

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Curso de Pós-graduação em Saúde Pública

JANAINA VIANA DE MELO

**Caracterização ultra-estrutural dos efeitos citopatológicos causados por
toxinas de *Bacillus sphaericus* no intestino de larvas de
*Culex quinquefasciatus***

RECIFE

2008

JANAINA VIANA DE MELO

**Caracterização ultra-estrutural dos efeitos citopatológicos causados por
toxinas de *Bacillus sphaericus* no intestino de larvas de
*Culex quinquefasciatus***

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadoras:

Dra. Christina Alves Peixoto

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha

RECIFE

2008

JANAINA VIANA DE MELO

**Caracterização ultra-estrutural dos efeitos citopatológicos causados por
toxinas de *Bacillus sphaericus* no intestino de larvas de
*Culex quinquefasciatus***

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 27/03/2008

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Maurílio José Soares
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

Dra. Regina Célia Bressan de Figueiredo
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ

Dra. Lêda Narcisa Régis
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ

Dra. Christina Alves Peixoto
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ
(Orientadora)

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

Ao meu filho Pedro de Melo Dhalia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que fortalece meu espírito para a luta diária e está junto a mim sempre que preciso, nos bons e maus momentos.

À Dra. Maria Helena Silva Filha (Chica), pela competente e admirável orientação. Pela presença constante e o compromisso com este projeto, e principalmente por seu apoio e compreensão, tantas vezes necessários.

À Dra. Christina Alves Peixoto, com quem comecei a carreira científica, pela orientação, apoio e longa amizade.

A Romero Henrique Teixeira Vasconcelos, por sua contribuição neste trabalho. Obrigada pela confiança, por seu carinho e orações.

Aos colegas do Departamento de Biologia Celular e Ultra-estrutura pelos momentos descontraídos.

Aos colegas do Departamento de Entomologia, pela agradável convivência, em especial a Karlos Diogo Chalegre e Lígia Maria Ferreira por terem sido tão disponíveis em todos os momentos em que deles precisei.

A Márcio Bezerra pelo apoio na produção das culturas dos bacilos.

A Raimundo Pimentel pelo suporte fotográfico.

À equipe do insetário pelo apoio na manutenção das colônias de culicídeos, em especial a Alaíde Maria da Silva por me ensinar de forma tão divertida a diferença dos estádios larvários.

Aos pesquisadores Colin Berry (Universidade de Cardiff, Reino Unido), Jean-François Charles, Christina Nielsen-LeRoux, Armele Delècluse (Instituto Pasteur, França) e Brian Federici (Universidade da Califórnia-Riverside, E.U.A.), por cederem gentilmente os clones produtores de toxinas recombinantes utilizados.

Ao pesquisador Dr. André Freire Furtado pelo auxílio intelectual e financeiro.

À Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira, pela colaboração na determinação das concentrações letais dos pós liofilizados.

A todos os membros da banca examinadora, em especial à Dra. Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque pela participação na elaboração do parecer prévio, e ao Dr. Maurílio José Soares pela disponibilidade em vir ao Recife para participar da avaliação desta tese.

A todos aqueles, que não se encontram aqui citados, mas que direta ou indiretamente, tornaram possível a realização deste trabalho.

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

MELO, J. V. **Caracterização ultra-estrutural dos efeitos citopatológicos causados por toxinas de *Bacillus sphaericus* no intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus***. 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

RESUMO

O *Bacillus sphaericus* (Bsp) é uma bactéria entomopatogena eficiente para o controle de *Culex quinquefasciatus*, um importante vetor da filariose e arbovirose. O fator larvicida do Bsp é a toxina binária (Bin) e a sua ação em *C. quinquefasciatus* depende da ligação ao receptor Cqm1. A ausência deste receptor no epitélio intestinal é o principal mecanismo de resistência à toxina Bin. Larvas resistentes a esta toxina, são susceptíveis ao Bsp IAB59 que, além da Bin, produz as toxinas Cry48Aa e Cry49Aa. O principal objetivo deste estudo foi caracterizar os efeitos de toxinas do Bsp nas células do epitélio intestinal de *C. quinquefasciatus*, utilizando como modelos larvas de uma colônia susceptível a todas as toxinas estudadas (S), de uma colônia resistente à toxina Bin (R2362) e de uma colônia resistente à Bin e Cry48Aa/Cry49Aa (RIAB59). Na primeira etapa, larvas não tratadas das colônias S e R2362 dissecionadas 30 min, 4, 6 e 48 h após a muda para o 4º estágio foram fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET). A avaliação morfológica do epitélio intestinal mostrou que células de larvas R2362, ao final do 4º estágio, são caracterizadas por um intenso acúmulo de inclusões lipídicas, sugerindo que a ausência da α -glicosidase Cqm1 pode estar envolvida com alterações no metabolismo. Para caracterizar os efeitos causados pelas toxinas no epitélio intestinal, as larvas foram dissecionadas 1 e 6 h após o tratamento e processadas para MET. A avaliação ultra-estrutural da ação da toxina Bin nas células do epitélio intestinal mostrou que os principais efeitos em larvas S foram a vacuolização citoplasmática e destruição de microvilosidades. Estes foram observados exclusivamente em células que possuem o receptor Cqm1, demonstrando que esta molécula é essencial para mediar a ação da toxina Bin. Em células de larvas das colônias S e R2362, susceptíveis à Cry48Aa/Cry49Aa, o principal efeito destas toxinas foi a vacuolização mitocondrial, e este parece estar associado à Cry48Aa que possui estrutura de 3 domínios típica de toxinas da família Cry. Efeitos similares aos da toxina Bin também foram observados e parecem resultantes da ação da Cry49Aa que possui homologia com toxinas do tipo binária. Os dados mostram que a Cry48Aa/Cry49Aa possui uma ação complexa nas células e seu sítio de ligação é diferente do Cqm1. Combinações da toxina Bin com as toxinas Cry11Aa e Cyt1Aa do Bti também provocaram alterações em células de larvas R2362, desprovidas do receptor Cqm1. A combinação Bin/Cry11Aa causou efeitos similares aos induzidos pela toxina Cry48Aa/Cry49Aa, e sugerem que as toxinas de 3 domínios, Cry11Aa e Cry48Aa, podem mediar os efeitos das toxinas Bin e Cry49Aa, respectivamente, nos modelos estudados. A combinação Bin/Cyt1Aa provocou efeitos drásticos como a perda precoce de microvilosidades e a lise celular, característica da toxina Cyt1Aa que apresenta ação citolítica. Os resultados deste trabalho contribuem para o entendimento do modo de ação de toxinas do Bsp, bem como do efeito sinérgico de suas toxinas com aquelas do Bti.

Palavras-chave: Controle biológico de vetores, *Culex*, ultra-estrutura celular, patologia, toxinas bacterianas, mucosa intestinal.

MELO, J. V. **Ultrastructural characterization of cytopathological effects of *Bacillus sphaericus* toxins on the midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae.** 2008. Thesis (Doctorate in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

ABSTRACT

Bacillus sphaericus (Bsp) is an entomopathogenic bacterium which is effective to control *Culex quinquefasciatus*, an important vector of filariasis and arboviruses. The major toxic factor of Bsp is the binary toxin (Bin) and its action on *C. quinquefasciatus* larvae relies on the binding to the Cqm1 receptor. The main resistance mechanism of *Culex* larvae to the Bin toxin is due the absence of this receptor on the epithelium. Resistant larvae to this toxin are susceptible to Bsp strain IAB59 that, beyond Bin, produces the Cry48Aa and Cry49Aa toxins. The major goal of this study was to characterize the effects of Bsp toxins in the midgut epithelial cells of *C. quinquefasciatus*, using as models larvae from a susceptible colony to all toxins studied (S), a Bin resistant colony (R2362) and a Bin and Cry48Aa/Cry49Aa resistant colony (RIAB59). At the first part of this study, S and R2362 untreated larvae dissected 30 min, 4, 6 and 48 h after the 4th instar moult were fixed and processed for transmission electron microscopy (TEM). The morphological analysis of midgut epithelial cells showed that cells from late 4th instar R2362 larvae are characterized by the presence of abundant number of lipid inclusions, suggesting that the absence of the α -glucosidase Cqm1 could be related with alterations in the metabolism. To characterize the effects caused by the toxins on the midgut epithelium, larvae were dissected 1 and 6 h after treatment and processed for TEM. The ultrastructural analysis of the Bin action in the midgut epithelial cells showed that the major effects in the larvae from S colony were cytoplasm vacuolization and microvilli destruction. Those were observed only in the cells displaying the Cqm1 receptor, demonstrating that this molecule is essential to mediate the Bin action. In cells from S and R2362 larvae, which are susceptible to Cry48Aa/Cry49Aa, the main effect of this toxin was the mitochondrial vacuolization, and this seems to be related to the action of the 3-domain Cry48Aa component. Bin-like effects were also observed and these might be due to the Cry49Aa component, which share homology with other binary toxins. Data showed that Cry48Aa/Cry49Aa toxins have a complex action in the cells and their binding site is different from Cqm1. The associations of Bin+Cry11Aa and Bin+Cyt1Aa presented relevant effects in the cells of R2362 larvae, lacking the Cqm1 receptor. Bin/Cry11Aa showed similar effects to those from Cry48Aa/Cry49Aa, and suggest that the toxins with 3-domains structure, Cry11Aa and Cry48Aa, can mediate Bin and Cry49Aa toxin effects, respectively. The treatment with Bin/Cyt1Aa provoked drastic effects, resulting in early microvilli destruction and cell lyses, as a characteristic effect of this cytolytic toxin. The results of this work provided a contribution for the knowledge on the Bsp toxins mode of action, as well as, the synergistic effect that those toxins can have with Bti toxins.

Key-words: Vector biological control, *Culex*, cellular ultrastructure, pathology, bacterial toxins, intestinal mucosae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Culex quinquefasciatus</i>	19
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>Wuchereria bancrofti</i> nos seus hospedeiros intermediário e definitivo.....	21
Figura 3 – Micrografia eletrônica de transmissão do <i>Bacillus sphaericus</i> em fase de esporulação.....	26
Figura 4. Perfil protéico do cristal de cepas do <i>Bacillus sphaericus</i> 2362, 1593 e C3-41. A pró-toxina binária (Bin) característica destas cepas é formada por dois componentes BinA (42 kDa) e BinB (51 kDa) PM: peso molecular em kDa.....	28
Figura 5 – Representação esquemática do tubo digestivo de larvas mostrando as regiões que compõem o intestino médio: cárdia, ceco gástrico, estômago anterior e estômago posterior. O ceco gástrico e o estômago posterior correspondem às regiões de localização dos receptores da toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i>	29
Figura 6. Representação esquemática da ligação do componente BinB da toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i> ao receptor Cqm1, ligado à membrana plasmática das células do epitélio intestinal de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> por uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI).....	32
Figura 7. Perfil protéico dos cristais que contém os componentes da nova toxina binária da cepa IAB59 do <i>B. sphaericus</i> , obtidos individualmente em organismos recombinantes. As toxinas Cry48Aa e Cry49Aa têm pesos moleculares (PM) de 135- e 49 kDa, respectivamente.....	36
Figura 8. Micrografia eletrônica de transmissão do <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i> em fase de esporulação. E. esporo; C. cristal com ação larvicida para dípteros.	37
Figura 9. Perfil protéico dos cristais que contém as toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa do <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i> . PM: peso molecular em kDa.....	38
Figura 10. Perfil de α -glicosidases presentes no microvilli intestinal de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia susceptível (S) e uma colônia resistente (R) ao <i>Bacillus sphaericus</i> 2362, através de ensaio enzimático em gel, sob condições semi-desnaturantes (A) Em larvas S o receptor Cqm1 corresponde a uma banda de \approx 80 kDa (seta) que está ausente em larvas R. (B) Imunodeteção das amostras observadas em A com o anticorpo anti Cqm1. Em larvas S o anticorpo reconheceu a banda correspondente ao receptor (seta), ao contrário das larvas R. À esquerda, marcadores de peso molecular em kDa.....	40
Figura 11. Toxinas produzidas por bactérias entomopatógenas e colônias de <i>Culex quinquefasciatus</i> , susceptível (S) e resistente ao <i>Bacillus sphaericus</i> cepa 2362 (R2362), utilizadas neste estudo para avaliar a ação das toxinas na ultra-estrutura das células do epitélio intestinal das larvas.....	47
Figura 12. Células do intestino de larvas do 4º estágio de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia susceptível.....	56

Figura 13. Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4º estágio de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia susceptível (S) e uma colônia resistente à toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i> (R2362), analisadas em diferentes momentos após a muda para o 4º estágio.....	57
Figura 14. Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4º estágio de uma colônia de <i>Culex quinquefasciatus</i> susceptível (S) à toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i>	60
Figura 15. Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4º estágio de uma colônia do <i>Culex quinquefasciatus</i> resistente à toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i>	61
Figura 16. Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4º estágio de uma colônia do <i>Culex quinquefasciatus</i> susceptível (S) às toxinas Cry48Aa e Cry49Aa do <i>Bacillus sphaericus</i> cepa IAB59.....	64
Figura 17. Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4º estágio de uma colônia de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistente à toxina Bin (R2362), tratadas com as toxinas Cry48Aa e Cry49Aa do <i>Bacillus sphaericus</i> cepa IAB59.....	65
Figura 18. Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4º estágio de uma colônia do <i>Culex quinquefasciatus</i> resistente (RIAB59) às toxinas produzidas pelo <i>Bacillus sphaericus</i> IAB59, tratadas com as toxinas Cry48Aa e Cry49Aa desta cepa.....	66
Figura 19. Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4º estágio de uma colônia de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistente à toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i> (R2362) tratadas com uma mistura das toxinas Bin/Cry11Aa na proporção 3:1 (p/p).....	69
Figura 20. Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4º estágio de uma colônia de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistente à toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i> (R2362) tratadas com uma mistura das toxinas Bin/Cyt1Aa na proporção 3:1 (p/p).....	70
Figura 21. Principais efeitos citopatológicos causados por toxinas produzidas por bactérias entomopatógenas nas células do epitélio intestinal de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia susceptível (S), de uma colônia resistente à toxina Bin (R2362) e uma colônia resistente às toxinas Cry48Aa/Cry49Aa (RIAB59).....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Colônias de <i>Culex</i> sp. selecionadas sob condições de laboratório (Lab) com o <i>Bacillus sphaericus</i> (Bsp) ou populações de campo expostas ao tratamento com estes agente, que apresentaram alterações na susceptibilidade.....	41
Tabela 2 – Grupos experimentais de larvas do 4º estágio de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia susceptível (S) e de duas colônias resistentes ao <i>Bacillus sphaericus</i> cepas 2362 (R2362) e IAB59 (RIAB59), submetidas aos tratamentos com as toxinas recombinantes Bin e Cry48Aa/Cry49Aa, produzidas pelo <i>Bacillus sphaericus</i> , além de associações de Bin com toxinas Cry11Aa e Cyt1Aa do <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i>	53
Tabela 3 – Número de inclusões lipídicas presentes nas células do epitélio intestinal de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia susceptível (S) e uma colônia resistente (R2362) ao <i>Bacillus sphaericus</i> , analisadas 6 h após a muda para o 4º estágio.....	58
Tabela 4 – Mortalidade de larvas do 4º estágio de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia susceptível (S) e uma colônia resistente à toxina binária (Bin) do <i>Bacillus sphaericus</i> (R2362) tratadas com um pó liofilizado contendo cristais da toxina Bin, após 48 h.....	59
Tabela 5 – Mortalidade de larvas do 4º estágio de <i>Culex quinquefasciatus</i> de duas colônias susceptíveis (S e R2362) e de uma colônia resistente ao <i>Bacillus sphaericus</i> IAB59 (RIAB59) tratadas com um pó liofilizado contendo uma mistura de cristais das toxinas Cry48Aa e Cry49Aa na razão de 1:1 (p/p), após 48 h.....	63
Tabela 6 – Mortalidade de larvas do 4º estágio de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia resistente (R2362) à toxina binária (Bin) do <i>Bacillus sphaericus</i> 2362 tratadas com um pó liofilizado contendo uma mistura de cristais das toxinas Bin/Cry11Aa ou Bin/Cyt1Aa do <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i> na razão de 3:1 (p/p), após 48 h.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Adenosina monofosfato
BBMF	Brush Border Membrane Fraction (frações de microvilli intestinal)
Bin	Binária
Bsp	<i>Bacillus sphaericus</i>
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i>
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CL ₉₀	Concentração letal do inseticida para 90% de insetos tratados
Cpm1	<i>Culex pipiens</i> maltase 1
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Cqm1	<i>Culex quinquefasciatus</i> maltase 1
Cry	Toxinas do cristal
Cyt	Toxina citolítica
DEC	Dietilcabamazina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Ferricianeto de Potássio
kDa	Quilodaltos
MDCK	Madin and Darby canine kidney cell (Células de rins de cão Madin e Darby)
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
Mtx	Toxina Mosquitocida
Na(CH ₃) ₂ AsO ₄	Cacodilato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OsO ₄	Tetróxido de ósmio
PBS	Phosphate Buffered Saline (Solução salina tamponada com fosfato)
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride (Fluoreto de fenil-metil-sulfonil)
R2362	Resistente ao <i>Bacillus sphaericus</i> 2362
RIAB59	Resistente ao <i>Bacillus sphaericus</i> IAB59
RR	Razão de resistência
S	Susceptível
TA	Temperatura ambiente
TBS-T	Tris-HCl Buffered Saline Tween 20 (Solução salina tamponada com Tris-HCl contendo Tween 20)
VNO	Vírus do Oeste do Nilo

SUMÁRIO

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 <i>Culex quinquefasciatus</i> Say, 1823.....	18
2.1.1 Estrutura do tubo digestivo das larvas.....	19
2.2 Papel do <i>Culex</i> na transmissão de patógenos.....	19
2.3 Controle de vetores.....	22
2.4 Bactérias entomopatógenas.....	23
2.5 <i>Bacillus sphaericus</i> Neide, 1904.....	25
2.6 Toxina Bin.....	26
2.6.1 Modo de ação.....	28
2.6.2 Morfologia das regiões alvo.....	30
2.6.4 Receptor.....	30
2.6.3 Efeitos citopatológicos.....	32
2.7 Toxinas Cry48Aa e Cry49Aa.....	34
2.8 <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i>.....	36
2.9 Resistência ao <i>Bacillus sphaericus</i>.....	38
2.9.1 Mecanismos de resistência.....	39
2.9.2 Genética.....	42
2.9.3 Resistência cruzada.....	43
3 JUSTIFICATIVA.....	44
4 PERGUNTA CONDUTORA.....	45
5 OBJETIVOS.....	46
5.1 Objetivo geral.....	46
5.2 Objetivos específicos.....	46
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
6.1 Colônias de <i>Culex quinquefasciatus</i>.....	47
6.2 Toxinas recombinantes.....	49
6.3 Ensaios de toxicidade <i>in vivo</i>.....	51

6.4 Grupos experimentais.....	51
6.5 Dissecção das larvas.....	53
6.6 Processamento para microscopia eletrônica de transmissão.....	53
6.7 Detecção de lipídeos pelo método do ósmio-imidazol.....	54
7 RESULTADOS.....	55
7.1 Morfologia das células do epitélio intestinal de larvas da colônia S e R2362...	55
7.2 Efeitos da toxina Bin em larvas S e R2362.....	58
7.3 Efeitos das toxinas Cry48Aa e Cry49Aa em larvas das colônias S, R2362 e RIAB59.....	62
7.4 Efeitos de combinações da toxina Bin + Cry11Aa e Bin + Cyt1Aa em larvas da colônia R2362.....	66
8 DISCUSSÃO.....	73
9 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICES.....	103
Apêndice A. Resultados complementares.....	104
A1. Detecção de inclusões lipídicas nas células epiteliais do intestino de <i>Culex</i>.....	104
A2. Produção de anticorpo anti-BinB.....	106
A3. Produção de anticorpo anti-Cry49Aa.....	109
Apêndice B. Artigo no prelo.	112
Apêndice C. Publicações, participação em congressos e resumos.....	121
ANEXO	122
Anexo A. Registro no Comitê de Ética/CPqAM/FIOCRUZ: 008/2007.....	123

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

O *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) é uma espécie de distribuição cosmopolita que tem um importante papel na transmissão de agentes etiológicos de doenças humanas. No Brasil, a filariose linfática causada pelo helminto *Wuchereria bancrofti* é transmitida pelo *C. quinquefasciatus*, e traz graves conseqüências sociais e econômicas. No estado de Pernambuco, áreas endêmicas com alta prevalência estão situadas na região metropolitana do Recife, onde foram registrados aproximadamente 69.000 indivíduos infectados entre os anos de 1998 e 2002 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2002). Espécies do gênero *Culex* também são vetores potenciais de graves arbovírus, como o vírus do Nilo Ocidental (VNO) (MARFIN et al., 2001).

O controle de culicídeos vetores é complexo devido à grande capacidade de adaptação destas espécies e de suas características biológicas, que asseguram uma alta proliferação (REGIS et al., 2001). Os inseticidas químicos de amplo espectro constituem o principal meio de controle desde a década de 40, entretanto apresentam limitações tais como o seu impacto em organismos não-alvo, inclusive ao homem, e a seleção de populações de mosquitos resistentes.

O uso exclusivo de inseticidas químicos para o controle de vetores vem sendo gradativamente substituído pelo manejo integrado que propõe a utilização de várias ações dentre elas, o uso de larvicidas a base de *Bacillus sphaericus* (Bsp) e *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) como um dos métodos específicos para a redução da densidade populacional de vetores. As principais vantagens destes bioinseticidas são a sua alta especificidade para o inseto alvo e a facilidade de produção e utilização em larga escala. O Bsp apresenta atividade para algumas espécies dos gêneros *Anopheles*, *Psorophora*, *Mansonia* e *Aedes*, sendo particularmente eficaz no controle de larvas do complexo *Culex*.

Cepas do Bsp com alta atividade larvicida foram isoladas na década de 80 e as principais, como as cepas 2362, 1593 e C3-41 são usadas na produção de biolarvicidas em escala industrial (WEISER, 1984; ZHANG et al., 1987). No final da década de 80, o Bsp foi introduzido pela primeira vez para o controle de *C. pipiens* no sul da França (THIÉRY et al., 1996). Desde então, este biolarvicida vem sendo utilizado em larga escala em programas de controle de *Culex* e *Anopheles*, em vários países do mundo tais como China (YUAN et al., 2000), Tailândia (MULLA et al., 2001), Alemanha (BECKER, 1997), Guatemala (BLANCO

CASTRO et al., 2000), Camarões (HOUGARD et al., 1997) e Brasil (REGIS et al., 1995; REGIS et al., 1996; REGIS et al., 2000).

A ação inseticida das principais cepas do Bsp é devida à presença de uma toxina binária (Bin), produzida na forma de uma inclusão cristalina durante a esporulação bacteriana. A toxina Bin é constituída pelos polipeptídeos BinA (42- kDa) e BinB (51- kDa), que agem em sinergia para provocar a ação larvicida. O processo de intoxicação das larvas sensíveis ao Bsp tem início com a ingestão dos cristais protéicos que contém a toxina Bin sob a forma de uma pró-toxina. Devido às condições alcalinas do intestino das larvas (pH \approx 10) ocorre a solubilização dos cristais e a clivagem da pró-toxina, pela ação de proteases intestinais, em fragmentos menores que constituem a toxina ativa (BAUMANN et al., 1985; BROADWELL; BAUMANN, 1987; BROADWELL et al., 1990; DAVIDSON et al., 1987). Em *C. quinquefasciatus*, a ação da toxina depende de sua ligação ao receptor Cqm1 presente na membrana apical das células intestinais (CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELÈCLUSE, 1996; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). O receptor Cqm1 (*Culex quinquefasciatus* maltase1) é uma α -glicosidase de 60 kDa ligada à membrana das células do epitélio intestinal através de uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) que permite a sua apresentação na superfície das microvilosidades (ROMÃO et al., 2006). A interação da toxina com o receptor Cqm1 provoca uma série de efeitos citopatológicos que levam à morte organismos susceptíveis, entretanto poucos estudos foram realizados no intuito de revelar os mecanismos de ação dessa toxina após a sua ligação ao receptor.

A resistência à toxina Bin, que é o princípio ativo dos biolarvicidas comerciais, é o principal problema a ser superado para o uso racional do Bsp. A resistência de larvas de *C. quinquefasciatus* à toxina Bin já foi registrada em colônias submetidas à seleção em laboratório e em populações naturais submetidas a tratamento. O principal mecanismo de resistência observado nas larvas é a ausência do receptor Cqm1 nas células do epitélio intestinal devido à mutação no gene *cqm1* que impede a produção de proteínas funcionais e dotadas da âncora GPI (DARBOUX et al., 2001, 2007; ROMÃO et al., 2006). As larvas apresentam um padrão de resistência cruzada para as cepas usadas comercialmente, como a 2362, 1593 e C3-41, visto que todas produzem unicamente a toxina Bin como fator inseticida. Por outro lado, larvas resistentes às cepas produtoras da toxina Bin são susceptíveis à cepa IAB59, pois esta produz também uma segunda toxina binária formada por dois componentes caracterizados recentemente: as toxinas Cry48Aa (135 kDa) e Cry49Aa (49 kDa) (JONES et al., 2007). Outro exemplo de ausência de resistência cruzada é em relação ao Bti. Larvas

resistentes à toxina Bin são susceptíveis ao Bti e alguns estudos já mostraram que a mistura da toxina Bin com toxinas Cry ou Cyt desse entomopatógeno são letais para estas larvas (WIRTH et al., 2004, 2005; WIRTH; WALTON; FEDERICI, 2000).

