul de comassie. PM: Peso molecular em pb em A e em kDa em B.

Os ensaios de afinidade empregados para verificar a capacidade de interação das proteínas recombinantes de 45 kDa com a toxina Bin, demonstraram que todas se ligaram especificamente à toxina Bin imobilizada (Figura 18). Na presença de um excesso do competidor (toxina Bin), as respectivas bandas não foram observadas o que demonstra a especificidade de ligação. O controle positivo, representado pela Cqm1-Rec45, ligou-se especificamente às esferas-Bin e o controle negativo representado pela Lm4A1, uma proteína recombinante de iniciação da tradução de *Leishmania major*, que não apresentou o mesmo perfil de competição apresentado pelas demais proteínas testadas no ensaio, apesar de sua ligação inespecífica com a resina (Figura 18). Este resultado incita algumas afirmações: o motivo de ligação à toxina Bin estaria conservado na região N-terminal das proteínas ortólogas e nas parálogas analisadas, inclusive nas proteínas cuja identidade é inferior a 40% em relação à Cqm1; uma vez que a capacidade de ligação à toxina Bin foi detectada no fragmento Aam1, a refratariedade em *Ae. aegypti* poderia ser determinada por outros fatores nesta proteína que impedem a sua interação com a toxina Bin.

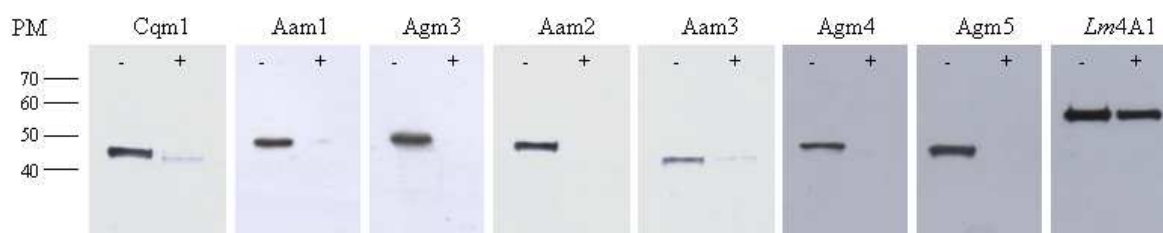


Figura 18. Ensaio de afinidade entre as proteínas recombinantes Cqm1-Rec45 de *Culex quinquefasciatus* (controle positivo), Aam1, Aam2 e Aam3-Rec45 de *Aedes aegypti* e Agm3, Agm4, Agm5-Rec45 de *Anopheles gambiae* e Lm4A1 de *Leishmania major* (controle negativo) e a subunidade BinB do *Bacillus sphaericus*, imobilizada em resina de sefarose.

Nota: As proteínas recombinantes de culicídeos foram incubadas com a subunidade BinB, separadas em SDS-PAGE 10%, transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à imunodeteção com anticorpo anti XpressTM (Invitrogen). Incubação realizada na presença (+) e na ausência (-) da toxina Bin livre utilizada como competidor. PM: Peso molecular em kDa.

Após esta análise, o cDNA completo do gene *cqm1* clonado no vetor pRSETC foi utilizado para a produção e avaliação da Cqm1 recombinante total (Cqm1-Rec). A proteína Cqm1-Rec apresentou um peso molecular de aproximadamente 66 kDa (Cqm1-Rec66), entretanto, não foi possível expressar quantidades suficientes desta proteína para empregá-la em ensaios funcionais.

Apesar da funcionalidade dos fragmentos recombinantes de α -glicosidases de culicídeos observada nos ensaios de afinidade, é importante considerar que o dobramento destas proteínas possivelmente não é adequado para avaliar a sua especificidade de ligação à toxina Bin. É sabido que um sistema de expressão procarioto não insere todas as modificações pós-traducionais, possivelmente requeridas para a funcionalidade de uma proteína eucariótica, tendo sido essencial dar continuidade ao trabalho com proteínas expressas em sua totalidade estrutural. Para esta etapa de estudo foram selecionadas a proteína Cqm1 e a sua ortóloga Aam1 cujo alto nível de identidade (70%) associado à diferentes características de ligação à toxina Bin *in vivo* serviu como um modelo de estudo para investigar aspectos importantes envolvidos na interação com a toxina Bin.

8.1.3 Expressão e funcionalidade das proteínas Cqm1 e a Aam1 em lisado de reticulócito de coelho.

As proteínas Cqm1 e Aam1 recombinantes foram produzidas em um sistema de expressão eucarioto que utiliza lisado de células de reticulócito de coelho com capacidade de inserir modificações pós-traducionais nas moléculas expressas tais como acetilação, isoprenilação e alguns tipos de fosforilação, no entanto, algumas modificações como glicosilações não são possíveis. A reação de PCR da construção plasmidial do cDNA de *cqm1* clonado no vetor 4-TOPO possibilitou a amplificação e clonagem de um fragmento de \cong 1800 pb no pRSETc. A reação de PCR do cDNA do gene *aam1*, obtido a partir de RT-PCRs de RNA total de um *pool* de larvas de *Ae. aegypti*, também levou à amplificação de um fragmento de \cong 1800 pb que foi clonado em pGEM[®]T- easy. Os fragmentos gênicos liberados das digestões das construções plasmidiais *cqm1*/pRSETc e *aam1*/pGEM[®]T- easy com Pst I e Hind III foram subclonados no pGEM3Zf+ para os ensaios de transcrição e tradução *in vitro*. Na transcrição *in vitro*, os mRNAs produzidos a partir dos cDNAs *cqm1* e *aam1* foram obtidos para a produção das proteínas recombinantes marcadas com ³⁵S. A proteína Cqm1-³⁵S migrou com peso molecular aproximado de 66 kDa, similar ao seu tamanho expresso em *E. coli*, e a Aam1-³⁵S apresentou um peso molecular cerca de 70 kDa (Figura 19).

As proteínas Cqm1-³⁵S e Aam1-³⁵S foram submetidas a ensaios de *pull-down*, para avaliar a sua capacidade de interação com a toxina recombinante BinB, no entanto, nenhuma delas mostrou capacidade de interação com a subunidade BinB imobilizada (Figura 20). A

proteína *LmEIFG3*-³⁵S de *L. major*, obtida sob as mesmas condições e utilizada como controle positivo do ensaio, foi capaz de ligar-se à proteína *LmEIF4A1* imobilizada na resina, pela qual tem afinidade, demonstrada pela presença de uma banda de 70 kDa (Figura 20). A ausência de ligação da proteína *Cqm1* à toxina Bin sugere que o sistema de expressão utilizado não é adequado para avaliar esta proteína em relação a sua interação com a toxina Bin.

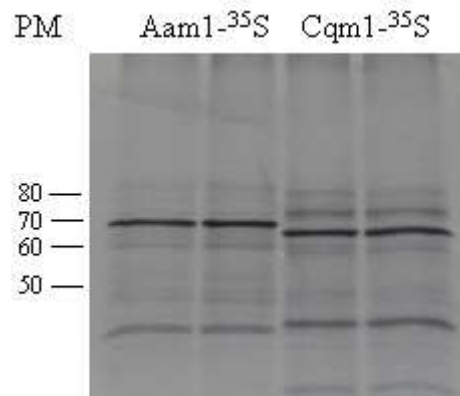


Figura 19. Proteínas *Aam1*-³⁵S e *Cqm1*-³⁵S de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, produzidas através de tradução *in vitro* em células de lisado de reticulócito de coelho, separadas em SDS-PAGE a 10% e visualizadas por autoradiografia.

Nota: PM: Peso molecular em kDa.

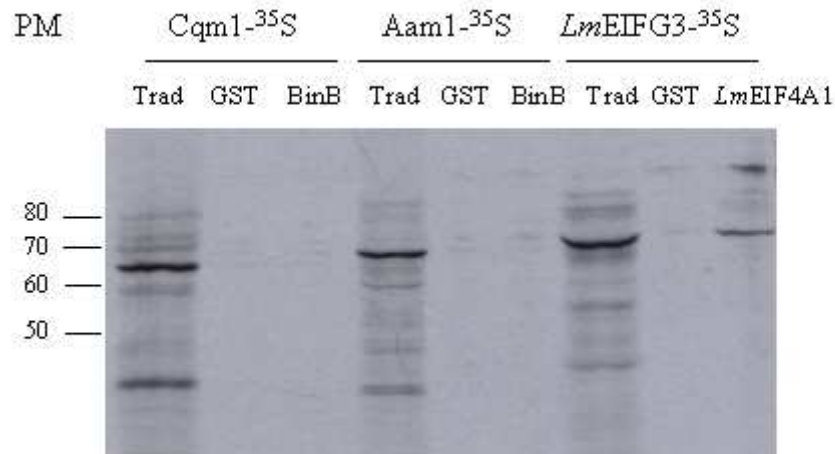


Figura 20. Ensaio de *pull-down* entre as proteínas *Cqm1*-³⁵S e *Aam1*-³⁵S e a subunidade BinB da toxina Bin imobilizada em resina.

Nota: O ensaio entre as proteínas *LmEIFG3*-³⁵S e *LmEIF4A1* de *Leishmania* sp imobilizada em resina foi utilizado como controle positivo do experimento. As proteínas foram separadas em SDS-PAGE a 10% e o gel foi exposto a um filme autoradiográfico. Trad. Proteínas ³⁵S traduzidas sem incubação. GST. Proteína ³⁵S incubada com glutatona S-transferase. BinB. Proteína ³⁵S incubada com a subunidade BinB da toxina. *LmEIF4A1*. Proteína ³⁵S incubada com a proteína *LmEIF4A1*. PM: Peso molecular em kDa.

8.1.4 Análise das proteínas Cqm1 e Aam1 nativas.

A ausência de funcionalidade da proteína Cqm1 produzida no sistema de expressão de reticulócito de coelho levou à avaliação de características das proteínas Cqm1 e Aam1 nativas obtidas de amostras de *microvilli* intestinal de larvas. Nesta análise foi realizada a imunodeteção de extratos totais de larvas utilizando o anticorpo anti-Cqm1, o perfil de bandas catalíticas de α -glicosidases e o padrão de glicosilação das proteínas. A imunodeteção de extratos protéicos de *C. quinquefasciatus* e de *Ae. aegypti* submetidos a SDS-PAGE 10% com o anticorpo anti-Cqm1, revelou um perfil de migração para as proteínas Cqm1 e Aam1 nativas de 66 kDa e de 73 kDa respectivamente (Figura 21A). Os ensaios enzimáticos de atividade de α -glicosidase em amostras de BBMF de *C. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* apresentaram 4 bandas catalíticas (Figura 21B), e imunodeteção com o anticorpo anti-Cqm1 revelou que as bandas correspondentes as proteínas Cqm1 e Aam1, na condição semi-desnaturante deste ensaio, migram com pesos moleculares diferentes superiores a 80 kDa (Figura 21C). Os dados demonstram que as α -glicosidases Cqm1 e Aam1 nativas possuem perfis de migração distintos nas duas condições testadas e indicam diferenças conformacionais nestas moléculas.

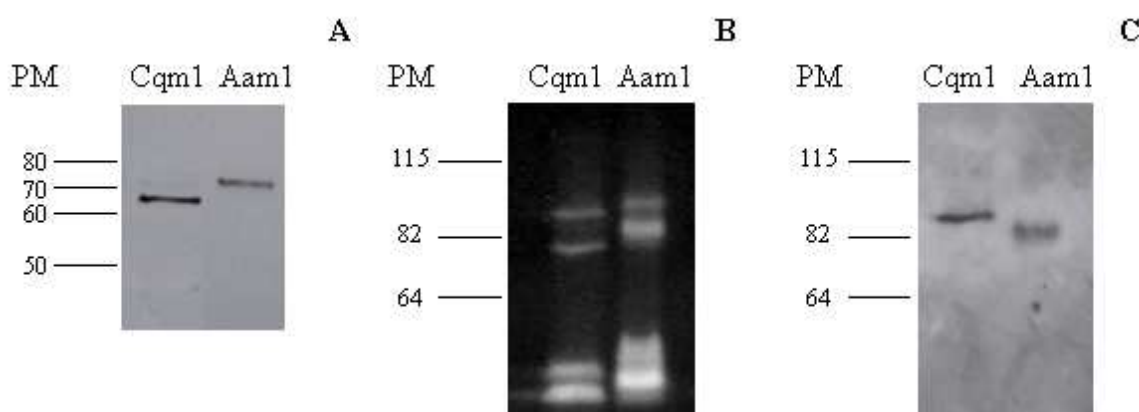


Figura 21. Análise das proteínas Cqm1 e Aam1 obtidas de preparações de *microvilli* intestinal de larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, respectivamente.

Nota: A. Proteínas separadas em SDS-PAGE 10% e submetidas a imunodeteção com o anticorpo anti-Cqm1. B. Detecção enzimática de α -glicosidase em SDS-PAGE 8% sob condições semi-desnaturantes. C. Imunodeteção das proteínas em (B) com o anticorpo anti-Cqm1. PM: Peso molecular em kDa.

O padrão de glicosilação de proteínas foi avaliado a partir de preparações de *microvilli* intestinal de larvas solubilizados com detergente CHAPS (extrato-CHAPS), e tratados com as

endoglicosidases PNGase e EndoH. A incubação da amostra de *C. quinquefasciatus* com a enzima PNGase resultou em uma proteína Cqm1 de 66 kDa similar àquela da amostra controle não tratada (Figura 22). Este resultado indica que não houve remoção de carboidratos da proteína nativa ou a possível remoção não causou redução de tamanho após o tratamento. Em contraste, o tratamento de extratos de *Ae. aegypti* com a PNGase resultou em uma proteína cerca de 7 kDa menor indicando que houve remoção de carboidratos da cadeia polipeptídica da Aam1 (Figura 22). O tratamento com uma segunda endoglicosidase, a EndoH, não apresentou efeito nas proteínas analisadas (dados não apresentados). Os resultados sugerem que a Aam1 possui glicosilações em sua cadeia polipeptídica, mas a mesma afirmação parece não ser consistente para a proteína Cqm1. A predição de sítios de glicosilação na sequência protéica de Cqm1 comparada com a sequência de Aam1 apresentou um sítio de glicosilação divergente (³¹⁰NRT³¹²), que pode ser o alvo da deglicosilação observada na Aam1 (Figura 16).

Os extratos-CHAPS tratados com a PNGase foram utilizados em ensaios de *pull-down* para investigar o efeito da deglicosilação na capacidade de interação das proteínas Cqm1 e Aam1 com a subunidade BinB-Rec, já descrita no item 8.2.1. Nenhuma mudança no perfil de interação com a BinB foi observada, a Cqm1 se ligou especificamente, enquanto que a Aam1 não interagiu (Figura 22).

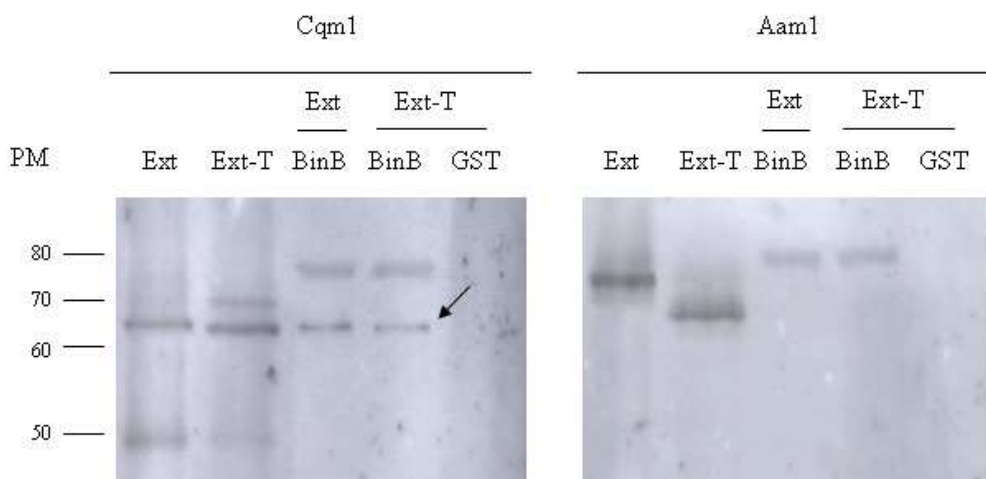


Figura 22. Imunodeteccção das proteínas Cqm1 e Aam1 em extratos-CHAPS de larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, respectivamente, tratados com a enzima PNGase F e avaliação de sua capacidade de interação com a subunidade BinB através de ensaios de *pull down*.

Nota: Os extratos-CHAPS nativos (Ext) foram tratados com a PNGase F (Ext-T) e incubados com BinB-Rec (BinB) ou com a Glutathione S-transferase (GST) imobilizada em resina. As proteínas ligadas foram separadas em SDS-PAGE 10%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e imunodetectadas com anti-Cqm1. A seta indica a banda que corresponde à ligação específica no receptor Cqm1. PM: Peso molecular em kDa.

8.1.5 Expressão e funcionalidade das proteínas recombinantes Cqm1 e a Aam1 em células Sf9.

As características observadas na análise das proteínas Cqm1 e Aam1 nativas apontaram a importância da conformação das moléculas para sua funcionalidade, sendo necessário dar continuidade ao estudo em um sistema de expressão de proteínas em células de inseto. Linhagens de células Sf9 foram utilizadas para a expressão das proteínas recombinantes Cqm1 e Aam1. Os fragmentos gênicos *cqm1-S* e *M* e *aam1-S* e *M*, com cerca de 1650 pb, foram amplificados, purificados e clonados no vetor plasmidial pGEM[®]T-easy para sua subclonagem no plasmídeo pIZT. As construções plasmidiais *cqm1-S/ pIZT/V5-His*, *cqm1-M/ pIZT/V5-His*, *aam1-S/ pIZT/V5-His* e *aam1-M/ pIZT/V5-His* que codificam respectivamente as proteínas recombinantes Cqm1-Sf9-S secretada, Cqm1-Sf9-M de membrana, Aam1-Sf9-S secretada e Aam1-Sf9-M de membrana, foram utilizados em ensaios de transfecção de células Sf9.