Duas colônias resistentes, uma ao Bsp 2362 (R2362) e outra ao Bsp IAB59 (RIAB59) foram selecionadas em nosso laboratório para o desenvolvimento de estudos do modo de ação das toxinas do Bsp (AMORIM et al., 2007; PEI et al., 2002). As larvas da colônia R2362 não expressam o receptor Cqm1 da toxina Bin no epitélio intestinal, devido a uma deleção de 19 nucleotídeos no gene *cqm1* que codifica esta proteína (OLIVEIRA et al., 2004; ROMÃO et al., 2006). No caso da colônia RIAB59 as larvas são refratárias tanto à toxina Bin como às toxinas Cry48Aa/Cry49Aa, que também compõe o perfil de proteínas inseticidas da cepa IAB59. O mecanismo de resistência da colônia RIAB59 à toxina Bin é idêntico aquele caracterizado na colônia R2362, enquanto que a resistência às toxinas Cry48Aa e Cry49Aa ainda não foi caracterizada, pois o seu sítio alvo e o modo de ação ainda são desconhecidos (JONES et al., 2007).

As novas toxinas do Bsp IAB59, Cry48Aa e Cry49Aa, bem como as combinações de Bin/Cry11Aa e Bin/Cyt1Aa possuem atividade larvicida para os indivíduos resistentes, porém os efeitos citopatológicos não foram caracterizados. Ao nível ultra-estrutural pouco se conhece sobre os efeitos das toxinas produzidas por bactérias entomopatógenas nas células do epitélio digestivo de larvas de *C. quinquefasciatus*. O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar os efeitos das toxinas do Bsp e do Bti em larvas de *C. quinquefasciatus*, buscando a melhor compreensão do modo de ação destes fatores, a partir de modelos de larvas susceptíveis e resistentes, disponíveis em nosso laboratório.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Culex quinquefasciatus* Say, 1823

Os culicídeos são insetos pertencentes à ordem Diptera e são de grande interesse para a saúde pública por participarem como vetores na transmissão de agentes etiológicos de doenças como, dengue, febre amarela, malária, filarioses e encefalites, além de causarem incômodo e diminuição da qualidade de vida à população humana (FORATTINI, 2002; NATAL; PAGANELLI; SANTOS, 1991).

O *Culex quinquefasciatus* apresenta distribuição cosmopolita, ocorrendo nas regiões tropicais da Ásia meridional, África, Oceania e nas Américas, na faixa entre o sul dos Estados Unidos e o norte da Argentina. No Brasil é encontrado em todo o território sendo sua distribuição e abundância fortemente influenciada pela presença humana (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Assim como os demais culicídeos, os insetos do gênero *Culex* são holometábolos cujo desenvolvimento compreende as fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto. Em climas tropicais, o desenvolvimento, desde a oviposição até a emergência do adulto, dura em média 10 dias (Fig. 1). Trata-se de uma espécie com hábitos endofílicos e antropofílicos, ou seja, machos e fêmeas abrigam-se nas habitações humanas durante o dia e, no período crepuscular vespertino e à noite as fêmeas realizam a hematofagia. O repasto sanguíneo é necessário para o desenvolvimento dos ovos que são depositados agrupados em forma de “jangada” sobre a superfície aquática. Após o desenvolvimento embrionário, as larvas de 1º estágio (L1) eclodem e evoluem, passando por mais três estádios larvais (L2, L3 e L4) até chegar à fase de pupa. Os criadouros típicos desta espécie em ambientes urbanos são fossas, valetas, caixas de inspeção de esgoto e demais ambientes contendo água estagnada e rica em dejetos orgânicos. Observa-se também que as fêmeas têm preferência em realizar a oviposição em criadouros anteriormente colonizados, cuja atração se dá pelo feromônio de agregação de oviposição, depositado em forma de gotículas sobre o pólo apical dos ovos (BARBOSA et al., 2007). As larvas dispõem-se perpendicularmente à superfície da água e se alimentam continuamente por filtração, na camada superficial do criadouro. Na fase de pupa a alimentação é suspensa, porém o deslocamento ativo na coluna d’água é mantido. Os adultos emergem preferencialmente no crepúsculo vespertino, permanecendo próximos à lâmina

d'água até o endurecimento da cutícula, sobretudo das asas, quando estão preparados para o voo e a cópula. O adulto pode sobreviver cerca de 50 dias e as fêmeas podem realizar quatro oviposições neste período, produzindo de 150 a 300 ovos em cada uma delas (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).



Figura 1 – Ciclo de vida do *Culex quinquefasciatus*. Fonte: Cedido por Maria Helena N. L. Silva-Filha em comunicação pessoal.

2.2 Papel do *Culex* na transmissão de patógenos

O *C. quinquefasciatus* é o principal vetor da *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose bancroftiana nas Américas, além de ser incriminado como vetor de arbovírus. Em alguns países do continente americano esta espécie foi encontrada naturalmente infectada por vírus causadores de encefalites dos tipos Saint Louis (EUA) e Venezuelana (Panamá). No Brasil é considerado vetor secundário do vírus Oropouche, em áreas do estado do Pará, onde foram registradas várias epidemias (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). O *C. quinquefasciatus* também pode ser vetor do vírus do Nilo Ocidental (VNO), um flavivírus que provoca mortalidade em aves domésticas, silvestres e em cavalos. No homem induz a um quadro

febril, podendo evoluir para meningite aguda, encefalite e óbito. O VNO foi isolado pela primeira vez em Uganda, 1937 e dispersou-se pela África, Europa e Ásia (SMITHBURN et al., 1940). Nas Américas, os primeiros casos de encefalite em seres humanos causada pelo VNO foram relatados em 1999 em Nova York (EUA) e, até 2002, o vírus havia se espalhado por vários estados americanos (GODDARD et al., 2002). Em 2001, apenas dois anos após a entrada do vírus no continente americano, este foi detectado ao sul das Ilhas Cayman na América Central, em 2002 na ilha de Guadalupe e no México e, em 2003 e 2004 em El Salvador e Cuba. Em 2005 o VNO demonstrou sua notável velocidade de disseminação ao ser detectado em cavalos infectados na Colômbia (MATTAR et al., 2005). O risco da entrada do VNO no Brasil é eminente visto a existência de rotas de aves migratórias, que são hospedeiras e reservatórios naturais do vírus, e a abundância do potencial vetor, o *C. quinquefasciatus*, o que requer medidas de prevenção e controle no âmbito da saúde pública (LUNA; PEREIRA; SOUZA, 2003).

A filariose linfática também é uma doença de transmissão vetorial destacando-se como um grave problema de saúde pública mundial, não só por sua ampla distribuição geográfica, atingindo cerca de 80 países, mas também pelo seu aspecto clínico, com danos e seqüelas muitas vezes irreversíveis (BONFIM et al., 2003). Estima-se que exista 1,2 bilhão de pessoas vivendo em áreas de risco de contrair a parasitose no mundo (DEAN, 2000) e destas, cerca de 120 milhões são portadoras de filariose linfática, sendo 106 milhões o número de infectados por *Wuchereria bancrofti* (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000; OTTESEN; RAMACHANDRAN, 1995). Sua importância é justificada tanto pelo número de casos como pela morbidade associada ao dano linfático. O mecanismo de transmissão da *W. bancrofti* pelo *C. quinquefasciatus* é considerado de baixa eficiência, exigindo uma exposição intensa e prolongada ao vetor. Além disso, para um indivíduo se tornar microfilarêmico é necessário que ocorra uma série de eventos como a sobrevivência e penetração das larvas infectantes sobre a pele do hospedeiro, o desenvolvimento de larvas L₃ até a fase adulta, o alojamento de machos e fêmeas no mesmo vaso linfático, permitindo o acasalamento e, finalmente, a produção de microfilárias (Fig. 2) (REGIS et al., 1996).

As ações governamentais visando o controle da filariose no Brasil começaram no início da década de 50 e até 1956 a parasitose autóctone foi detectada em vários estados brasileiros atingindo desde a região norte ao sul do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1977; RACHOU, 1957; RACHOU; DEANE, 1954). As cidades que apresentaram os focos de maior

importância foram Belém e Recife, seguidas de Maceió (DEANE et al., 1953; RACHOU, 1960).

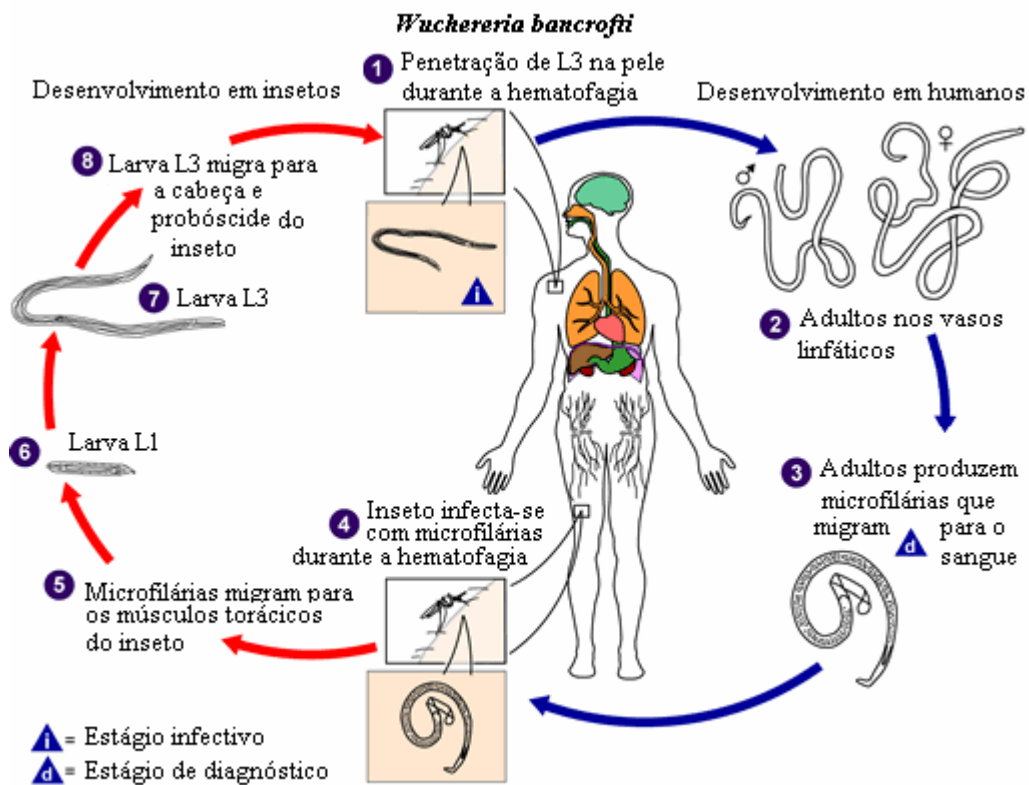


Figura 2– Ciclo de vida de *Wuchereria bancrofti* nos seus hospedeiros intermediário e definitivo.
Fonte: Centro para o Controle e Prevenção de Doenças (2007).

A filariose é considerada endêmica, pelos órgãos de saúde pública, na região metropolitana de Recife (PE), principalmente em Recife, Olinda e Jaboatão, com índices de microfilarêmicos variando de 2% a 15% em comunidades de baixo nível sócio-econômico (RANGEL; DREYER, 1988; DREYER; MEDEIROS, 1990; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1992). Exames realizados em 10.851 indivíduos residentes em 31 diferentes bairros da cidade do Recife detectaram 683 microfilarêmicos, o que representa uma prevalência média de 6,5% (MACIEL et al., 1996).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) têm como objetivo a erradicação da bancroftose nas Américas até o ano de 2020, uma vez que a OMS inclui a filariose linfática entre as seis doenças potencialmente

erradicáveis (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1994; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2002). Para concretizar este objetivo foi elaborado o "Plano Nacional para Eliminação da Filariose Linfática no Brasil" tendo como bases as seguintes ações: reavaliação epidemiológica dos focos ativos e dos considerados extintos; mobilização das comunidades nas áreas endêmicas; tratamento em massa das populações nas áreas endêmicas; controle de vetores adequado à realidade local; atenção aos casos humanos; articulação interinstitucional, interprogramática e intersetorial.

2.3 Controle de vetores

O controle populacional de mosquitos vetores é uma ferramenta efetiva para interromper o ciclo de transmissão de doenças. Em razão das características biológicas dos culicídeos, que são espécies *r*-estrategistas, caracterizadas por uma elevada taxa de reprodução, curto ciclo de vida e acentuadas flutuações na densidade populacional, o controle desta densidade pode se tornar complexo (REGIS et al., 2001; RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Outros fatores de ordem ambiental, social e econômico, também contribuem para compor um cenário favorável à elevada proliferação de culicídeos em áreas urbanas.

A descoberta dos inseticidas químicos de ação residual, na década de 40, revolucionou o controle de insetos. A introdução desses compostos no combate aos insetos vetores foi bastante difundida e, inicialmente, se mostrou eficaz para controlar e até mesmo erradicar doenças provocadas por vetores em várias regiões (HEMINGWAY et al., 2006). Os inseticidas químicos possuem um mecanismo de ação inespecífico, caracterizado por um amplo espectro de ação. Estes atuam inclusive em organismos não-alvo, podendo interferir nos processos metabólicos e causar sérios danos à saúde humana, além de gerar prejuízos para o meio ambiente. O uso massivo de inseticidas químicos levou à seleção de insetos resistentes a uma ou mais categorias desses agentes, limitando a efetividade dos mesmos (BRACCO et al., 1997; HEMINGWAY et al., 2004). Aliado a esses fatores, também se constatou o risco à saúde humana, devido à exposição direta e/ou o consumo de alimentos e água contaminados (HEMINGWAY et al., 2004; HEMINGWAY; FIELD; VONTAS, 2002). Estes aspectos negativos associados ao uso dos inseticidas químicos levaram à busca de agentes de controle de insetos mais eficazes, capazes de superar os problemas encontrados e que, sobretudo,

fôssem mais seguros. Atualmente, a estratégia mais utilizada para o controle de vetores é o manejo integrado que inclui o uso de inseticidas específicos e seguros para organismos não-alvo, associado a outras estratégias tais como ações físicas e manejo ambiental para a eliminação ou redução dos criadouros, proteção pessoal, além da conscientização e participação comunitária.

O controle de insetos com agentes biológicos pode ser uma alternativa bastante eficaz. Ele se baseia na utilização de organismos, ou de toxinas resultantes de suas atividades metabólicas, para reduzir a densidade populacional dos insetos (MITTAL, 2003). Agentes biológicos tais como predadores, parasitas, competidores e patógenos, podem ser empregados no controle de insetos, em substituição ao uso de inseticidas sintéticos. Diversos organismos têm sido investigados como agentes potenciais para o controle de vetores, podendo ser citados, bactérias, fungos, protozoários e nematódeos (WOODRING; DAVIDSON, 1996). As bactérias entomopatógenas são os agentes de controle biológico mais utilizados e representam cerca de 90% do mercado de bioinseticidas (POLANCZYK; GARCIA; ALVES, 2003). Estas bactérias possuem um alto poder larvicida de ação seletiva para insetos de importância agrícola e médica, e propiciam segurança para o homem e para outras espécies não-alvo. Sua ação larvicida é devida à produção de toxinas potentes dentro de inclusões cristalinas paraesporais, que garantem sua maior estabilidade. Outras características como a facilidade de produção em larga escala, armazenamento, transporte e aplicação viabilizam a sua utilização em programas de controle (BECKER et al., 2003).

2.4 Bactérias entomopatógenas

O uso de bactérias como agente de controle biológico de insetos teve início com a descoberta da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Berliner), e as primeiras cepas isoladas e utilizadas até a década de 70 apresentavam atividade, sobretudo para espécies da ordem Lepidoptera (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992). A utilização destes agentes para o controle de insetos vetores recebeu atenção limitada até a descoberta do *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) em 1976 (DE BARJAC, 1978; GOLDBERG; MARGALIT, 1977) e de uma cepa altamente tóxica do *Bacillus sphaericus* (Bsp) para mosquitos (SINGER, 1973).

O Bti e o Bsp, pertencentes à família *Bacillaceae*, são bactérias saprófitas, Gram-positivas, esporulantes e aeróbicas. Sua distribuição é cosmopolita sendo amplamente encontrados no solo e em ambientes aquáticos. Durante a esporulação produzem inclusões cristalinas paraesporais nas quais estão contidas endotoxinas responsáveis por sua atividade inseticida (KNOWLES, 1994; Apud PORTER, 1993; SCHNEPF et al., 1998).

Biolarvicidas à base do Bsp e Bti são eficazes para o controle de culicídeos e simulídeos, e têm sido utilizados em programas de controle em vários países, como Alemanha (BECKER, 1997), França (THIÉRY et al., 1996), China (YUAN et al., 2000), Índia (RAO et al., 1995) e Brasil (POLANCZYK; GARCIA; ALVES, 2003; REGIS et al., 1995; REGIS et al., 1996). Essas bactérias produzem toxinas potentes, que agem por ingestão e têm atividade letal e específica, para larvas de certas espécies de dípteros (CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELÉCLUSE, 1996; REGIS et al., 2001).

O principal fator tóxico destas bactérias é um cristal protéico, produzido durante a esporulação, que contém toxinas com ação larvicida (BAUMANN et al., 1991). O modo de ação das toxinas produzidas pelo Bsp e pelo Bti envolve inicialmente a ingestão dos cristais em suspensão na água, pelas larvas de mosquitos (Culicidae) ou borrachudos (Simuliidae) (CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELÉCLUSE, 1996). Uma vez ingerido, o cristal é solubilizado em pH alcalino intestinal (pH \approx 10), liberando no lúmen pró-toxinas que são convertidas para a sua forma ativa pela ação de proteases intestinais. Estas atravessam a membrana peritrófica e interagem com receptores específicos presentes nas microvilosidades do epitélio intestinal das larvas (DE BARROS MOREIRA BELTRÃO; SILVA-FILHA, 2007; FERNANDEZ et al., 2006; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; RAVOAHANGIMALALA; CHARLES, 1995).

O Bsp é ativo sobretudo para espécies dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Mansonia*, enquanto o Bti exerce maior ação tóxica contra *Aedes*, *Culex* e *Simulium* (CHARLES et al., 1997; POLANCZYK; GARCIA; ALVES, 2003; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997). O princípio ativo das preparações de biolarvicidas é constituído por uma mistura de cristais e esporos, e a sua eficácia pode ser influenciada por fatores como temperatura e pH da água, incidência de luz solar, poluição orgânica, densidade e estágio das larvas presentes nos criadouros (BECKER et al., 1992; MULLA et al., 1990). Uma grande vantagem do Bsp é a longa persistência da atividade larvicida, mesmo em criadouros onde há incidência de luz solar e o nível de poluição orgânica da água é elevado (DAVIDSON et al., 1984). A reciclagem, ou seja, a germinação e esporulação do Bsp em cadáveres de larvas

produzindo novos cristais, é um dos fatores que explica a boa persistência da bactéria nestes criadouros (DAVIDSON et al., 1984; SKOVMAND; BAUDUIN, 1997).

2.5 *Bacillus sphaericus* Neide, 1904

O *Bacillus sphaericus* (Bsp) é uma das principais bactérias entomopatógenas utilizadas comercialmente para o controle de espécies de *Culex*, *Anopheles* e *Mansonia* (Fig. 3). Essa bactéria utiliza preferencialmente fontes protéicas para obtenção de energia, uma vez que não é capaz de metabolizar carboidratos, a exemplo do Bt (KALFON et al., 1983; CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELECLUSE, 1996). A primeira cepa do Bsp que mostrou atividade tóxica para larvas de mosquito, denominada K, foi isolada de cadáveres de *Culiseta incidens* (Diptera: Culicidae) (KELLEN; MEYERS, 1964). A ação larvicida desta cepa é relativamente baixa e, somente após o isolamento de cepas com alta toxicidade, como a 1593 na Indonésia (SINGER, 1973), a 2297 no Sri Lanka (WICKREMESINGHE; MENDIS, 1980), a 2362 na Nigéria (WEISER, 1984) e a C3-41 na China (ZHANG et al., 1987), o Bsp foi considerado um agente promissor para o controle de mosquitos. As cepas estão agrupadas de acordo com as características morfológicas e bioquímicas, e o método mais utilizado para classificação das cepas de Bsp é a aglutinação flagelar, que as agrupa em diferentes sorotipos (DE BARJAC; VÉRON; COSMAO-DUMANOIR, 1980; DE BARJAC et al., 1985). Segundo este método as cepas mais tóxicas para larvas de mosquitos pertencem aos sorotipos H5 (1593, 1691, 1881, 2362 e C3-41), H6 (IAB59) e H25 (2297).

As cepas do Bsp podem produzir as seguintes categorias de toxinas inseticidas: a toxina Binária (Bin) encontrada no cristal, as toxinas Cry48Aa e Cry49Aa, também produzidas em cristais, e as toxinas mosquitocidas (Mtx), produzidas e secretadas ao meio. As toxinas Mtx foram classificadas em Mtx (100 kDa), Mtx2 (30,8 kDa) e Mtx3 (35,8 kDa) (LIU et al., 1996; THANABALU et al., 1991; THANABALU; PORTER, 1995). Em cepas nativas do Bsp as toxinas Mtx são produzidas durante o estágio vegetativo do crescimento bacteriano e são posteriormente degradadas por proteases quando as células entram na fase estacionária (CHARLES; NIELSEN-LEROUX, DELECLUSE, 1996). Por esta razão, sua contribuição na atividade larvicida de culturas esporuladas é muito baixa, entretanto, podem ter alta atividade larvicida quando são produzidas sob a forma de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

(PARTRIDGE; BERRY, 2002; WEI; CAI; YUAN, 2006; WIRTH et al., 2007). Apesar do importante potencial das toxinas Mtx, as cepas nativas do Bsp têm como principal fator tóxico a toxina Bin contida nos cristais produzidos na fase de esporulação bacteriana. As toxinas Cry48Aa (135 kDa) e Cry49Aa (49 kDa) foram recentemente caracterizadas na cepa IAB59 do Bsp e juntas também compõem uma toxina binária produzida sob a forma de cristais protéicos (JONES et al., 2007). Suas características serão descritas de forma mais detalhada na seção 2.7.

O espectro de ação do Bsp é restrito às larvas de mosquitos (DAVIDSON; YOUSTEN, 1990; GROVES; MEISCH, 1996; LACEY et al., 1988; MERRITT et al., 2005), especialmente às espécies do complexo *Culex pipiens*, que são as mais sensíveis. Várias outras espécies de *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia* e *Psorophora*, bem como algumas espécies do gênero *Aedes* também são sensíveis à sua atividade (DAVIDSON, 1983; BAUMANN et al., 1985; KALFON et al., 1984; PAYNE; DAVIDSON, 1984). Dentre os anofelinos, *Anopheles gambiae* e *An. stephensi* são as espécies mais sensíveis. O *Cx. cinereus* (NICOLAS; DOSSOU-YOVO, 1987), *Ae. aegypti* e espécies do gênero *Simulium* são insensíveis à ação do Bsp (DAVIDSON; YOUSTEN, 1990). Para o controle destas espécies é recomendado o uso do Bti, cujas características estão descritas na seção 2.8.

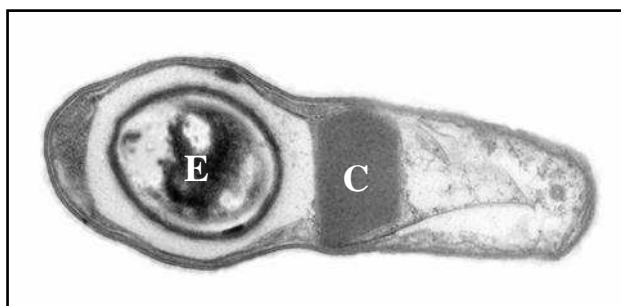


Figura 3 – Micrografia eletrônica de transmissão do *Bacillus sphaericus* em fase de esporulação. E. esporo; C. cristal com ação larvicida para dípteros. Fonte: Modificado de Kalfon et al. (1983).

2.6 Toxina Bin

O principal fator tóxico das cepas de Bsp com alta atividade, usadas na produção de biolarvicidas comerciais é a toxina Bin, presente nos cristais produzidos durante a

esporulação. A pró-toxina Bin é composta por dois polipeptídeos de 42- e 51 kDa denominadas BinA e BinB, respectivamente (BERRY; HINDLEY, 1987; BERRY et al., 1993; BAUMANN et al., 1987; BAUMANN; BROADWELL; BAUMANN, 1988; HINDLEY; BERRY, 1988) (Fig. 4). Os componentes que formam a toxina Bin unem-se na forma de cristais que são visíveis a partir do III estágio de esporulação (BAUMANN et al., 1985; KALFON et al., 1984; YOSTEN; DAVIDSON, 1982). Esse heterodímero atua em sinergia, sendo que os dois componentes devem estar presentes em uma razão equimolar para a expressão completa da toxicidade (BROADWELL et al., 1990; NICOLAS et al., 1993). Os componentes BinA e BinB parecem interagir em solução antes de se ligarem ao receptor específico e serem capazes de se inserir nas membranas celulares (BOONSERM et al., 2006). O componente BinB é responsável pelo reconhecimento e ligação ao receptor Cqml no epitélio intestinal de *C. quinquefasciatus* (CHARLES et al., 1997) e não apresenta toxicidade quando administrado sozinho. A subunidade BinA pode ser letal para *C. pipiens* quando administrado em uma concentração cerca de 100 vezes maior do que a do cristal nativo, indicando o seu importante papel na toxicidade (NICOLAS et al., 1993; SEBO et al., 1990)

Os genes que codificam a toxina Bin (*bin*) são altamente conservados entre as diferentes cepas de *B. sphaericus* e as proteínas Bin são classificadas em 4 grupos, com base em pequenas diferenças observadas na seqüência de aminoácidos: Bin 1 (IAB59), Bin 2 (2362, 1593), Bin 3 (2297) e Bin 4 (LP1-G) (BERRY et al., 1989; PRIEST et al., 1997). Com exceção da Bin 4, todas são altamente tóxicas para larvas de *Culex* e ligam-se com alta afinidade aos receptores do epitélio intestinal (PRIEST et al., 1997; SILVA-FILHA et al., 2004). A baixa atividade da toxina Bin 4, caracterizada na cepa LP1-G, é devido a uma mutação que gera a troca de uma leucina por uma serina na posição 93 do gene que codifica a subunidade BinA. Esta mutação afeta drasticamente a toxicidade de Bin 4 (YUAN et al., 2001).