A expressão das proteínas recombinantes secretadas Cqm1-Sf9-S e Aam1-Sf9-S foi detectada no meio de cultura das células Sf9 através de imunodeteção com o anticorpo anti-Cqm1. A proteína Cqm1-Sf9-S apresentou um peso molecular de 66 kDa, similar aquele apresentado pela proteína nativa, pela proteína expressa em *E. coli* e em lisado de células de reticulócito de coelho e a proteína Aam1-Sf9-S apresentou um peso de 73 kDa similar à proteína nativa e diferente daquela expressa em células de reticulócito de coelho, sugerindo possível glicosilação (Figura 23A). A imunodeteção de preparações de membranas de células Sf9 transfectadas com as construções plasmidiais *cqm1-M/ pIZT/V5-His* e *aam1-M/ pIZT/V5-His* revelou que as proteínas Cqm1-Sf9-M e Aam1-Sf9-M apresentam pesos similares as proteínas secretadas (Figura 23B e C)

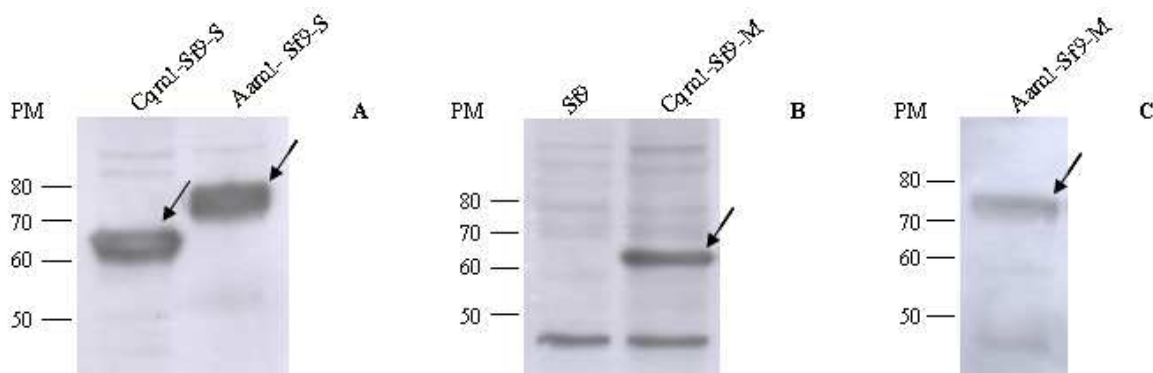


Figura 23. Imunodeteção das proteínas recombinantes Cqm1-Sf9 e Aam1-Sf9 secretadas (S) e de membrana (M) expressas em células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) com o anticorpo anti-Cqm1.

Nota: A. Amostras de proteínas de 1 ml de meio de cultura Sf9 precipitado com ácido tricloroacético. B e C. Amostras de proteínas (25 µg) de preparações de membranas (M) de células Sf9. O controle negativo é representado pela preparação de células Sf9 transfectada com o plasmídeo pIZT/V5-His sem inserto (Sf9). As setas indicam as proteínas recombinantes. PM: Peso Molecular em kDa.

As proteínas Cqm1-Sf9-S e Aam1-Sf9-S foram submetidas a ensaios de *pull-down*, para avaliar a sua capacidade de interação com a toxina Bin. Estas foram incubadas com a proteína BinB recombinante imobilizada em resina utilizada como controle positivo, e com a proteína glutationa S-transferase (GST) imobilizada nesta resina como controle negativo. A proteína Cqm1-Sf9-S apresentou capacidade de interação específica com a subunidade BinB e a proteína Aam1-Sf9-S não apresentou capacidade de ligação a esta proteína (Figura 24).

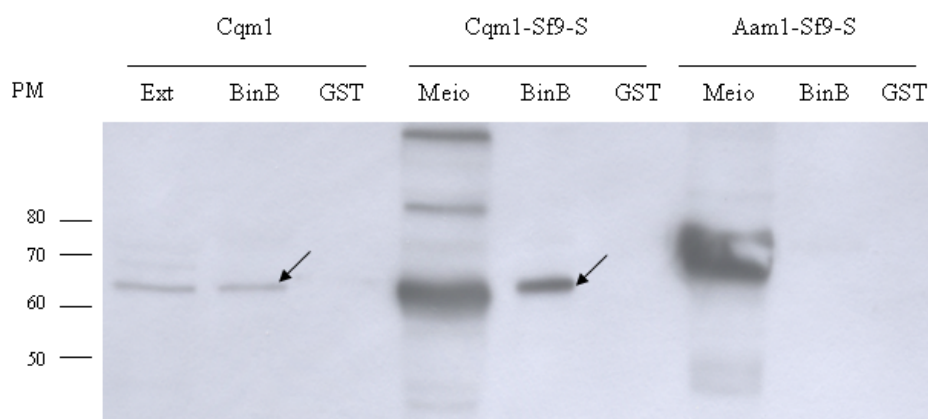


Figura 24. Imunodeteção dos ensaios de *pull-down* realizados entre as proteínas recombinantes Cqm1-Sf9-S e Aam1-Sf9-S e a subunidade BinB-Rec imobilizada em resina de glutationa com o anticorpo anti-Cqm1.

Nota: O controle positivo é representado pela incubação de extrato-CHAPS (Ext) de *Culex quinquefasciatus* contendo a proteína Cqm1 com a proteína BinB-Rec (BinB) imobilizada na resina e com a glutationa S-transferase (GST) utilizada como controle negativo. Volumes de 2 ml de meio de cultura Sf9 (Meio) contendo as proteínas Cqm1-Sf9-S e Aam1-Sf9-S foram incubados com a proteína BinB-Rec (BinB) imobilizada em resina e com a glutationa S-transferase (GST) utilizada como controle negativo. As proteínas ligadas a BinB-Rec foram separadas em SDS-PAGE 10%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e imunodetectadas com o anticorpo anti-Cqm1. Ext. extrato-CHAPS de *C. quinquefasciatus* sem incubação. Meio: meio de cultura Sf9 contendo as respectivas proteínas recombinantes sem incubação. A seta indica ligação específica do receptor Cqm1 a proteína BinB-Rec. PM: Peso molecular em kDa.

8.2 Determinação do motivo de ligação da subunidade BinB ao receptor Cqm1

Neste bloco, motivos envolvidos na ligação da toxina Bin ao receptor Cqm1 de larvas de *C. quinquefasciatus* foram estudados através da mutagênese e avaliação funcional da subunidade BinB. As proteínas BinB mutantes foram produzidas, imobilizadas em resina e sua capacidade de interação com o receptor Cqm1 presente em extratos protéicos de *microvilli* intestinal de *C. quinquefasciatus* foi avaliada.

8.2.1 Expressão e funcionalidade da proteína BinB recombinante

O gene que codifica a proteína BinB da toxina Bin do *B. sphaericus* foi amplificado e o fragmento obtido, de aproximadamente 1400 pb, foi clonado no vetor de expressão pGEX4T3 (Figura 25A). A proteína BinB recombinante expressa em *E. coli* fusionada a Glutathione S-Transferase (BinB-Rec) em sua porção N-terminal apresentou $\cong 80$ kDa (Figura 25B). Uma vez purificada, a BinB-Rec foi imobilizada em uma resina de glutathione sefarose (BinB-GS) e submetida a ensaios de *pull-down* com extratos-CHAPS de *C. quinquefasciatus* e de *Ae. aegypti*. As incubações com os extratos de *C. quinquefasciatus* demonstraram a presença de uma banda específica de 66 kDa que interagiu com a BinB imobilizada na resina enquanto que na incubação de glutathione sefarose bloqueada com BSA e com a proteína glutathione S-transferase (GST) imobilizada, usados como controles negativos, a banda não foi detectada (Figura 25C). Nos ensaios realizados com o extrato-CHAPS de *Ae. aegypti* nenhuma banda foi detectada (Figura 25C). A especificidade de ligação do ensaio de *pull-down* entre a resina BinB-Rec incubada e o extrato-CHAPS de *C. quinquefasciatus* demonstrou que esta abordagem é adequada para a avaliação de proteínas BinB mutagenizadas a fim de caracterizar o sítio de ligação ao receptor.

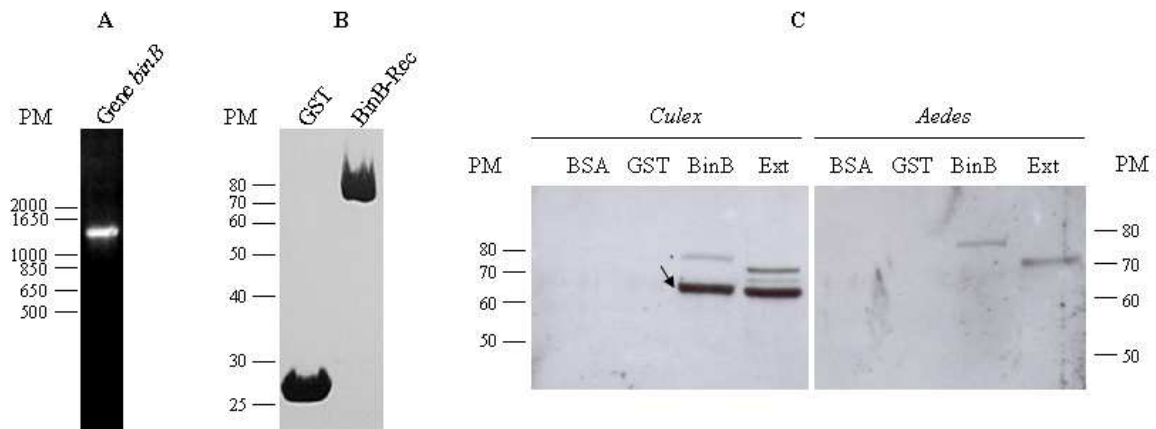


Figura 25. Clonagem, expressão e avaliação de funcionalidade da proteína BinB, subunidade da toxina Bin do *Bacillus sphaericus*.

Nota: A. Fragmento gênico de 1400 pb amplificado por PCR a partir do gene *binB*, separado em gel de agarose a 1,5%. B. Proteínas glutatona S-transferase (GST) e BinB-Rec produzidas em *Escherichia coli* imobilizadas em resina de glutatona sefarose, separadas em SDS-PAGE a 10%. C. Ensaio de *pull-down* entre extratos-CHAPS de *Culex quinquefasciatus* ou de *Aedes aegypti* para avaliar a interação com a proteína BinB-Rec. Os extratos-CHAPS foram incubados com as proteínas BSA, GST e BinB-Rec (BinB) imobilizadas em resina de glutatona. As proteínas do extrato-CHAPS ligadas à resina foram separadas em SDS-PAGE 10%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e imunodetectadas com anti-Cqm1. Ext: Extrato-CHAPS nativo; A seta indica a banda que corresponde à ligação específica do receptor Cqm1 a proteína BinB-Rec. PM: Peso molecular em pares de bases (pb) em A e em kDa em B e C.

8.2.2 Funcionalidade de proteínas BinB recombinantes mutagenizadas truncadas

O mapeamento de motivos envolvidos na ligação ao receptor Cqm1 na subunidade BinB se deu em três etapas de mutagênese sítio dirigida. A análise comparativa das sequências de aminoácidos das subunidades BinB e BinA, alinhadas através do programa Bioedit, revelou alguns trechos conservados na porção N- e C-terminal das proteínas e alguns segmentos na proteína BinB que estão ausentes na BinA (Figura 26). Na primeira etapa, que visou à remoção de amplos trechos de aminoácidos tanto na porção N-terminal como na C-terminal da subunidade BinB, foram obtidas seis proteínas mutantes de diferentes tamanhos fusionadas a GST: BinBMutStop1 (35 kDa), BinBMutBamHI 1 (68 kDa), BinBMutStop2 (44 kDa), BinBMutBamHI 2 (59 kDa), BinBMutBamHI 3 (44k Da) e BinBMutBamHI 1Mod (50kDa) (Figuras 27 e 28).



Figura 26. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das subunidades BinA e BinB da toxina Bin do *Bacillus sphaericus*.

Nota: Triângulos azuis indicam os locais de inserção de códons de parada prematuros ou sítio de restrição para a endonuclease BamH I. As caixas vermelhas marcam as trincas de aminoácidos selecionadas para serem substituídas por alaninas.

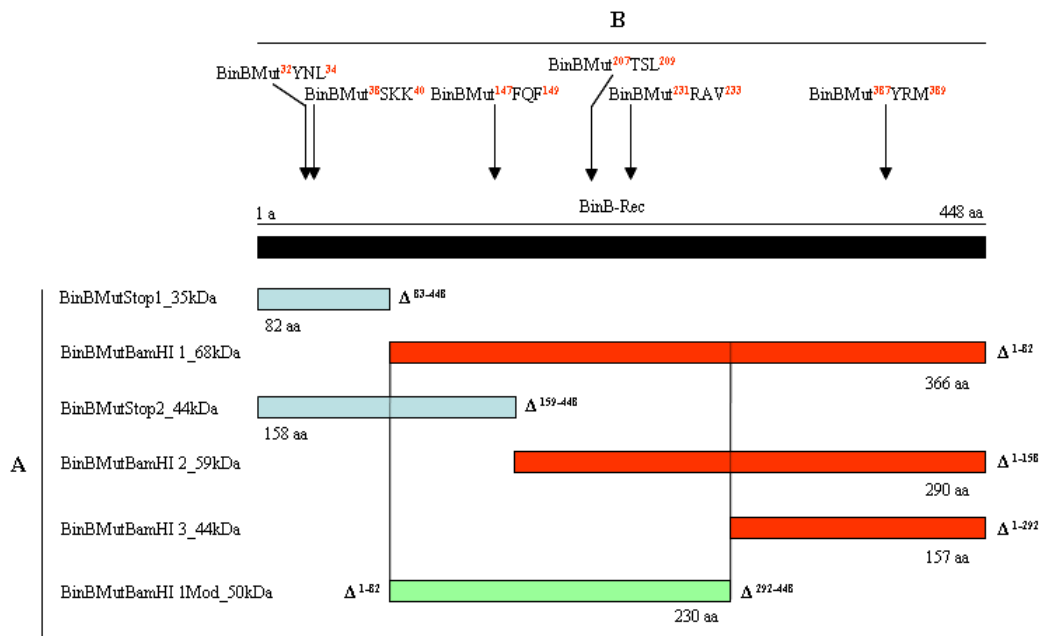


Figura 27. Representação esquemática das proteínas mutantes da subunidade BinB do *Bacillus sphaericus* geradas por mutagênese sítio dirigida.

Nota: A. Proteínas BinB mutantes truncadas com diferentes deleções da porção N e C-terminal. B. Proteínas BinB mutantes com diferentes substituições de trincas de aminoácidos por alaninas.

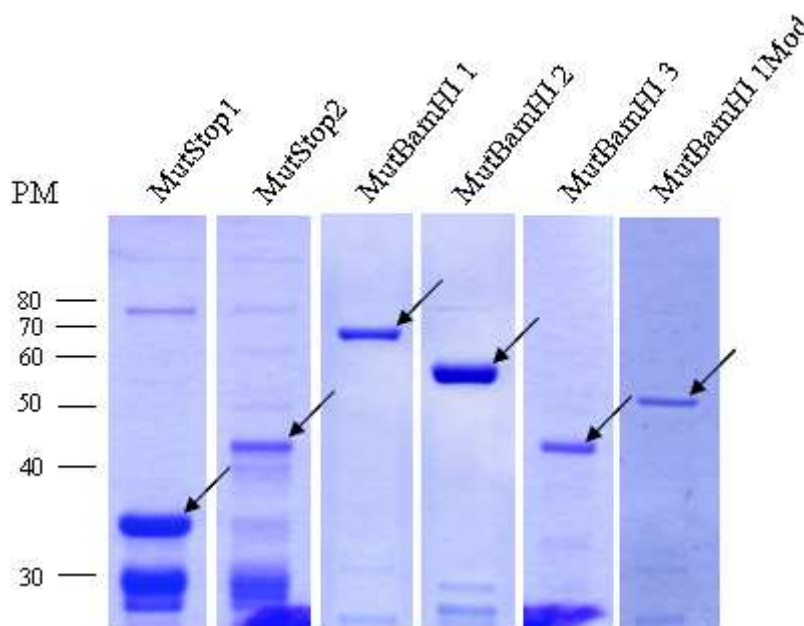


Figura 28. Proteínas BinB mutantes truncadas separadas em SDS-PAGE a 10% e coradas com azul de comassie, indicadas pelas setas.

Os fragmentos mutantes purificados e imobilizados em resina de glutationa sefarose foram submetidos a ensaios de ligação tipo *pull-down* com extratos-CHAPS de *C. quinquefasciatus*. A ligação específica ao receptor Cqm1 presente no extrato foi detectada apenas na incubação com a proteína mutante BinBMutStop2, indicando que os primeiros 158 aminoácidos da porção N-terminal da proteína seriam suficientes para a ligação com o receptor Cqm1 (Figura 29A). A proteína BinBMutStop1 cuja sequência protéica é composta pelos primeiros 82 aminoácidos N-terminais, não apresentou capacidade de interação (Figura 29A). Este resultado demonstra que a região compreendida entre os aminoácidos R82 e S159 possui elementos importantes para a interação com o receptor Cqm1. A total perda de funcionalidade foi observada nas proteínas BinB mutantes que tiveram sua porção N-terminal deletada (BinBMutBamHI 1, 2 e 3) (Figura 29A, B e C). Estes dados ressaltam que região N-terminal da proteína BinB pode ser importante para a ligação ao receptor Cqm1.

A construção plasmidial que codifica a proteína mutante BinBMutBamHI 1 foi modificada, gerando um fragmento protéico menor que possui deleções de 82 aminoácidos N-terminais e de 157 aminoácidos C-terminais. Apenas a região central da proteína (R82 a E293) foi conservada, a fim de verificar se este fragmento, denominado BinBMutBamHI 1Mod, poderia demonstrar capacidade de interação ao receptor Cqm1. Os ensaios de *pull-down* mostraram que esta proteína não é funcional (Figura 29C), e reforçam que a região que vai da M1 até a R82 apesar de não apresentar capacidade de ligação ao receptor Cqm1, pode conter elementos que são requeridos para a funcionalidade da subunidade BinB. Neste bloco de ensaios a especificidade da ligação foi comprovada através de incubações controle com a

proteína GST imobilizada sobre a resina (GST-GS) e com a resina de glutationa bloqueada com BSA (BSA-GS) (dados não apresentados). É importante observar que nos ensaios de *pull-down* foi detectada uma banda inespecífica, com tamanho discretamente inferior a banda do receptor Cqm1 nativo de 66 kDa, cuja presença foi avaliada com cuidado para não interferir na detecção da banda específica.