A estrutura da toxina Bin ainda não foi definida, ao contrário da estrutura de 3 domínios característica das toxinas Cry presentes nos cristais das cepas inseticidas do Bt. Sabe-se apenas que os componentes BinA e BinB devem ligar-se através de sítios específicos e que BinB possui um epítipo de ligação aos receptores da membrana celular no epitélio intestinal das larvas susceptíveis.

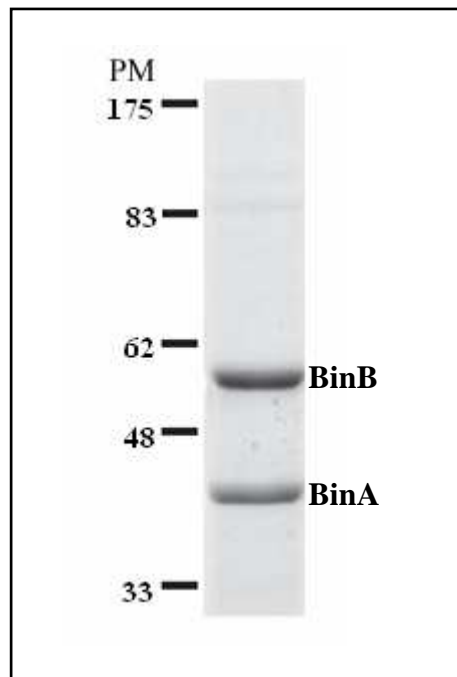


Figura 4 – Perfil protéico do cristal de cepas do *Bacillus sphaericus* 2362, 1593 e C3-41. A pró-toxina binária (Bin) característica destas cepas é formada por dois componentes BinA (42 kDa) e BinB (51 kDa). PM: peso molecular em kDa. Fonte: Modificado de Jones et al. (2007).

2.6.1 Modo de ação

A ação tóxica do Bsp tem início quando larvas aquáticas de mosquitos sensíveis ingerem os cristais e esporos em suspensão na água. Após a ingestão, a matriz do cristal é solubilizada no pH próximo a 10, característico do intestino de culicídeos. Uma vez liberada do cristal, a pró-toxina formada pelos polipetídeos BinA (42 kDa) e BinB (51 kDa) sofre uma clivagem no lúmen intestinal devido à ação de serina proteases, gerando dois fragmentos ativos de 39- e 42 kDa, respectivamente (BROADWELL; BAUMANN, 1987; BROADWELL et al., 1990). Apesar das etapas de solubilização e ativação terem caráter seletivo, sabe-se que a toxina pode ser processada no mesêntero de várias espécies de mosquitos, inclusive naquelas naturalmente refratárias ao Bsp tais como *Ae. aegypti*

(BAUMANN et al., 1985; DAVIDSON et al., 1987; DAVIDSON, 1988; NICOLAS; LECROISEY; CHARLES, 1990). A seletividade da ação é dada pela ligação da toxina a receptores específicos presentes nas microvilosidades apicais das células do intestino médio (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997) que desencadeia uma série de alterações citopatológicas que culminam com a morte da larva (CHARLES, 1987; DAVIDSON; TITUS, 1987).

Ensaio utilizando larvas de *C. quinquefasciatus* tratadas com a toxina marcada demonstraram que BinB é o responsável pelo reconhecimento e ligação da toxina aos receptores do epitélio intestinal, enquanto BinA é essencial para toxicidade (CHARLES et al., 1997; OEI; HINDLEY; BERRY, 1992). A ligação de BinB ao epitélio desta espécie é forte, específica e mostra um padrão de ligação regionalizado ao ceco gástrico e estômago posterior (Fig. 5) (DAVIDSON et al., 1990; OEI; HINDLEY; BERRY, 1992). Apesar de haver ligação da toxina ao receptor no mesêntero de larvas de *Anopheles*, a mesma não se apresenta regionalizada a nenhum segmento do intestino das espécies estudadas. Em *Ae. aegypti* nenhuma ligação foi observada (DAVIDSON et al., 1990).

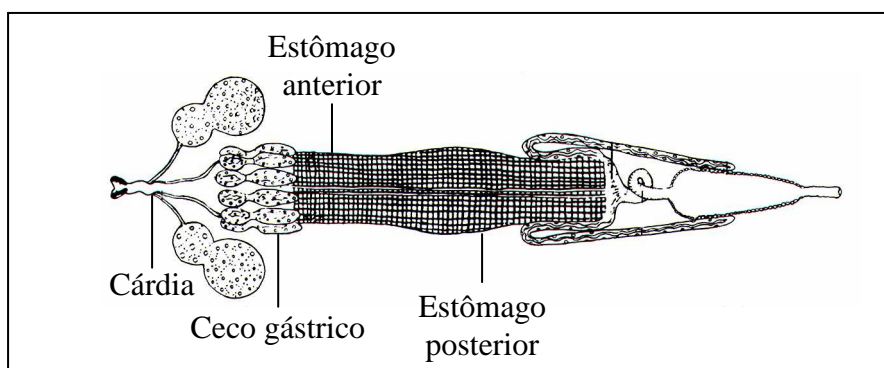


Figura 5 – Representação esquemática do tubo digestivo de larvas mostrando as regiões que compõem o intestino médio: cárdia, ceco gástrico, estômago anterior e estômago posterior. O ceco gástrico e o estômago posterior correspondem às regiões de localização dos receptores da toxina Bin do *Bacillus sphaericus*. Fonte: Extraído de Clements (1992).

2.6.2 Morfologia das regiões alvo

O tubo digestivo das larvas é formado por três segmentos de origem embrionária distintas, o intestino anterior, o intestino médio e o intestino posterior. Em larvas de *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* o intestino médio é composto por quatro regiões: a cárdia, o ceco gástrico, o estômago anterior e o estômago posterior (Fig. 5). Nas regiões alvo da toxina Bin, ou seja, no ceco gástrico e estômago posterior, o epitélio simples é formado principalmente por células colunares ricas em microvilosidades, e células regenerativas distribuídas de forma isolada ou em grupos na região basal. Este epitélio não é revestido por cutícula, diferente daquele que reveste as outras porções do tubo digestivo, sendo separado do bolo alimentar pela membrana peritrófica. Fibras musculares longitudinais e circulares envolvem o ceco gástrico, enquanto o estômago é envolvido por uma trama formada por estas fibras (IMMS, 1907 apud CLEMENTS, 1992; O'BRIEN, 1966 apud CLEMENTS 1992; CHARLES, 1987). O ceco gástrico apresenta quatro tipos celulares: as células de reabsorção/secreção, células transportadoras de íons, células secretoras de membrana e células imaginais (VOLKMANN; PETERS, 1989). As células do ceco gástrico e do estômago posterior possuem microvilosidades alongadas, abundância de mitocôndrias na porção apical do citoplasma e o labirinto basal, formado por invaginações da membrana plasmática, é bastante desenvolvido nesta primeira porção do intestino médio, o ceco gástrico, e menos desenvolvido na região do estômago posterior. Lamelas do retículo endoplasmático liso e rugoso estão distribuídas por todo o citoplasma (CHARLES, 1987; CHARLES; DE BARJAC, 1983; COCKE et al., 1979). As células da região do estômago posterior assemelham-se as células de reabsorção/secreção encontradas no ceco gástrico (VOLKMANN; PETERS, 1989).

2.6.3 Receptor

A toxina Bin liga-se especificamente a uma única classe de receptores presente na membrana das células do epitélio intestinal das larvas de *C. pipiens*, *An. gambiae* e *An. stephensi* (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997). Em larvas de *Ae. aegypti*, espécie naturalmente refratária, foi observado que a toxina Bin não se liga a receptores específicos no epitélio intestinal (NIELSEN-

LEROUX; CHARLES, 1992), demonstrando que a ligação da toxina ao receptor é a etapa mais importante do modo de ação do Bsp. A afinidade de ligação da toxina aos receptores do microvilli intestinal das larvas de *C. pipiens*, *An. gambiae* e *An. stephensi*, está diretamente relacionada com a susceptibilidade observada *in vivo*, sendo a atividade larvicida da toxina decrescente para estas espécies (SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997).

O receptor da toxina Bin em larvas de *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus* denominado Cpm1 e Cqm1, respectivamente, é uma α -glicosidase de 60-kDa ligada à membrana das células intestinais através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Fig. 6) (DARBOUX et al., 2001; PAUCHET et al., 2005; ROMÃO et al., 2006; SILVA-FILHA, NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999). A clonagem e expressão desta molécula comprovaram o seu papel como receptor da toxina Bin, e as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos estão disponíveis no banco de dados GeneBank (DARBOUX et al., 2001; PAUCHET et al., 2005; ROMÃO et al., 2006). As α -glicosidases desempenham um papel fisiológico na digestão e este é um dos casos em que enzimas do sistema digestivo de insetos podem atuar como receptores de toxinas produzidas por patógenos. Aminopeptidases e uma fosfatase alcalina também já foram identificadas como receptores para toxinas de *B. thuringiensis* (ABDULLAH; VALAITIS; DEAN, 2006; FERNANDEZ et al., 2006; KNIGHT; CRICKMORE; ELLAR, 1994; LUO et al., 1997). O sítio de ligação da toxina Bin à α -glicosidase Cqm1 ainda não foi identificado e não se sabe se está relacionado com o sítio catalítico desta molécula.

Mutações no gene *cqm1* podem causar alterações na proteína impedindo que ela desempenhe o papel de receptor da toxina Bin, levando assim à resistência que será descrita posteriormente na seção 2.9.

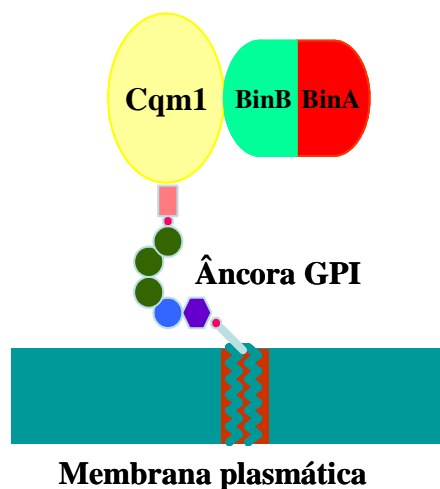


Figura 6 – Representação esquemática da ligação do componente BinB da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* ao receptor Cqm1, ligado à membrana plasmática das células do epitélio intestinal de larvas de *Culex quinquefasciatus* por uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Fonte: Cedido por Maria Helena N. L. Silva-Filha em comunicação pessoal.

2.6.4 Efeitos citopatológicos

Estudos anteriores sobre a citopatologia provocada pela ação da toxina Bin no epitélio intestinal de larvas mostraram que as alterações podem ser observadas 15 min após a ingestão do complexo esporo-cristal, e os principais danos causados às células do intestino de larvas de *C. pipiens* foram o aparecimento de grandes vacúolos citoplasmáticos e o intumescimento mitocondrial (CHARLES, 1987; DAVIDSON, 1981; KARCH; COZ, 1983; SINGH; GILL, 1988). O intestino posterior e o ceco gástrico são as áreas mais afetadas pela toxina Bin, porém danos posteriores no tecido neuronal e músculos esqueléticos também foram detectados (SINGH; GILL, 1988). Efeitos ultra-estruturais foram observados em culturas de células de *C. pipiens*, após alguns minutos de tratamento com a toxina Bin do Bsp solubilizada e ativada (DAVIDSON; TITUS, 1987). Essas alterações envolveram principalmente o intumescimento das cristas mitocondriais e do retículo endoplasmático, seguido pelo aparecimento de vacúolos e condensação da matriz mitocondrial, sugerindo que a toxina pode exercer seus efeitos na própria membrana celular (DAVIDSON et al., 1987). A formação de poros pela toxina Bin ou seus componentes também pode ser observada em

vesículas lipídicas unilamelares e em bicamadas lipídicas planares principalmente devido à ação do componente BinA (SCHWARTZ et al., 2001). O componente BinB pode causar a formação de canais, embora em menor extensão. Estudos de imunolocalização realizados em larvas de *C. quinquefasciatus* tratadas com o Bsp 2362 demonstraram que a toxina Bin poderia ser internalizada pelas células intestinais, uma vez que foi observada marcação positiva nas membranas do ceco gástrico e intestino posterior, e dentro da própria célula (SILVA-FILHA; PEIXOTO, 2003). Os resultados da formação de poros pela ação da toxina Bin devem ser considerados cuidadosamente uma vez que todos os estudos foram realizados em sistemas de membranas artificiais.

A análise do efeito da toxina Bin em células MDCK (Madin and Darby canine kidney cell), transfectadas com o receptor Cpm1, demonstrou que a ligação da toxina Bin aos receptores presentes nesta linhagem de células epiteliais provocou a formação de vacúolos citoplasmáticos sugerindo que a toxina Bin modifica a permeabilidade da membrana plasmática pela abertura de poros (PAUCHET et al., 2005). Quando o receptor Cpm1 foi expresso nas células como proteína de membrana, porém, desprovido da ligação via âncora GPI, o efeito de vacuolização não foi observado. Este resultado sugere que a localização do receptor na membrana através da molécula de GPI pode ser essencial para mediar os efeitos causados pela toxina nas células (OPOTA; CHARLES; PAURON, 2007).

Os efeitos fisiológicos da toxina do *B. sphaericus* têm sido pouco documentados. O estudo realizado por Narasu e Gopinathan (1988) foi o único a registrar que, na presença da toxina, a captura de oxigênio por mitocôndrias isoladas de larvas de *C. quinquefasciatus* era inibida, bem como a atividade da acetilcolina transferase. Os fatores que determinam a morte das larvas necessitam ser investigados, uma vez que ainda não se sabe se a ação da toxina, após a ligação aos receptores, se dá através de uma transdução de sinal pela célula ou por um processo de internalização. Várias questões sobre a forma pela qual a toxina interage com o epitélio após o reconhecimento e ligação ao receptor, permanecem sem resposta. O modo de ação e a causa da morte celular provocada por toxinas Cry do Bt têm sido mais estudados. Muitos trabalhos apontam a lise colóide osmótica, resultante da formação de poros provocada por estas toxinas, como o principal fato responsável pela morte celular (DE MAAGD et al., 2003; KNOWLES; ELLAR, 1987; SCHNEPF et al., 1998). Porém, estudos recentes sugerem que a morte celular causada por toxinas do Bt, envolve um complexo caminho de sinalização, e não simplesmente a lise colóide osmótica (HUFFMAN et al., 2004). Zhang et al. (2006) propõem um novo modelo de ação para a toxina Cry1Ab do Bt, segundo o qual a ligação da

toxina ao seu receptor específico estimula a ação da proteína G e adenilciclase, que elevam os níveis de AMP-cíclico intracelular e ativam a proteína kinase A. Esta última por sua vez, desestabiliza o citoesqueleto e os canais iônicos na membrana plasmática que levam à morte das células. Neste estudo as alterações observadas em células tratadas com a toxina Cry1Ab envolveram a formação de projeções da membrana plasmática, seguida do intumescimento e lise celular. Estas alterações foram semelhantes àquelas associadas a processos oncóticos (FINK; COOKSON, 2005), e não pareceram ter relação com a morte celular por apoptose, uma vez que a fragmentação nuclear e a ativação de caspases não foram observadas.

2.7 Toxinas Cry48Aa e Cry49Aa

A exposição ao Bsp pode levar à seleção de larvas resistentes à toxina Bin presente nas cepas deste entomopatógeno utilizadas para a produção comercial de biolarvicidas. A cepa IAB59 do Bsp, entretanto, apresenta uma característica distinta, pois é tóxica para larvas resistentes às cepas 2362, 1593 e C3-41, que produzem unicamente a toxina Bin. Estudos recentes mostraram que a atividade tóxica da cepa IAB59 para larvas resistentes é devida à presença de outras toxinas produzidas sob a forma de cristais protéicos (PEI et al., 2002; NIELSEN-LEROUX et al., 2002). As novas toxinas são dois polipeptídeos de 49- e 135 kDa, que foram caracterizadas como endotoxinas da família de proteínas Cry e denominadas Cry49Aa e Cry48Aa, respectivamente (Fig. 7) (JONES et al., 2007). Estas toxinas não apresentam atividade larvicida quando administradas individualmente, pois a sua ação ocorre em sinergia quando ambos os componentes estão presentes em concentração equimolar. Por esta razão as toxinas Cry48Aa e Cry49Aa são consideradas como uma nova toxina binária, que possui uma constituição única, como será descrito a seguir (JONES et al., 2007). O componente de 135 kDa (Cry48Aa), compartilha uma forte identidade com toxinas da família Cry que possuem uma estrutura composta por 3 domínios (JONES et al., 2007). O domínio I é formado por sete α -hélices e é responsável pela inserção da proteína à membrana e formação de poros. O domínio II, composto por folhas β com regiões em alças expostas, é responsável pelo reconhecimento e ligação ao receptor, enquanto o domínio III, também composto por folhas β , está relacionado à ligação ao receptor bem como à função de promover a estabilidade à molécula (DE MAAGD et al., 2003). O componente de 49 kDa

(Cry49Aa) compartilha identidade com ambos os componentes da toxina Bin do Bsp e também com a Cry36 e Cry35 do Bt, que fazem parte de uma família de toxinas consideradas binárias, pois requerem a presença de um par protéico para a expressão da ação larvicida (BAUM et al., 2004; ELLIS et al., 2002). A dependência observada entre os componentes Cry48Aa e Cry49Aa para a produção de toxicidade sugere haver uma forma de interação singular entre estas toxinas, uma vez que, a associação de toxinas do tipo binária com toxinas Cry de 3 domínios nunca foi descrita anteriormente (JONES et al., 2007). Durante o processo evolutivo, a aquisição dos genes que codificam as proteínas Cry48Aa e Cry49Aa pode ter acontecido através de elementos de transposição, aos quais os genes *cry48Aa* e *cry49Aa* estão associados (JONES et al., 2007), a exemplo de outros genes de toxinas inseticidas (MAHILLON et al., 1994).

As toxinas Cry48Aa/Cry49Aa são altamente potentes quando administradas sob a forma de proteínas purificadas, em razão equimolar, sendo a toxicidade observada comparável a da toxina Bin. Na cepa IAB59 do Bsp, que produz ambas as toxinas, Bin e Cry48Aa/Cry49Aa, a presença desses últimos fatores não aumenta a toxicidade total da cepa nativa, pois o acúmulo do componente Cry48Aa é baixo, e a presença de concentrações equimolares dos dois componentes é essencial para a expressão total da toxicidade (JONES et al., 2007).

Recentemente, uma colônia de *C. quinquefasciatus* com um alto nível de resistência (\approx 40.000) ao Bsp IAB59 foi selecionada sob condições de laboratório, e permitirá desenvolver estudos sobre o modo de ação dos novos fatores tóxicos Cry48Aa e Cry49Aa (AMORIM et al., 2007).

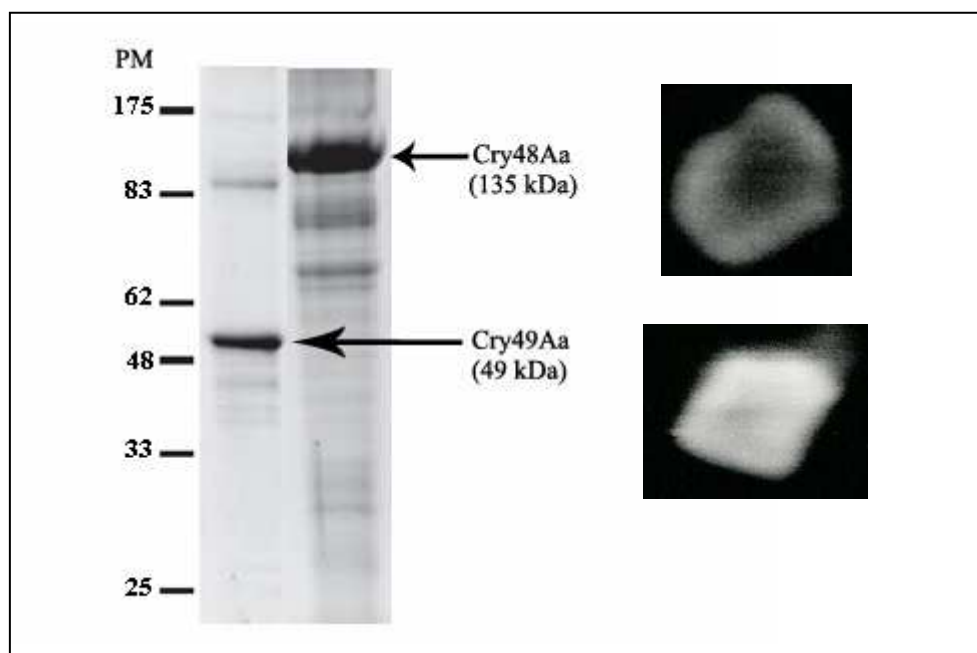


Figura 7 – Perfil protéico dos cristais que contém os componentes da nova toxina binária da cepa IAB59 do *B. sphaericus*, obtidos individualmente em organismos recombinantes. As toxinas Cry48Aa e Cry49Aa têm pesos moleculares (PM) de 135- e 49 kDa, respectivamente. Fonte: Adaptado de Jones et al. (2007).

2.8 *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti)

O uso de microorganismos no controle biológico de insetos vetores teve grande impulso com a descoberta do Bti (GOLDBERG; MARGALIT, 1977; DE BARJAC, 1978), uma sorovariedade com alta atividade larvicida para mosquitos (Culicidae) e simuliídeos (Simuliidae). O principal fator tóxico do Bti é uma inclusão cristalina produzida durante a esporulação que pode conter diversas δ -endotoxinas (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa e Cyt2Aa) com atividade larvicida específica para espécies de *Aedes*, *Culex* e *Simulium* (Fig. 8) (LACEY et al., 1986). Essa diversidade de toxinas e o seu modo de ação complexo são fatores determinantes do baixo potencial que este patógeno apresenta para selecionar resistência (GEORGHIU; WIRTH, 1997). O perfil tóxico mais comum nos isolados de Bti é composto pelas pró-toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa (Fig. 9). As toxinas Cry do Bti possuem a estrutura típica de 3 domínios descrita na seção 2.7, enquanto a proteína Cyt1Aa possui um único domínio formado por α -hélices e folhas β (DE MAAGD et al., 2003; LI; KONI; ELLAR, 1996; SCHNEPF et al., 1998).

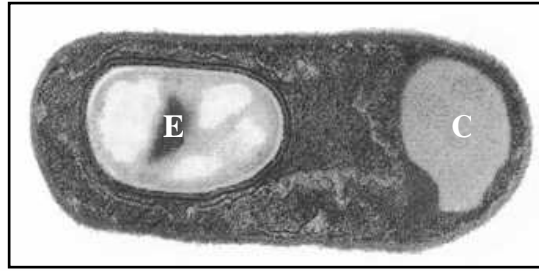


Figura 8 – Micrografia eletrônica de transmissão do *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* em fase de esporulação. E. esporo; C. cristal com ação larvicida para dípteros. Fonte: Modificado de Charles; De Barjac (1982).

Os primeiros passos para modo de ação do Bti são a ingestão dos cristais pelas larvas e sua dissolução no pH alcalino intestinal, de forma similar ao modo de ação do Bsp. A prótoxina contida nos cristais é liberada e ativada por serina proteases em fragmentos menores, tornando-se capaz de reconhecer e interagir com receptores presentes no microvilli intestinal (DE BARROS MOREIRA BELTRÃO; SILVA-FILHA, 2007). Em *Ae. aegypti* o receptor para as toxinas Cry11Aa e Cry4Aa é uma fosfatase alcalina de 65 kDa ligada à membrana do epitélio intestinal através de uma âncora GPI (GPI-ALP) (BUZDIN et al., 2002; FERNANDÉZ et al., 2006). No caso de Cry11Aa, após sua ligação ao receptor a toxina entra em um processo de oligomerização e inserção na membrana plasmática, causando a formação de poros que levam a uma lise colóide-osmótica das células (DE MAAGD et al., 2003; KNOWLES, 1994; SCHNEPF et al., 1998). Os receptores para as demais toxinas do Bti não são conhecidos, mas é possível que as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba compartilhem o mesmo receptor no microvilli intestinal de larvas em *Ae. aegypti* (DE BARROS MOREIRA BELTRÃO; SILVA-FILHA, 2007).

A atividade individual das toxinas Cry ou Cyt produzidas pelo Bti é fraca, mas juntas apresentam efeito sinérgico, e o maior nível de toxicidade é alcançado na presença de todas as toxinas do cristal nativo (CRICKMORE et al., 1995; PONCET et al., 1995). Um estudo recente mostrou que a Cyt1Aa tem um papel importante para a sinergia observada entre estas toxinas e, por conseguinte para a alta atividade inseticida do Bti. Ensaios *in vitro* demonstraram que a ligação da toxina Cry11Aa a frações de microvilli intestinal (BBMF) de *Ae. aegypti* aumenta na presença de Cyt1Aa, sugerindo que esta pode funcionar como um receptor de membrana para a toxina Cry11Aa (PÉREZ et al., 2005). Desta forma, a toxina Cry11Aa tem a possibilidade de interagir com as células do epitélio intestinal através do seu

receptor específico, a fosfatase alcalina de 65 kDa, bem como através da sua ligação com a Cyt1Aa que se insere diretamente na membrana das células epiteliais (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; FERNANDEZ et al., 2006; PÉREZ et al., 2005). Outro estudo recente demonstrou que a ligação da toxina Cry11Aa a Cyt1Aa facilita a formação de uma estrutura oligomérica, formada por proteínas Cry11Aa, que é capaz de se inserir na membrana e formar poros iônicos (PÉREZ et al., 2007). O Bti constitui um patógeno interessante, pois apresenta um arsenal diverso de toxinas Cry e a toxina Cyt, que tem um papel estratégico por ter a capacidade de interagir diretamente com a membrana plasmática e atuar como um receptor para as toxinas Cry.