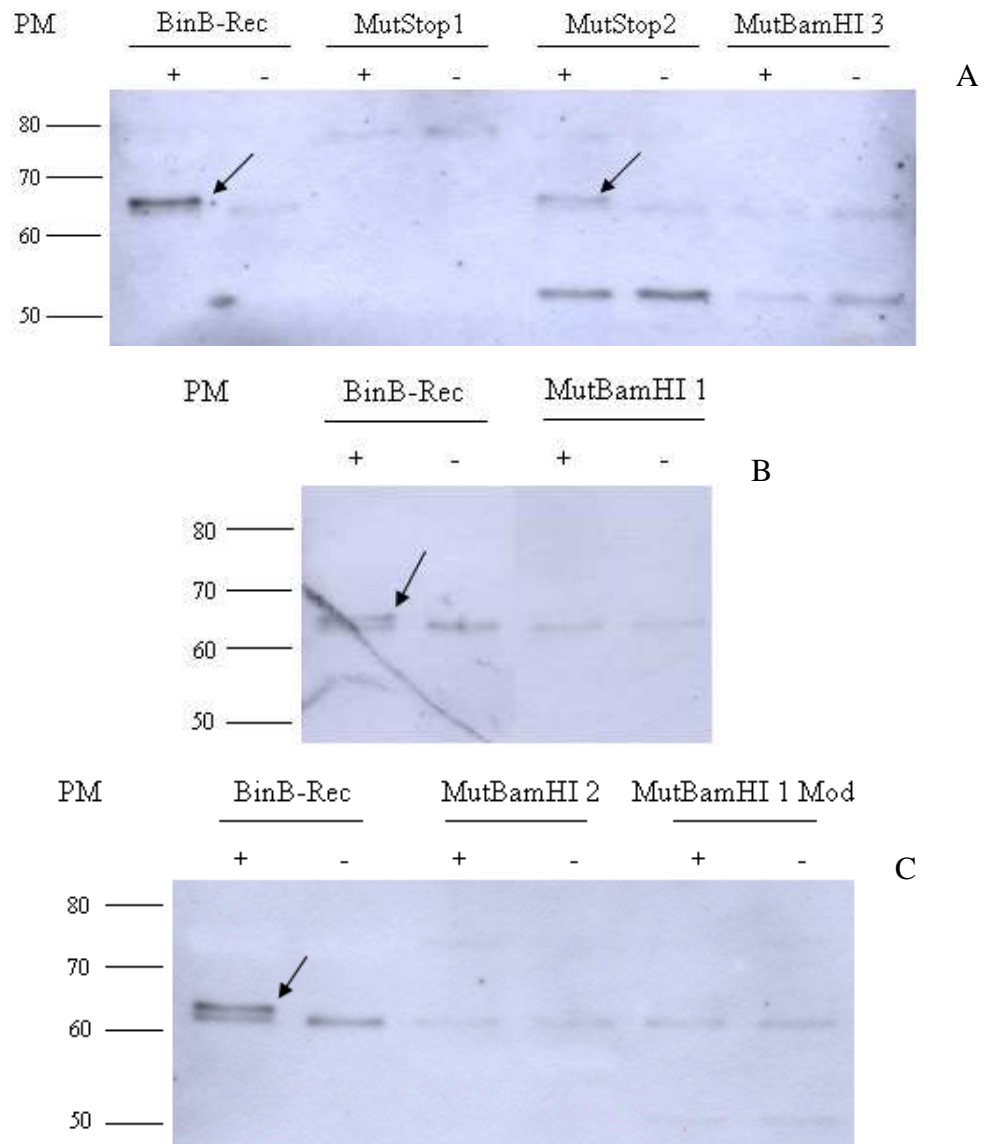


Figura 29. Ensaio de *pull-down* entre as proteínas mutantes BinB truncadas imobilizadas em resina e extratos-CHAPS de *Culex quinquefasciatus*, para avaliar sua capacidade de interação com o receptor Cqm1.

Nota: (A) Ensaio de *pull-down* realizado com as proteínas mutantes MutStop 1, MutStop 2 e MutBamHI 3. (B) Ensaio de *pull-down* com a proteína MutBamHI 1. (C) Ensaio de *pull-down* com as proteínas MutBamHI 2 e MutBamHI 1 Mod. O controle positivo dos ensaios é representado pela incubação entre extratos de *Culex quinquefasciatus* e a proteína BinB-Rec imobilizada na resina. Os ensaios foram realizados na presença (+) e na ausência (-) de extrato-CHAPS. As proteínas do extrato ligadas à resina foram separadas em SDS-PAGE 8%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetidas à imunodeteção com o anticorpo anti-Cqm1. A seta indica a ligação específica do receptor Cqm1 à subunidade BinB testada. PM: Peso molecular em kDa.

8.2.3 Funcionalidade de proteínas BinB mutagenizadas em trincas de aminoácidos

Numa terceira etapa, foram obtidas proteínas BinB mutantes em blocos de 3 aminoácidos em diferentes posições da sequência da proteína BinB-Rec substituídos por alaninas. Os seis blocos de aminoácidos para mutagênese (³²YNL³⁴, ³⁸SKK⁴⁰, ¹⁴⁷FQF¹⁴⁹, ²⁰⁷TSL²⁰⁹, ²³¹RAV²³³ e ³⁸⁷YRM³⁸⁹) foram selecionados de acordo com dados de literatura e hidrofobicidade das regiões obtidas pelo programa *Protean* do DNASTar. A análise da expressão das toxinas BinB mutantes não apresentaram divergências em perfil de expressão e tamanho molecular, todas migraram com o peso molecular discretamente inferior a 80 kDa, com a cauda GST (Figura 30).

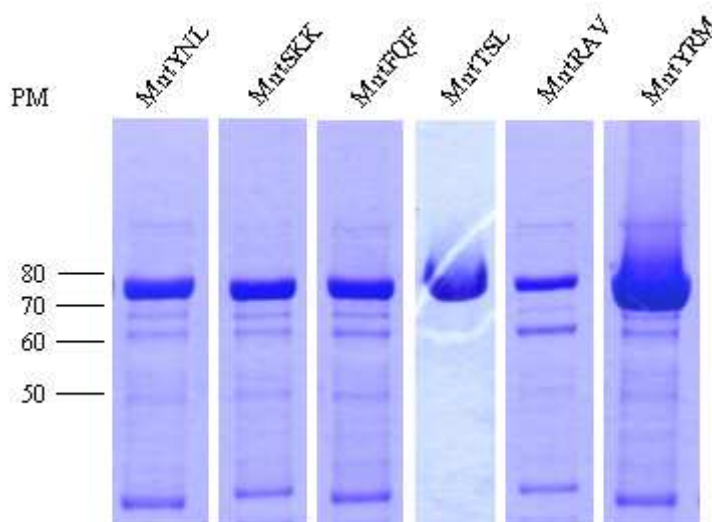


Figura 30. Proteínas BinB mutantes em trincas de aminoácidos purificadas e dialisadas, separadas por SDS-PAGE a 10% corado com azul de comassie.

Os ensaios de *pull-down* das proteínas mutantes revelaram que a substituição de blocos de aminoácidos que provocou interferência na capacidade de ligação da BinB foi ¹⁴⁷FQF¹⁴⁹ que está localizado na região que vai da R82 até a S159 (Figura 31A) mapeada anteriormente. A proteína BinBMutFQF perdeu a capacidade de interação com o receptor Cqm1, ao contrário das demais que mantiveram a funcionalidade (Figura 31A, B, C e D). À exemplo dos ensaios anteriores, foi detectada uma banda inespecífica discretamente inferior a banda do receptor Cqm1 nativo de 66 kDa, no entanto a presença desta não interferiu na avaliação dos ensaios.

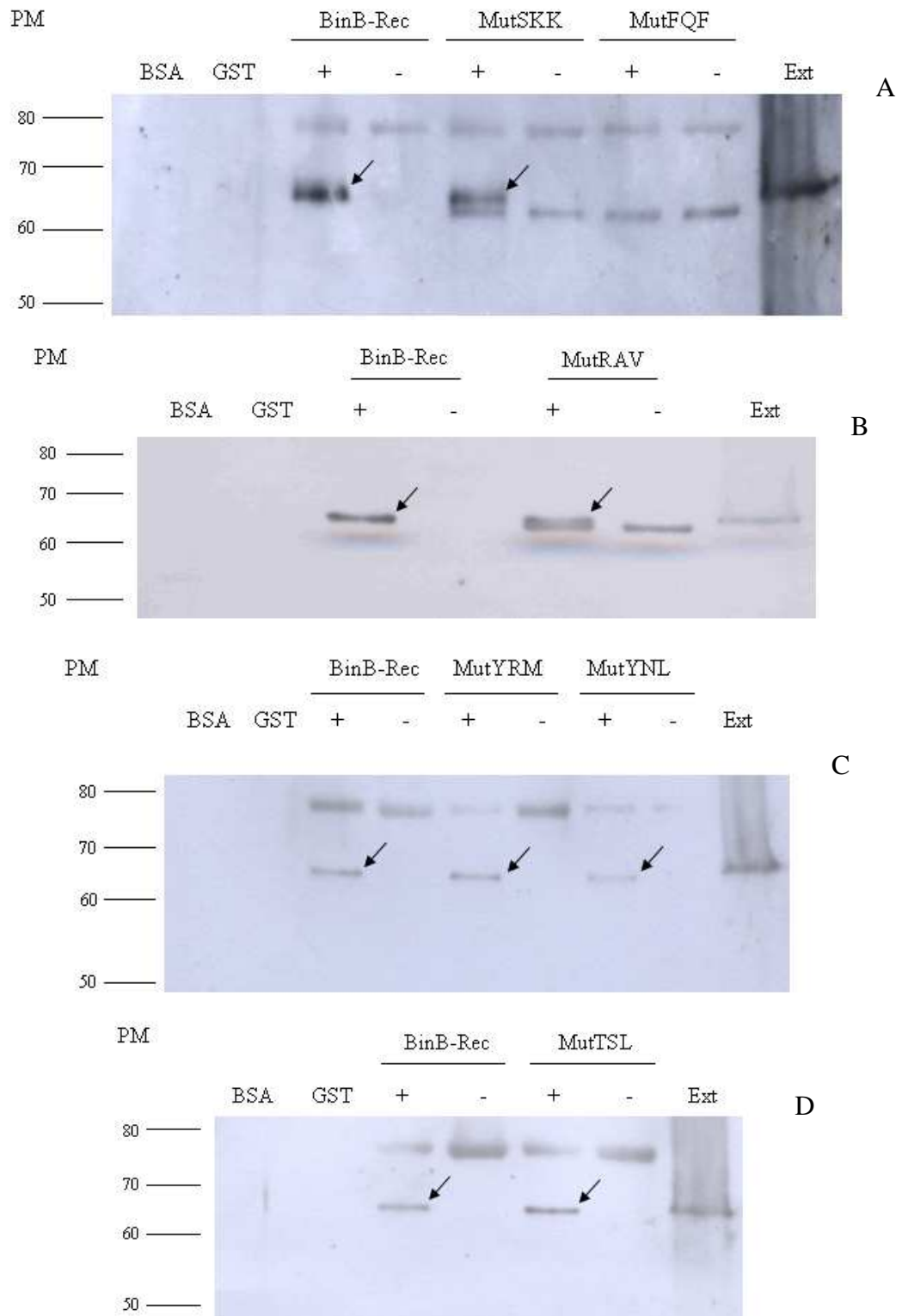


Figura 31. Ensaios de *pull-down* entre as proteínas BinB mutantes em trincas de aminoácidos imobilizadas em resina e extrato-CHAPS de *Culex quinquefasciatus* com o receptor CqM1.

Nota: Ensaios de *pull-down* com as proteínas mutantes MutSKK e MutFQF (A), MutRAV (B), MutYRM e MutYNL (C), MutTSL (D). O controle positivo do ensaio é representado pela incubação entre extratos de *C. quinquefasciatus* e a proteína BinB-Rec imobilizada na resina. O controle negativo é representado pela mesma incubação com BSA e GST em resina. Os ensaios de *pull-down* foram realizados na presença (+) e ausência (-) de extrato-CHAPS de *Culex*. As proteínas do extrato ligadas à resina foram separadas em SDS-PAGE 8%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e imunodetectadas com anti-CqM1. Ext. Extrato-CHAPS nativo A seta indica a banda que corresponde à ligação específica do receptor CqM1 à subunidade BinB testada. PM: Peso molecular em kDa.

A capacidade de ligação da subunidade BinB recombinante e de suas mutantes, com preparações ricas em *microvilli* intestinal (BBMF) de *C. quinquefasciatus*, também foi avaliada através de ensaios de competição. A toxina Bin marcada (Bin-I¹²⁵) foi incubada com amostras de BBMF na ausência do competidor, sendo a sua capacidade de ligação total tomada como referência. As subunidades BinB mutantes mostraram uma capacidade de competição pelos sítios de ligação na BBMF similar à toxina Bin e à subunidade BinB-Rec íntegra, enquanto que, a mutante BinBMutFQF mostrou uma capacidade de competição considerada baixa, em relação às proteínas controle (Bin, BinB) e às demais subunidades BinB mutantes (Figura 32).

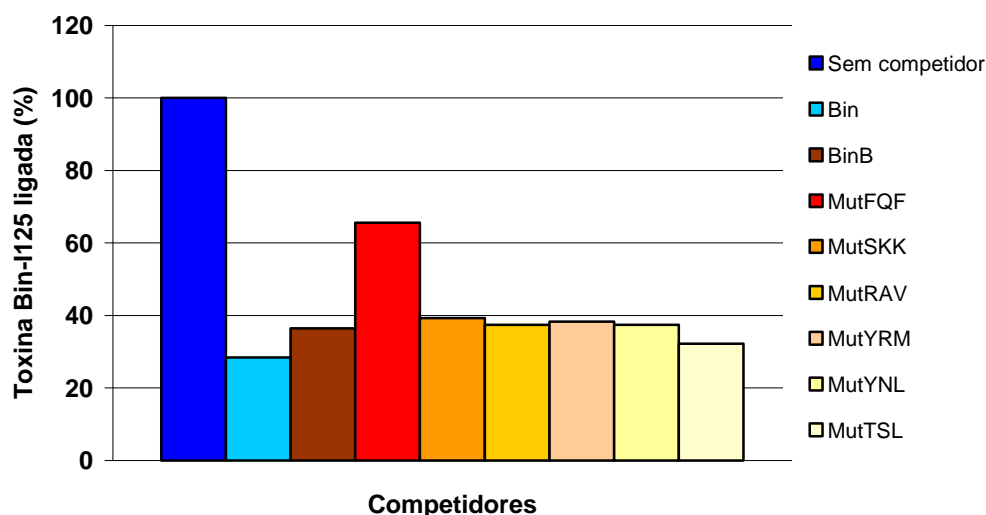


Figura 32. Ensaio de competição entre a toxina Bin do *Bacillus sphaericus* (10 nM) radiomarcada (Bin-I¹²⁵) e preparações de *microvilli* intestinal (25 µg) de larvas de *Culex quinquefasciatus*, na ausência ou na presença de um excesso (1 µM) de competidores não marcados: toxina Bin, subunidade BinB-GST, subunidades BinB contendo mutações (MutFQF, MutSKK, MutRAV, MutYRM, MutYNL, MutTSL).

Nota: Após a incubação, as amostras foram centrifugadas e os sedimentos submetidos à leitura em contador de cintilação.

Os ensaios de competição foram realizados entre a toxina Bin-I¹²⁵ e BBMF na presença de concentrações crescentes (0 a 3 µM) de proteína BinBMutFQF não marcada. Na ausência do competidor a Bin-I¹²⁵ apresentou capacidade total de ligação à BBMF e esta toxina foi gradualmente deslocada na presença de concentrações crescentes dos competidores Bin e da subunidade BinB-Rec enquanto que a proteína BinBMutFQF não mostrou capacidade de competição (Figura 33). Os dados de avaliação funcional das proteínas BinB mutantes confirmam que os aminoácidos F147, Q148 e F149 são essenciais para a ligação da

toxina Bin ao receptor Cqm1 de *C. quinquefasciatus*, visto que a capacidade de competição desta mutante foi substancialmente menor do que as proteínas controle.

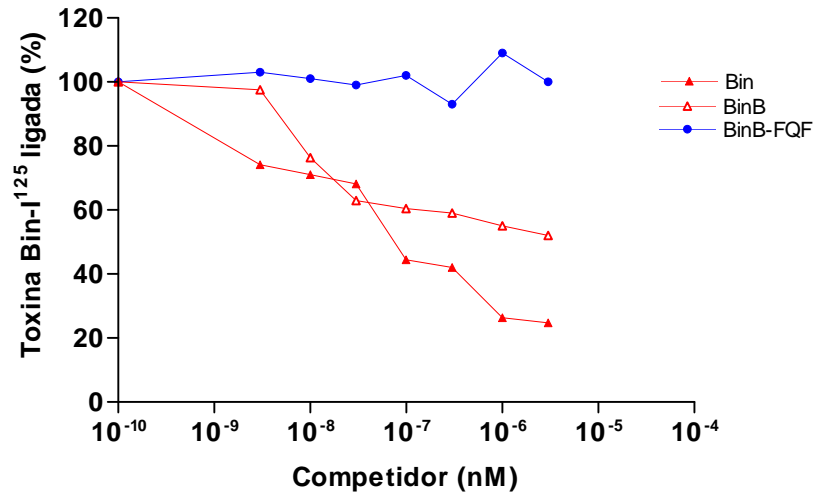


Figura 33. Curva de competição entre a toxina Bin do *Bacillus sphaericus* (10 nM) radiomarcada (Bin-I¹²⁵) e preparações de microvilli intestinal (25 µg) de larvas de *Culex quinquefasciatus*, na presença de concentrações crescentes (0-3.000 nM) dos seguintes competidores não marcados: toxina Bin, subunidade BinB-Rec, e subunidade BinBMutFQF.

Nota: Após a incubação, as amostras foram centrifugadas e os sedimentos submetidos à leitura em contador de cintilação.

8.3 Resultados suplementares (Desenvolvimento de PCR diagnóstica para os alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1*)

Durante a caracterização da proteína Cqm1 de *C. quinquefasciatus* como receptor da toxina Bin, foi realizada uma etapa de investigação de mutações no gene *cqm1* que podem conferir resistência à toxina Bin. O estudo foi feito a partir de uma colônia de *C. quinquefasciatus* de laboratório resistente à toxina Bin cujo alelo de resistência *cqm1_{REC}* foi caracterizado, permitindo o desenvolvimento de um método de PCR para o diagnóstico e determinação de sua frequência em populações do vetor (CHALEGRE, 2008; ROMÃO et al., 2006). O princípio da PCR foi amplificar um fragmento de DNA que englobasse a deleção de 19 nucleotídeos no alelo *cqm1_{REC}* utilizando um par de primers específicos. Os ensaios realizados com DNA extraído de larvas de *C. quinquefasciatus* susceptíveis (S) e resistentes (R) ao *Bs* em homozigose para os alelos *cqm1* e *cqm1_{REC}* amplificaram dois fragmentos distintos de aproximadamente 208 e 189 pb a partir destes alelos, respectivamente (Figura

34). A amplificação de ambos os fragmentos foi observada em heterozigotos, obtidos a partir do cruzamento de indivíduos susceptíveis e resistentes das colônias estudadas. Não houve amplificação de fragmentos nos controles negativos que consistiam de reações de PCR feitas com DNA de *Ae. aegypti* e sem DNA. Os fragmentos amplificados tinham os tamanhos esperados e o sequenciamento dos fragmentos clonados confirmou sua identidade como produtos de PCR do gene *cqm1*. A técnica foi utilizada na análise da frequência do alelo *cqm1_{REC}* em populações de *C. quinquefasciatus* de áreas não tratadas e tratadas com o biolarvicida *B. sphaericus*, a fim de avaliar o risco de seleção de resistência deste alelo. Os resultados completos deste estudo estão descritos em Chalegre et al. (2009) publicado como parte dos resultados obtidos no âmbito desta tese (Apêndice 1).

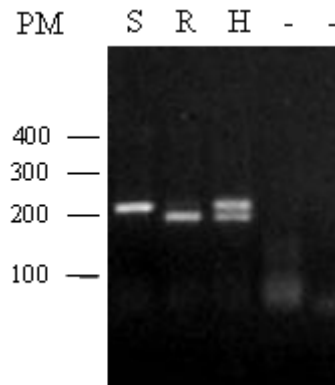


Figura 34. Separação eletroforética dos fragmentos amplificados por PCR a partir do gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus*, em gel de agarose a 1,5%.

Nota: Fragmentos de 208 e 189 pb foram amplificados a partir do alelo *cqm1* e *cqm1_{REC}* em larvas susceptíveis (S) e resistentes (R) ao *Bacillus sphaericus*, respectivamente. S: Indivíduos susceptíveis homozigotos; R: resistentes homozigotos; H: heterozigotos com ambos os fragmentos. O controle negativo da reação foram amostras sem DNA molde (-) e com outro DNA molde não específico de *Aedes aegypti* (-). O gel foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta. PM: Peso molecular em pares de bases (pb).