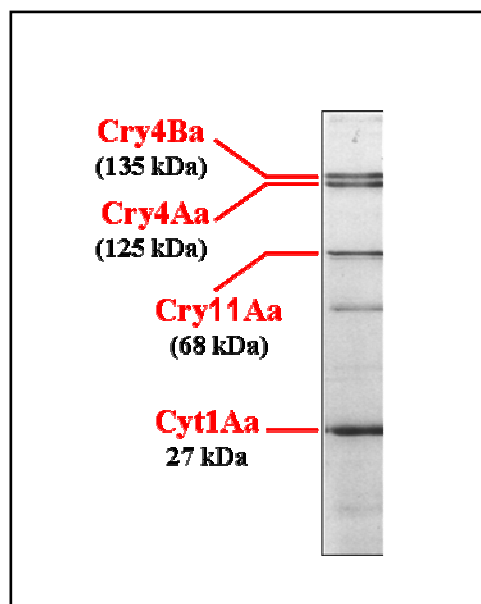


Figura 9 – Perfil protéico dos cristais que contém as toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa do *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis*. Peso molecular em kDa. Fonte: Modificado de Angsuthanasombat et al. (2004).

2.9 Resistência ao *Bacillus sphaericus*

A exposição aos biolarvicidas a base de Bsp pode levar à seleção de populações resistentes. A resistência de larvas já foi obtida através de pressão de seleção sob condições de laboratório (AMORIM et al., 2007; PEI et al., 2002; WIRTH et al., 2000), bem como detectada em populações naturais, submetidas a tratamento intensivo com este agente (NIELSEN-LEROUX et al., 2002; SILVA-FILHA et al., 1995; SINÈGRE et al., 1994; RAO

et al., 1995; YUAN et al., 2000). O primeiro caso de resistência ao Bsp foi obtido em laboratório após a exposição de uma colônia a uma alta pressão de seleção durante 12 gerações sucessivas (WIRTH et al., 2000). A resistência em campo foi registrada em populações do complexo *C. pipiens* na França (CHEVILLON et al., 2001; NIELSEN-LEROUX et al., 2002), Brasil (SILVA-FILHA et al., 1995), Índia (RAO et al., 1995), China (YUAN et al., 2000), Tunísia (NIELSEN-LEROUX et al., 2002) e Tailândia (MULLA et al., 2003). Os níveis de resistência detectados são variáveis e os principais fatores que modulam a evolução da resistência são a pressão de seleção imposta à população e a frequência inicial do(s) gene(s) que conferem resistência.

2.9.1 Mecanismos de resistência

O principal mecanismo de resistência à toxina Bin detectado em populações de *Culex* está relacionado à ausência do receptor específico da toxina Bin (Cpm1 ou Cqm1) no microvilli intestinal de larvas (Tabela 1) (DARBOUX et al., 2002; 2007; NIELSEN-LEROUX et al., 1995, 1997, 2002; OLIVEIRA et al., 2004; ROMÃO et al., 2006; SILVA-FILHA et al., 2004). Em algumas colônias resistentes, tais como TUNIS e SPHAE, foi observado que a interação da toxina com o receptor não é afetada e as larvas resistentes possuem receptores funcionais no epitélio intestinal. Estes casos indicam um mecanismo diferente de resistência e sugerem que outros genes podem estar envolvidos na resistência ao Bsp (NIELSEN-LEROUX et al., 1997, 2002).

A ausência do receptor Cqm1 no microvilli intestinal constitui a principal causa de resistência e provoca a refratariedade total das larvas à ação larvicida da toxina Bin. Um aspecto interessante a ser investigado é se larvas resistentes, devido à ausência de receptores, podem sofrer alterações no epitélio intestinal em consequência do tratamento com a toxina Bin. A colônia R2362 analisada neste trabalho é resistente à toxina Bin devido à ausência da α -glicosidase Cqm1 no microvilli intestinal (OLIVEIRA et al., 2004). Um ensaio para a detecção de α -glicosidases em frações ricas em microvilli intestinal de larvas demonstrou que há 5 bandas catalíticas em larvas da colônia S, e uma delas correspondente ao receptor Cqm1, conforme demonstrado por imunodetecção utilizando um anticorpo anti Cqm1 (Fig. 10, S). Em larvas da colônia R2362 todas as bandas foram observadas, exceto a banda

correspondente à α -glicosidase Cqm1 (Fig. 10, R) (ROMÃO et al., 2006). Em outra colônia analisada neste estudo, a RIAB59, as larvas são resistentes a todos os fatores tóxicos da cepa IAB59, ou seja, às toxinas Bin, Cry48Aa e Cry49Aa. A análise do mecanismo de resistência à toxina Bin mostrou que este é similar ao da colônia R2362, no qual as larvas não apresentam receptores no epitélio intestinal. (SILVA-FILHA et al., 2004).

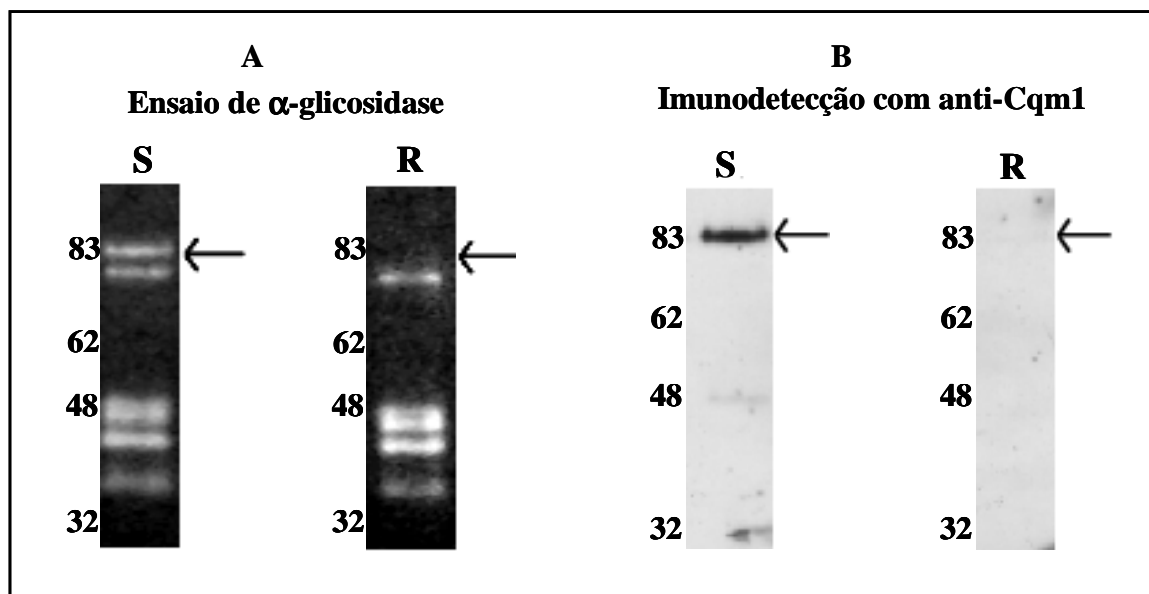


Figura 10 – Perfil de α -glicosidases presentes no microvilli intestinal de larvas de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia susceptível (S) e uma colônia resistente (R) ao *Bacillus sphaericus* 2362, através de ensaio enzimático em gel, sob condições semi-desnaturantes (A) Em larvas S o receptor Cqm1 corresponde a uma banda de \approx 80 kDa (seta) que está ausente em larvas R. (B) Imunodeteccção das amostras observadas em A com o anticorpo anti Cqm1. Em larvas S o anticorpo reconheceu a banda correspondente ao receptor (seta), ao contrário das larvas R. À esquerda, marcadores de peso molecular em kDa. Fonte: Modificado de Romão et al. (2006).

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

Colônia ou população	País	Origem	Razão de resistência	Ligação toxina-receptor ³	Alelo <i>r</i>	Forma de herança ⁴	Referência
GEO ¹	EUA	Lab	>100.000	Não	<i>cpm1_{GEO}</i>	R/A	NIELSEN-LEROUX et al., 1995
CqRL1/2362 ²	Brasil	Lab	>100.000	Não	<i>cqm1-d19</i>	R/A	OLIVEIRA et al., 2004
CqRL2/IAB59 ²	Brasil	Lab	≈40.000	Não	<i>cqm1-d19</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	ND	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 et al., 2000
TUNIS ²	Tunísia	Campo	≈750	Sim	ND	R/S	NIELSEN-LEROUX et al., 2002
BP ²	França	Campo	>5.000	Não	<i>cpm1_{BP}</i> <i>cpm1_{BP}-del</i>	R/S	NIELSEN-LEROUX et al., 2002
Wat Pikul ¹	Tailândia	Campo	>125.000	ND	ND	ND	MULLA et al., 2003

¹Colônia de *Cx. quinquefasciatus*.²Colônia de *Cx. pipiens*.³Razão entre a concentração letal do *B. sphaericus* para 50% (LC₅₀) das larvas em 48h da colônia avaliada e a respectiva LC₅₀ de uma colônia susceptível usada como referência.⁴R/A: Recessiva autossômica; R/S: Recessiva ligada ao sexo.

ND: não determinado.

2.9.2 Genética

Os principais fatores que modulam a evolução da resistência são a pressão de seleção pelo uso do inseticida, a frequência inicial dos alelos de resistência e a sua forma de herança. Nos casos de resistência de *Culex* ao Bsp já estudados, os alelos de resistência são herdados de forma recessiva, o que é uma vantagem para o manejo da resistência (NIELSEN-LEROUX et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004).

Estudos sobre a base molecular da resistência à toxina Bin desenvolvida pela colônia de *C. pipiens* denominada GEO, mostraram que o receptor Cpm1 está ausente do epitélio intestinal devido a uma mutação em um único nucleotídeo no gene do receptor Cqm1 (alelo *cqm1_{GEO}*) levando a um término de tradução prematuro e formação de uma proteína truncada, com um sinal de direcionamento extracelular e, portanto sem a âncora GPI (DARBOUX et al., 2002). Neste caso, a toxina Bin não tem ação para larvas da colônia GEO, devido à ausência do receptor nas células do epitélio intestinal.

Em *C. quinquefasciatus*, a resistência também pode estar associada à ausência do receptor no microvilli intestinal. As larvas da colônia R2362 não expressam o receptor Cqm1 devido a uma deleção de 19 nucleotídeos no gene *cqm1* (alelo *cqm1-d19*) que codifica esta proteína (OLIVEIRA et al., 2004; ROMÃO et al., 2006). Esta deleção gera um códon de parada prematura da tradução, e a proteína produzida é menor, sem o segmento que contém a âncora GPI, tal como observado na colônia GEO (ROMÃO et al., 2006).

Dois novos alelos de resistência à toxina Bin foram recentemente caracterizados em uma população de campo de *C. pipiens* na França, denominada BP. Ambos codificam proteínas que são incapazes de interagir com a toxina Bin, resultando na ausência de toxicidade do Bsp para as larvas. O alelo *cpm1_{BP}* apresenta uma mutação “nonsense” que causa a perda do domínio C-terminal necessário para o correto ancoramento do receptor Cpm1 na superfície da célula, a exemplo do que é observado nas colônias GEO e R2362. O outro alelo *cpm1_{BP-del}*, é caracterizado pela inserção de um elemento de transposição no éxon 2 deste gene. Este evento gera um processamento incorreto do RNAm e a proteína resultante é menor, embora a fase de leitura não seja modificada e a proteína seja dotada de âncora GPI. Neste caso a região afetada da proteína é crítica para a ligação da toxina Bin e ela não é funcional (DARBOUX et al., 2007).

2.9.3 Resistência cruzada

A resistência ao Bsp foi observada em populações de *C. pipiens* ou *C. quinquefasciatus* selecionadas ou submetidas a tratamentos com biolarvicidas a base das cepas 2362, 1593 e C3-41. Estas pertencem ao sorotipo H5a5b e possuem genes idênticos expressando a toxina Bin (PRIEST et al., 1997). A ocorrência de resistência cruzada entre as mesmas tem sido detectada, uma vez que, a toxina Bin presente nestas cepas liga-se ao mesmo receptor, a α -glicosidase Cqm1 (NIELSEN-LEROUX et al., 2001; SILVA-FILHA et al., 2004). Entretanto, trabalhos prévios revelaram que colônias resistentes às cepas 2362, 1593 e C3-41 são susceptíveis à cepa IAB59 (NIELSEN-LEROUX et al., 2001; PEI et al., 2002). A seleção de colônias resistentes à cepa IAB59 mostra que o desenvolvimento de resistência foi mais lento e a magnitude de resistência atingida foi menor (PEI et al., 2002; AMORIM et al., 2007). De fato, estudos recentes mostraram que a cepa IAB59 produz dois outros fatores tóxicos, Cry48Aa e Cry49Aa, além da toxina Bin (JONES et al., 2007), que justifica o baixo nível de resistência cruzada observada. O estudo dos efeitos das novas toxinas em células do epitélio intestinal de *Culex*, ao nível ultra-estrutural, está sendo apresentado de forma inédita neste trabalho, utilizando como modelos larvas das seguintes colônias: colônia susceptível (S) a todas as toxinas, colônia resistente à toxina Bin (R2362) e susceptível às toxinas Cry48Aa/Cry49Aa e colônia resistente a todas as toxinas do Bsp testadas (RIAB59). Uma alternativa, além do uso de cepas nativas com perfil tóxico diferente para superar a resistência, é a produção de cepas do Bsp modificadas geneticamente. Trabalhos anteriores já demonstraram que cepas recombinantes que produzem, além da toxina Bin, outras toxinas com sítios de ação distintos como as toxinas Cry ou Cyt do Bti, são ativas para larvas resistentes ao Bsp (GAMMON et al., 2006; PONCET et al., 1994; SERVANT et al., 1999; THIÉRY et al., 1998; TRISRISOOK et al., 1990; WIRTH et al., 2004, 2005; WIRTH; WALTON; FEDERICI, 2000). Como descrito na seção 2.8, a combinação de Bin com toxinas do Bti é ativa para larvas resistentes unicamente à toxina Bin, devido a uma ação em sinergia de toxinas que possuem receptores ou sítios alvos diferentes. Outro aspecto analisado neste trabalho foi o efeito que combinações da toxina Bin com toxinas do Bti podem exercer sobre larvas resistentes.

3 JUSTIFICATIVA

O controle de vetores é uma ferramenta necessária para reduzir ou interromper o ciclo de transmissão de doenças. Além disso, dentro do conceito de “cidade saudável” as ações de combate aos insetos têm um papel importante nas condições do ambiente urbano e conseqüentemente na melhoria da qualidade de vida das populações. Em 2003 a Prefeitura da cidade do Recife deu início ao Programa de Controle da Filariose como parte de um projeto para eliminação da filariose nas Américas, preconizado pela Organização Mundial de Saúde. Dentre as ações deste programa está incluído o uso do *Bacillus sphaericus*, como agente larvicida do vetor *Culex quinquefasciatus*.

Os primeiros eventos do processo de intoxicação das larvas pelo *B. sphaericus* estão bem caracterizados, assim como a identificação e sequenciamento do receptor para a toxina binária (Bin) produzida por esta bactéria. Entretanto, poucos estudos foram realizados no intuito de compreender os eventos que ocorrem após a interação da toxina Bin com o seu receptor, que desencadeiam os danos ao epitélio intestinal de larvas de *C. quinquefasciatus*. Outras toxinas, como a Cry48Aa e Cry49Aa, recentemente caracterizadas no *B. sphaericus* cepa IAB59, ou associações da toxina Bin com toxinas Cry ou Cyt do Bti são eficazes em superar a resistência à toxina Bin, apresentada por algumas colônias de *C. quinquefasciatus*. Porém, as alterações citopatológicas que ocorrem no intestino das larvas não foram descritas e a caracterização ultra-estrutural desses efeitos são fundamentais para a compreensão do modo de ação dessas toxinas inseticidas. Considerando as vantagens do uso do *B. sphaericus* como biolarvicida e o papel relevante que esse organismo tem hoje em programas de controle de vetores, é de grande importância científica e prática o melhor entendimento desse entomopatógeno na busca de soluções para o seu uso racional, bem como para o desenvolvimento de novos biolarvicidas.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Quais os efeitos citopatológicos causados pelas toxinas Cry48Aa/Cry49Aa e pela combinação da toxina Bin/Cry11Aa e Bin/Cyt1Aa em células do epitélio intestinal de larvas de *Culex quinquefasciatus* resistentes ao *Bacillus sphaericus*?

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Caracterizar o efeito da ação de toxinas das bactérias entomopatógenas *Bacillus sphaericus* e *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis* sobre a ultra-estrutura das células do epitélio intestinal de larvas de *Culex quinquefasciatus*, visando contribuir para o conhecimento do seu modo de ação.

5.2 Objetivos específicos

- Comparar a morfologia das células do epitélio intestinal de larvas do 4º estágio da colônia susceptível (S) e de uma colônia resistente à toxina Bin do *B. sphaericus* cepa 2362 (R2362), que não expressa o receptor desta toxina.
- Comparar os efeitos citopatológicos da toxina Bin do *B. sphaericus* 2362 no mesêntero de larvas da colônia S e da colônia R2362.
- Caracterizar a ação da nova toxina Cry48Aa/Cry49Aa do *B. sphaericus* cepa IAB59, nas células de larvas das colônias susceptíveis a estas toxinas (S e R2362).
- Caracterizar os efeitos citopatológicos causados por associações da toxina Bin com a toxina Cry11Aa ou com a toxina Cyt1A do *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis* no mesêntero de larvas da colônia R2362.

6. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram avaliados os efeitos de toxinas produzidas pelo *Bacillus sphaericus* (Bsp), individualmente, ou em combinação com toxinas do *B. thuringiensis* svar. *israelensis* (Bti) em células do epitélio digestivo de larvas de diferentes colônias do *Culex quinquefasciatus*, conforme ilustra o esquema abaixo (Fig 11).

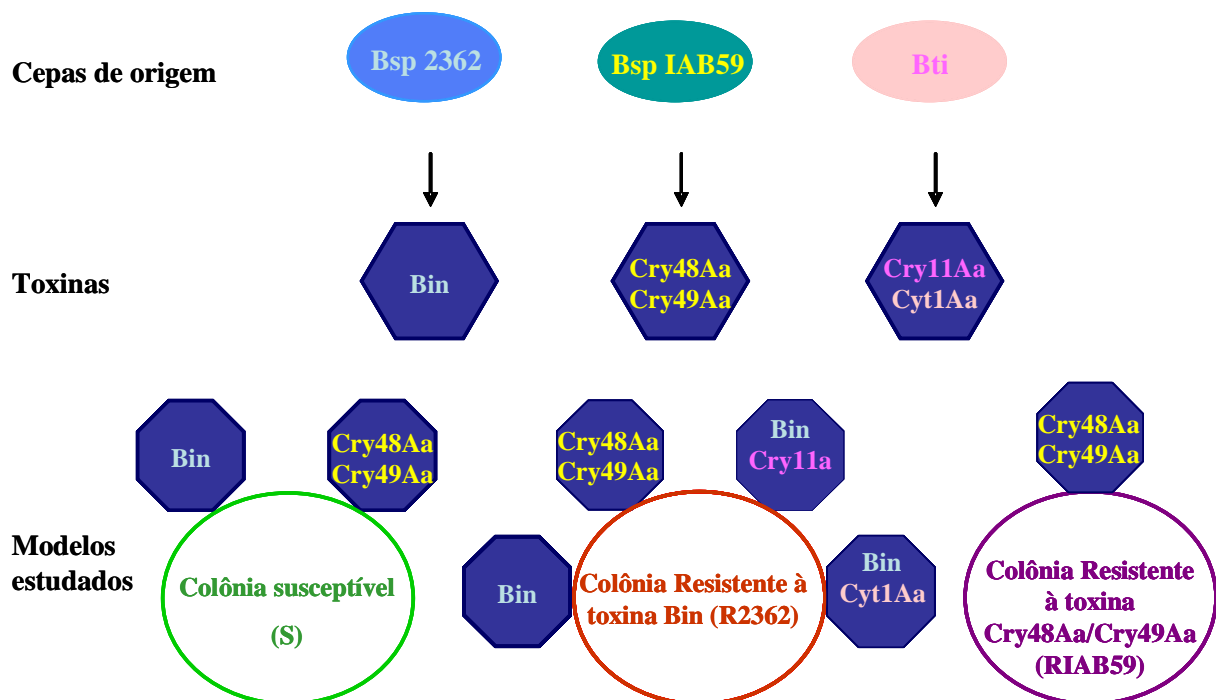


Figura 11 – Toxinas produzidas por bactérias entomopatógenas e colônias de *Culex quinquefasciatus*, susceptível (S) e resistente ao *Bacillus sphaericus* cepa 2362 (R2362), utilizadas neste estudo para avaliar a ação das toxinas na ultra-estrutura das células do epitélio intestinal das larvas.

6.1 Colônias de *Culex quinquefasciatus*

As larvas do 4º estágio de *Culex quinquefasciatus* utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de três colônias mantidas no insetário do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ (CPqAM/FIOCRUZ). As características de cada colônia estão descritas a seguir.

- **Colônia susceptível (S).** Colônia de referência, fundada a partir de ovos coletados em criadouros de bairros da região Metropolitana do Recife e mantida há mais de dez anos no insetário. As larvas desta colônia são susceptíveis a todas as toxinas produzidas pelas bactérias entomopatógenas analisadas neste estudo.

- **Colônia resistente ao *B. sphaericus* cepa 2362 (R2362).** Colônia selecionada sob condições de laboratório com a cepa 2362 do Bsp, cujo principal fator inseticida é a toxina binária (Bin). Larvas desta colônia apresentam uma razão de resistência (RR) à toxina Bin superior a 100.000 vezes (PEI et al., 2002), em relação à colônia S. A colônia atingiu esta RR após 46 gerações e é mantida sob pressão de seleção a fim de manter um nível estável e elevado de resistência. A refratariedade desta colônia é devido à ausência do receptor da toxina Bin, a α -glicosidase Cqm1, na membrana apical das células do epitélio intestinal das larvas (OLIVEIRA et al., 2004). Esta colônia não apresenta resistência cruzada com toxinas da família Cry ou Cyt sendo, portanto, susceptível às toxinas Cry48Aa/Cry49Aa produzidas pelo Bsp IAB59, e às toxinas Cry11Aa e Cyt1Aa produzidas pelo Bti, que foram analisadas neste estudo.

- **Colônia resistente ao *B. sphaericus* cepa IAB59 (RIAB59).** Colônia selecionada com o Bsp IAB59, sob condições de laboratório. Esta cepa do Bsp possui como fatores tóxicos, além da toxina Bin, as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa (JONES et al., 2007). Esta colônia foi selecionada a partir da colônia S e apresentou uma RR ao Bsp IAB59 de aproximadamente 40.000 vezes após 72 gerações de seleção (AMORIM et al., 2007).

Os insetos das três colônias utilizadas são mantidos no insetário do Departamento de Entomologia-CPqAM a 26 ± 2 °C, 70% de umidade relativa e fotoperíodo 12:12 h (claro:escuro). Os adultos são alimentados com solução de sacarose a 10% e as fêmeas também fazem o repasto sanguíneo em *Gallus sp.* As larvas são mantidas em recipientes com água declorada e alimentadas com ração para gatos Whiskas®.

6.2 Toxinas recombinantes

Neste estudo foram analisadas as seguintes toxinas: Bin do Bsp 2362, Cry48Aa/Cry49Aa do Bsp IAB59, além da Cry11Aa e Cyt1Aa do Bti. Todas as toxinas foram produzidas sob a forma recombinante por cepas do Bti transformadas com plasmídeos contendo os genes que codificam as respectivas toxinas, individualmente. Culturas esporuladas contendo uma mistura de esporos e cristais protéicos de cada uma das pró-toxinas recombinantes foram liofilizadas e utilizadas nos bioensaios para avaliar sua ação nas células epiteliais do intestino das larvas alvo deste estudo.

- **Toxina Binária (Bin).** Esta toxina é o principal fator inseticida das cepas de Bsp que possuem alta toxicidade para culicídeos, tais como as cepas 2362, 1593, C3-41 e IAB59. Neste trabalho foram avaliados os efeitos da toxina Bin recombinante no mesêntero de larvas das colônias S e R2362 de *C. quinquefasciatus*. A toxina recombinante foi produzida no Bti cepa 4Q2-81 que naturalmente não expressa nenhuma toxina. Esta cepa foi transformada com o plasmídeo pGSP10 que contém os genes que codificam as subunidades BinA e BinB da cepa 1593 do Bsp (BOURGOUIN et al., 1990). A cepa foi gentilmente cedida por J.F. Charles e C. Nielsen-LeRoux (Instituto Pasteur, França). O Bti cepa 4Q2-81/pGSP10 foi cultivado em meio para *B. thuringiensis* (LECADET et al., 1980) suplementado com glicose (1%) e tetraciclina (25 µg/mL). As culturas foram mantidas a 30 °C, sob agitação, durante 72 h até alcançarem um nível de esporulação $\geq 70\%$, analisado através de observação ao microscópio óptico. A biomassa presente nas culturas esporuladas foi recuperada por centrifugação, lavada sequencialmente com NaCl 1 M/EDTA 10 mM e EDTA 10 mM e armazenada a -20 °C. Posteriormente, a biomassa foi liofilizada e o pó contendo uma mistura de esporos/cristais foi utilizado para tratar as larvas selecionadas para os bioensaios.

- **Toxinas Cry48Aa e Cry49Aa.** Estas toxinas foram caracterizadas, recentemente, como o novo fator tóxico do Bsp IAB59, cepa que também produz a toxina Bin (JONES et al., 2007). Estas novas toxinas agem em sinergia na razão molar de 1:1 e têm atividade inseticida tanto para larvas susceptíveis como para larvas resistentes às cepas de Bsp que produzem como único elemento tóxico a toxina Bin (JONES et al., 2007; PEI et al., 2002). Neste estudo foram

avaliados os efeitos de Cry48Aa/Cry49Aa nas células do epitélio intestinal de larvas das colônias S e R2362, que são susceptíveis a estas toxinas, bem como em larvas da colônia RIAB59 resistente a todas as toxinas do Bsp IAB59, que foi selecionada previamente sob condições de laboratório (AMORIM et al., 2007). As toxinas recombinantes foram produzidas individualmente no Bti cepa 4Q7 transformada com os plasmídeos pSTAB135 e pHTP49, contendo os genes que codificam as toxinas Cry48Aa e Cry49Aa, respectivamente. As cepas foram gentilmente cedidas por C. Berry (Universidade de Cardiff, Reino Unido). O protocolo para a obtenção da biomassa e dos pós liofilizados contendo esporos/cristais foi o mesmo utilizado para a toxina Bin, exceto pelo uso da eritromicina (25 µg/mL) como antibiótico presente no meio de cultura. Os pós liofilizados obtidos de cada toxina foram misturados na proporção de 1:1 (peso/peso) para o tratamento das larvas nos bioensaios.

- **Toxinas Cry11Aa e Cyt1Aa.** O Bti produz uma inclusão cristalina paraesporal na qual comumente estão contidas quatro proteínas tóxicas (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa) que interagem em sinergia produzindo alta atividade larvicida para culicídeos (CRICKMORE et al., 1995; IBARRA; FEDERICI, 1986; PONCET et al., 1994; WU; CHANG, 1985). Combinações da toxina Bin do Bsp com a toxina Cry11Aa ou Cyt1Aa são tóxicas para larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes à toxina Bin (WIRTH et al., 2005; WIRTH; WALTON; FEDERICI, 2000). Os efeitos citopatológicos causados por misturas da toxina Bin com as toxinas Cry11Aa e Cyt1Aa, individualmente, no mesêntero de indivíduos da colônia R2362 foram analisados neste trabalho. As toxinas Cry11Aa e Cyt1Aa recombinantes foram produzidas separadamente no Bti 4Q2-81, transformado com os plasmídeos pHT640 e pWF45, respectivamente. As cepas foram gentilmente cedidas por A. Delécluse (Instituto Pasteur, França) e B. Federici (Universidade da Califórnia-Riverside, E.U.A.). O cultivo das cepas, bem como a obtenção da biomassa e dos pós liofilizados foram realizados segundo o protocolo descrito para as toxinas Cry48Aa e Cry49Aa. As misturas da toxina Bin + Cry11Aa e Bin + Cyt1Aa foram preparadas na proporção de 3:1 (peso/peso) com base em trabalhos anteriores (WIRTH et al., 2005; WIRTH; FEDERICI; WALTON, 2000; WIRTH; WALTON; FEDERICI, 2000).

6.3 Ensaios de toxicidade *in vivo*

Os bioensaios foram realizados de acordo com o protocolo padrão recomendado pela Organização Mundial de Saúde (1985). Para cada amostra de pó liofilizado contendo esporos/cristais de uma toxina recombinante testada foi preparada uma suspensão a 5 g/L, posteriormente diluída de acordo com a concentração (mg/L) utilizada nos ensaios. Para cada tratamento, grupos de 20 larvas jovens do 4º estágio, ou seja, coletadas em até 1 h após a muda, foram colocados em recipientes contendo 100 mL de água mineral. Os grupos foram tratados com uma alíquota da suspensão bacteriana necessária para atingir a concentração desejada e receberam uma pequena quantidade de alimento. Os grupos experimentais e as concentrações empregadas para as diferentes toxinas estão descritos no item 6.4. A mortalidade das larvas dos grupos experimentais tratados e não tratados de todos os ensaios foi registrada após 48 h. A concentração letal de algumas toxinas para 90% das larvas expostas durante 48 h (CL₉₀), como as combinações Bin/Cry11Aa e Bin/Cyt1Aa, foi determinada a partir de dados de bioensaios segundo Pei et al. (2002). Os ensaios foram realizados com a colaboração da Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira.

6.4 Grupos experimentais

A primeira abordagem desse estudo foi descrever e comparar a morfologia das células do epitélio intestinal de larvas não tratadas da colônia susceptível e da colônia resistente à toxina Bin. A segunda foi avaliar os efeitos citopatológicos das toxinas Bin, Cry48Aa/Cry49Aa, Bin/Cry11Aa e Bin/Cyt1Aa em larvas tratadas das respectivas colônias analisadas. Todos os grupos experimentais foram compostos por 20 larvas de *C. quinquefasciatus* coletados após a muda para o 4º estágio.

Para avaliar a morfologia das células intestinais de indivíduos das colônias S e R2362, as larvas foram dissecionadas 30 min, 4, 6 e 48 h após a muda para o 4º estágio. Outras amostras de larvas das duas colônias, fixadas 48 h após a muda foram submetidas a um ensaio citoquímico para detecção de lipídeos conforme descrito na seção 6.7.

Para caracterizar os efeitos citopatológicos causados pelas toxinas recombinantes no epitélio intestinal, as larvas foram dissecionadas 1 e 6 h após o tratamento e processadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET). Em todos os ensaios, um grupo não tratado também foi dissecionado e processado para MET, enquanto dois grupos tratados e dois grupos não tratados foram mantidos por 48 h para registro da mortalidade. Os diferentes grupos experimentais analisados e as respectivas concentrações das toxinas utilizadas neste estudo estão relacionados na Tabela 2. O efeito da toxina Bin foi avaliado em larvas da colônia S tratadas com 0,1 mg/L, que é a concentração letal para 90% das larvas (CL_{90}) após 48 h de exposição, e as larvas resistentes R2362 foram tratadas com uma concentração de 10 mg/L, 100 vezes superior a esta CL_{90} .

Os efeitos das novas toxinas Cry48Aa e Cry49Aa do Bsp IAB59 sobre o epitélio intestinal de larvas susceptíveis foram avaliados utilizando a CL_{90} , para essas larvas, da mistura 1:1 (peso/peso) das toxinas, que foi 10 e 20 mg/L, respectivamente, para as larvas das colônias S e R2362. Para larvas da colônia RIAB59, resistente às toxinas, a concentração usada foi de 30 mg/L.

As CL_{90} de combinações da toxina Bin/Cry11Aa ou Bin/Cyt1Aa, misturadas na proporção de 3:1 (peso/peso), foram 7,5 e 4,0 mg/L, respectivamente. As misturas de toxinas foram utilizadas para o tratamento de larvas R2362 com o objetivo de avaliar a ação destas combinações no epitélio intestinal de larvas de uma colônia resistente unicamente à toxina Bin (R2362). Esta avaliação foi feita com a colaboração da Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira do Departamento de Entomologia do CPqAM/FIOCRUZ.

Tabela 2 – Grupos experimentais de larvas do 4º estágio de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia susceptível (S) e de duas colônias resistentes ao *Bacillus sphaericus* cepas 2362 (R2362) e IAB59 (RIAB59), submetidas aos tratamentos com as toxinas recombinantes Bin e Cry48Aa/Cry49Aa, produzidas pelo *Bacillus sphaericus*, além de associações de Bin com toxinas Cry11Aa e Cyt1Aa do *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis*.

Colônias	Grupos	Toxinas (mg/L)			
		Bin	Cry48 + Cry49 (1:1 p/p)	Bin + Cry11Aa (3:1 p/p)	Bin + Cyt1Aa (3:1 p/p)
S	A*	0,0	-	-	-
	B	0,1	-	-	-
	C	-	10,0	-	-
R2362	D*	0,0	-	-	-
	E	10,0	-	-	-
	F	-	20,0	-	-
	G	-	-	7,5	-
	H	-	-	-	4,0
RIAB59	I*	0,0	-	-	-
	J	-	30,0	-	-

(*) Grupos de larvas não tratadas utilizadas como controle.

6.5 Dissecção das larvas

Dez larvas de cada grupo experimental foram coletadas e paralisadas em gelo por alguns minutos para a retirada do tubo intestinal, sob um microscópio binocular. Após a remoção do alimento, envolvido pela membrana peritrófica, e dos túbulos de Malpighi, o estômago posterior, um dos principais alvos da toxina Bin no epitélio intestinal de *Culex*, foi fixado em uma solução de glutaraldeído grau I a 3,0% em tampão cacodilato de sódio ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_4$) 0,1 M, pH 7,2, a 4 °C, por 24 h e posteriormente processado para MET.

6.6 Processamento para microscopia eletrônica de transmissão

Após a dissecção e fixação, o estômago posterior foi lavado três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e pós-fixado por 1 h à temperatura ambiente (TA) em uma solução contendo: tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1%, cloreto de cálcio (CaCl_2) 5 mM e

ferricianeto de potássio $K_3[Fe(CN)_6]$ a 0,8% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Posteriormente, os espécimes foram desidratados em uma série de concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 3 vezes a 100%), infiltrados lentamente em resina epóxi SPI-PON 812® (Sigma), incluídos na mesma resina e polimerizados em estufa a 70 °C por 72 h. Os cortes ultrafinos (60 a 70 nm) foram obtidos por ultramicrotomia, coletados em grades de níquel com malha de 300 orifícios e contrastados com solução aquosa de acetato de uranila a 5% por 1 h e, com citrato de chumbo a 1% por 3 min. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico Zeiss EM 109. Seções semi-finas (400 nm) foram coradas com azul de Toluidina e observadas em microscópio óptico Zeiss Axiophot para a descrição do aspecto geral do intestino das larvas.

6.7 Detecção de lipídeos pelo método do ósmio-imidazol

Um ensaio citoquímico para a detecção de ácidos graxos insaturados nas células de larvas fixadas 48 h após a muda para o 4º estágio, foi realizado segundo Angermüller e Fahimi (1982). Após a dissecação, as larvas foram fixadas por 2 h à TA em uma solução de glutaraldeído a 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. As amostras foram lavadas duas vezes no mesmo tampão, uma vez no tampão imidazol 0,1 M, pH 7,2 e pós-fixadas por 30 min à TA com tetróxido de ósmio a 2% em tampão imidazol 0,1 M, pH 7,5. Subsequentemente, as amostras foram lavadas em tampão imidazol, desidratadas em solução crescente de acetona e infiltradas e polimerizadas em resina epóxi SPI-PON 812® (Sigma). As seções ultrafinas obtidas por ultramicrotomia foram observadas sem contrastação em microscópio eletrônico Zeiss EM 109.

7 RESULTADOS

7.1 Morfologia das células do epitélio intestinal de larvas das colônias S e R2362

O primeiro aspecto investigado neste trabalho foi a morfologia das células do epitélio intestinal de larvas não tratadas, de uma colônia susceptível (S) e de uma colônia resistente à toxina Bin do Bsp (R2362), após a muda para o 4º estágio. Seções semi-finas mostraram que o estômago posterior de larvas S era constituído por um epitélio simples composto de numerosas células colunares, com microvilosidades abundantes, além da presença de algumas células regenerativas (Fig. 12, A e B). Este último tipo celular foi caracterizado como células pequenas, presentes na porção basal do epitélio e que não apresentavam superfície de contato com o lúmen, nem microvilosidades (Fig. 12, C). O epitélio intestinal apresentou-se separado de outras estruturas como os músculos longitudinais e transversais por uma delgada lâmina basal (Fig. 13, A). Células mióides, com mitocôndrias de forma arredondada e numerosos miofilamentos, foram frequentemente observadas (Fig. 13, A). As células epiteliais apresentaram abundante retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias de formas variadas (Fig. 13, A-C). As células epiteliais de larvas da colônia S, disseccionadas 48 h após a muda para o 4º estágio, apresentaram algumas inclusões elétron-lucentes na região basal (Fig. 13, B), mas não na região apical das células colunares (Fig. 13, C).

As células de larvas R2362 disseccionadas 30 min e 4 h após a muda para o 4º estágio apresentaram uma morfologia geral similar às células de larvas S, analisadas nos respectivos tempos (dados não apresentados). Em larvas R2362 fixadas 6 h após a muda, as células mostraram um aspecto normal da lâmina basal, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias, entretanto, ao contrário do observado nas larvas S neste momento do desenvolvimento, numerosas inclusões elétron-lucentes foram detectadas na porção basal das células (Fig. 13, D). Uma análise quantitativa destas inclusões presentes nas células colunares foi realizada em larvas de ambas as colônias, 6 h após a muda para o 4º estágio. Em larvas R2362 foi observado uma média de 185 inclusões por perfil celular versus 6 inclusões por perfil celular em larvas S (Tabela 3). Este aspecto morfológico foi característico das células de larvas R2362, sendo observado de forma mais evidente em espécimes disseccionadas 48 h após a muda, quando estas inclusões se tornaram abundantes e apresentaram um tamanho aumentado (Fig. 13, E). Esta diferença marcante na quantidade de inclusões, escassa em

células de larvas S, e presentes em grande número na maioria de células R2362 pode também ser observada nas imagens mostradas no Apêndice A1 (Figs. S e R2362). Amostras do intestino de larvas R2362 dissecionadas 48 h após a muda foram submetidas a um ensaio citoquímico para investigar a natureza das inclusões elétron-lucentes. Após a fixação em uma solução de tetróxido de ósmio e tampão imidazol as células exibiram um contraste elétron-denso dentro das inclusões revelando sua composição lipídica (Fig. 13, F).

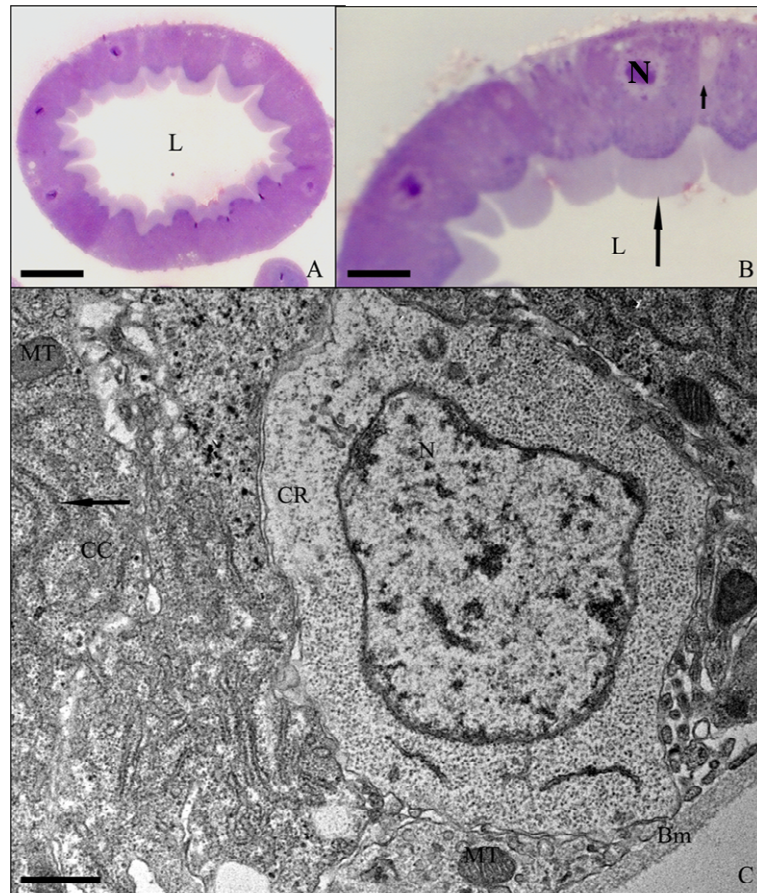


Figura 12 – Células do intestino de larvas do 4º estágio de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia susceptível. A. Aspecto geral do epitélio do estômago posterior observado através de um corte transversal semi-fino por microscopia óptica; lúmen (L). Barra de escala = 25 μm . B. Células colunares ricas em microvilosidades (seta longa) e célula regenerativa (seta curta) da mesma seção observada em A; núcleo (N); lúmen (L). Barra de escala = 10 μm . C. Micrografia eletrônica de transmissão de uma seção transversal ultrafina mostrando uma célula regenerativa (CR) presente na região basal do epitélio; célula colunar (CC) rica em retículo endoplasmático (seta) e mitocôndrias (Mt); núcleo (N); membrana basal (Mb). Barra de escala = 1 μm .

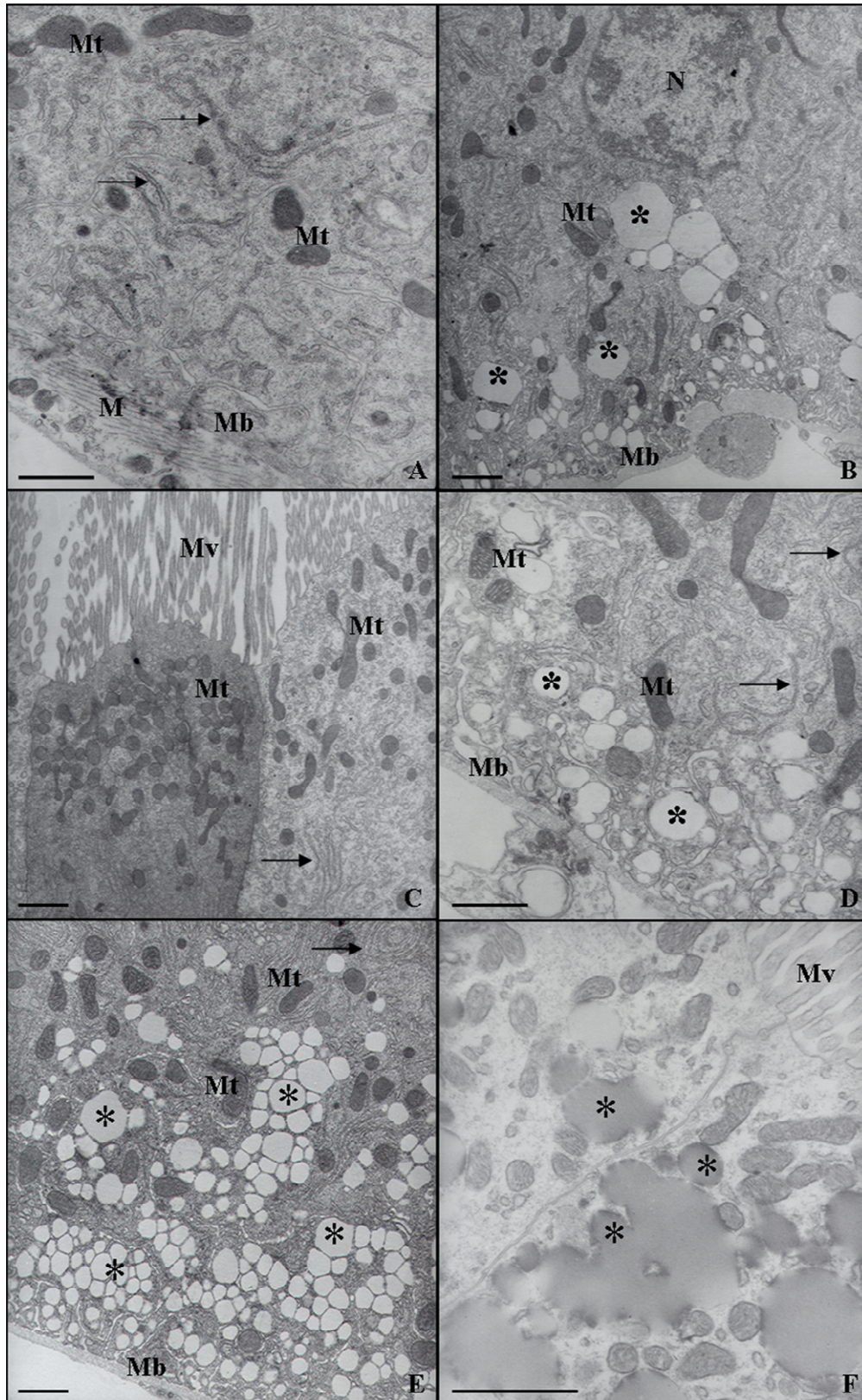


Figura 13 – Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4º estágio de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia susceptível (S) e uma colônia resistente à toxina Bin do *Bacillus sphaericus* (R2362), analisadas em diferentes momentos após a muda para o 4º estágio. A. Célula de uma larva S fixada 6 h após a muda mostra a membrana basal (Mb) subjacente à célula rica em retículo endoplasmático rugoso (setas); mitocôndrias alongadas (Mt) podem ser observadas dispersas no citoplasma das células epiteliais e no interior das células mióides (M). B. Célula de uma larva S

fixada 48 h após a muda; presença de inclusões elétron-lucentes (*) na região basal da célula; membrana basal (Mb) e mitocôndrias (Mt) estão preservadas; núcleo (N) na posição basal. C. Região apical da célula de larvas S fixadas 48 h após a muda; numerosas mitocôndrias (Mt) e retículo endoplasmático rugoso (seta) podem ser observados; ausência de inclusões elétron-lucentes nesta região da célula; microvilosidades (Mv). D. Célula de uma larva R2362 fixada 6 h após a muda; várias inclusões elétron-lucentes (*) são observadas próximas à região basal; retículo endoplasmático rugoso (setas) e mitocôndrias (Mt) estão bem preservados; a membrana basal (Mb) apresenta aspecto normal. E. Células de uma larva R2362 fixada 48 h após a muda; as inclusões elétron-lucentes (*) apresentam um aumento no número e tamanho e estão concentradas na região basal da célula; o retículo endoplasmático rugoso (seta); mitocôndrias (Mt) sem alterações; membrana basal (Mb). F. Células de uma larva R2362 fixada 48 h após a muda e submetida ao ensaio citoquímico utilizando o complexo ósmio-imidazol; uma marcação elétron-densa é observada no interior e na periferia das inclusões (*) demonstrando a natureza lipídica dessas estruturas; microvilosidades (Mv). Barra de escala = 1 μ m.

Tabela 3 – Número de inclusões lipídicas presentes nas células do epitélio intestinal de larvas de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia susceptível (S) e uma colônia resistente (R2362) ao *Bacillus sphaericus*, analisadas 6 h após a muda para o 4º estágio.

Colônia	Nº de células analisadas	Células com inclusões		Nº total de inclusões
		Nº de células	\bar{X} inclusões/célula \pm D.P.	
S	20	2	60,0 \pm 15,5	120
R2362	10	10	185,4 \pm 43,7	1.854

7.2 Efeitos da toxina Bin em larvas da colônia S e R2362

A análise da morfologia das células do epitélio intestinal foi seguida pela comparação dos efeitos da toxina Bin sobre as células de larvas do 4º estágio da colônia susceptível (S) e da colônia resistente à toxina Bin do Bsp (R2362). Os grupos de larvas tratadas da colônia S mostraram uma mortalidade de cerca de 90% após 48 h e os grupos de larvas R2362 tratados, bem como os grupos não tratados de ambas as colônias, não apresentaram níveis significantes de mortalidade (Tabela 4). O intestino de larvas S não tratadas mostrou uma camada bem preservada de células epiteliais, abundância de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, e grânulos de glicogênio foram observados próximos ao labirinto basal, situado em posição subjacente à lâmina basal (Fig. 14, A). O lúmen intestinal estava delimitado pela membrana apical composta por numerosas microvilosidades (Fig. 14, B). Os danos iniciais nas células de larvas S foram observados após 1 h de tratamento. O retículo endoplasmático estava fragmentado formando numerosas vesículas pelo citoplasma (Fig. 14, C) e as

mitocôndrias presentes na região basal das células epiteliais mostraram-se intumescidas quando comparadas com as mitocôndrias presentes nas células mióides (Fig. 14, D). A presença de grânulos elétron-densos também foi observada (dados não mostrados). As principais alterações citopatológicas foram observadas nas larvas S dissecionadas 6 h após o tratamento. O citoplasma apresentou um aspecto denso e vacúolos de tamanhos diferentes, contendo debris celulares, foram observados na região apical das células (Fig. 14, E). O intumescimento mitocondrial, a formação de vacúolos, quebra do retículo endoplasmático e uma extensiva perda de microvilosidades foram características marcantes decorrentes da ação da toxina Bin nas células de larvas S (Fig. 14, E e F).

A análise comparativa das células do intestino de larvas R2362 não tratadas mostrou um aspecto similar ao de larvas S não tratadas (Fig. 15, A). Alguns efeitos foram detectados nas células de larvas R2362 tratadas, que são desprovidas do receptor Cqm1 na membrana das células do epitélio intestinal. Larvas R2362 analisadas 1 e 6 h após o tratamento mostraram o aparecimento de grânulos elétron-densos e a quebra do retículo endoplasmático rugoso produzindo pequenas vesículas cobertas por ribossomos (Fig. 15, B e C). Em 6 h as mitocôndrias presentes em ambas as regiões das células estavam intumescidas e as cristas mitocondriais apresentaram um aspecto desorganizado (Fig. 15, C e D), enquanto as microvilosidades não apresentaram alterações evidentes e a ocorrência de vacúolos não foi observada (Fig. 15, D). Como previamente descrito, os grupos de larvas R2362 tratadas não mostraram mortalidade significativa ($\approx 4\%$). Os efeitos da toxina Bin, ao contrário daqueles observados em larvas S, não causam a mortalidade de larvas desprovidas do receptor Cqm1.

Tabela 4 – Mortalidade de larvas do 4^o estágio de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia susceptível (S) e uma colônia resistente à toxina binária (Bin) do *Bacillus sphaericus* (R2362) tratadas com um pó liofilizado contendo cristais da toxina Bin, após 48 h.