9 DISCUSSÃO

No âmbito dos trabalhos que objetivam elucidar o modo de ação das proteínas inseticidas de bactérias entomopatógenas, o mapeamento de motivos de ligação envolvidos na interação toxina-receptor é um aspecto importante, não apenas para caracterizar a base molecular de mecanismos de resistência, mas também para desenvolver estratégias para o aperfeiçoamento das toxinas contra os insetos susceptíveis. A maioria dos trabalhos voltados para a base molecular da interação toxina-receptor referem-se aos domínios de ligação das toxinas Cry do *B. thuringiensis* e de seus receptores em insetos lepidópteros e dípteros (BRAVO; GILL; SÓBERON, 2007; CHEN et al., 2009; FERNANDEZ-LUNA et al., 2010; GRIKO et al., 2007; HUA et al., 2008). Fazem-se necessários trabalhos semelhantes sobre a base molecular da interação da toxina Bin do *B. sphaericus* a seus receptores específicos em espécies de culicídeos. A avaliação dos fatores que influenciam a ligação específica do receptor Cqm1 em larvas de *C. quinquefasciatus* à subunidade BinB da toxina Bin, assim como a identificação do motivo de ligação ao receptor na subunidade BinB, foram os principais questionamentos investigados neste estudo.

Como um primeiro passo para caracterizar o motivo de ligação à toxina Bin do *B. sphaericus* na α -glicosidase Cqm1 de *C. quinquefasciatus* identificada como seu receptor, foram avaliadas sequências protéicas ortólogas e parálogas à Cqm1 em *Ae. aegypti* e *An. gambiae*. Estas revelaram múltiplos trechos conservados na porção N-terminal e alguns trechos e resíduos mais divergentes na porção C-terminal, corroborando com os dados de ROMÃO et al. (2006) que sugeriram que o sítio de ligação à toxina Bin está possivelmente localizado numa região de 45 kDa N-terminal no receptor Cqm1 que vai da Q32 até a L320. Baseado em evidências que demonstram que proteínas ortólogas, com alta identidade e similaridade de sequências de aminoácidos, poderiam conter o sítio de ligação à toxina Bin em *Culex* e *Anopheles* e que este sítio potencialmente esteja ausente em sequências parálogas, com menor identidade e similaridade, as regiões de 45 kDa N-terminais destas proteínas foram avaliadas em relação a sua funcionalidade. Esta análise demonstrou que todas as proteínas testadas se ligaram especificamente à toxina Bin e sugere que o motivo de ligação estaria conservado na região N-terminal das proteínas ortólogas e parálogas analisadas, inclusive naquelas que possuem uma identidade inferior a 40% em relação à Cqm1. Porém diante do achado com a proteína Rec-45 kDa de *Ae. aegypti* que demonstrou capacidade de ligação à toxina Bin, o qual difere do perfil de ligação da proteína Aam1 nativa que não

possui funcionalidade, os resultados foram inconclusivos e indicam outros fatores, além da presença do motivo de ligação nas proteínas, que seriam necessários para determinar a capacidade de ligação específica com a subunidade BinB, como por exemplo, modificações conformacionais destas proteínas. De fato é possível que outras regiões da molécula possam também determinar o *status* de funcionalidade da proteína Cqm1. Darboux et al. (2007) demonstraram que a resistência de uma população de *C. pipiens* pode ser conferida pelo alelo *cpm1_{BP-del}*, o qual codifica uma proteína mutante Cpm1_{BP-del}, desprovida de 66 aminoácidos da V393 até a Q458, localizada além da região 45 kDa N-terminal avaliada neste estudo. A proteína Cpm1_{BP-del} não possui capacidade de interação com a toxina Bin, demonstrando que esta região pode estar envolvida, seja por conter o sítio de ligação propriamente dito, discordando dos achados deste estudo em relação à região de 45 kDa, seja por conter um epitopo conformacional, o que poderia ser uma informação complementar aos dados obtidos.

Dentre as proteínas de culicídeos avaliadas, foi realizado um estudo mais detalhado da Aam1 de *Ae. aegypti* o qual demonstrou que esta molécula é uma α -glicosidase de $\cong 73$ kDa expressa no *microvilli* intestinal de larvas (FERREIRA et al., 2010). A análise da expressão demonstrou que a Aam1 está presente em quantidades equivalentes à sua proteína ortóloga Cqm1 em preparações de *microvilli* intestinal de larvas, no entanto, não é capaz de ligar-se à toxina Bin, o que determina o *status* de refratariedade das larvas de *Ae. aegypti* (FERREIRA et al., 2010). Ao contrário da proteína Aam1 nativa, o respectivo fragmento recombinante de 45 kDa da proteína apresentou capacidade de interação com a toxina Bin, sugerindo que a refratariedade em *Ae. aegypti* poderia ser determinada por outros fatores que impedem a sua interação com a subunidade BinB. Devido a estas peculiaridades, a proteína ortóloga Aam1 de *Ae. aegypti* foi utilizada neste estudo para fins comparativos com o receptor Cqm1 a fim de trazer informações importantes sobre fatores que influenciam a ligação específica toxina Bin-receptor.

Os resultados obtidos a partir do sistema de expressão em *E. coli* não foram suficientemente elucidativos para analisar a capacidade funcional desta classe de proteínas, cujo dobramento adequado pode desempenhar um papel determinante na ligação específica com a toxina Bin. Todavia, vários estudos de caracterização dos sítios de ligação de receptores de lepidópteros e de dípteros às toxinas Cry do *B. thuringiensis* utilizam em suas análises proteínas recombinantes expressas em *E. coli* cuja ausência de dobramento não foi limitante para a avaliação de sua funcionalidade (CHEN et al., 2009; FERNANDEZ et al., 2009; GRIKO et al., 2007). Sabe-se que um sistema de expressão procarioto não insere todas as modificações pós-traducionais, possivelmente requeridas para a funcionalidade de uma

proteína eucariótica, por esta razão foi feita uma avaliação em um sistema de expressão de lisado de células de reticulócito de coelho para a expressão da proteína Cqm1 e da sua ortóloga Aam1. Este sistema de expressão, para transcrever e traduzir *in vitro* proteínas eucarióticas marcadas radioativamente com ^{35}S e analisar a sua funcionalidade em ensaios de *pull-down*, foi utilizado com êxito em outros modelos de estudo (DHALIA et al., 2005). Apesar de apresentar vantagens em relação ao sistema procarioto, capacidade de inserir algumas modificações pós-traducionais a mais, a proteína Cqm1- ^{35}S , sabidamente funcional, não apresentou capacidade de ligação à toxina Bin. Os atributos presentes no sistema em termos de processamento pós-traducional são a acetilação, isoprenilação e alguma atividade de fosforilação (WALTER; BLOBEL, 1983). Proteínas secretadas e de membrana geralmente contém um peptídeo sinal N-terminal que é reconhecido por uma proteína específica que a conduz para o tráfego celular adequado em células eucarióticas e em bactérias (JANDA et al., 2010). A glicosilação é a mais abundante modificação pós-traducional de proteínas eucarióticas possuindo ampla variedade de funções como exemplo fornecer epitopos de reconhecimento adicionais nos receptores (LIS; SHARON, 1998). As proteínas que possuem o peptídeo sinal são expostas à maquinaria de N-glicosilação e segundo Darboux et al. (2001), a proteína Cpm1, caracterizada como receptor da toxina Bin em *C. pipiens*, possui em sua sequência três possíveis sítios de glicosilação. A análise preditiva de sítios de glicosilação na sequência proteica de Cqm1 é similar à Cpm1 e revelou dois possíveis sítios similares à Aam1, mas apenas a localização de um deles ($^{310}\text{NRT}^{312}$) foi peculiar em *Ae. aegypti* (FERREIRA et al., 2010).

Em vista dos achados nos dois sistemas de expressão utilizados foi feita uma análise das proteínas nativas Cqm1 e Aam1 nativas, incluindo uma avaliação do padrão de glicosilação. A análise do padrão de migração eletroforética das proteínas Cqm1 e Aam1, sob condições desnaturantes e nativas sugeriram diferenças conformacionais entre elas. A proteína Cqm1 apresentou um peso molecular de 66 kDa em extratos protéicos de *C. quinquefasciatus*, similar ao peso molecular observado nas proteínas recombinantes expressas em *E. coli* e em reticulócito de coelho. A proteína Aam1 apresentou um peso de 73 kDa em extratos de *Aedes* ligeiramente diferente do peso da recombinante expressa em células de reticulócito de coelho. Por outro lado, a migração das proteínas em condições semi-desnaturantes revelou que Cqm1 e Aam1 migram com tamanhos diferentes superiores a 80 kDa (ROMÃO et al., 2006; FERREIRA et al., 2010). Este padrão de migração sugere diferenças estruturais e conformacionais nestas moléculas que podem ter um papel para a sua capacidade de interação específica à toxina Bin. No caso da proteína Cqm1, a diferença de peso detectada sugere duas

situações a serem analisadas: a importância da conformação assumida pela proteína nativa para a sua função como receptor da toxina Bin; a presença de uma molécula acessória (cofator) que seria necessária para a interação do receptor Cqm1 com a toxina Bin. Em relação a este aspecto, dados prévios de nossa equipe (FERREIRA et al., 2010) demonstraram que o receptor Cqm1 perde sua capacidade de ligação à toxina Bin ao ser desnaturado, e esta característica distingue este receptor da maioria dos receptores já descritos para toxinas Cry, os quais mantêm sua funcionalidade sob condição nativa ou desnaturada (CHEN et al., 2009; FERNANDEZ et al., 2006; FERNANDEZ-LUNA et al., 2010; HUA et al., 2008; JURAT-FUENTES et al., 2004; KNIGHT; CRICKMORE; ELLAR, 1994; VADLAMUDI et al., 1995; VALAITIS et al., 2001; YAOI et al., 1999). Segundo Nagmatsu et al. (1998) a conformação nativa da caderina BtR175 do lepidóptero *Bombyx mori* que atua como receptor da toxina Cry1Aa é essencial para a ligação com a toxina, pois uma vez desnaturada, a caderina perdeu sua funcionalidade. Por outro lado, os epitopos de ligação da aminopeptidase N de *Manduca sexta* são expostos para interação com a toxina Cry1A quando o receptor é desnaturado (DANIEL et al., 2002). A perda de funcionalidade sob condições desnaturantes é consistente com os dois aspectos anteriormente levantados que, ou o dobramento, ou uma proteína acessória presente nas condições nativas, seriam indispensáveis para a ligação do receptor Cqm1 à toxina Bin.

Um outro aspecto avaliado, o padrão de glicosilação também mostrou diferenças entre as proteínas Cqm1 e Aam1. N-glicanos como N-acetilgalactosamina (GalNac) presentes em aminopeptidases e fosfatases alcalinas que atuam como receptores em espécies de lepidópteros, são o epitopo de ligação de algumas toxinas Cry (DENOLF et al., 1997; JURAT-FUENTES et al., 2004; KNOWLES; KNIGHT; ELLAR, 1991; PARDO-LOPEZ et al., 2006). Alguns casos de resistência de insetos e nemátodos às toxinas Cry foram relacionados a alterações no padrão de glicosilação de proteínas do *microvilli* envolvidas na ligação com as toxinas (GRIFFITTS et al., 2003, 2005; JURAT-FUENTES et al., 2004). As glicosilações protéicas de Cqm1 e de Aam1 foram investigadas através do tratamento de extratos protéicos de *C. quinquefasciatus* e de *Ae. aegypti* com endoglicosidases específicas. Os resultados revelaram que não há remoção de carboidratos da proteína nativa Cqm1 ou a possível remoção não causou diferenças de peso molecular. Em contraste, o tratamento da proteína Aam1 indicou a remoção de carboidratos de sua cadeia polipeptídica. Há evidências de que a eliminação de todas ou de algumas glicosilações podem ou não ter efeito no dobramento protéico, o que implica que alguns sítios de glicosilação são mais cruciais do que outros (MITRA; SHARON; SUROLIA, 2003; PARODI, 2000). Neste estudo foi

demonstrado que a proteína Aam1 é glicosilada ao contrário da Cqm1, apesar dos dois sítios de N-glicosilações preditos em sua sequência protéica. A remoção dos carboidratos de Aam1 não alterou sua propriedade de interação à toxina Bin sugerindo que a glicosilação diferencial detectada nesta molécula não afetaria o reconhecimento do potencial sítio de ligação pela toxina Bin. Entretanto, é possível afirmar que o dobramento protéico original da molécula Aam1, o qual pode prevenir o acesso ao epitopo de ligação à toxina Bin, talvez seja mantido mesmo após o tratamento com a endoglicosidase (SHENTAL-BECHOR; LEVY, 2008), e poderia explicar ausência de ligação da Aam1 mesmo sob a sua forma deglicosilada. As glicosilações de algumas proteínas intestinais de insetos podem determinar a susceptibilidade às toxinas Cry, as quais são cruciais para a sua ligação específica ou há casos em que a ligação de certos receptores às toxinas Cry não dependem destes N-glicanos (JURAT-FUENTES et al., 2004; PERERA et al., 2009). Os resultados obtidos sugerem fortemente que N-glicanos não estão envolvidos na ligação do receptor Cqm1 à toxina Bin em larvas de *C. quinquefasciatus* e as glicosilações em Aam1 precisam ser melhor investigadas para determinar sua influência no acesso da toxina Bin ao possível epitopo de ligação presente nesta molécula.

Diante dos achados obtidos nos sistemas de expressão de proteínas recombinantes utilizados e das características das proteínas Cqm1 e Aam1 nativas, foi possível concluir que a continuidade do estudo deveria ser feita em sistema de expressão em linhagem de células de inseto. Estudos prévios demonstraram que proteínas recombinantes de dípteros obtidas em sistema de expressão em linhagens de células do lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (Sf9) foram funcionais (DARBOUX et al., 2002, 2007; OPOTA et al., 2008). Quatro construções plasmidiais permitiram a expressão das proteínas Cqm1 e Aam1 recombinantes em linhagens de células Sf9 sob a forma secretada (Cqm1-Sf9-S e Aam1-Sf9-S), cuja sequência protéica não possui 19 aminoácidos hidrofóbicos finais responsáveis pela ancoragem via GPI na membrana celular, e sob formas de membrana (Cqm1-Sf9-M e Aam1-Sf9-M) as quais mantiveram suas características que conferem à ancoragem na membrana celular. A proteína recombinante Cqm1-Sf9-S apresentou capacidade de interação com a subunidade BinB, e demonstrou que este sistema de expressão é adequado para os estudos de caracterização do motivo de ligação à toxina Bin nesta molécula. Diante deste achado, podemos dizer que o dobramento da proteína Cqm1 é fundamental para sua funcionalidade como receptor da toxina Bin, pois uma vez produzida em sistema de lisado de células de reticulócito que não possui todos os aparatos celulares responsáveis pelo dobramento adequado e secreção de proteínas além de atributos em nível de modificações pós-traducionais, esta molécula perdeu

sua capacidade funcional. A proteína Aam1-Sf9-S foi produzida com 73 kDa, sob a forma glicosilada e não interagiu com a toxina Bin, demonstrando características similares à proteína nativa (FERREIRA et al., 2010). A mutagenização das proteínas Cqm1-Sf9-S e Aam1-Sf9-S como modelo de estudo é o próximo passo para a caracterização do motivo de ligação à toxina Bin. No caso da proteína Cqm1, a mutagênese terá como alvos potenciais regiões na proteína indicadas neste e em outros estudos (DARBOUX et al., 2007) que seriam epitopos de ligação ou conformacionais envolvidos na interação com a toxina Bin. A modificação dos sítios de glicosilação na molécula Aam1 através de estratégias de mutagênese que visem prevenir a inserção de N-glicanos, também será avaliada a fim de trazer informações sobre a influência deste aspecto na sua capacidade de interação à toxina Bin.

Outro aspecto do modo de ação do *B. sphaericus* realizado neste estudo foi a caracterização de motivos envolvidos na ligação da subunidade BinB com o receptor Cqm1. Dados prévios demonstraram que a porção N-terminal da subunidade BinB é responsável pela ligação específica ao receptor intestinal em larvas susceptíveis enquanto que a porção C-terminal está envolvida na interação com a região N-terminal da subunidade BinA (OEI; HINDLEY; BERRY, 1990). Algumas pesquisas inferiram funções a determinados resíduos de aminoácidos ou domínios protéicos nos componentes BinA e BinB, através da técnica de mutagênese sítio dirigida (CLARK; BAUMANN, 1990; BOONYOS et al., 2010; ELANGOVAN et al., 2000; LIMPANAWAT; PROMDONKOY; BOONSERM, 2009; PROMDONKOY et al., 2008; SANITT; PROMDONKOY; BOONSERM, 2008; SINGKHAMANAN et al., 2009; YUAN et al., 2001). Nosso modelo de estudo se baseou na comparação da capacidade de ligação específica da subunidade BinB recombinante e proteínas BinB mutantes derivadas, com o receptor Cqm1 em extratos protéicos de *C. quinquefasciatus*.

A primeira etapa de mutagênese sítio dirigida visou à remoção de amplos trechos de aminoácidos tanto na porção N-terminal como na C-terminal da proteína BinB e seis proteínas truncadas mutantes fusionados a GST foram obtidas. Dentre os fragmentos mutantes testados, apenas a proteína BinBMutStop2 apresentou capacidade de ligação específica ao receptor Cqm1, indicando que a região que vai da M1 até a S159, é suficiente para a ligação ao receptor Cqm1. Entretanto, a ausência de ligação da proteína BinBMutStop 1, composta pelos aminoácidos M1 a R82, ao receptor Cqm1, evidencia que os elementos de ligação ao receptor estariam presentes na região que vai da R82 até S159. Estudos de predição da estrutura secundária da subunidade BinB mostraram que os aminoácidos 1-34 são potenciais regiões formadoras de *loop* seguida por uma estrutura em α -hélice formada pelos 45 aminoácidos

subsequentes (ELANGO VAN et al., 2000). Estudos prévios mostraram que a deleção dos primeiros 32 aminoácidos da região N-terminal da subunidade BinB da toxina Bin do *B. sphaericus* 2362 não afetam a sua atividade, já a deleção de 41 aminoácidos N-terminais aboliu sua atividade biológica (CLARK; BAUMANN, 1990). A localização de potenciais sítios de clivagem enzimática na subunidade BinB importantes para a sua ativação, possibilita a deleção de 21 aminoácidos N-terminais e 53 aminoácidos C-terminais na toxina (CLARK; BAUMANN, 1990). De fato, a desestruturação direta desta estrutura de *loop* ou de α -hélice pode afetar diretamente a capacidade de ligação ao receptor Cqm1, resultado evidenciado a partir dos ensaios realizados com a proteína MutBinBBamHI 1. Esta proteína mutante cujos primeiros 82 aminoácidos foram deletados não apresentou capacidade de interação com o receptor Cqm1, mesmo contendo em sua sequência a região R82 a S159 caracterizada por conter elementos importantes para a ligação da subunidade BinB ao receptor Cqm1. Estes dados sugerem que a presença da região R82 a S159 não é suficiente para determinar sua capacidade de interação com receptor Cqm1. Pode-se sugerir que a região de α -hélice entre os aminoácidos N33 até a R82 possibilita um dobramento adequado da toxina para a exposição do motivo de ligação ao receptor Cqm1, sendo fundamental no modo de ação da subunidade BinB. A exposição da região R82 a E293 em uma nova proteína mutante modificada a partir da proteína BinBMutBamHI 1, na proteína BinBMutBamHI 1Mod de 50 kDa, que possui deleções tanto na sua porção N-terminal como na sua porção C-terminal, não se mostrou efetiva quanto a sua capacidade de ligação à Cqm1. Os dados reforçam a idéia que a presença da região R82 a S159, que contém elementos de ligação ao receptor, não é suficiente para que a proteína BinB interaja à Cqm1 e sugere que outros elementos fornecidos pela α -hélice N-terminal que vai da N33 até a R82 na subunidade BinB são requeridos para ligação ao receptor.

Dentre várias estratégias que visam aumentar a atividade inseticida das toxinas Cry do *B. thuringiensis*, a deleção de pequenas regiões da toxina se mostrou particularmente efetiva (PARDO-LOPEZ et al., 2009). De acordo com o modelo de ação das toxinas Cry1A, a ligação ao receptor caderina possibilita uma clivagem de uma α -hélice na porção N-terminal da proteína que é importante para promover a oligomerização das toxinas e formação de uma estrutura pré-poro, necessária para a toxicidade (GÓMEZ et al., 2002). Vários eventos de resistência de lepidópteros às toxinas Cry são ocasionados por mutações nesta caderina, que impede a ligação da toxina a este receptor e consequente clivagem da α -hélice citada. Dentre as estratégias de melhoramento da toxina Cry1A, foi obtida uma mutante com a região N-terminal desprovida da α -hélice 1 (Cry1AMod) que é capaz de formar oligômeros na ausência

da caderina (MUÑOZ-GARAY et al., 2009). A Cry1AMod tem atividade inseticida similar à toxina selvagem e a modificação inserida permitiu que a mesma tivesse habilidade formadora de poro em insetos resistentes, superando problemas de resistência relacionados à falha de ligação com a caderina. Na protoxina Cry2A, a proteólise de um fragmento de 42 resíduos N-terminais, que precede à α -hélice 1, expõe uma região antes oclusa da toxina que corresponde à região de ligação ao receptor em lepidópteros, e esta toxina modificada apresenta um aumento de sua atividade tóxica em até seis vezes (MORSE; YAMAMOTO; STROUD, 2001). No presente estudo, os dados obtidos trazem uma informação importante para futuras abordagens de melhoramento da atividade tóxica da toxina Bin do *B. sphaericus*, pois ao contrário do que acontece com as toxinas Cry, a deleção na região N-terminal da subunidade BinB da toxina Bin é capaz de abolir sua capacidade de ligação ao receptor Cqm1.

Para determinar o epitopo de ligação ao receptor Cqm1 na proteína BinB, foram obtidas seis proteínas mutantes com substituições de blocos de 3 aminoácidos, baseado em dados da literatura como áreas críticas (CLARK; BAUMANN, 1990; ELANGOVAN et al., 2000; SINGKHAMANAN et al., 2009) e em análise de hidrofiliçidade das regiões. Os ensaios de funcionalidade das proteínas BinB mutantes revelaram que a simples substituição do bloco de aminoácidos $^{147}\text{FQF}^{149}$, localizado na região da R82 até a S159, afetou a capacidade de interação com o receptor, diferente das demais mutantes que mantiveram a funcionalidade. Os dados indicam que a ausência dos aminoácidos F147, Q148 e F149 na sequência protéica da BinB é capaz de afetar sua capacidade de ligação com o receptor Cqm1 *in vitro*. Segundo SINGKAMANAN et al. (2009) a substituição residual da Y150 por uma alanina resultou em uma proteína BinB mutante incapaz de se ligar ao intestino de larvas de *C. quinquefasciatus in vivo*. Contudo, nossos dados revelam que os resíduos $^{147}\text{FQF}^{149}$ anteriores a Y150 também tem um papel crítico na capacidade de ligação da subunidade BinB ao receptor Cqm1. Ensaio de competição homóloga da proteína BinB e de suas proteínas mutantes demonstraram que a proteína MutBinBFQF teve uma reduzida capacidade de competição pelos sítios de BBMF de *C. quinquefasciatus* demonstrando que os aminoácidos F147, Q148 e F149 são importantes para a ligação da toxina Bin ao receptor Cqm1 de *Culex*. Dentre as estratégias que visam aumentar a afinidade de ligação das toxinas Cry aos seus receptores em lepidópteros e dípteros através de modificações no gene da toxina Cry, a modificação direcional de resíduos de aminoácidos na região que contém o sítio de ligação ao receptor tem demonstrado resultados promissores no âmbito dos trabalhos que visam a potencialização da ação tóxica das Cry (ISHIKAWA et al., 2007; LIU; DEAN, 2006; RAJAMOHAN et al., 1996; WU et al., 2000). A mesma estratégia poderia ser utilizada na

toxina Bin, na qual mutagênese direcional na região que contém o motivo de ligação ao receptor na subunidade BinB caracterizado neste estudo, possibilitaria integrar a esta molécula características que potencializasse sua ação tóxica. A revelação dos aspectos moleculares ainda desconhecidos da interação toxina Bin do *B. sphaericus* ao seu receptor em *C. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* descritos neste trabalho, trazem conhecimentos sobre o modo de ação do *Bs* nestas espécies que podem subsidiar a criação de estratégias para o aperfeiçoamento do espectro biolarvicida.

10 CONCLUSÕES

- a) As proteínas Cqm1 e Aam1 possuem diferenças estruturais e conformacionais que têm um papel determinante para a sua capacidade de interação específica à toxina Bin;
- b) O papel do receptor da toxina Bin desempenhado pela proteína Cqm1 depende do epitopo de ligação, potencialmente localizado na região N-terminal de 45 kDa, e do seu estado conformacional nativo;
- c) Os N-glicanos não estão envolvidos na ligação do receptor Cqm1 à toxina Bin em larvas de *C. quinquefasciatus*;
- d) A refratariedade do *Aedes aegypti* seria devido à diferença conformacional da proteína Aam1, a qual pode estar ligada à glicosilação desta proteína;
- e) O epitopo ¹⁴⁷FQF¹⁴⁹ e a região N-terminal N33 a R82 são essenciais para a ligação da subunidade BinB da toxina Bin ao receptor Cqm1.

11 PERSPECTIVAS

- a) Análise funcional de proteínas Cqm1 e Aam1 mutantes produzidas em sistema de expressão de células Sf9, a fim de identificar o epitopo de ligação à toxina Bin;

- b) Mutagênese da toxina Bin e avaliação do melhoramento da ação inseticida para larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, M. A. et al. Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering. Appl. environ. microbiol., Washington, v. 69, n. 9, p. 5343-5353, 2003.
- ABDULLAH, M. A.; VALAITIS, A. P.; DEAN, D. H. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. BMC biochem., Londres, v. 7, p. 16, 2006.
- AMORIM, L. B. et al. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure. Biol. control theory appl. pest manag., San Diego, v. 42, p. 155-160, 2007.
- AQUINO DE MURO, M.; MITCHELL, W. J.; PRIEST, F. G. Differentiation of mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus* from non-toxic varieties by ribosomal RNA gene restriction patterns. J. gen. microbiol., Londres, v. 138, n. 6, p. 1159-1166, 1992.
- AUSBEL, F. M. et al. Short protocols in molecular biology, 2. ed. Nova York: Harvard Medical School, 1992, cap. 1, p. 16-17.
- AYRES, C. F. et al. Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., Rio de Janeiro, v. 97, n. 6, p. 871-875, 2002.
- BARBAZAN, P. et al. Control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) with *Bacillus sphaericus* in Maroua, Cameroon. J. Am. Mosq. Control Assoc., Fresno CA, v. 13, n. 3, p. 263-269, 1997.
- BAUMANN, P. et al. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. J. bacteriol., Washington, v. 163, n. 2, p. 738-747, 1985.
- BECKER, N. Mosquitoes and their Control. 1. ed. New York: Kluwer Academic, 2003.
- BERNARD, K. A. et al. West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. Emerg. infect. dis., Atlanta, v. 7, n. 4, p. 679-685, 2001.
- BERRY, C. et al. Nucleotide sequence of two toxin genes from *Bacillus sphaericus* IAB59: sequence comparisons between five highly toxinogenic strains. Nucleic acids res., Londres, v. 17, n. 18, p. 7516, 1989.
- 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.
- BONFIM, C. et al. The occurrence and distribution of lymphatic filariasis in Greater Metropolitan Recife: the case of an endemic area in Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brazil. Cad. saúde pública, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5, p. 1497-1505, 2003.

BOONSERM, P. et al. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. J. mol. biol., Londres, v. 348, n. 2, p. 363-382, 2005.

BOONSERM, P.; ELLAR, D. J.; LI, J. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a mosquito-larvicidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Acta crystallogr., D. Biol. crystallogr., Copenhagen, v. 59, n. Pt 3, p. 591-594, 2003.

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., Washington, v. 188, n. 9, p. 3391-3401, 2006.

BOONYOS, P. et al. Role of cysteine at positions 67, 161 and 241 of a *Bacillus sphaericus* binary toxin BinB. BMB Rep, Korea, v. 43, n. 1, p. 23-28, 2010.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Síntese epidemiológica da filariose. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/filariose.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Emergências em saúde pública de importância nacional (ESPIN) de febre amarela silvestre em São Paulo e no Rio Grande do Sul e a situação epidemiológica atual no Brasil (2008/2009). Brasília, DF, 2009a. Disponível em: <http://portal2.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_febre_amarela_09_12_09.pdf>. Acesso em: 01 jan. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Malária no Brasil. Brasília, DF, 2009b. Disponível em: <http://portal2.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao_da_malaria_site_svs_28_12.pdf>. Acesso em: 01 jan. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informe epidemiológico da dengue. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se7_05_03.pdf>. Acesso em: 01 jan. 2010.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon., Oxford, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A. et al. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochim. biophys. acta., Amsterdam, v. 1667, n. 1, p. 38-46, 2004.

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, n. 6, p. 1333-1337, 1987.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (USA). West Nile Virus. Atlanta, 2010. Disponível em: <www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&control/CaseCount09detailed.htm>. Acesso em: 01 jan. 2010.

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

CHARLES, J. F. Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. Ann. Inst. Pasteur Microbiol., Paris, v. 138, n. 4, p. 471-484, 1987.

CHARLES, J. F.; NIELSON-LEROUX, C.; DELECLUSE, A. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. Ann. rev. entomol., Palo Alto, v. 41, p. 451-472, 1996.

CHARLES, J. F. et al. Binding of the 51- and 42-kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). FEMS microbiol. lett., Amsterdam, v. 156, n. 1, p. 153-159, 1997.

CHEN, J. et al. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Biochem. J., Londres, v. 424, n. 2, p. 191-200, 2009.

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, n. 5, p. 657-664, 2001.

CLARK, M. A.; BAUMANN, P. Deletion analysis of the 51-kilodalton protein of the *Bacillus sphaericus* 2362 binary mosquitocidal toxin: construction of derivatives equivalent to the larva-processed toxin. J. bacteriol., Washington, v. 172, n. 12, p. 6759-6763, 1990.

CONSOLI, R. A. G. D., OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 20. ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1994.

COSTANTINI, C. et al. Mosquito behavioural aspects of vector-human interactions in the *Anopheles gambiae* complex. Parassitologia., Roma, v. 41, n. 1/3, p. 209-217, 1999.

CRICKMORE, N. Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. Trends microbiol., Cambridge, v. 13, n. 8, p. 347-350, 2005.

CRICKMORE, N. Full list of delta-endotoxins. Brighton, 2010. Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html>. Acesso em: 01 jan. 2010.

- DANIEL, A. et al. Denaturation of either *Manduca sexta* aminopeptidase N or *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins exposes binding epitopes hidden under nondenaturing conditions. Appl. environ. microbiol., Washington, v. 68, n. 5, p. 2106-2112, 2002.
- DARBOUX, I. et al. 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.
- DARBOUX, I. et al. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. Insect biochem. mol. biol., Oxford, v. 31, n. 10, p. 981-990, 2001.
- DARBOUX, I. et al. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Washington, v. 99, n. 9, p. 5830-5835, 2002.
- DAVIDSON, E. W. A Review of the Pathology of Bacilli Infecting Mosquitoes, Including an Ultrastructural Study of Larvae Fed *Bacillus sphaericus* 1593 Spores. Prog. ind. microbiol., Amsterdam, v. 22, p. 69-81, 1981.
- DAVIDSON, E. W. Binding of the *Bacillus sphaericus* (Eubacteriales: Bacillaceae) toxin to midgut cells of mosquito (Diptera: Culicidae) larvae: relationship to host range. J. med. entomol., Honolulu, v. 25, n. 3, p. 151-157, 1988.
- DE BARJAC, H. A new variety of *Bacillus thuringiensis* very toxic to mosquitoes: *B. thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14. C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D., Paris, v. 286, n. 10, p. 797-800, 1978.
- 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 BARJAC, H.; VÉRON, M.; COSMAO DUMANOIR, V. Biochemical and serological characterization of "*Bacillus sphaericus*" strains, pathogenic or non-pathogenic for mosquitoes. Ann. microbiol., Paris, v. 131B, n. 2, p. 191-201, 1980.
- DE MAAGD, R. A. et al. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. Ann. rev. genet., Palo Alto, v. 37, p. 409-433, 2003.
- 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, 2009.
- DE MELO, J. V. et al. Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. Micron, Oxford, v. 39, n. 8, p. 1342-1350, 2008.
- DE MELO NETO, O. P.; STANDART, N.; MARTINS DE SA, C. Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. Nucleic acids res., Londres, v. 23, n. 12, p. 2198-2205, 1995.

DENOLF, P. et al. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. Eur. j. biochem., Berlin, v. 248, n. 3, p. 748-761, 1997.

DHALIA, R. et al. Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. Mol. biochem. parasitol., Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 23-41, 2005.

DOHM, D. J.; SARDELIS, M. R.; TURELL, M. J. Experimental vertical transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). J. med. entomol., Honolulu, v. 39, n. 4, p. 640-644, 2002.

ELANGOVAN, G. et al. Identification of the functional site in the mosquito larvicidal binary toxin of *Bacillus sphaericus* 1593M by site-directed mutagenesis. Biochem. biophys. res. commun, New York, v. 276, n. 3, p. 1048-1055, 2000.

FABRICK, J. A.; TABASHNIK, B. E. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac to multiple sites of cadherin in pink bollworm. Insect biochem. mol. biol., Oxford, v. 37, n. 2, p. 97-106, 2007.

FARID, H. A. et al. Detection of *Wuchereria bancrofti* in mosquitoes by the polymerase chain reaction: a potentially useful tool for large-scale control programmes. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., Londres, v. 95, n. 1, p. 29-32, 2001.

FERNANDEZ-LUNA, M. T. et al. An alpha-amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Environ. microbiol., Oxford, v. 12, n. 3, p. 746-757, 2010.

FERNANDEZ, L. E. et al. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. Biochem. J., Londres, v. 394, n. Pt 1, p. 77-84, 2006.

FERNANDEZ, L. E. et al. Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*. Biochemistry., Washington, v. 48, n. 37, p. 8899-8907, 2009.

FERNANDEZ, L. E. et al. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop alpha-8 of domain II. FEBS lett., Amsterdam, Amsterdam, v. 579, n. 17, p. 3508-3514, 2005.

FERREIRA, L. M. Caracterização do receptor da toxina binária do *Bacillus sphaericus* em *Anopheles gambiae*: clonagem, expressão e funcionalidade. 2007. Monografia (Conclusão de curso de graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

FERREIRA, L. M. Análise da refratariedade do *Aedes aegypti* à toxina binária do biolarvicida *Bacillus sphaericus*. 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

FERREIRA, L. M. et al. The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI6 anchored alpha-glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. Insect biochem. mol. biol., Oxford, v. 40, p. 604-610, 2010.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Programa Nacional de Controle do Dengue. Brasília, DF, 2003. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23614>. Acesso em: 01 jan. 2008.

FOCACCIA, R.; VERONESI, R. Tratado de Infectologia. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

FONSECA, D. M. et al. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. Science, Estados Unidos, v. 303, n. 5663, p. 1535-1538, 2004.

GALITSKY, N. et al. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. Acta crystallogr., D. Biol. crystallogr., Copenhagen, v. 57, n. Pt 8, p. 1101-1109, 2001.

GEORGHIOU, G. P. et al. Characterization of Resistance of *Culex quinquefasciatus* to the Insecticidal Toxins of *Bacillus sphaericus* (Strain 2362). Mosq. Control. Res., Annual Report 1992, Berkeley, p. 34-35, 1992.

GODDARD, L. B. et al. Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. Emerg. infect. dis., Atlanta, v. 8, n. 12, p. 1385-1391, 2002.

GODDARD, L. B. et al. Vertical transmission of West Nile Virus by three California *Culex* (Diptera: Culicidae) species. J. med. entomol., Honolulu, v. 40, n. 6, p. 743-746, 2003.

GOMEZ, I. et al. Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops alpha-8 and 2 in domain II of Cy1Ab toxin. Biochemistry, Washington, v. 42, n. 35, p. 10482-10489, 2003.

GOMEZ, I. et al. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. J. biol. chem., Baltimore, v. 276, n. 31, p. 28906-28912, 2001.

GOMEZ, I. et al. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. Peptides, New York, v. 28, n. 1, p. 169-173, 2007.

GOMEZ, I. et al. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. FEBS lett., Amsterdam, v. 513, n. 2-3, p. 242-246, 2002.

GRIFFITTS, J. S. et al. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. Science, Estados Unidos, v. 307, n. 5711, p. 922-925, 2005.

GRIFFITTS, J. S. et al. Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. J. biol. chem., Baltimore, v. 278, n. 46, p. 45594-45602, 2003.

GRIFFITTS, J. S. et al. Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. Science, Estados Unidos, v. 293, n. 5531, p. 860-864, 2001.

GRIKO, N. B. et al. Univalent binding of the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* to a conserved structural motif in the cadherin receptor BT-R1. Biochemistry, Washington, v. 46, n. 35, p. 10001-10007, 2007.

GROCHULSKI, P. et al. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. J. mol. biol., Londres, v. 254, n. 3, p. 447-464, 1995.

HAYES, C. G. et al. Dengue fever in American military personnel in the Philippines: clinical observations on hospitalized patients during a 1984 epidemic. Southeast Asian j. trop. med. public health, Bangkok, v. 20, n. 1, p. 1-8, 1989.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. Curr. opin. struct. biol., Londres, v. 7, n. 5, p. 637-644, 1997.

HINDLEY, J.; BERRY, C. *Bacillus sphaericus* strain 2297: nucleotide sequence of 41.9 kDa toxin gene. Nucleic acids res., Londres, v. 16, n. 9, p. 4168, 1988.

HOUGARD, J. M. et al. Campaign against *Culex quinquefasciatus* using *Bacillus sphaericus*: results of a pilot project in a large urban area of equatorial Africa. Bull. World Health Organ., Geneva, v. 71, n. 3-4, p. 367-375, 1993.

HUA, G.; JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. Bt-R1a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity. J. biol. chem., Baltimore, v. 279, n. 27, p. 28051-28056, 2004.