Colônias	Grupos tratados			Grupos não tratados		
	N	% Mortalidade	N MET ^a	N	% Mortalidade	N MET ^a
S	160	86,3	80	160	3,1	40
R2362	180	3,8	80	200	4,4	80

^(a) Amostras de larvas dos grupos tratados e de um grupo não tratado, processados para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

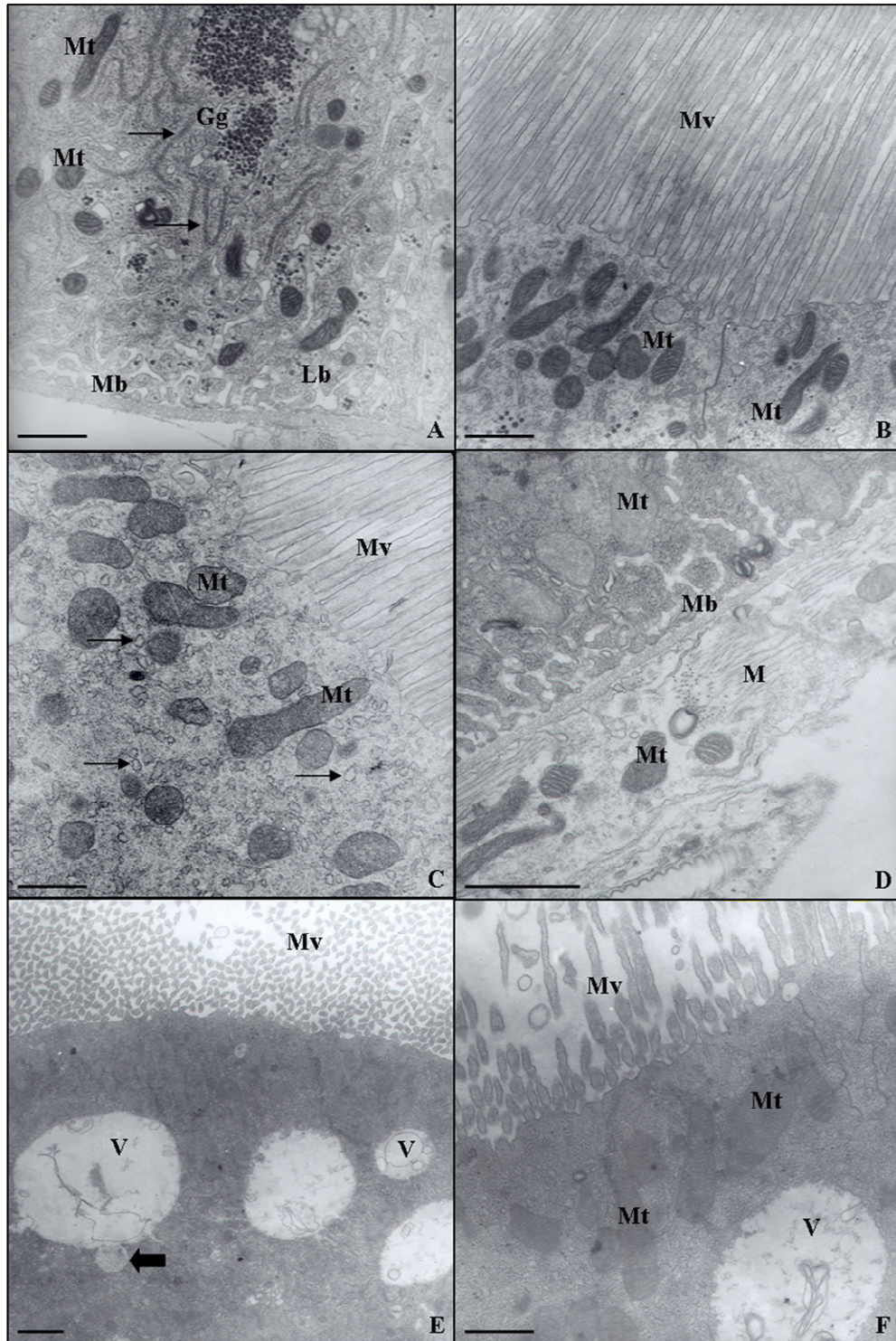


Figura 14 – Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4º estágio de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* susceptível (S) à toxina Bin do *Bacillus sphaericus*. A. Célula colunar de uma larva não tratada rica em retículo endoplasmático rugoso (setas), mitocôndrias (Mt) e glicogênio (Gg); labirinto basal (Lb); membrana basal (Mb). B. Região apical da célula de uma larva não tratada composta por numerosas microvilosidades (Mv) e um grande número de mitocôndrias (Mt). C. Ruptura do retículo endoplasmático rugoso (setas) na região apical da célula de uma larva tratada por 1 h; as mitocôndrias (Mt) apresentam um intumescimento inicial, porém as microvilosidades (Mv) estão intactas. D. Intumescimento das mitocôndrias (Mt) presentes na região basal da célula; as mitocôndrias presentes nas células mióides (M) não mostram danos; membrana basal (Mb). E. Célula de uma larva tratada por 6 h mostrando o aparecimento de vacúolos no

citoplasma (V); uma pequena vesícula contendo um material elétron-denso pode ser observada em fusão com um grande vacúolo (seta larga); neste tempo de tratamento as microvilosidades estão rompidas (Mv). F. Célula de uma larva tratada por 6 h mostrando uma ruptura intensa das microvilosidades (Mv); presença de um grande vacúolo (V) contendo debris celulares e intumescimento das mitocôndrias (Mt). Barra de escala = 1 μ m.

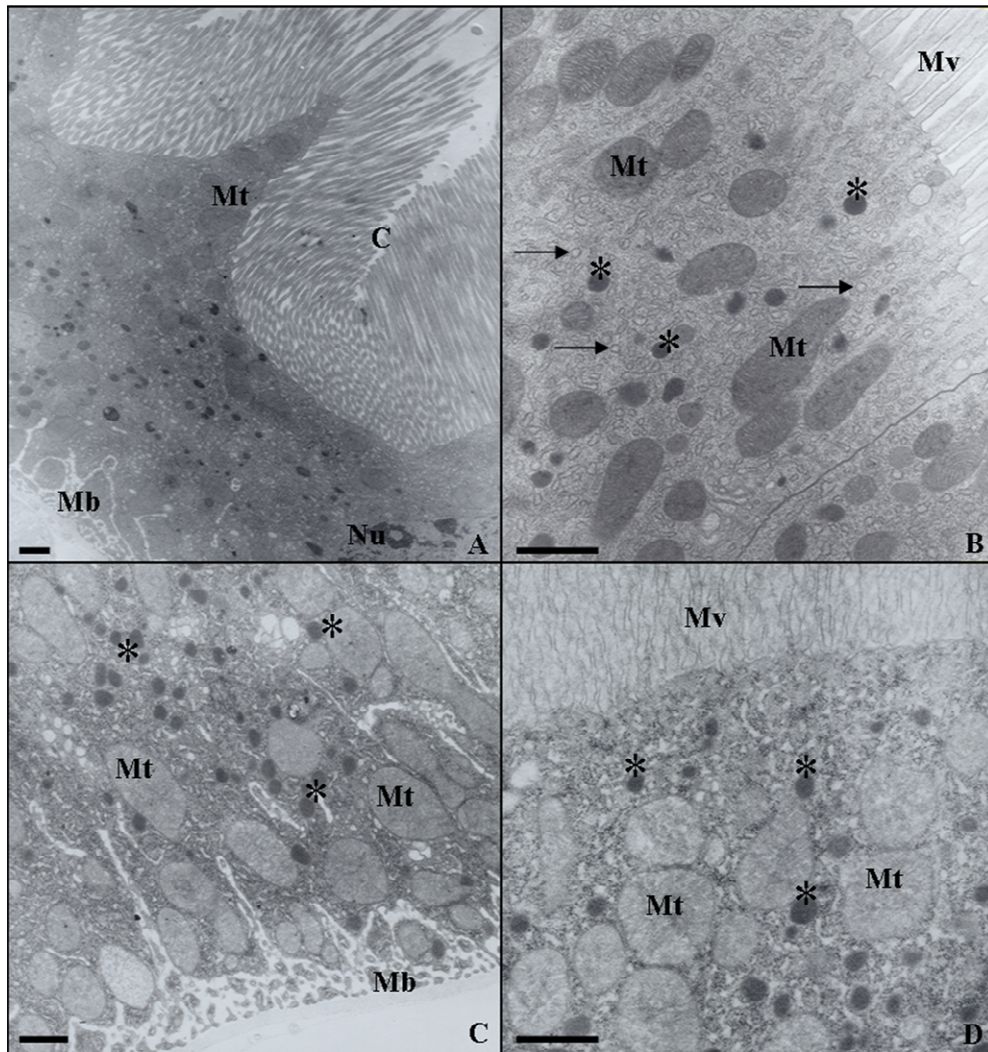


Figura 15 – Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4^o estágio de uma colônia do *Culex quinquefasciatus* resistente à toxina Bin do *Bacillus sphaericus* (R2362). A. Célula de uma larva não tratada mostrando numerosas mitocôndrias (Mt) na região apical; as microvilosidades foram observadas ocasionalmente invaginadas no epitélio formando criptas (C); membrana basal (Mb); núcleo (N). B. Célula epitelial de larvas tratadas por 1 h mostrando o aparecimento de grânulos elétron-densos (*) e pequenas vesículas cobertas por ribossomos (setas); as mitocôndrias (Mt) e as microvilosidades (Mv) permaneceram intactas. C. Célula de uma larva tratada por 6 h apresentando um citoplasma denso; as mitocôndrias (Mt) estão um pouco intumescidas e apresentam uma matriz desorganizada; presença de grânulos elétron-densos (*); membrana basal (Mb). D. Célula epitelial de uma larva tratada por 6 h apresentando microvilosidades preservadas, mitocôndrias (Mt) intumescidas e grânulos elétron-densos (*). Barra de escala = 1 μ m.

7.3 Efeitos das toxinas Cry48Aa e Cry49Aa em larvas das colônias S, R2362 e RIAB59

A ação das proteínas Cry48Aa e Cry49Aa, caracterizadas como uma nova toxina binária presente na cepa IAB59 do Bsp, foi investigada em larvas de 3 colônias: aquelas susceptíveis a todas às toxinas (S), larvas resistentes à toxina Bin e susceptíveis às toxinas Cry48Aa/Cry49Aa (R2362) e larvas resistentes ao Bsp IAB59 (RIAB59), que possui as três toxinas mencionadas. Os grupos de larvas S e R2362 tratadas mostraram uma mortalidade superior a 90% após 48 h de tratamento, não sendo observada uma mortalidade significativa no grupo tratado de larvas RIAB59, bem como nos grupos não tratados (Tabela 5).

As células de larvas da colônia S não tratadas apresentaram características morfológicas similares àquelas observadas nas seções 5.1 e 5.2., mostrando-se ricas em mitocôndrias e microvilosidades (Fig. 16, A). Uma hora após o tratamento uma visível alteração das mitocôndrias pôde ser observada. Estas se apresentaram intumescidas e mostraram uma intensa vacuolização com desorganização das cristas mitocondriais, sem rompimento da integridade da membrana externa (Fig. 16, B). No citoplasma também foram observadas pequenas vesículas, provavelmente oriundas da fragmentação do retículo endoplasmático, aparecimento de grânulos elétron-densos e a formação de vacúolos citoplasmáticos (Fig. 16, C). Neste momento, as microvilosidades apresentaram-se íntegras na maioria das células observadas (Fig. 16, D), no entanto, 6 h após o tratamento, estas estruturas mostraram-se completamente destruídas (Fig. 16, E). Seis horas após o tratamento também foram observadas mitocôndrias intumescidas, apresentando um início de vacuolização (Fig. 16, E), formação de inúmeras vesículas pelo citoplasma (Fig. 16, E e F) e aumento do número e tamanho dos vacúolos citoplasmáticos (Fig. 16, F).

As células de larvas não tratadas da colônia R2362 apresentaram aspecto similar aquele descrito em outros grupos controle, não expostos ao tratamento (Fig. 17, A). As larvas tratadas desta colônia, que são susceptíveis as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa, apresentaram os primeiros efeitos do tratamento após 1 h de exposição. A ruptura do retículo endoplasmático resultando na formação de pequenas vesículas por todo o citoplasma (Fig. 17, B e C) e a vacuolização mitocondrial sem ruptura da membrana externa foram os principais efeitos observados (Fig. 17, C), de forma similar ao detectado em larvas da colônia S. As microvilosidades não apresentaram alterações após 1 h de tratamento (Fig. 17, D), entretanto, após 6 h de tratamento, uma evidente perda dessas estruturas foi observada (Fig. 17, E e F),

além dos efeitos de vacuolização mitocondrial e ruptura do retículo (Fig. 17, E). Larvas S e R2362 apresentaram o mesmo padrão de alteração das microvilosidades, que foram detectados apenas 6 h após o tratamento.

Larvas da colônia RIAB59, que são resistentes ao conjunto de toxinas produzidas pela cepa IAB59 do Bsp, apresentaram apenas alterações discretas como o surgimento de grânulos elétron-densos nas células 1 e 6 h após o tratamento (dados não apresentados) e um aspecto denso do citoplasma (Fig. 18, A). As microvilosidades apresentaram-se íntegras (Fig. 18, B) e as mitocôndrias presente nas células de larvas desta colônia apresentaram intumescimento, porém o efeito de vacuolização não foi observado (Fig. 18, A e B).

Tabela 5 – Mortalidade de larvas do 4^o estágio de *Culex quinquefasciatus* de duas colônias susceptíveis (S e R2362) e de uma colônia resistente ao *Bacillus sphaericus* IAB59 (RIAB59) tratadas com um pó liofilizado contendo uma mistura de cristais das toxinas Cry48Aa e Cry49Aa na razão de 1:1 (p/p), após 48 h.

Colônias	Grupos tratados			Grupos não tratados		
	N	% Mortalidade	N MET ^a	N	% Mortalidade	N MET ^a
S	140	94,2	180	140	15,3	60
R2362	40	100,0	20	40	20,0	10
RIAB59	80	3,8	40	80	2,5	20

(^a) Amostras de larvas dos grupos tratados e de grupos não tratados processados para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

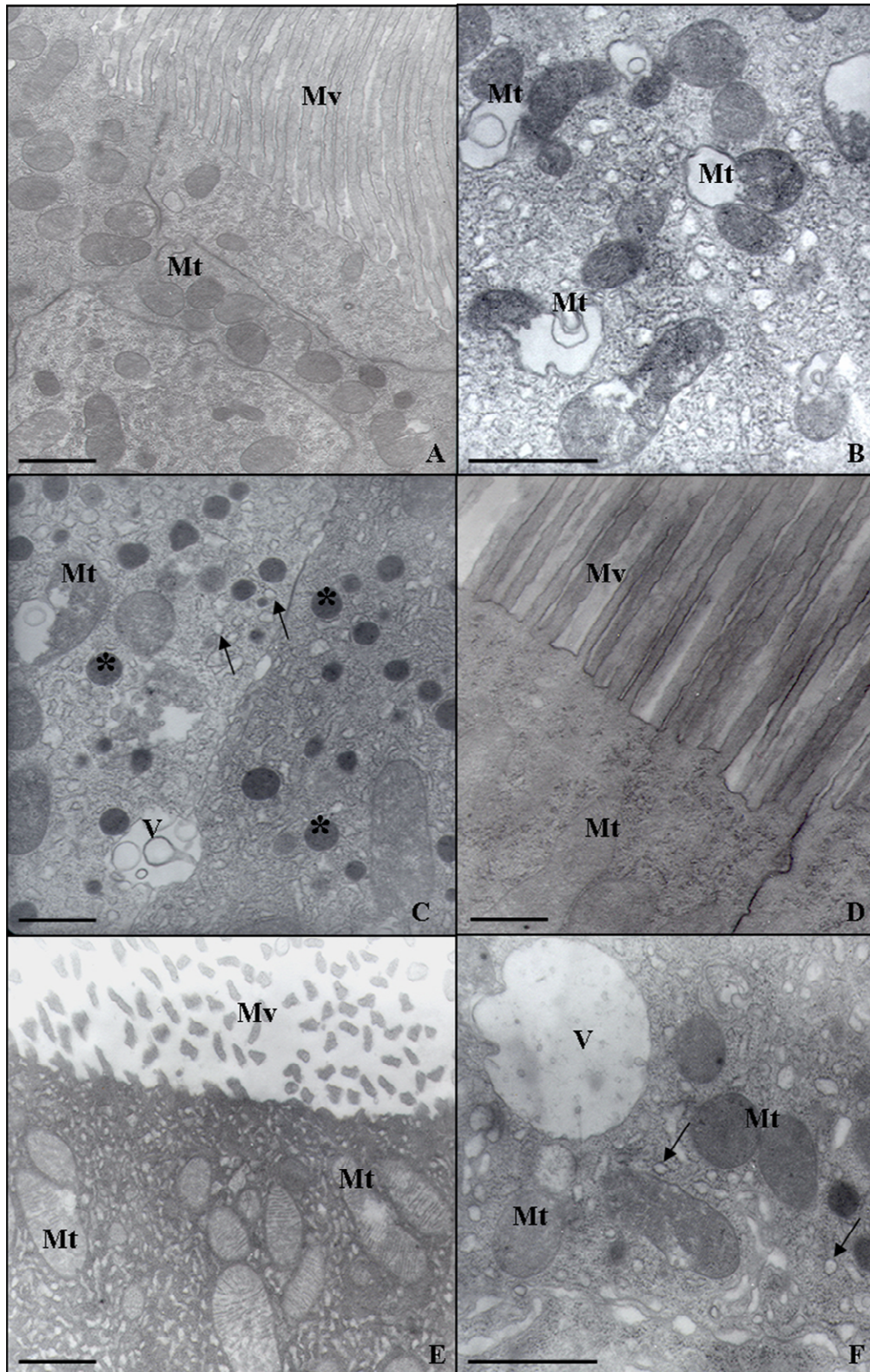


Figura 16 – Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4^o estágio de uma colônia do *Culex quinquefasciatus* susceptível (S) às toxinas Cry48Aa e Cry49Aa do *Bacillus sphaericus* cepa IAB59. A. Célula de uma larva não tratada rica em microvilosidades (Mv) e mitocôndrias (Mt). B. Células de larvas tratadas por 1 h apresentando vacuolização da matriz mitocondrial (Mt). C. Grânulos elétron-densos (*), a formação de vacúolos citoplasmáticos (V) e pequenas vesículas oriundas da quebra do retículo (setas) foram observados nas células após 1 h de tratamento; mitocôndrias (Mt). D. As microvilosidades (Mv) não apresentaram alterações e as

mitocôndrias (Mt) na porção apical da célula mostraram-se intumescidas após 1 h de tratamento. E. Células tratadas por 6 h apresentaram danos evidentes às microvilosidades (Mv); mitocôndrias (Mt) em estágio inicial de vacuolização. F. Após 6 h de tratamento observa-se o aumento dos vacúolos citoplasmáticos (V) e formação de pequenas vesículas cobertas por ribossomos (setas); mitocôndria (Mt). Barra de escala = 1 µm.

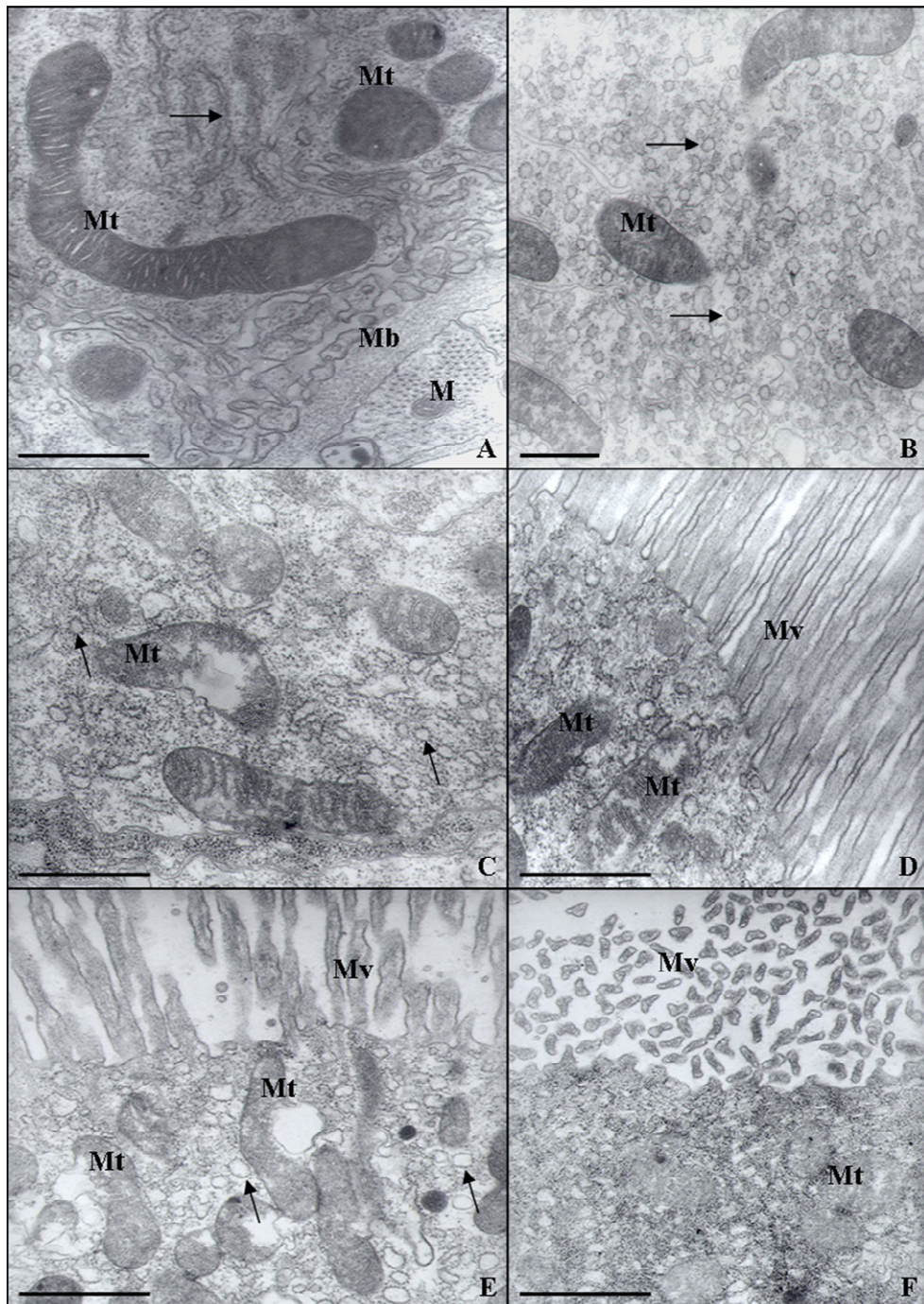


Figura 17 – Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4º estágio de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente à toxina Bin (R2362), tratadas com as toxinas Cry48Aa e Cry49Aa do *Bacillus sphaericus* cepa IAB59. A. Célula de uma larva não tratada apresentando mitocôndrias (Mt) e retículo endoplasmático íntegro (seta); a membrana basal (Mb) e a célula mióide (M) subjacente apresentam aspecto preservado. B. Em larvas após 1 h de tratamento observou-se a destruição da matriz mitocôndrial (Mt) e formação de vesículas cobertas por ribossomos (setas). C.

Após este tempo de tratamento, algumas mitocôndrias (Mt) apresentaram vacuolização sem rompimento da membrana externa. D. Microvilosidades (Mv) em células de larvas após 1 h de tratamento apresentaram aspecto íntegro; algumas mitocôndrias (Mt) apresentaram um início de vacuolização. E. Célula de uma larva após 6 h de tratamento apresentando vacuolização mitocondrial (Mt), quebra do retículo endoplasmático (setas) e ruptura de microvilosidades (Mv). F. Célula de uma larva após 6 h de exposição às toxinas apresentando uma grande destruição das microvilosidades (Mv) e um citoplasma desorganizado. Barra de escala = 1 µm.

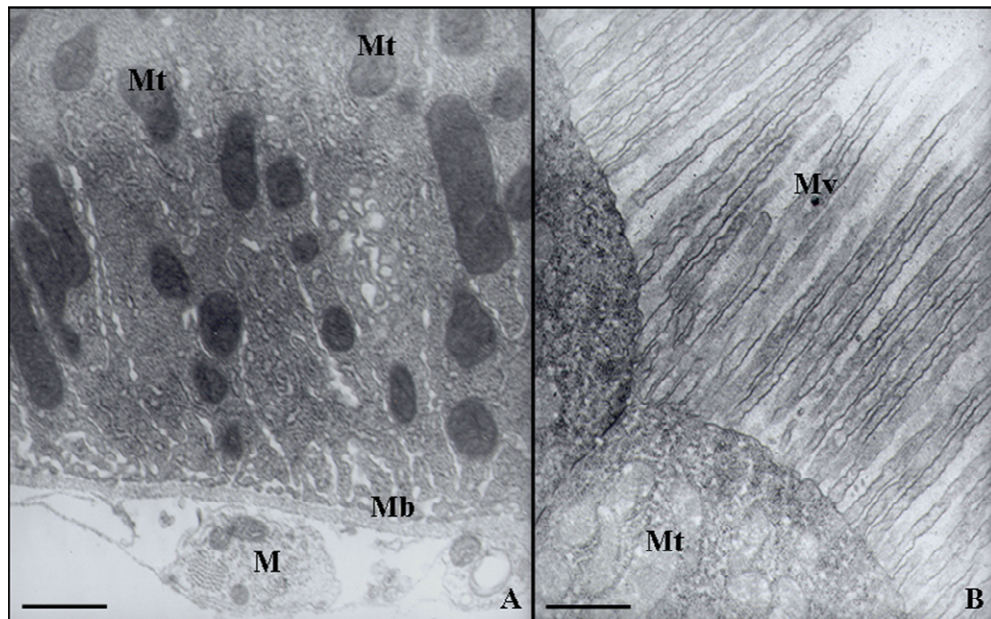


Figura 18 – Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4º estágio de uma colônia do *Culex quinquefasciatus* resistente (RIAB59) às toxinas produzidas pelo *Bacillus sphaericus* IAB59, tratadas com as toxinas Cry48Aa e Cry49Aa desta cepa. A. Região basal da célula epitelial de uma larva tratada por 6 h, mitocôndrias (Mt) não apresentaram vacuolização; membrana basal (Mb) e célula mióide (M) subjacente bem preservada. B. Célula neste mesmo momento após o tratamento apresentando microvilosidades (Mv) sem alterações. Barra de escala = 1 µm.

7.4 Efeitos das toxinas Bin/Cry11Aa e Bin/Cyt1Aa em larvas da colônia R2362

Misturas das toxinas Bin com a toxina Cry11Aa ou com a Cyt1Aa do *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis*, individualmente, foram utilizadas para o tratamento de larvas da colônia R2362, com a finalidade de analisar as alterações citopatológicas causadas pela ação em sinergia destas toxinas, para larvas resistentes unicamente à toxina Bin. Os grupos de larvas R2362 tratadas com a mistura Bin/Cry11Aa e Bin/Cyt1Aa na proporção de 3:1 (p/p) mostraram uma mortalidade de cerca de 80% após 48 h de tratamento, não sendo observada mortalidade significativa nos grupos não tratados (Tabela 6).

As células epiteliais de larvas do grupo não tratado apresentaram aspecto morfológico já descrito nas seções anteriores, com a presença de um grande número de mitocôndrias íntegras (Fig. 19, A). Após 1 h de tratamento com a toxina Bin/Cry11Aa, as mitocôndrias das células de larvas R2362 apresentaram destruição das cristas mitocondriais, seguida da vacuolização desta organela (Fig. 19, B). Este último efeito foi semelhante ao observado em larvas S e R2362 tratadas com as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa do *B. sphaericus* IAB59. O citoplasma das células apresentou um aspecto bastante denso após 1 h de tratamento (Fig. 19, C). As mitocôndrias presentes na célula epitelial apresentaram desorganização das cristas mitocondriais, ao contrário daquelas localizadas em uma célula mióide, subjacente a membrana basal, que não apresentaram alterações (Fig. 19, C). Uma camada bem preservada de fibras musculares também pôde ser observada na célula mióide (Fig. 19, C). Após 6 h de tratamento o citoplasma e as mitocôndrias apresentaram um aspecto bastante denso, entretanto a membrana basal permaneceu intacta (Fig. 19, D). Grandes vacúolos citoplasmáticos contendo debris celulares foram detectados 6 h após o tratamento (Fig. 19, E), de forma semelhante ao observado em células de larvas S tratadas com as toxinas Bin e Cry48Aa/Cry49Aa. A ruptura de microvilosidades, no entanto, não foi observada em células de larvas R2362 tratadas com a mistura Bin/Cry11Aa (Fig. 19, F), diferindo do efeito observado em larvas S e R2362 tratadas com a toxina Bin e com as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa.

Larvas R2362 não tratadas e processadas como controle dos ensaios de toxicidade com a mistura da toxina Bin/Cyt1Aa mostraram o mesmo padrão morfológico observado nos ensaios anteriores (Fig. 20, A). Um efeito peculiar do tratamento de larvas com essa mistura de toxinas foi a presença, após 1 h de tratamento, de organelas e debris celulares no interior do lúmen, oriundas da lise das células epiteliais (Fig. 20, B). As células de larvas tratadas por 1 h (Fig. 20, C e D) e 6 h (Fig. 20, E e F) apresentaram um citoplasma desestruturado e mitocôndrias com danos a matriz interna, embora o efeito de vacuolização mitocondrial não tenha sido observado (Fig. 20, C-F), como registrado em células de larvas tratadas com as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa e Bin/Cry11Aa. O tratamento de larvas R2362 com a mistura das toxinas Bin/Cyt1Aa durante 1 h provocou a destruição das microvilosidades (Fig. 20, C). A observação deste efeito neste tempo de exposição, não ocorreu em nenhum tratamento anteriormente analisado e, após 6 h foi detectada uma destruição completa das microvilosidades (Fig. 20, E). As mitocôndrias presentes na região basal das células

mostraram destruição das cristas mitocondriais e o citoplasma estava bastante danificado pela ação das toxinas, apresentando um aspecto semelhante ao de células em necrose (Fig. 20, F).

Os principais efeitos relacionados à ação direta das toxinas nos modelos estudados estão sumarizados na figura 21.

Tabela 6 – Mortalidade de larvas do 4º estágio de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia resistente (R2362) à toxina binária (Bin) do *Bacillus sphaericus* 2362 tratadas com um pó liofilizado contendo uma mistura de cristais das toxinas Bin/Cry11Aa ou Bin/Cyt1Aa do *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* na razão de 3:1 (p/p), após 48 h.

Toxinas	Grupos tratados			Grupos não tratados		
	N	% Mortalidade	N MET ^a	N	% Mortalidade	N MET ^a
Bin/Cry11Aa	80	81,3	40	80	1,3	20
Bin/Cyt1Aa	120	76,3	40	80	5,0	20

(^a) Amostras de larvas dos grupos tratados e de grupos não tratados processados para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

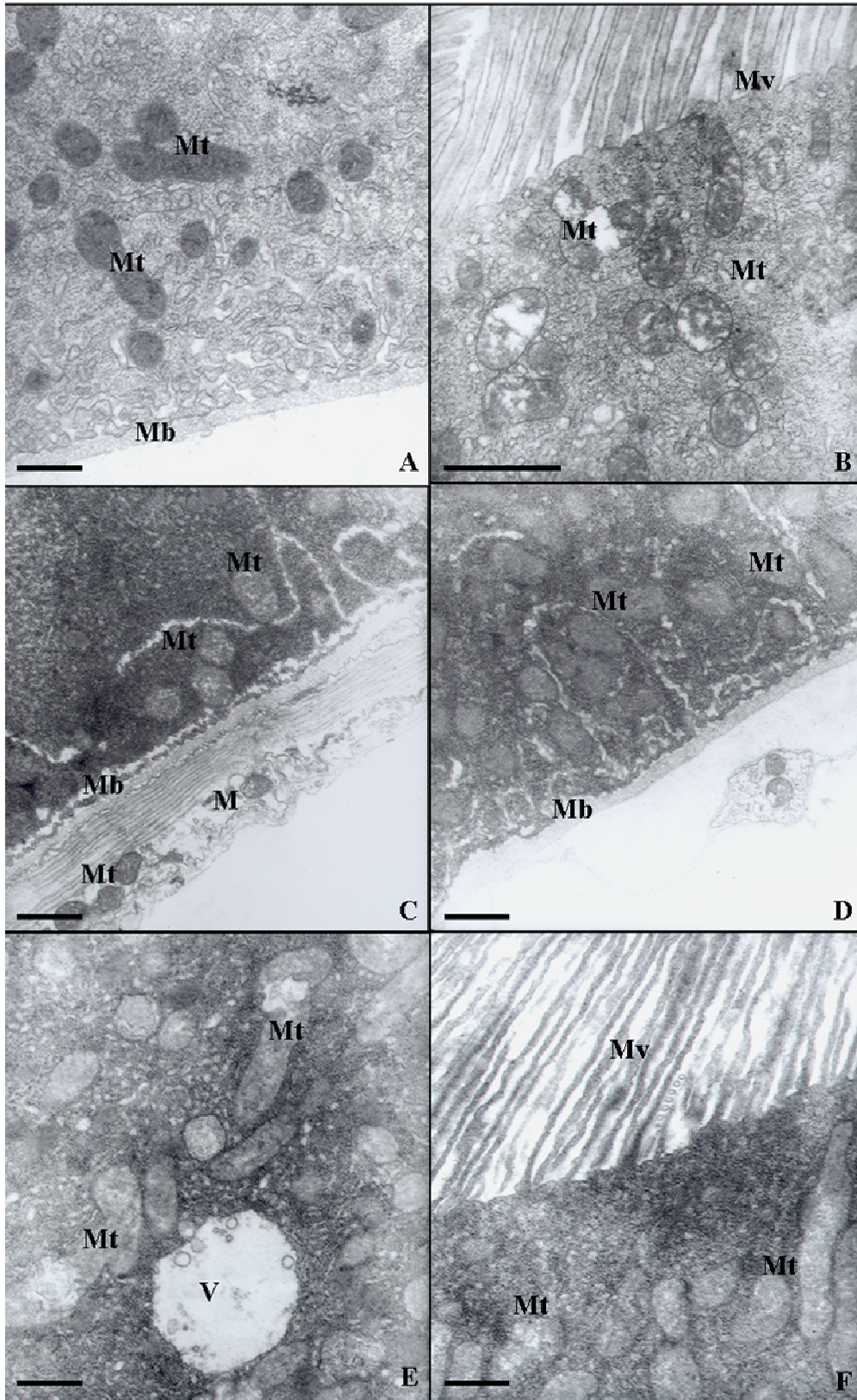


Figura 19 – Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4º estágio de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente à toxina Bin do *Bacillus sphaericus* (R2362) tratadas com uma mistura das toxinas Bin/Cry11Aa na proporção 3:1 (p/p). A. Célula de uma larva não tratada exibindo mitocôndrias com aspecto normal (Mt); membrana basal (Mb). B. Célula de uma larva após 1 h de tratamento apresentando destruição das cristas mitocondriais e vacuolização (Mt); as

microvilosidades (Mv) após este tempo de tratamento estão intactas. C. Região basal de uma célula após 1 h de tratamento mostrando um citoplasma bastante denso e danos às mitocôndrias (Mt) em contraste com as mesmas organelas presentes na célula mióide (M) subjacente à membrana basal (Mb). D. Célula de uma larva após 6 h de tratamento, com mitocôndrias (Mt) alteradas, citoplasma denso e membrana basal (Mb) bem preservada. E. Presença de vacúolo (V) no citoplasma de uma célula após 6 h de tratamento e vacuolização de mitocôndrias (Mt). F. Microvilosidades (Mv) íntegras em células após 6 h de tratamento. Barra de escala = 1 μ m.

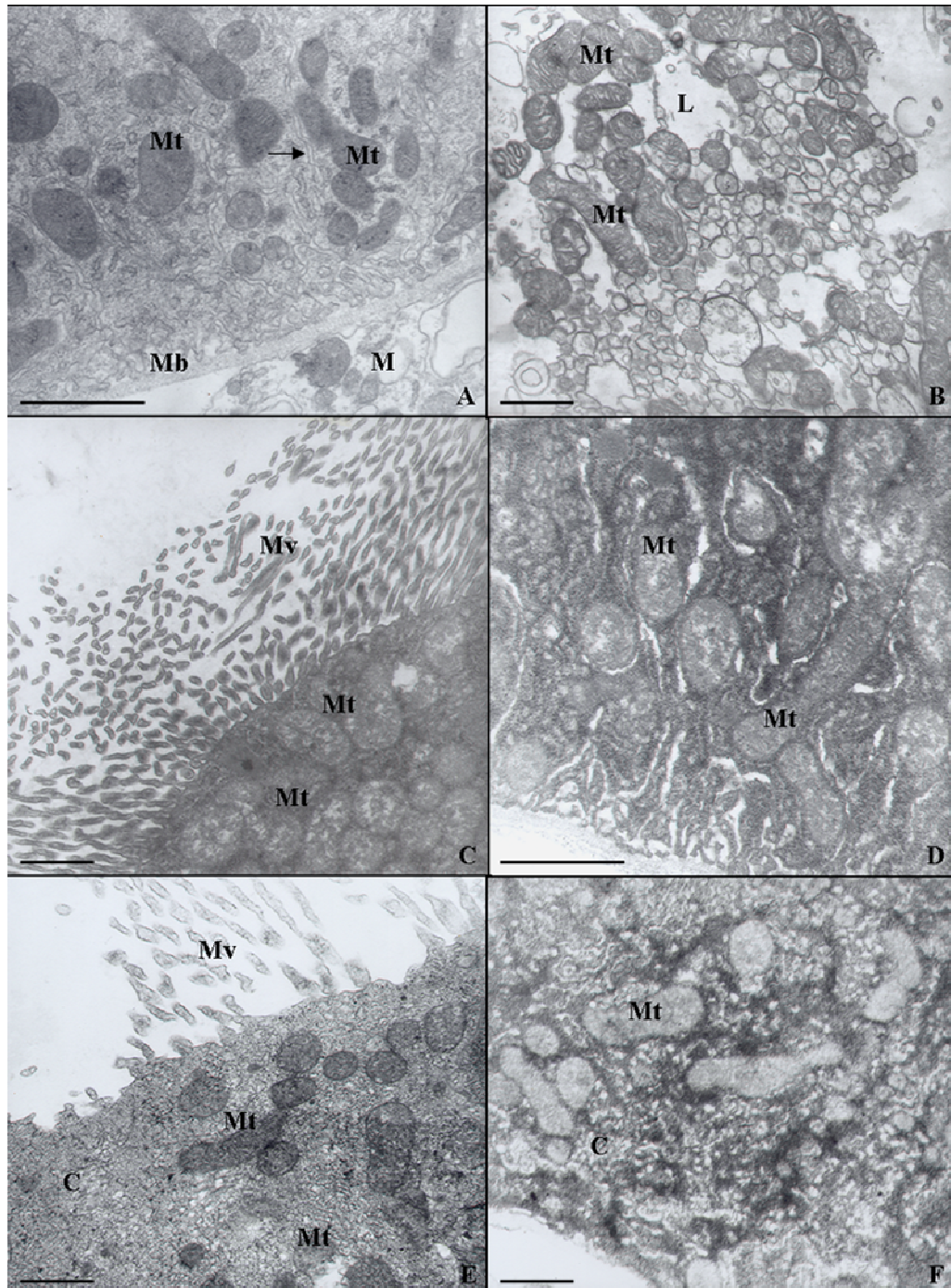


Figura 20 – Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas do 4^o estágio de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente à toxina Bin do *Bacillus sphaericus* (R2362) tratadas com uma mistura das toxinas Bin/Cyt1Aa na proporção 3:1 (p/p). A. Larvas não tratadas apresentaram

células sem alterações citoplasmáticas, exibindo mitocôndrias (Mt) não vacuolizadas, retículo endoplasmático (seta) íntegro e a membrana basal (Mb) bem preservada; célula mióide (M). B. Mitocôndrias (Mt) e debris celulares observadas no interior do lúmen intestinal (L) das larvas após 1 h de tratamento. C. Célula de larva após 1 h de tratamento com microvilosidades (Mv) rompidas, citoplasma denso e mitocôndrias (Mt) com destruição das cristas. D. Mitocôndrias (Mt) presentes na região basal de células após 1 h de tratamento apresentaram destruição das cristas mitocondriais. E. Célula de uma larva após 6 h de tratamento exibindo um citoplasma desorganizado (C), mitocôndrias (Mt) com perda de matriz e microvilosidades destruídas. F. Região basal da célula neste mesmo tempo de tratamento apresentando citoplasma (C) típico de célula em necrose e mitocôndrias (Mt) com matriz desorganizada. Barra de escala = 1 μ m.

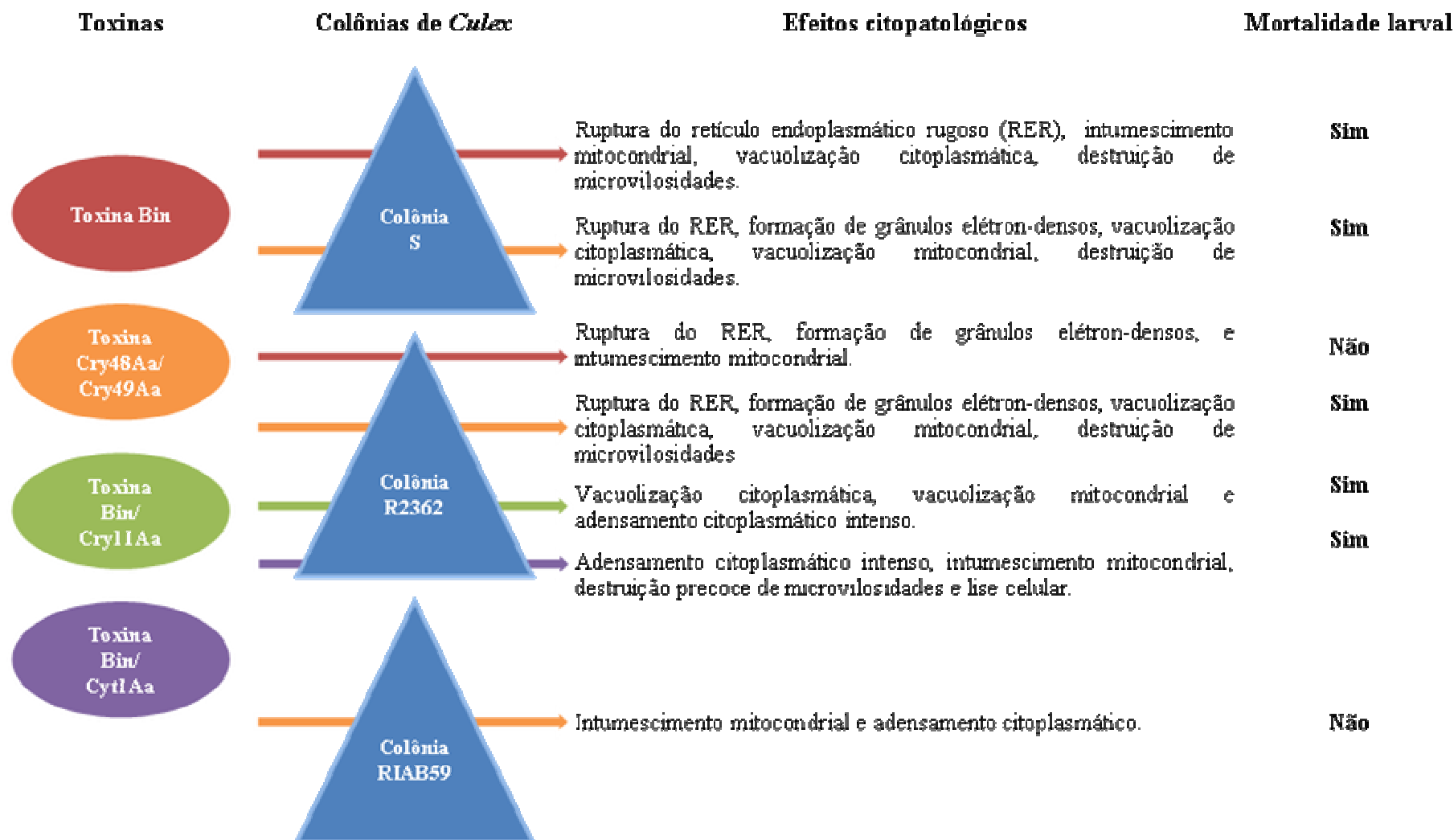


Figura 21. Principais efeitos citopatológicos causados por toxinas produzidas por bactérias entomopatógenas nas células do epitélio intestinal de larvas de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia susceptível (S), de uma colônia resistente à toxina Bin (R2362) e uma colônia resistente às toxinas Cry48Aa/Cry49Aa (RIAB59).

8 DISCUSSÃO

O primeiro aspecto investigado neste estudo foi a análise comparativa da ultra-estrutura de células do epitélio intestinal de larvas do *Culex quinquefasciatus*, de uma colônia susceptível (S) e de uma colônia resistente à toxina Bin do *Bacillus sphaericus* (R2362). A morfologia geral do intestino das larvas foi similar à observada previamente em formas adultas do mosquito *Aedes aegypti* (CLEMENTS, 1992; HOUK, 1977; SHAHABUDDIN; PIMENTA 1998), embora as células secretórias descritas por estes autores não tenham sido observadas entre as células colunares e regenerativas. Neste estudo foi observado que a morfologia das células de larvas S e R2362 analisadas logo após a muda para o 4º estágio foi similar, entretanto, 6 h após a muda, as larvas da colônia R2362 puderam ser distinguidas pela maior quantidade de inclusões lipídicas nas células colunares. O aumento da produção destas inclusões foi diretamente relacionado à evolução para o final do 4º estágio e muda para a fase de pupa, sugerindo uma alteração no metabolismo das larvas R2362. Este é o primeiro relato de alterações morfológicas em células intestinais de larvas, cuja resistência a uma proteína inseticida está relacionada à ausência de um receptor, que também desempenha um papel fisiológico na digestão de mosquitos.

Algumas enzimas intestinais como aminopeptidases, fosfatases e glicosidases, podem atuar como receptores de toxinas produzidas por bactérias entomopatógenas (ABDULLAH et al., 2006; FERNANDEZ et al., 2006; KNIGHT et al., 1994; LUO et al., 1997; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999). O receptor Cqm1 pertence ao grupo das α -glicosidases que atuam na via metabólica catalisando a hidrólise de resíduos α -glicosil, para liberar α -glicose (TERRA; FERREIRA, 1994). O fato destes receptores terem um papel primordial na fisiologia do intestino sugere que moléculas com a mesma função, ou funções similares, poderiam ser produzidas para compensar sua ausência ou redução no inseto. Os resultados de um estudo sobre a resistência de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) à toxina Cry1Aa do *B. thuringiensis* sugeriram que a perda do receptor poderia ser compensada por outras moléculas com funções similares (VAN RIE et al., 1990). Resultado similar foi observado em um estudo recente, no qual a atividade total de α -glicosidases detectada em amostras do microvilli intestinal de larvas de *C. quinquefasciatus* de uma colônia susceptível (S) e uma colônia resistente à toxina Bin do *B. sphaericus* (R2362) foi semelhante, apesar da ausência da α -glicosidase Cqm1 no microvilli intestinal de larvas R2362 (ROMÃO et al.,

2006). Hipoteticamente, o nível similar de atividade α -glicosidase encontrada seria explicado pelo aumento da expressão de outras α -glicosidasas para compensar a ausência do Cqm1 ou, se o receptor Cqm1 fôsse um componente minoritário desse grupo de enzimas e a sua ausência não pudesse ser detectada através da mensuração da atividade α -glicosidase total. Um estudo recente demonstrou que três isoformas de α -glicosidasas são sintetizadas pelo culicídeo *Anopheles aquasalis* e sugere, corroborando os resultados de Romão et al. (2006), que não somente uma, mas um grupo de α -glicosidasas é expresso em larvas de culicídeos (SOUZA-NETO et al., 2007). Por outro lado, se a falta da α -glicosidase Cqm1 não é crítica e não está relacionada a mudanças no metabolismo celular, é provável que a resistência, embora monogênica, possa envolver a ativação de genes secundários que poderiam ser responsáveis pelas alterações observadas nas larvas R2362.

A reserva nutricional durante o estágio larval é essencial para a sobrevivência do adulto. A colônia R2362, apesar de sere mantida há mais de cinco anos sob condições de laboratório, apresentam um custo adaptativo em relação a dois aspectos. O tempo de desenvolvimento de ovo a ovo é maior e, a maioria das fêmeas desta colônia requer dois repastos sanguíneos para realizar a primeira oviposição, enquanto que 60% das fêmeas susceptíveis necessitam de apenas um repasto (OLIVEIRA et al., 2003). Estes aspectos de desempenho biológico associados aos dados do presente trabalho sugerem que insetos resistentes da colônia R2362 podem ter características relacionadas ao armazenamento nutricional e metabolismo de lipídeos diferente dos insetos da colônia susceptível.

Em outra etapa deste trabalho foram avaliados os efeitos de toxinas produzidas pelo *B. sphaericus* e pelo *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis* sobre a ultra-estrutura do epitélio intestinal de larvas de uma colônia susceptível e duas colônias resistentes de *C. quinquefasciatus*. A primeira análise foi uma comparação dos efeitos da toxina binária (Bin), em larvas de uma colônia susceptível (S) e de uma colônia resistente a esta toxina (R2362), cujas larvas são desprovidas do receptor Cqm1 que é o sítio alvo da toxina Bin. As células do estômago posterior de larvas S tratadas com a toxina Bin mostraram importantes alterações citopatológicas como fragmentação do retículo endoplasmático, intumescimento mitocondrial, formação de vacúolos citoplasmáticos e destruição de microvilosidades. O núcleo das células analisadas não apresentou alterações relevantes como condensação da cromatina ou nucleólise, efeitos característicos de células apoptóticas. O tratamento com a toxin Bin aumentou a densidade do citoplasma, dando um aspecto granuloso ao mesmo, e causou a formação de vacúolos citoplasmáticos, sugerindo sinais de morte celular por necrose. Os

efeitos da toxina Bin sobre as células do epitélio intestinal de larvas de *C. quinquefasciatus* observados neste trabalho foram restritos às células epiteliais e estão de acordo com as alterações previamente descritas na literatura (CHARLES, 1987; SINGH; GILL, 1988). Lesões às células do sistema nervoso central e músculos esqueléticos também já foram descritas em larvas de *C. quinquefasciatus*, porém essas alterações só foram observadas após 32 h de exposição à toxina Bin (SINGH; GILL, 1988).