HUA, G. et al. Molecular cloning of a GPI-anchored aminopeptidase N from *Bombyx mori* midgut: a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin. Gene, Amsterdam, v. 214, n. 1-2, p. 177-185, 1998.

HUA, G. et al. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. Biochemistry, Washington, v. 47, n. 18, p. 5101-5110, 2008.

INGLE, S. S. et al. Aminopeptidase-N from the *Helicoverpa armigera* (Hubner) brush border membrane vesicles as a receptor of *Bacillus thuringiensis* cryIac delta-endotoxin. Curr. microbiol., New York, v. 43, n. 4, p. 255-259, 2001.

ISHIKAWA, H. et al. A system for the directed evolution of the insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. Mol. biotechnol., Totowa, v. 36, n. 2, p. 90-101, 2007.

JANDA, C. Y. et al. Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle. Nature (London), Londres, v. 465, n. 7297, p. 507- 510, 2010.

JENKINS, J. L.; DEAN, D. H. Exploring the mechanism of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods. Genet. eng (N Y), New York, v. 22, p. 33-54, 2000.

JENKINS, J. L. et al. Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. J. biol. chem., Baltimore, v. 275, n. 19, p. 14423-14431, 2000.

JIMENEZ-JUAREZ, N. et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. J. biol. chem., Baltimore, v. 282, n. 29, p. 21222-21229, 2007.

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.

JONES, G. W. et al. The Cry48Aa-Cry49Aa binary toxin from *Bacillus sphaericus* exhibits highly restricted target specificity. Environ. microbiol., Oxford, v. 10, n. 9, p. 2418-2424, 2008.

JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. Eur. j. biochem., Berlin, v. 271, n. 15, p. 3127-3135, 2004.

JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. The *Heliothis virescens* cadherin protein expressed in Drosophila S2 cells functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A but not Cry1Fa toxins. Biochemistry., Washington, v. 45, n. 32, p. 9688-9695, 2006.

JURAT-FUENTES, J. L. et al. The HevCaLP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. Biochemistry., Washington, v. 43, n. 44, p. 14299-14305, 2004.

KALFON, A. et al. Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297: an electron microscope study of crystal-like inclusion biogenesis and toxicity to mosquito larvae. J. gen. microbiol., Londres, v. 130, n. 4, p. 893-900, 1984.

KELLEN, W. R. et al. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. J. invertebr. pathol., New York, v. 7, n. 4, p. 442-448, 1965.

KNIGHT, P. J.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D. J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. Mol. microbiol., Oxford, v. 11, n. 3, p. 429-436, 1994.

KNOWLES, B. H.; KNIGHT, P. J.; ELLAR, D. J. N-acetyl galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B, Biol. sci., Londres, v. 245, n. 1312, p. 31-35, 1991.

KRASIKOV, V. V.; KARELOV, D. V.; FIRSOV, L. M. alpha-Glucosidases. Biochemistry (Mosc), Moscow, v. 66, n. 3, p. 267-281, 2001.

KULASEKERA, V. L. et al. West Nile virus infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000. Emerg. infect. dis., Atlanta, v. 7, n. 4, p. 722-725, 2001.

KUMAR, P. A.; SHARMA, R. P.; MALIK, V. S. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Adv. appl. microbiol., New York, v. 42, p. 1-43, 1996.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), Londres, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LI, J. D.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature (London), Londres, v. 353, n. 6347, p. 815-821, 1991.

LIMPANAWAT, S.; PROMDONKOY, B.; BOONSERM, P. The C-terminal domain of BinA is responsible for *Bacillus sphaericus* binary toxin BinA-BinB interaction. Curr. microbiol., New York, v. 59, n. 5, p. 509-513, 2009.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. Chem. rev., Washington, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.

LIU, J. W. et al. New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8-kilodalton mosquitocidal toxins. Appl. environ. microbiol., Washington, v. 62, n. 6, p. 2174-2176, 1996.

LIU, X. S.; DEAN, D. H. Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin into a mosquito toxin. Protein Eng. Des. Sel., Oxford, v. 19, n. 3, p. 107-111, 2006.

LUO, K.; TABASHNIK, B. E.; ADANG, M. J. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin to Aminopeptidase in Susceptible and Resistant Diamondback Moths (*Plutella xylostella*). Appl. environ. microbiol., Washington, v. 63, n. 3, p. 1024-1027, 1997.

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

MASSON, L. et al. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. J. biol. chem., Baltimore, v. 270, n. 35, p. 20309-20315, 1995.

MITRA, N.; SHARON, N.; SUROLIA, A. Role of N-linked glycan in the unfolding pathway of Erythrina corallodendron lectin. Biochemistry., Washington, v. 42, n. 42, p. 12208-12216, 2003.

MITTAL, P. K. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. J. vector borne dis., Delhi, v. 40, n. 1-2, p. 20-32, 2003.

MORSE, R. J.; YAMAMOTO, T.; STROUD, R. M. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. Structure (London), Londres, v. 9, n. 5, p. 409-417, 2001.

MULLA, M. S. Mosquito control then, now, and in the future. J. Am. Mosq. Control Assoc., Fresno CA, v. 10, n. 4, p. 574-584, 1994.

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 CA, v. 19, n. 1, p. 39-46, 2003.

MUNOZ-GARAY, C. et al. Oligomerization of Cry11Aa from *Bacillus thuringiensis* has an important role in toxicity against *Aedes aegypti*. Appl. environ. microbiol., Washington, v. 75, n. 23, p. 7548-7550, 2009.

NAGAMATSU, Y. et al. Identification of *Bombyx mori* midgut receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. Biosci. biotechnol. biochem., Tokyo, v. 62, n. 4, p. 718-726, 1998.

NICOLAS, L. et al. Respective role of the 42- and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. FEMS microbiol. lett., Amsterdam, v. 106, n. 3, 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, n. 2, p. 585-590, 1992.

NIELSEN-LEROUX, C. et al. Resistance in a laboratory population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. Eur. j. biochem., Berlin, v. 228, n. 1, p. 206-210, 1995.

NIELSEN-LEROUX, C. et al. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) larvae. J. med. entomol., Honolulu, v. 34, n. 3, p. 321-327, 1997.

NIELSEN-LEROUX, C. et al. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west Mediterranean countries. J. med. entomol., Honolulu, v. 39, n. 5, p. 729-735, 2002.

OEI, C.; HINDLEY, J.; BERRY, C. An analysis of the genes encoding the 51.4- and 41.9-kDa toxins of *Bacillus sphaericus* 2297 by deletion mutagenesis: the construction of fusion proteins. FEMS microbiol. lett., Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 265-273, 1990.

OLIVEIRA, C. M. et al. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. J. med. entomol., Honolulu, v. 41, n. 1, p. 58-64, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Lymphatic filariasis: the disease and its epidemiology. Geneva, 2007. Disponível em: <www.who.int/lymphatic_filariasis/epidemiology>. Acesso em: 01 jan. 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Fact sheet on malaria. Geneva, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>>. Acesso em: 01 jan. 2010.

OPOTA, O. et al. Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. Comp. biochem. physiol., Part B Biochem. mol. biol., Oxford, v. 149, n. 3, p. 419-427, 2008.

PARDO-LOPEZ, L. et al. Structural and functional analysis of the pre-pore and membrane-inserted pore of Cry1Ab toxin. J. invertebr. pathol., New York, v. 92, n. 3, p. 172-177, 2006.

PARDO-LOPEZ, L. et al. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. Peptides., New York, v. 30, n. 3, p. 589-595, 2009.

PARODI, A. J. Protein glycosylation and its role in protein folding. Ann. rev. biochem., Palo Alto, v. 69, p. 69-93, 2000.

PASSOS, M. N. et al. Clinical differences observed in patients with dengue caused by different serotypes in the epidemic of 2001/2002, occurred in Rio de Janeiro. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Brasília, v. 37, n. 4, p. 293-295, 2004.

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

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

PERERA, O. P. et al. Cloning and characterization of the Cry1Ac-binding alkaline phosphatase (HvALP) from *Heliothis virescens*. Insect biochem. mol. biol., Oxford, v. 39, n. 4, p. 294-302, 2009.

PEREZ, C. et al. *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. Cell. microbiol., Oxford, v. 9, n. 12, p. 2931-2937, 2007.

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.

PROMDONKOY, B. et al. Cys31, Cys47, and Cys195 in BinA are essential for toxicity of a binary toxin from *Bacillus sphaericus*. Curr. microbiol., New York, v. 56, n. 4, p. 334-338, 2008.

RAJAMOHAN, F. et al. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Washington, v. 93, n. 25, p. 14338-14343, 1996.

RAJAMOHAN, F.; LEE, M. K.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. Prog. nucleic acid res. mol. biol., New York, v. 60, p. 1-27, 1998.

RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Mosquito glutathione transferases. Methods enzymol., New York, v. 401, p. 226-241, 2005.

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 CA, v. 11, n. 1, p. 1-5, 1995.

REED, B. J.; CHANDLER, D. S.; SANDEMAN, R. M. Aminopeptidases as potential targets for the control of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. Int. j. parasitol., New York, v. 29, n. 6, p. 839-850, 1999.

REGIS, L. et al. Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Olinda, Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., Londres, v. 94, n. 5, p. 488-492, 2000.

REGIS, L. et al. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., Rio de Janeiro, v. 90, n. 1, p. 115-119, 1995.

REGIS, L. et al. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. Trends parasitol., Oxford, v. 17, n. 8, p. 377-380, 2001.

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

SANGADALA, S. et al. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and 86Rb(+)-K⁺ efflux in vitro. J. biol. chem., Baltimore, v. 269, n. 13, p. 10088-10092, 1994.

SANITT, P.; PROMDONKOY, B.; BOONSERM, P. Targeted mutagenesis at charged residues in *Bacillus sphaericus* BinA toxin affects mosquito-larvicidal activity. Curr. microbiol., New York, v. 57, n. 3, p. 230-234, 2008.

SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. mol. biol. rev., Washington, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

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, n. 2, p. 171-183, 2001.

SHENTAL-BECHOR, D.; LEVY, Y. Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Washington, v. 105, n. 24, p. 8256-8261, 2008.

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., Berlin, v. 247, n. 3, p. 754-761, 1997.

- SILVA-FILHA, M. H.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Insect biochem. mol. biol., Oxford, v. 29, n. 8, p. 711-721, 1999.
- SILVA-FILHA, M. H. et al. 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., San Diego, v. 77, p. 138-146, 2003.
- SILVA-FILHA, M. H. et al. 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., Fresno CA, v. 17, n. 1, p. 45-50, 2001.
- 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. Abstr. Viiiith Eur. Meet. Society of Vector Ecology, Cambridge, v. 17, p. 5-8, 1994.
- SINGER, S. Entomogenous Bacilli Against Mosquito Larvae. Prog. ind. microbiol., Amsterdam, v. 15, p. 187-194, 1974.
- SINGH, G. J.; 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, n. 2, p. 237-247, 1988.
- 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, n.1, p. 84- 91, 2009.
- SOUZA-NETO, J. A. et al. Sugar digestion in mosquitoes: identification and characterization of three midgut α -glucosidases of the neo-tropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). Comp. biochem. physiol., Part A Mol. integr. physiol., New York, v. 147, n. 4, p. 993-1000, 2007.
- SPIELMAN, A. Structure and seasonality of nearctic *Culex pipiens* populations. Ann. N. Y. Acad. sci., New York, v. 951, p. 220-234, 2001.
- THANABALU, T. et al. Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitoicidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. J. bacteriol., Washington, v. 173, n. 9, p. 2776-2785, 1991.

THANABALU, T.; PORTER, A. G. Efficient expression of a 100-kilodalton mosquitocidal toxin in protease-deficient recombinant *Bacillus sphaericus*. Appl. environ. microbiol., Washington, v. 61, n. 11, p. 4031-4036, 1995.

THIERY, I.; HAMON, S. Bacterial control of mosquito larvae: investigation of stability of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis and *Bacillus sphaericus* standard powders. J. Am. Mosq. Control Assoc., Fresno CA, v. 14, n. 4, p. 472-476, 1998.

THIÉRY, I. et al. Applications de *Bacillus thuringiensis* et de *B. sphaericus* dans la démoustication et la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales. Annales de l'Institut Pasteur/Actualités, Paris, v. 7, p. 247-260, 1996.

TURELL, M. J.; O'GUINN, M.; OLIVER, J. Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus. Am. j. trop. med. hyg., Baltimore, v. 62, n. 3, p. 413-414, 2000.

TURELL, M. J. et al. Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. J. med. entomol., Honolulu, v. 38, n. 2, p. 130-134, 2001.

TUTEJA, R. Malaria - an overview. FEBS j., Oxford, v. 274, n. 18, p. 4670-4679, 2007.

VADLAMUDI, R. K. et al. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. J. biol. chem., Baltimore, v. 270, n. 10, p. 5490-5494, 1995.

VALAITIS, A. P. et al. Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. Arch. insect biochem. physiol., New York, v. 46, n. 4, p. 186-200, 2001.

WALTER, P.; BLOBEL, G. Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. Methods enzymol., New York, v. 96, p. 84-93, 1983.

WANG, P.; ZHANG, X.; ZHANG, J. Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. Insect biochem. mol. biol., Oxford, v. 35, p. 611-620, 2005.

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.

WEISER, J. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. Zentralbl. bakteriol. mikrobiol. hyg [B], Stuttgart, v. 139, n. 1, p. 57-60, 1984.

WICKRAMASINGHE, R. H.; WICKRAMASINGHE, R. S.; MENDIS, C. L. Some recent mosquito-related studies and developments in Sri Lanka. Biomed. environ. sci., San Diego, v. 7, n. 3, p. 266-277, 1994.

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, n. 4, p. 534-540, 2000.

WIRTH, M. C. et al. 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.

WU, S. J. et al. Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop. FEBS lett., Amsterdam, v. 473, n. 2, p. 227-232, 2000.

WYND, S. et al. Understanding the community impact of lymphatic filariasis: a review of the sociocultural literature. Bull. World Health Organ., Geneva, v. 85, n. 6, p. 493-498, 2007.

YADAV, R. S.; SHARMA, V. P.; UPADHYAY, A. K. Field trial of *Bacillus sphaericus* strain B-101 (serotype H5a, 5b) against filariasis and Japanese encephalitis vectors in India. J. Am. Mosq. Control Assoc., Fresno CA, v. 13, n. 2, p. 158-163, 1997.

YUAN, Z. 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, p. 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, R. et al. A 106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin in the mosquito *Anopheles gambiae*. Biochemistry., Washington, v. 47, n. 43, p. 11263-11272, 2008.

APÊNDICE A – 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.

VOL. 75, 2009

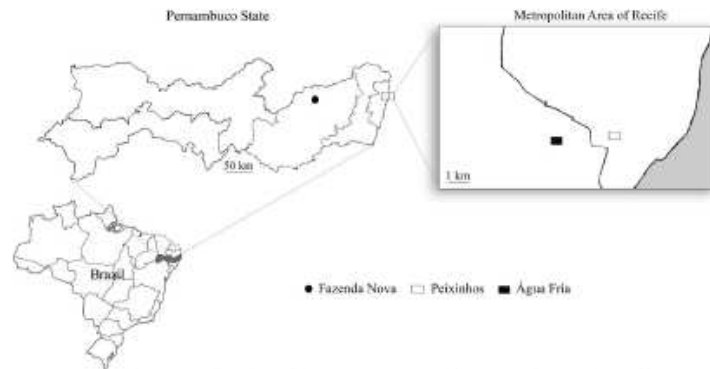
RESISTANCE TO *BACILLUS SPHAERICUS* BINARY TOXIN 1045

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).

1046 CHALEGRE ET AL.

APPL. ENVIRON. MICROBIOL.

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_{50} 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'-CGA GAA 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 (Göttingen, 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 3.2.1.29) 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-

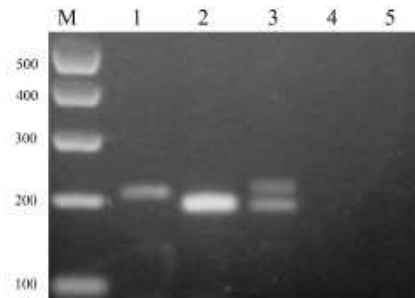


FIG. 2. DNA fragments amplified from the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* and *cqm1_{REC}* alleles of susceptible and *Bacillus sphaericus*-resistant larvae, respectively. The diagnostic PCR produces distinct profiles for susceptible homozygote, resistant homozygote, and susceptible heterozygote larvae (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-

VOL. 75, 2009

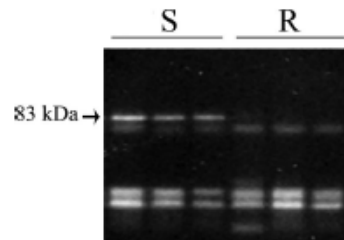
RESISTANCE TO *BACILLUS SPHAERICUS* BINARY TOXIN 1047

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 (*HvCaLP*) 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.

1048 CHALEGRE ET AL.

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 CryIAb 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. Cüstianera. 2007. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAb 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. Souts, 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 inornata* (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. Buschmann, 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. Chesillon, C., C. Bernard, M. Marquie, 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, L., 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, L., J.-F. Charles, Y. Fauchet, 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, L., Y. Fauchet, 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. French-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 B-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.* 106:275-290.
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 B-crops: evidence versus theory. *Nat. Biotechnol.* 26: 199-202.
35. Tabashnik, B. E., A. L. Putin, 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 nemoralis* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Heredity* 97:127-134.
38. Wirth, M. C., G. P. Georghiou, J. L. 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. Mt 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 B – Artigo 2

Insect Biochemistry and Molecular Biology 40 (2010) 604–610



Contents lists available at ScienceDirect

Insect Biochemistry and Molecular Biology

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

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

Lígia Maria Ferreira^a, Tatiány Patrícia Romão^a, Osvaldo Pompílio de-Melo-Neto^b, Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha^{a,*}

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

^b Department of Microbiology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife-PE 50670-420, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 March 2010
Received in revised form
14 May 2010
Accepted 27 May 2010

Keywords:
Bin toxin
Bacillus sphaericus
Biolarvicides
Receptor
Toxin binding
Glycosylation

ABSTRACT

Aedes aegypti larvae are refractory to the insecticidal binary (Bin) toxin from *Bacillus sphaericus*, which is not able to bind to its target tissue in the larval midgut. In contrast, *Culex pipiens* larvae are highly susceptible to that toxin, which targets its midgut brush border membranes (BBMF) through the binding of the BinB subunit to specific receptors, the Cpm1/Cqm1 membrane-bound α -glucosidases. The identification of an *Ae. aegypti* gene encoding a Cpm1/Cqm1 orthologue, here named Aam1, led to the major goal of this study which was to investigate its expression. The *aam1* transcript was found in larvae and adults from *Ae. aegypti* and a ≈ 73 -kDa protein was recognized by an anti-Cqm1 antibody in midgut BBMF. The Aam1 protein displayed α -glucosidase activity and localized to the midgut epithelium, bound through a GPI anchor, similarly to Cpm1/Cqm1. However, no binding of native Aam1 was observed to the recombinant BinB subunit. Treatment of both proteins with endoglycosidase led to changes in the molecular weight of Aam1, but not Cqm1, implying that the former was glycosylated. The findings from this work rule out lack of receptors in larval stages, or its expression as soluble proteins, as a reason for *Ae. aegypti* refractoriness to Bin toxin.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aedes aegypti is the major vector responsible for the transmission of dengue in the Americas, a disease which constitutes a major health problem in a number of different countries. So far, interruption of disease transmission relies on vector control actions and biolarvicides based on the bacteria *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* (Bti) have been used as effective tools to reduce the population density of *Ae. aegypti* (Armengoi et al., 2006; Lee and Zairi, 2006; Regis et al., 2008). Toxicity of Bti depends on the Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and Cyt1Aa insecticidal proteins, which act synergistically and display specific action against species of *Aedes*, *Culex* and *Anopheles*. *B. sphaericus* is another commercially available biolarvicide used to control culicid larvae whose activity is associated with a single heterodimeric crystal protein, the binary (Bin) toxin (Baumann et al., 1985; Broadwell and Baumann, 1987; Baumann et al., 1988). This insecticidal protein displays high toxicity against *Culex*, *Anopheles* and *Aedes* larvae, however *Ae.*

aegypti is considered a refractory species since the lethal concentration of Bin toxin is about 100-fold higher than that for *C. pipiens* larvae (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992). The mode of action of Bti and *B. sphaericus* insecticidal proteins is similar and involves ingestion of crystals, dissolution under alkaline pH, proteolytic processing of protoxins into toxins and specific binding of active toxins to membrane-bound midgut receptors, the later a critical step which determines the spectra of action of these toxins (Regis et al., 2001; Lacey, 2007). Bin toxin binding to the receptors triggers a set of cytopathological events in the midgut epithelium which result in larval death (Charles, 1987; Singh and Gill, 1988; de Melo et al., 2008). Action of Bin toxin on larvae midgut depends on the processing of the 51- (BinB) and 42-kDa (BinA) subunits into 43- and 39-kDa active fragments, respectively, which act in synergy and present optimal toxicity at equimolar concentration (Nicolas et al., 1993; Charles et al., 1997). Bin toxin, through its BinB subunit, recognizes and binds to a 66-kDa glycosylphosphatidylinositol (GPI) membrane bound α -glucosidase which acts as a receptor in *C. pipiens* (Cpm1), *C. quinquefasciatus* (Cqm1) and *An. gambiae* (Agm3) larvae, all *B. sphaericus* susceptible species (Silva-Filha et al., 1997, 1999; Darboux et al., 2001; Pauchet et al., 2005;

* Corresponding author. Tel.: +55 81 21012553; fax: +55 81 21012516.
E-mail address: mhneves@cpqam.fiocruz.br (M.H.NevesL. Silva-Filha).

Romão et al., 2006; Opota et al., 2008). *Ae. aegypti*, despite its close taxonomic position to the highly susceptible species from the *C. pipiens* complex, is refractory to *B. sphaericus*. Previous studies demonstrated that this condition is not related to the capacity of proteolytic processing of insect midgut, but rather to the failure of active Bin toxin to bind to brush border membranes (BBMF) (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992).

In silico analysis of *Ae. aegypti* genome revealed a gene which encodes an orthologue of the Bin toxin receptor, here named Aam1. This orthologue displays 74% identity to the Cqm1 α -glucosidase, which is higher than the 66% identity found between Cqm1 and Aam3, the functional Bin toxin receptor in *An. gambiae* (Romão et al., 2006; Nene et al., 2007; Opota et al., 2008). The high level of conservation between the Aam1 and Cqm1 sequences highlights the need to investigate the mechanisms behind the refractoriness of *Ae. aegypti* larvae to the Bin toxin, since the lack of Bin toxin binding to BBMF could result from inadequate expression of a potential receptor, or, to its inability to bind to the toxin. The major goal of this study was to investigate Aam1 expression in *Ae. aegypti* in order to understand factors involved in its refractoriness and to provide knowledge on the molecular basis of the Bin toxin interaction with cell receptors in the midgut of culicid larvae.

2. Materials and methods

2.1. Mosquito colonies

Aedes aegypti (Recl) and *Culex quinquefasciatus* (CqSF) colonies maintained for more than 10 years in the insectarium of the Department of Entomology/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ were used in this work. Insects were reared at 26 ± 1 °C, 70% relative humidity and photoperiod of 12:12 h light/darkness. Larvae were maintained in deionised water and fed with cat biscuits. Adults were maintained on 10% sucrose solution and the females were also fed with chicken blood.

2.2. Sequence analysis

Blast searches were carried out to identify Cqm1 orthologue and paralogues in *Ae. aegypti* genome available at GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequence alignment was performed with ClustalW (<http://www.cmbi.kun.nl/bioinf/tools/clustalw.shtml>) and manual refinement was done, when needed. NetNGlyc 1.0 predictor was used to identify potential putative N-glycosylation sites.

2.3. Reverse transcription

Ae. aegypti RNA extraction was carried out from pools of 4th instar larvae or adults from Recl colony using Trizol reagent, as previously described (Romão et al., 2006). Reverse transcription was performed at 37 °C, for 1 h using 13 μ g of total RNA, 7.5U of AMV[®] reverse transcriptase (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) and 2 μ M of the Oligo DT20[®] primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR reactions were performed to amplify the *aam1* cDNA using specific primers designed based on the gene sequence (GenBank accession no. XP_001660909) Fwd (5'-GCA CTG CAG AGT TCG GCT GAC GAG ATG-3') and Rev (5'-GAA AAG CTT CTA CAC TAA GAA ATA CT-3'). Forward and reverse primers contain restrictions sites for the *Pst*I and *Hind*III enzymes, respectively (underlined). Specific primers were used to amplify the cDNA from two *aam1* paralogue sequences. P1 (GenBank accession no. EAT45278) Fwd (5'-GCA GGA TCC ACT TCG AAA TGG TAT TAA CG-3') and Rev (5'-GAG AAG CTT AAG CCT CGA TTA CTG CTC-3'); P2 (GenBank accession no. EAT48295) Fwd (5'-CAA GGATCC CAA CTG CTT ACT GCA ACA TG-3') and Rev (5'-GAG GAA TTC TTC TAT GAC TCA TAC TCC-3'). Forward

and reverse P1 primers contain restrictions sites for the *Bam*HI and *Hind*III enzymes and P2 primers contain restrictions sites for the *Bam*HI and *Eco*RI enzymes, respectively (underlined).

2.4. Cloning and expression of *Aam1* and *Cqm1* in *Escherichia coli*

Amplified fragments from *cqm1* and *aam1* genes were purified using GFX DNA and Gel Band Purification[®] kit (GE Healthcare) and transferred to the plasmid vector pRSETc[®] (Invitrogen) for protein expression in *E. coli*. Recombinant plasmids containing fragments of the *aam1* and *cqm1* genes were sequenced to confirm their identities and used for the expression of the 45-kDa truncated recombinant protein in competent cells of strain BL21 star. The Aam1 truncated protein was produced and purified, as described previously for Cqm1 (Romão et al., 2006).

2.5. Protein samples

Whole crude extracts of *Ae. aegypti* and *C. quinquefasciatus* were obtained from 1st to 4th instar larvae and adults, which were homogenized in 20 μ l of PBS pH 7.4, supplemented with 0.02% of sodium azide and 10 mM PMSF (Sigma, St Louis, MO, USA), used as protease inhibitor. Samples were centrifuged at 1500 g for 2 min at 4 °C and the supernatant was collected to be used as crude extract samples. Brush border membrane fractions (BBMF) from 4th instar whole larvae and CHAPS-solubilized proteins from BBMF (CHAPS-extracts) were obtained as previously described (Silva-Filha et al., 1997, 1999). Crude extracts, BBMF and CHAPS-extracts were stored at -70 °C until use. Protein contents were determined by the Bio-Rad protein assay[®] (Biorad, Hercules, CA, USA) using a bovine serum albumine (BSA) standard curve. Enrichment of BBMF and CHAPS-extracts was evaluated through the detection of α -glucosidase activity (EC 3.2.1.20), a marker for proteins from apical cell membranes. Samples were incubated in 0.1 M sodium citrate-phosphate buffer pH 6.5 with 2 mM of p-nitrophenyl- α -D-glucanopyranoside (Sigma, St Louis, MO, USA) at 37 °C for 1 h, and the absorbance was recorded at 405 nm.

2.6. SDS-PAGE and immunoblotting

Protein samples were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose ECL[®] membranes (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). Membranes were blocked in 50 mM Tris-HCl/150 mM NaCl/0.1% Tween 20 pH 7.6, containing 5% nonfat dry milk. Cqm1/Aam1 detection was carried out through incubation with anti-Cqm1 antibodies, affinity purified from a rabbit polyclonal serum, at a 1:200 dilution, followed by incubation with the secondary serum, goat anti-rabbit antibodies conjugated to horseradish peroxidase, at a 1:20,000 dilution. The blots were developed using the ImmobilonWestern HRP Substrate[®] (Millipore, Billerica, MA, USA).

2.7. PI-PLC treatment

Ae. aegypti BBMF (100 μ g) was incubated with 1 unit of *B. cereus* PI-PLC (Sigma) for 90 min at 30 °C in 200 μ l of sodium phosphate buffered saline (2.1 mM NaH₂PO₄/14 mM Na₂HPO₄/150 mM NaCl, pH 7.4). Protein samples were centrifuged at 18,000 g for 30 min, pellet and supernatant were assayed for α -glucosidase activity and used in immunoblotting with anti-Cqm1 antiserum. Negative control samples were incubated without PI-PLC under the same conditions.

2.8. α -glucosidase assays

BBMF samples (15 μ g) from *C. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti* solubilized in SDS-PAGE sample buffer, without beta-mercaptoethanol and without being heated, were separated on 8% SDS-PAGE at

606

L.M. Ferreira et al. / Insect Biochemistry and Molecular Biology 40 (2010) 604–610

4 °C and submitted to enzymatic detection as previously described (Romão et al., 2006). Gels were also submitted to immunodetection as described in section 2.6. PI-PLC treated *Ae. aegypti* BBMF samples, pellets and proteins from supernatants, were submitted to α -glucosidase activity assay by incubating at 37 °C in 100 mM of citrate-phosphate buffer pH 6.5 with 2 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (Sigma) as the substrate. Non treated samples, submitted to the same incubation conditions described above, were used as a negative control.

2.9. Bin toxin

The gene encoding the BinB subunit from *B. sphaericus* Bin toxin was amplified from a *B. thuringiensis* recombinant strain containing the pGSP10 plasmid (Bourgooin et al., 1990). Specific primers Fwd (5'-CACGGATCCATGTGCGATTCAAAAGACAATTC-3') and Rev (5'-CACCTCGAGCTGGTTAAITTTAGGTATTAATTC-3'), containing *Bam*HI and *Xho*I restriction sites (underlined) were used in the amplification of the gene which was subsequently cloned into the expression vector pGEX4T3. Selected PCR products were subjected to automatic sequencing to confirm their identity and integrity. Recombinant BinB subunit was expressed in *E. coli* BLR cells fused to glutathione S-transferase (BinB-GST) and purified as described previously (de Melo Neto et al., 1995).

2.10. Pull-down assays

Pull down assays were carried out as previously described (Dhalia et al., 2005). Briefly, CHAPS-extracts (20 μ g) samples were incubated with BinB-GST (2 μ g) immobilized on glutathione-sepharose 4B[®] (GE Healthcare) beads (10 μ l) (BinB-beads), for 2 h at 4 °C in BB3 buffer (100 mM KCl/1 mM MgCl₂/50 mM HEPES/0.2% NP40/5% glycerol), under agitation. Non-specific binding was determined by incubating CHAPS-extract with glutathione-S-transferase immobilized on glutathione-sepharose (GST-beads). After incubation with CHAPS-extracts, BinB- or GST-beads were collected by centrifugation at 1.500 g, for 2 min at 4 °C and washed three times with BB3 buffer. Samples were solubilized in sample buffer, boiled for 5 min and separated on 10% SDS-PAGE. Protein samples were submitted to immunoblotting as described in section 2.6.

2.11. Enzyme deglycosylation

Deglycosylation of Aam1 and Cqm1 proteins was carried out using *N*-glycosidase F (PNGase F) and Endoglycosidase H (Endo H) (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Native or denatured *C. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti* CHAPS-extracts were treated according to manufacturer's instructions. Briefly 10–20 μ g of proteins from CHAPS-extracts and 2U of PNGase F or Endo H were

incubated at 37 °C for 1 h, in duplicates. CHAPS-extracts incubated under the same conditions in the absence of the enzyme, were used as untreated control. Samples were submitted to pull down assays, SDS-PAGE and immunoblotting as described in sections 2.10 and 2.6, respectively, in order to evaluate deglycosylation of proteins as well as their ability to bind BinB after treatment.

3. Results

3.1. Comparative analysis of sequences

The Cqm1, Agm3 and Aam1 orthologues (GenBank accessions no. ABC59609, no. ABW98683 and no. XP_001660909, respectively) share extensive segments identical in sequence spread out throughout their length. N- and C-terminal ends are more diverged in sequence but all are rich in hydrophobic residues and compatible with similar roles in protein secretion and GPI anchoring (Supplementary Fig. 1). No features within the Aam1 sequence, such as elements conserved in Cqm1 and Agm3 but missing from this orthologue, are observed through sequence analysis alone which could explain its lack of binding to the Bin toxin, although it cannot be discarded that single amino acid residues which differ between the three proteins could be critical for the interaction with the toxin.

3.2. Expression analysis of the *aam1* transcript

To investigate the possibility that Bin toxin binding failure to BBMF might be due to lack of expression of a potential receptor in larval stages, the presence of *aam1* transcript was first assayed through RT-PCR using RNA samples from different *Ae. aegypti* developmental stages. A single PCR band of the expected size for the *aam1* cDNA (~1.8 kb) was detected in samples from larvae and adult (Fig. 1A and B). In contrast, RT-PCR of two *aam1* paralogue α -glucosidases genes only produced the expected band in samples from adult tissues (Fig. 1B). This result is consistent with the *aam1* gene being constitutively transcribed throughout the insect life cycle. Presence of the *aam1* RNA does not necessarily mean that the mature polypeptide is being expressed in insect life stages. To analyze the expression of Aam1 native protein, a polyclonal serum raised against an N-terminal 45-kDa recombinant fragment of Cqm1 (Romão et al., 2006) was evaluated. Anti-Cqm1 serum recognized, with similar intensity, an equivalent Aam1 45-kDa recombinant fragment produced in *E. coli* (Fig. 1C), and therefore was used for further studies of native *Ae. aegypti* samples.

3.3. Expression of Aam1 in larvae midgut

Immunoblotting of whole crude extracts from *Ae. aegypti* using anti-Cqm1 allowed the detection of a \approx 73-kDa candidate protein

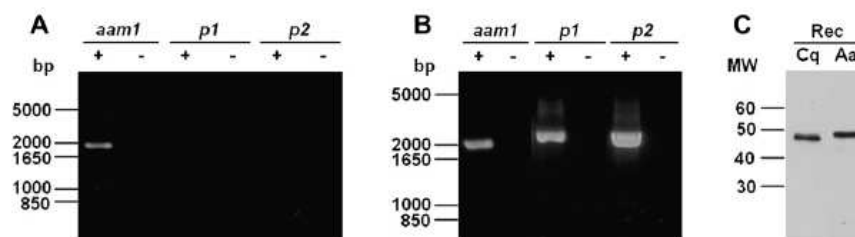


Fig. 1. Detection of *aam1* mRNA from *Aedes aegypti* and the respective Aam1 recombinant protein. (A) RT-PCR to detect *aam1* mRNA and two paralogs (*p1*, *p2*) mRNA from larvae, reactions were carried out in the presence (+) or absence (-) of the reverse transcriptase enzyme. (B) RT-PCR to detected mRNA described in A, using adults samples. Molecular weight markers in base pairs (bp). (C) Immunoblotting of Cqm1 (Cq) and Aam1 (Aa) 45-kDa recombinant proteins produced in *Escherichia coli*. Two μ g of proteins were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and submitted to immunodetection with an anti-Cqm1 antibody. MW, molecular weight markers in kDa.

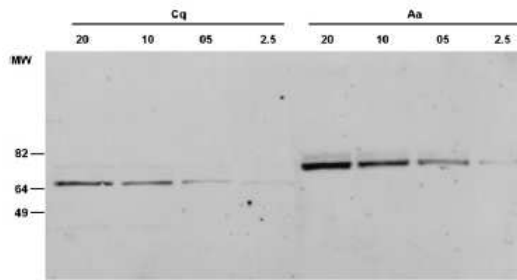


Fig. 2. Immunoblotting of midgut brush border proteins from *Culex quinquefasciatus* (Cq) and *Aedes aegypti* (Aa) larvae. Proteins samples (2.5 to 20 μ g) were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and submitted to immunodetection with an anti-Cqm1 antibody. MW, molecular weight markers in kDa.

which is present in all larval stages, as well as in female and male adults (data not shown). This analysis was further performed in BBMF samples and a protein of the same size was detected, confirming its localization to the midgut of *Ae. aegypti* larvae (Fig. 2, Aa). In equivalent samples from *C. quinquefasciatus*, used as a control, the 66-kDa protein corresponding to Cqm1 was recognized (Fig. 2, Cq). Considering that anti-Cqm1 antibody recognizes both Cqm1 and Aam1 with roughly similar intensities, based on the preliminary assays using the recombinant proteins (Fig. 1C), and since equivalent loads of BBMF samples were used for the blots (Fig. 2), these results are consistent with Aam1 being expressed at equivalent or increased levels, compared to Cqm1.

3.4. α -glucosidase assays

In gel enzymatic assays were performed to evaluate the presence of α -glucosidase catalytic bands in BBMF samples. Under semi-denaturing conditions *Ae. aegypti* BBMF resolved into four main catalytic bands while the same pattern was observed for *C. quinquefasciatus* BBMF samples, with the difference that *Ae. aegypti* proteins seemed to migrate with slower mobility (Fig. 3A). Immunoblotting of these proteins revealed a single *Ae. aegypti* catalytic band recognized by the anti-Cqm1 antiserum, as observed for *C. quinquefasciatus*, indicating that this band corresponded to the Aam1 orthologue (Fig. 3B). Migration of Cqm1 showed an apparent molecular weight of 82-kDa under semi-denaturing conditions,

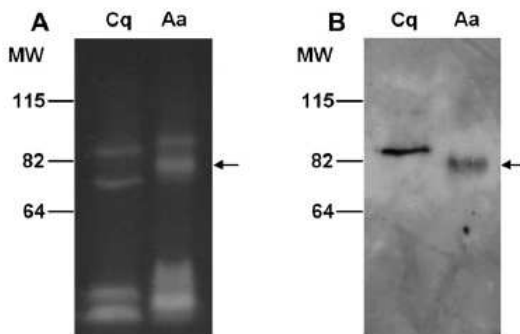


Fig. 3. *In gel* α -glucosidase assay of midgut brush border proteins from *Culex quinquefasciatus* (Cq) and *Aedes aegypti* (Aa) larvae separated on 8% semi-denaturing SDS-PAGE. (A) *In gel* α -glucosidase assay with bands indicating substrate cleavage, visualized under a UV transilluminator. (B) Immunoblotting of the samples shown in (A) with an anti-Cqm1 antibody. Arrows indicate the Aam1 protein. MW, molecular markers in kDa.

instead of the 66-kDa observed in denaturing SDS-PAGE which was in agreement with the weight predicted according to its sequence. In contrast, Aam1 has a predicted sequence of 66.8 kDa and migrates as a \approx 73-kDa protein in SDS-PAGE, while it is smaller than Cqm1 under semi-denaturing conditions.

3.5. Detection of Aam1 GPI anchor

Ae. aegypti BBMF samples were then treated with PI-PLC to determine if Aam1 is a GPI-anchored protein. Following treatment, the BBMF-bound (pellet) or released proteins (supernatant) were assayed for α -glucosidase activity. Whilst most α -glucosidase activity remained bound to the membrane fraction prior to treatment, a significant part of this activity was solubilized upon incubation with the enzyme and displaced to the supernatant (Fig. 4A). Immunoblotting showed that in untreated samples most of Aam1 was found to be present in membrane fractions, while after treatment it was displaced to the supernatant (Fig. 4B), confirming that it is a GPI-anchored protein.

3.6. Interaction assay between Aam1 and BinB

The presence of the putative Aam1 receptor as a midgut membrane bound α -glucosidase in *Ae. aegypti* larvae raised the question of whether it is able to bind to BinB subunit of Bin toxin. To address this, solubilized protein samples from *Ae. aegypti* and *C. quinquefasciatus* BBMF's (CHAPS-extracts) were evaluated through pull-down assays using the BinB-GST subunit expressed and purified from *E. coli*. Native Cqm1 from *C. quinquefasciatus* CHAPS-extracts specifically bound to BinB, as expected, whilst no protein bound to the GST control only (Fig. 5A). In contrast, no specific binding of Aam1 to the BinB was detected, despite its availability within the *Ae. aegypti* CHAPS-extract (Fig. 5B). Cqm1 45-kDa protein produced in *E. coli* was also evaluated through pull down assays, however, it did not provide conclusive data since this protein did not show a pattern of specific binding to BinB subunit (data not shown). It is possible that the truncated proteins from *E. coli* did not display adequate folding to be evaluated in terms of functionality to bind to Bin toxin. Complementary assays performed in this study showed that native Cqm1 protein loses its ability to bind to BinB toxin after being denaturated by thermal inactivation, reinforcing the role of protein folding for this feature (Supplementary Fig. 2).

3.7. Effect of deglycosylation on Aam1 and Cqm1

The molecular weight observed for native Aam1 contrasts with the predicted weight based on its sequence and is indicative of post-translation modifications, such as glycosylation. To investigate this possibility, *Ae. aegypti* and *C. quinquefasciatus* CHAPS-extracts were submitted to treatment with two endoglycosidases. After incubation with PNGase F, Cqm1 resulted in a 66-kDa-protein identical in size to the non-treated control, indicating a lack of carbohydrate removal from the native protein (Fig. 6A, T). In contrast, PNGase F treatment of Aam1 resulted in a protein about 5-kDa smaller, consistent with the removal of oligosaccharides from the polypeptide chain (Fig. 6B, T). A similar treatment with the Endo H endoglycosidase did not display any effect on either Cqm1 or Aam1 proteins from CHAPS-extracts (data not shown). Results are consistent with Aam1, but not Cqm1 being specifically glycosylated. A search for possible glycosylation sites present in the Aam1 but missing from its orthologues in *Culex* identified a single site, between residues 310 and 312 (³¹⁰NRT³¹²), which could be the target for the glycosylation observed. Treated CHAPS-extracts were then used in pull down assays to investigate any effect of the

608

L.M. Ferreira et al. / Insect Biochemistry and Molecular Biology 40 (2010) 604–610

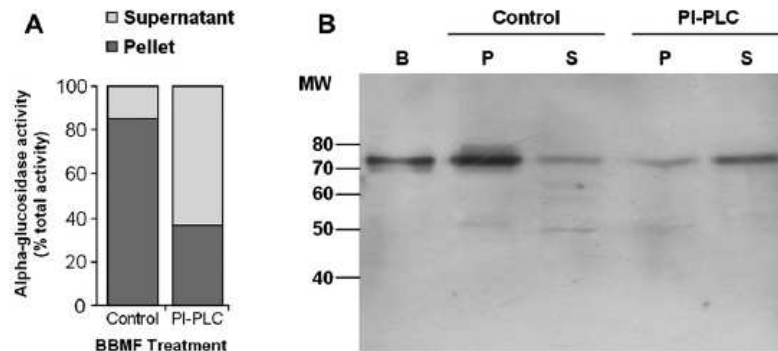


Fig. 4. Analysis of midgut brush border proteins from *Aedes aegypti* larvae after PI-PLC treatment. (A) Release of α -glucosidase activity in pellets (P) and supernatants (S) of PI-PLC-treated and non-treated samples. (B) Immunoblotting of pellets and supernatants from samples showed in A with an anti-Cqm1 antibody. B. Non-treated sample of midgut brush border proteins. MW, molecular markers in kDa.

deglycosylation on the interaction with the Bin toxin. No changes of binding properties to BinB were observed, Cqm1 still bound specifically to this subunit (Fig. 6A, T1) whilst no binding was observed for Aam1, before or after PNGase treatment (Fig. 6B, T1).

4. Discussion

Identification within the genome of *Ae. aegypti*, of a gene encoding an orthologue highly similar in sequence to the Bin toxin receptor from *Culex* sp. and *An. gambiae* (Darboux et al., 2001; Romão et al., 2006; Opota et al., 2008) contrasts with the failure of Bin toxin to specifically bind to the midgut of larvae from this species. Appropriate midgut proteolytic processing of the toxin and availability of functional binding sites has been claimed as key aspects for insect susceptibility to such toxins, but failure of midgut processing has been ruled out as the reason for the refractoriness of *Ae. aegypti* larvae to Bin, as well as to the Cry48Aa/Cry49Aa toxin from *B. sphaericus* strain IAB59, whose activity is also restricted to *Culex* (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992; Jones et al., 2008). This study shows that a closely related orthologue to the Bin toxin receptors previously described from *C. pipiens* (Cpm1), *C. quinquefasciatus* (Cqm1) and *An. gambiae* (Agm3) (Darboux et al., 2001; Romão et al., 2006; Opota et al., 2008) is expressed in *Ae. aegypti*

midgut larvae as a GPI-anchored protein. Previous studies reported α -glucosidases that can be stage-specific or expressed as soluble, instead of membrane-bound proteins (Darboux et al., 2002; Romão et al., 2006; Souza-Neto et al., 2007). The finding from our study rules out lack of expression of the receptor in larval stages, or its expression as a soluble protein, as a possible reason behind the refractoriness observed in *Ae. aegypti*.

α -glucosidases belong to the larger family of α -amylases which are responsible for catalyzing the hydrolysis of glycosidic linkage of oligosaccharides (Terra and Ferreira, 1994; Janecek, 1997). Aam1 is part of the set of membrane-bound α -glucosidases that play essential physiological roles for carbohydrate digestion in *A. aegypti* larvae. Cpm1, Cqm1 and Agm3, orthologues from *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus* and *An. gambiae* larva respectively, have been shown to be highly conserved and constitutively expressed in larvae and, as well as performing their enzymatic role essential for the insect survival, also act as specific receptors for the Bin toxin (Silva-Filha et al., 1999; Romão et al., 2006; Opota et al., 2008). Expression at adequate concentrations and life stages and localization on the epithelium surface are features which Aam1 shares with Cpm1, Cqm1 and Agm3, nevertheless, affinity assays have previously demonstrated that Bin toxin does not bind to *Ae. aegypti* BBMF (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992), which is corroborated by

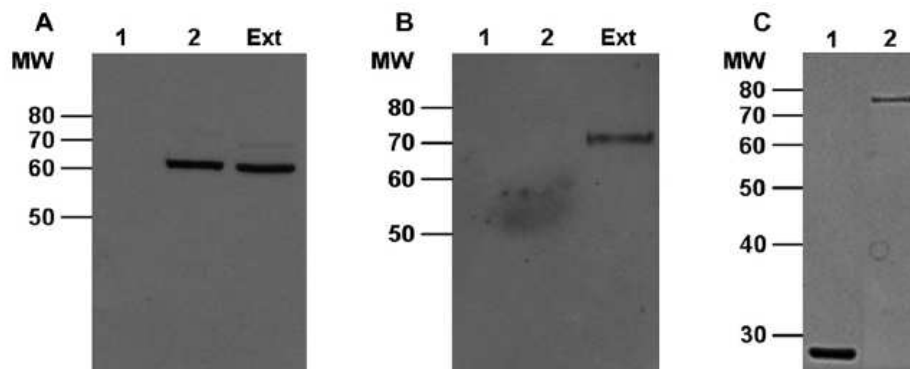


Fig. 5. Interaction of solubilized midgut brush border proteins (CHAPS-extracts) from *Culex quinquefasciatus* (A) and *Aedes aegypti* (B) larvae with the BinB toxin subunit, evaluated through pull down assay. CHAPS-extracts were incubated with GST (1) or BinB-GST (2) immobilized on beads. Bound proteins were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and submitted to immunodetection with an anti-Cqm1 antibody. Ext: CHAPS-extracts sample without incubation with GST or BinB-GST beads. (C) GST (1) and BinB-GST (2) proteins immobilized on beads are shown in a Coomassie-stained gel. MW, molecular weight markers in kDa.

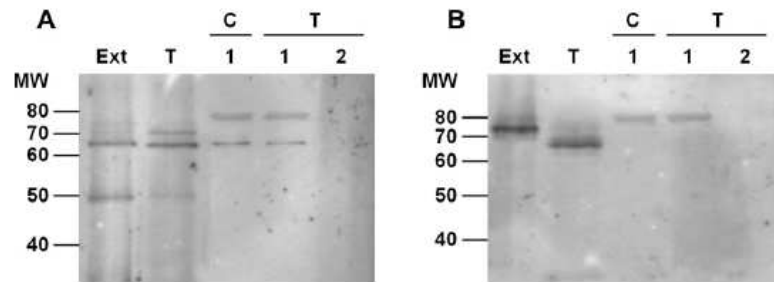


Fig. 6. Effect of PNGase F endoglycosidase treatment on midgut proteins (CHAPS-extracts) from *Culex quinquefasciatus* (A) and *Aedes aegypti* (B) larvae and on their capacity to interact with the BinB toxin subunit, through pull down assay. Native CHAPS-extracts were treated with PNGase F and incubated with BinB-GST (1) or GST (2) immobilized on beads. Bound proteins were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and immunodetected with an anti-Cqm1 antibody. Ext: native CHAPS-extracts; C: non treated CHAPS-extracts; T: treated CHAPS-extracts; BinB-GST and GST proteins immobilized on beads in Coomassie-stained gels are shown in Fig. 5C. MW, molecular weight markers in kDa.

this work in which native Aam1 did not bind to recombinant BinB subunit in pull-down assays.

Protein glycosylation was investigated since this is one of the most abundant post-translational modification of eukaryotic proteins and one which can affect features such as enzyme activity, receptor recognition and protein stability and structure (Varki, 1993). N-linked oligosaccharides, in particular N-acetylgalactosamine (GalNAc) from aminopeptidases and alkaline phosphatases that act as receptors in lepidopteran species, are needed for the binding of some Cry toxins (Knowles et al., 1991; Denolf et al., 1997; Jurat-Fuentes et al., 2004; Pardo-Lopez et al., 2006). Cases of insect and nematode resistance to Cry toxins were found to be related to altered glycosylation of microvillar proteins involved in binding (Griffitts et al., 2001, 2003, 2005). Here, we have shown that Aam1 is glycosylated, unlike Cqm1 and despite of the two N-glycosylation signals predicted in the *Culex* sequences (Darboux et al., 2001; Romão et al., 2006; Opota et al., 2008). Carbohydrate removal from Aam1 did not affect its binding properties suggesting that differential glycosylation of this protein is not interfering with potential toxin binding sites. Nevertheless, it is still possible that changes in protein folding originally induced by the glycosylation event, and which would presumably interfere with the Bin toxin binding epitope, are maintained after deglycosylation (Shental-Bechor and Levy, 2008). This would also explain why deglycosylated Aam1 still did not bind to the BinB. As described, glycosylation of insect midgut microvillar proteins seems to have a relevant role to determine susceptibility to Cry toxins, however, while N-glycosylations of some receptors are crucial for the binding and consequently to their susceptibility to certain toxins, there are cases in which toxin binding to receptors do not depend on those linked sugars (Jurat-Fuentes and Adang, 2004; Perera et al., 2009). Regarding the binding of functional receptors to the Bin toxin in culicid species, data from this study suggest that N-linked sugars are not involved in receptor recognition. Although speculative, it could not be excluded that Aam1 glycosylation could prevent the access to Bin toxin epitopes in Aam1. Previous studies of pathogenesis processes have show that glycosylation motifs can hide epitopes, in receptor molecules which are recognized by pathogen (Varki, 1993; Chabot et al., 2000).

The possibility remains that discrete differences in amino acid sequence between Aam1 and related orthologues, which would supposedly change the sequence of the not yet identified toxin binding or conformational epitope, might be the sole reason behind the lack of binding of Bin toxin to this α -glucosidase. Nevertheless differences in folding, which, as stated above, could be induced by the glycosylation event or another factor, might still be the major reason behind the binding differences. The apparent molecular weight of 80-kDa displayed by Cqm1 under semi-denaturing conditions,

higher than observed when the protein is denatured, associated with evidence that denatured Cqm1 lacks functionality to bind to BinB, suggest substantial conformational differences between Cqm1 and Aam1 or differential binding to a yet undescribed protein partner. Binding of BtR175 cadherin from *Bombix mori* to Cry1Ac toxin, similarly to Cqm1, was shown to be disrupted by denaturation, while the characterization of most receptors by ligand-blot assays is based on binding to denatured BBMF proteins (Nagamatsu et al., 1998). Further investigation of Cqm1 and Aam1 proteins produced in appropriate expression system needs to be performed to clarify this aspect. The results presented here confirm that this group of orthologue proteins constitutes an interesting model to understand the molecular determinants that allow midgut surface proteins to be target sites for insecticides, a knowledge which could help develop approaches to improve those and other molecules in the future.

Acknowledgments

We thank the team from the insectarium of the Department of Entomology (CPqAM-FIOCRUZ) for the technical support, the Program for Technological Development in Tools for Health PDTIS-FIOCRUZ for using its facilities. This study was supported by the Brazilian funding agencies 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 0427-2.13/08).

Appendix. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.ibmb.2010.05.007.

References

- Armengol, G., Hernandez, J., Velez, J.G., Orduz, S., 2006. Long-lasting effects of a *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* experimental tablet formulation for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) control. *J. Econ. Entomol.* 99, 1590–1595.
- Baumann, L., Broadwell, A.H., Baumann, P., 1988. Sequence analysis of the mosquitoicidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. *J. Bacteriol.* 170, 2045–2050.
- Baumann, P., Unterman, B.M., Baumann, L., Broadwell, A.H., Abbene, 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.
- Bourgouin, C., Delecluse, A., de la Torre, F., Szulmajster, J., 1990. Transfer of the toxin protein genes of *Bacillus sphaericus* into *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and their expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 340–344.
- 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.

- Chabot, D.J., Chen, H., Dimitrov, D.S., Broder, C.C., 2000. N-linked glycosylation of CXCR4 masks coreceptor function for CCR5-dependent human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J. Virol.* 74, 4404–4413.
- 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.
- Charles, J.F., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Humphreys, M.J., Berry, C., 1997. Binding of the 51- and 42-kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). *FEMS Microbiol. Lett.* 156, 153–159.
- Darboux, I., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 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., 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.
- de Melo Neto, O.P., Standart, N., Martins de Sa, C., 1995. Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res.* 23, 2198–2205.
- Denolf, P., Hendrickx, K., Van Damme, J., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D., Van Rie, J., 1997. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* 248, 748–761.
- Dhalia, R., Reis, C.R., Freire, E.R., Rocha, P.O., Katz, R., Muniz, J.R., Standart, N., de Melo Neto, O.P., 2005. Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol. Biochem. Parasitol.* 140, 23–41.
- Griffitts, J.S., et al., 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science* 307, 922–925.
- Griffitts, J.S., et al., 2003. Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *J. Biol. Chem.* 278, 45594–45602.
- Griffitts, J.S., Whitacre, J.L., Stevens, D.E., Aroian, R.V., 2001. Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science* 293, 860–864.
- Janecek, S., 1997. alpha-Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67, 67–97.
- 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.
- Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J., 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.* 271, 3127–3135.
- Jurat-Fuentes, J.L., Gahan, L.J., Gould, F.L., Heckel, D.G., Adang, M.J., 2004. The HevCaP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Biochemistry* 43, 14299–14305.
- Knowles, B.H., Knight, F.J., Ellar, D.J., 1991. N-acetyl galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Biol. Sci.* 245, 31–35.
- Lacey, L.A., 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety israelensis and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23, 133–163.
- Lee, Y.W., Zairi, J., 2006. Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* H-14 against *Aedes* mosquitoes. *Trop. Biomed.* 23, 37–44.
- Nagamatsu, Y., Toda, S., Koike, T., Miyoshi, Y., Shigematsu, S., Kogure, M., 1998. Cloning, sequencing, and expression of the Bombyx mori receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 727–734.
- Nene, V., et al., 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 316, 1718–1723.
- Nicolas, L., Nielsen-Leroux, C., Charles, J.F., Delecluse, A., 1993. Respective role of the 42- and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 106, 275–280.
- Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 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.
- Opota, O., Charles, J.F., Warot, S., Pauron, D., Darboux, I., 2008. 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.* 149, 419–427.
- Pardo-Lopez, L., Gomez, I., Rausell, C., Sanchez, J., Soberon, M., Bravo, A., 2006. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. *Biochemistry* 45, 10329–10336.
- Pauchet, Y., Luton, F., Castella, C., Charles, J.F., Romey, G., Pauron, D., 2005. Effects of a mosquitoicidal toxin on a mammalian epithelial cell line expressing its target receptor. *Cell. Microbiol.* 7, 1335–1344.
- Perera, O.P., Willis, J.D., Adang, M.J., Jurat-Fuentes, J.L., 2009. Cloning and characterization of the Cry1Ac-binding alkaline phosphatase (HvALP) from *Heliothis virescens*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 294–302.
- Regis, L., et al., 2008. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 50–59.
- Regis, L., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 2001. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends Parasitol* 17, 377–380.
- 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.
- Shental-Bechor, D., Levy, Y., 2008. Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 8256–8261.
- Silva-Filha, M.H., Nielsen-Leroux, C., Charles, J.F., 1997. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.* 247, 754–761.
- 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.
- 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.
- Souza-Neto, J.A., Machado, F.P., Lima, J.B., Valle, D., Ribolla, P.E., 2007. Sugar digestion in mosquitoes: identification and characterization of three midgut alpha-glucosidases of the neo-tropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 147, 993–1000.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 109B, 1–62.
- Varki, A., 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3, 97–130.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/ CPqAM



Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: Base molecular da interação da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* ao seu receptor em culicídeos vetores de doenças.

Pesquisador responsável: Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 11/09/2009

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 53/09

Registro no CAAE: 0051.0.095.000-09

PARECER Nº 46/2008

O Comitê avaliou e considera que o Projeto em questão 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.

Recife, 08 de outubro de 2009.


Giselle Campozana Gouveia
Farmacêutica
Coordenadora
Mat. SIAPE 0463376
CPqAm / FIOCRUZ