Estudos sobre o modo de ação do *B. sphaericus* em larvas de *C. quinquefasciatus* mostram que a ação larvicida depende da ligação da toxina Bin ao receptor Cqm1 presente no microvilli intestinal (NIELSEN-LEROUX et al., 1995, 2002; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA et al., 2004). Esse trabalho mostra que células intestinais de larvas R2362, que não expressam o receptor Cqm1, exibem alterações quando tratadas com a toxina Bin, entretanto, os efeitos observados em larvas R2362 não estão associados à ação inseticida e morte das larvas. A presença de grânulos elétron-densos e o intumescimento mitocondrial nas células de larvas R2362 após 6 h de tratamento podem ser consequência da exposição às altas concentrações da toxina Bin usada nos bioensaios. Alterações similares, como intumescimento mitocondrial e ruptura do retículo endoplasmático, também foram observados em larvas de *Ae. aegypti*, uma espécie naturalmente refratária, desprovida de receptor para a toxina Bin, quando tratadas em condições similares (CHARLES, 1987). Isto poderia ser explicado pela ação do componente BinA que é capaz de provocar toxicidade quando administrado em altas doses, independente da ligação de BinB ao receptor celular (NICOLAS et al., 1993). No caso deste estudo, as alterações celulares observadas no intestino de larvas resistentes não são relevantes para a sua sobrevivência e os dados mostraram que a α -glicosidase Cqm1 é essencial para mediar a ação letal da toxina Bin nas células. Os danos observados exclusivamente em células de larvas S, como a formação de vacúolos citoplasmáticos e a perda de microvilosidades sugerem que estes efeitos, específicos e dependentes da ligação da toxina ao receptor Cqm1, estão diretamente associados à mortalidade das larvas. O efeito de vacuolização citoplasmática não ocorre em linhagens celulares que expressam o receptor como proteína de membrana, porém sem a âncora GPI, sugerindo que a completa expressão dessa molécula é essencial para mediar os efeitos da toxina Bin nas células (OPOTA; CHARLES, PAURON, 2007).

Os efeitos das toxinas Cry48Aa/Cry49Aa produzidas pela cepa IAB59 do *B. sphaericus*, caracterizadas como uma toxina binária devido a sua ação em sinergia para a produção de toxicidade, também foram avaliados em células intestinais de larvas de colônias susceptíveis a

estas toxinas (S e R2362) e sobre larvas de uma colônia resistente (RIAB59). Este é o primeiro estudo dos efeitos citopatológicos de Cry48Aa/Cry49Aa. Até então, apenas dados de toxicidade *in vitro* para larvas foram registrados, não sendo conhecido nenhum outro aspecto relativo à ação destas toxinas sobre as células do mesêntero (PEI et al., 2002; AMORIM et al., 2007; JONES et al, 2007). Em larvas susceptíveis da colônia S os primeiros efeitos das toxinas Cry48Aa/Cry49Aa, como ruptura do retículo endoplasmático, formação de vacúolos citoplasmáticos e vacuolização mitocondrial foram observados 1 hora após o tratamento, sendo a destruição de microvilosidades um efeito detectado somente após 6 h de exposição. A vacuolização mitocondrial, caracterizada pelo intumescimento das mitocôndrias, destruição da matriz interna e deformação das mitocôndrias sem rompimento da membrana externa, foi uma alteração distinta dos efeitos da toxina Bin em larvas S, sendo considerado uma característica marcante. As mitocôndrias são organelas susceptíveis a uma variedade de toxinas que interferem com suas funções bioquímicas (ADES; CASCARNO, 1979). Disfunções mitocondriais podem aumentar a produção de oxigênio reativo, causando danos a importantes componentes celulares tais como ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (ANDREASSSEN et al., 2000). Além disso, danos mitocondriais resultam em déficit energético, levando à redução da atividade de bombas iônicas dependentes de ATP, que por sua vez é responsável pelo desbalanço iônico nas células ocasionando o influxo de água e solutos responsáveis pelo edema celular (BEAL, 1992).

Entre o conjunto de alterações decorrentes do tratamento com as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa, algumas foram características do tratamento com a toxina Bin, tais como formação de vacúolos citoplasmáticos, ruptura do retículo endoplasmático e destruição de microvilosidades. A associação de efeitos tal como a vacuolização mitocondrial, às demais alterações típicas da toxina Bin pode ser explicada pela natureza dos fatores que compõem essa nova toxina de ação binária. A ação similar de Cry48Aa/Cry49Aa sobre larvas R2362 e S comprova a atuação dessas toxinas em células desprovidas do receptor Cqm1 da toxina Bin e indica claramente que sua ação é mediada por receptores distintos. Um aspecto que permanece a ser esclarecido é qual destes componentes possui o sítio de ligação ao receptor, e ainda, se teria uma atividade formadora de poros. Cry48Aa, por sua estrutura típica de 3 domínios possui, hipoteticamente, o domínio II com região para reconhecimento do receptor, além do domínio I, envolvido na formação de poros. Cry49Aa, por ter similaridade com o componente BinB da toxina Bin (JONES et al, 2007), poderia ter a capacidade de ligar-se aos receptores. Apesar dos dados ainda escassos sobre as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa é importante

ressaltar que estas são comprovadamente toxinas potentes que não apresentam resistência cruzada à toxina Bin, presente nos biolarvicidas a base do Bsp comercializados atualmente. Estes aspectos destacam o grande potencial de utilização dessas toxinas como ingredientes ativos em biolarvicidas que conjuguem mais de um fator tóxico, a exemplo do produto VectoMax® (Sumitomo Chemical) que está em fase de desenvolvimento e tem como princípio ativo cristais protéicos produzidos pelo *B. sphaericus* e pelo *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis*.

As larvas da colônia resistente ao *B. sphaericus* IAB59 (RIA59) quando tratadas com as toxinas Cry48Aa/Cry49a apresentaram alterações discretas que não resultaram na morte das larvas. Foram observados efeitos secundários e de natureza inespecífica sobre as células, tal como detectado no tratamento de larvas da colônia R2362 com a própria toxina Bin. A avaliação de Cry48Aa/Cry49Aa no epitélio de larvas RIAB59 demonstrou a especificidade de ação dessas toxinas e esta colônia poderá ser útil como modelo para a caracterização do modo de ação desta nova toxina binária.

A existência de múltiplas toxinas no cristal produzido pelo entomopatógeno *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis* é responsável pela ausência de seleção de resistência em populações tratadas com biolarvicidas a base desta bactéria (DE MAAGD et al., 2003; GEORGHIOU; WIRTH, 1997; IBARRA; FEDERICI, 1986). A falta de um complexo de proteínas com diferentes sítios de ligação é considerado um fator que facilita a seleção da resistência de populações de *Culex* ao *B. sphaericus*, uma vez que este entomopatógeno produz unicamente a toxina Bin como fator larvicida, que age sobre um único sítio alvo (DARBOUX et al., 2002; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999). Na tentativa de superar as limitações do reduzido espectro de ação do *B. sphaericus*, bem como de tornar mais complexo o arsenal tóxico desta espécie, algumas tentativas já foram realizadas no intuito de obter bactérias recombinantes capazes de expressar combinações de proteínas inseticidas produzidas pelo *B. sphaericus* e pelo *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis*. De acordo com alguns trabalhos, combinações da toxina Bin do *B. sphaericus* com toxinas Cry ou Cyt do *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis* apresentam efeito sinérgico (GAMMON et al., 2006; PARK et al., 2005; PONCET et al., 1997; SERVANT et al., 1999; SUN et al., 2001; WIRTH; WALTON; FEDERICI, 2000; WIRTH et al., 2004, 2005, 2007). Cepas recombinantes, transformadas para expressar proteínas inseticidas diferentes, ou misturas da toxina Bin do *B. sphaericus* e toxinas do *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis*, obtidas a partir de culturas de cepas nativas, apresentaram atividade larvicida tanto para *Ae. aegypti*, espécie

refratária ao *B. sphaericus*, como para larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes à toxina Bin (WIRTH et al., 2004, 2005).

Neste estudo, larvas de uma colônia resistente à toxina Bin do *B. sphaericus* (R2362) foram tratadas com combinações das toxinas Bin/Cry11Aa e das toxinas Bin/Cyt1Aa para avaliar as alterações citopatológicas em células de organismos resistentes, decorrentes da interação sinérgica entre essas toxinas, que até então não foram caracterizadas. O principal efeito observado no tratamento com a combinação Bin/Cry11Aa foi a vacuolização da matriz mitocondrial, semelhante ao registrado no tratamento de larvas S e R2362 com as toxinas Cry48Aa/Cry49Aa. A toxina Cry11Aa, assim como a Cry48Aa, é uma proteína de 3 domínios e, provavelmente, a vacuolização mitocondrial observada deve estar relacionada à ação destas toxinas, uma vez que esse efeito não foi registrado em nenhum tratamento com a toxina Bin. Estudos anteriores sobre as alterações histopatológicas causadas pelas δ -endotoxinas do Bt no epitélio intestinal de larvas de mosquitos e lepdópteras, relatam a ocorrência de intumescimento mitocondrial e destruição de matriz interna (CAVADOS et al., 2004; CHARLES; DE BARJAC, 1981; DE BARJAC, 1978; LAHKIM-TSROR et al., 1983; LÜTHY; WOLFERSBERGER, 2000; REY et al., 1998). No entanto, em alguns destes trabalhos o aspecto das mitocôndrias é bastante semelhante ao observado nesse estudo, demonstrando que a vacuolização mitocondrial ocorre em células tratadas com toxinas da família Cry, sendo muitas vezes descrita como intumescimento mitocondrial. Outras importantes alterações detectadas, como a formação de vacúolos citoplasmáticos e o aspecto denso do citoplasma, resultam possivelmente da ação da toxina Bin e mostram que esta toxina, na ausência do receptor Cqm1, tem ação nas células através da sinergia com Cry11Aa.

O tratamento com a combinação Bin/Cyt1Aa foi o único que provocou a perda precoce de microvilosidades, observada após 1 h de exposição a estas toxinas. Outro aspecto singular relacionado a este tratamento foi a presença de organelas intracelulares no lúmen intestinal sugerindo a lise celular. Os efeitos observados no tratamento com a combinação de Bin/Cyt1Aa foram mais marcantes do que os demais estudados, provavelmente decorrentes da conhecida ação citolítica da toxina Cyt1Aa. Embora toxinas de ambas as famílias Cyt e Cry possam causar a formação de poros em bicamadas lipídicas (KNOWLES et al., 1989; VON TERSCH et al., 1994), apenas a toxina Cyt é capaz de causar a citólise *in vitro* de células de insetos e de mamíferos, além de hemolisar uma variedade de eritrócitos (THOMAS; ELLAR, 1983).

Vários trabalhos propõem a hipótese que os danos causados pela Cyt1Aa são decorrentes de um mecanismo de lise colóide-osmótica no qual esta toxina formaria poros ou canais seletivos de cátions e o re-equilíbrio das concentrações desses íons através da membrana celular levaria a um desequilíbrio osmótico acarretando o intumescimento e eventual ruptura da célula (THOMAS; ELLAR, 1983; WAALWIJK et al., 1985; HAIDER; ELLAR, 1989; KNOWLES et al., 1989; KNOWLES et al., 1992; KNOWLES; ELLAR, 1987). Outra hipótese sugere que a toxina teria uma ação detergente sobre a membrana plasmática, na qual a interação entre a toxina e os lipídeos formaria agregados responsáveis por causar danos inespecíficos na estrutura dos lipídeos, permitindo o extravasamento de estruturas intracelulares (BUTKO et al., 1996, 1997). Em ambas as hipóteses os danos ocorrem devido à capacidade que esta toxina apresenta de interagir diretamente com a membrana plasmática, envolvendo uma mudança conformacional da toxina e sua ligação aos lipídeos (BUTKO, 2003).

A toxina Cyt1A é capaz de restaurar a susceptibilidade de larvas de culicídeos que foram selecionados em laboratório para resistência à toxinas individuais como Cry11Aa, Cry4Aa e Bin (WIRTH; GEORGHIOU; FEDERICI, 1997; WIRTH; WALTON; FEDERICI, 2000; WIRTH et al., 2005; CHANG et al., 1993; WU; JOHNSON; FEDERICI, 1994). A base molecular da sinergia entre Cyt1Aa e Cry11Aa foi recentemente elucidada. Os estudos sobre a interação destas toxinas demonstraram que Cyt1Aa atua como um receptor para Cry11Aa, além de facilitar o processo de oligomerização desta proteína (PÉREZ et al., 2005, 2007). Os epítomos de ligação de Cyt1Aa (alça $\beta 6$ - αE e parte da $\beta 7$) e Cry11Aa (domínio II alça $\alpha 8$, $\beta 4$ e alça 2) foram identificados e, dois desses sítios em Cry11Aa, são os mesmos envolvidos na interação desta toxina com a fosfatase alcalina de 65 kDa que serve como receptor no epitélio intestinal. Este resultado indica que Cyt1Aa pode funcionar como um receptor para Cry11Aa e promover sua inserção na membrana de uma maneira similar à que ocorre na interação de Cry11Aa com seu receptor expresso no epitélio das larvas (PÉREZ et al., 2005).

Possivelmente, a base da sinergia entre as toxinas Bin e Cyt1Aa, capaz de superar a resistência devido à ausência do receptor Cqm1, ocorra através de um mecanismo semelhante, ou seja, Cyt1Aa poderia interagir com a membrana, servindo como um receptor para a toxina Bin, e permitir a sua ação em células de organismos resistentes. A combinação de Cyt1Aa com a toxina Bin foi capaz de suprimir completamente a resistência apresentada por uma colônia de *C. quinquefasciatus*, cuja RR era em torno de 30.000 vezes, demonstrando a capacidade de interação entre estas toxinas (WIRTH; WALTON; FEDERICI, 2000).

A ação e sinergia das toxinas do Bsp e Bti avaliadas neste estudo demonstram o potencial destas proteínas inseticidas no controle de culicídeos, sobretudo na sua aplicação para o manejo da resistência. O tratamento de larvas com a toxina Bin revelou efeitos citopatológicos típicos desta toxina e demonstrou a importância do receptor Cqm1 em mediar sua ação larvicida. Outros modelos de tratamento, utilizando toxinas como a Cry48Aa/Cry49Aa da cepa IAB59 do *B. sphaericus* ou misturas de toxinas como Bin/Cry11Aa e Bin/Cyt1Aa produziram efeitos complexos nas células alvo, que podem ser obtidos em indivíduos cujas células epiteliais são desprovidas de um receptor funcional para a toxina Bin. Estudos relacionados à caracterização da ação de toxinas já identificadas e de novos fatores tóxicos são de suma importância para viabilizar o desenvolvimento de uma nova geração de inseticidas que contenha um arsenal tóxico diversificado, com alvos distintos nas células e com risco mínimo de seleção de indivíduos resistentes.

9 CONCLUSÕES

- A resistência de larvas à toxina Bin devido à ausência da α -glicosidase Cqm1 está associada a mudanças fisiológicas marcadas pelo aumento de inclusões lipídicas nas células do epitélio intestinal.
- Os efeitos citopatológicos causados pela toxina Bin são a vacuolização citoplasmática e a destruição de microvilosidades. Estes efeitos ocorrem unicamente em células dotadas do receptor Cqm1 e estão associados especificamente com a ação letal da toxina.
- As toxinas Cry48Aa/Cry49Aa provocaram efeitos complexos nas células de larvas susceptíveis, resultantes da ação combinada de uma toxina com estrutura em 3 domínios e de uma toxina do tipo binária.
- Os efeitos das toxinas Cry48Aa/Cry49Aa em células de larvas R2362 comprovam que a sua ação é mediada por receptores distintos do receptor Cqm1 e demonstram a sua importância no manejo da resistência aos biolarvicidas a base de Bsp atualmente disponíveis.
- As toxinas Cry11Aa e Cyt1Aa medeiam os efeitos citopatológicos característicos da toxina Bin em células desprovidas do receptor Cqm1, além de causar sua ação específica sobre as células.
- A ação complexa da nova toxina Cry48Aa/Cry49Aa, bem como das associações de toxinas do Bti com o Bsp, mostraram a sua importância para serem usados como princípios ativos, na composição de novos biolarvicidas.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, M. A. F.; VALAITIS, A. P.; DEAN, D. H. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. **BMC Biochem.**, London, v. 7, p. 16, 2006.

ADES, I. Z.; CASCARANO, E. J. Mitochondrial alterations in heart, kidney, and liver of rats subjected to anemic hypoxia. **Exp. Mol. Pathol.**, New York, v. 30, n. 1, p. 94-109, 1979.

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

ANDREASSEN, O. A. *et al.* Partial deficiency of manganese superoxide dismutase exacerbates a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Ann. Neurol.**, Boston, v. 47, n. 4, p. 447-455, 2000.

ANGERMULLER, S.; FAHIMI, H. D. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochem. J.**, London, v. 14, n. 5, p. 823-835, 1982.

ANGSUTHANASOMBAT, C. *et al.* *Bacillus thuringiensis* Cry4A and Cry4B mosquito-larvicidal proteins: homology-based 3D model and implications for toxin activity. **J. Biochem. Mol. Biol.**, Seoul, v. 37, n. 3, p. 304-313, 2004.

BARBOSA, R. M. *et al.* Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 4, p. 523-529, 2007.

BAUM, J. A. *et al.* Binary toxins from *Bacillus thuringiensis* active against the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4889-4898, 2004.

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

BAUMANN, P. *et al.* *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 55, n. 3, p. 425-436, 1991.

_____. Cloning of the gene for the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* 2362: evidence for a family of related sequences. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 169, n. 9, p. 4061-4067, 1987.

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

BEAL, M. F. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? **Ann. Neurol.**, Boston, v. 31, n. 2, p. 119-130, 1992.

BECKER, N. *et al.* Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 8, n. 3, p. 285-289, 1992.

_____. **Mosquitoes and their control**. 1st ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

BECKER, N. Microbial control of mosquitoes: Management of the Upper Rhine mosquito population as a model programme. **Parasitol. Today**, Cambridge, v. 13, n. 12, p. 485-487, 1997.

BEEGLE, C. C.; YAMAMOTO, T. Invitation paper (CP Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **Can. Entomol.**, Ottawa, v. 124, p. 587-616, 1992.

BERRY, C. *et al.* Genetic determinants of host ranges of *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxins. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, n. 2, p. 510-518, 1993.

_____. Nucleotide sequence of two toxin genes from *Bacillus sphaericus* IAB59: sequence comparisons between five highly toxinogenic strains. **Nucleic Acids. Res.**, London, v. 17, n. 18, p. 7516, 1989.

BERRY, C.; HINDLEY, J. *Bacillus sphaericus* strain 2362: identification and nucleotide sequence of the 41.9 kDa toxin gene. **Nucleic Acids. Res.**, London, v. 15, n. 14, p. 5891, 1987.

BLANCO CASTRO, S. D. *et al.* Introduction of *Bacillus sphaericus* strain-2362 (GRISELESF) for biological control of malaria vectors in Guatemala. **Rev. Cubana Med. Trop.**, Habana, v. 52, n. 1, p. 37-43, 2000.

BONFIM, C. *et al.* Situação da filariose bancroftiana na região metropolitana do Recife: estudo em uma área endêmica no município de Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 1497-1505, 2003.

BOONSERM, P. *et al.* Association of the components of the binary toxin from *Bacillus sphaericus* in solution and with model lipid bilayers. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 342, n. 4, p. 1273-1278, 2006.

BOURGOUIN, C. *et al.* Transfer of the toxin protein genes of *Bacillus sphaericus* into *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and their expression. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 56, p. 340-344, 1990.

BRACCO, J. E. *et al.* Resistance to organophosphorous and carbamates insecticides in a population of *Culex quinquefasciatus*. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 182-183, 1997.

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

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, 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.

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

BROADWELL, A. H. *et al.* Construction by site-directed mutagenesis of a 39-kilodalton mosquitocidal protein similar to the larva-processed toxin of *Bacillus sphaericus* 2362. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 172, n. 7, p. 4032-4036, 1990.

BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington v. 69, n. 5, p. 2415-2422, 2003.

BUTKO, P. *et al.* Interaction of the delta-endotoxin CytA from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* with lipid membranes. **Biochemistry**, Moscou v. 36, n. 42, p. 12862-12868, 1997.

_____. Membrane permeabilization induced by cytolytic delta-endotoxin CytA from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Biochemistry**, Moscou, v. 35, n. 35, p. 11355-11360, 1996.

BUZDIN, A. A. *et al.* Interaction of 65- and 62-kD proteins from the apical membranes of the *Aedes aegypti* larvae midgut epithelium with Cry4B and Cry11A endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. **Biochemistry**, Moscou, v. 67, p. 540-546, 2002.

CAVADOS, C. F. *et al.* Histopathological and ultrastructural effects of delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera, Simuliidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, p. 493-498, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Filariasis**, Atlanta, 2007.
Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Filariasis.htm>> acesso em: 23 Dez 2007.

CHANG, C. *et al.* High-level cryIVD and cytA gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 59, n. 3, p. 815-821, 1993.

CHARLES, J. F.; DE BARJAC, H. Histopathologie de l'action de la delta-endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur les larves de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Entomophaga**, [Sem local], v. 26, n. 2, p. 203-212, 1981.

_____. pH variations in the midgut of *Aedes aegypti* in relation to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotype H14) crystal intoxication. **Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales**, Paris, v.74, n.1, p.91-95, 1981.

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.

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

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

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.**, Lawrence KS, v. 38, n. 5, p. 657-664, 2001.

CLEMENTS, A. N. **The Biology of Mosquitoes**. 1st ed. New York: Chapman & Hall, 1992.

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

CRICKMORE, V.; BONE, E. J.; WILLIAMS, J. A.; ELLAR, D. J. Contribution of the individual components of the endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 131, p. 249-254, 1995.

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, p. 5830-5835, 2002.

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

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

DAVIDSON, E. W. Alkaline extraction of toxin from spores of the mosquito pathogen, *Bacillus sphaericus* strain 1593. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 29, n. 2, p. 271-275, 1983.

_____. A review of the pathology of bacilli infecting mosquitoes, including an ultrastructural study of larvae fed *Bacillus sphaericus* 1593 spores. **Dev. Industr. Microbiol.**, London, v. 22, p. 69-81, 1981.

_____. 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.

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

_____. Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 spores used as larvicides in the aquatic environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 47, n. 1, p. 125-129, 1984.

_____. Interaction of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal proteins. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 36, n. 12, p. 870-878, 1990.

DAVIDSON, E. W.; TITUS, M. Ultrastructural effects of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxin on cultured mosquito cells. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 50, n. 3, p. 213-220, 1987.

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

DEAN, M. At last, the fight against lymphatic filariasis begins. **Lancet**, London, v. 355, p. 385, 2000.

DEANE, L. M. *et al.* Filariasis bancrofti in Maceio, Alagoas: results of 1952 research. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Brasília, v. 5, n. 1, p. 17-22, 1953.

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 (author's transl). **Ann. Microbiol.**, Paris, v. 131B, n. 2, p. 191-201, 1980.

DE BARROS MOREIRA BELTRÃO, H; SILVA-FILHA, M. H. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 266, n. 2, p. 163-169, 2007.

DE MAAGD, R. A. *et al.* Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 37, p. 409-433, 2003.

DREYER, G.; MEDEIROS, Z. Filariose linfática: ainda um desafio. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 12, p. 6-7, 1990.

ELLIS, R. T. *et al.* Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1137-1145, 2002.

FEDERICI, B. A. *et al.* Developing recombinant bacteria for control of mosquito larvae. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 23, p. 164-175, 2007.

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

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect. Immun.**, Washington, v. 73, n. 4, p. 1907-1916, 2005.

FORATTINI, O. P. Espécies de *Culex* (*Culex*). In: **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp, 2002. v. 2, p. 693-722.

GAMMON, K. *et al.* Conjugal transfer of a toxin-coding megaplasmid from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquitocidal strains of *Bacillus sphaericus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 72, n. 3, p. 1766-1770, 2006.

GEORGHIOU, G. P.; WIRTH, M. C. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 63, n. 3, p. 1095-1101, 1997.

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.

GOLDBERG, L. H.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito News**, New York, v. 37, p. 355-358, 1977.

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

HAIDER, M. Z.; ELLAR, D. J. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxin: interaction with phospholipid vesicles. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 978, n. 2, p. 216-222, 1989.

HEMINGWAY, J. *et al.* The Innovative Vector Control Consortium: improved control of mosquito-borne diseases. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 22, n. 7, p. 308-312, 2006.

_____. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 34, n. 7, p. 653-665, 2004.

HEMINGWAY, J.; FIELD, L.; VONTAS, J. An overview of insecticide resistance. **Science**, Washington, v. 298, n. 5591, p. 96-97, 2002.

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

HOUARD, J. M. *et al.* Twenty-two years of blackfly control in the onchocerciasis control programme in West Africa. **Parasitol. Today**, Cambridge, v. 13, n. 11, p. 425-431, 1997.

HOUK, E. J. Midgut ultrastructure of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) before and after a bloodmeal. **Tissue Cell**, Edinburgh, v. 9, p. 103-118, 1977.

HUFFMAN, D. L. *et al.* Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 101, n. 30, p. 10995-11000, 2004.

IBARRA, J. E.; FEDERICI, B. A. Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **J. Bacteriol.**, v. 165, n. 2, p. 527-33, 1986.

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.

KALFON, A. *et al.* Growth, sporulation and larvicidal activity of *Bacillus sphaericus*. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 18, p. 168-173, 1983.

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

KARCH, S.; COZ, J. Histopathologie de *Culex pipiens* Linne (Diptera, Culicidae) soumis a l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* 1593-4. **Ser. Ent. Med. Parasitol.**, Paris, v. 21, n. 4, p. 225-230, 1983.

KELLEN, W. R.; MEYERS, C.M. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, n. 7, p. 442-448, 1964.

KNIGHT, P. J.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D. J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(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.; ELLAR, D. J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 924, p. 509-518, 1987.

KNOWLES, B. H. *et al.* A broad-spectrum cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis*. **Proc. Biol. Sci.**, v. 248, n. 1321, p. 1-7, 1992.

_____. A cytolytic d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation selective channels in planar lipid bilayers. **FEBS Lett.**, Amsterdam, n. 244, p. 259-262, 1989.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Adv. Insect Physiol.**, San Diego, v. 24, p. 275-308, 1994.

LACEY, L. A. *et al.* Mosquito host range and field activity of *Bacillus sphaericus* isolate 2297 (serotype 25). **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 4, n. 1, p. 51-56, 1988.

LACEY, L. A.; UNDEEN, A. H. Microbial control of black flies and mosquitoes. **Annu. Rev. Entomol.**, Palo Alto, v. 31, p. 265-296, 1986.

LAHKIM-TSROR, L. *et al.* Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, serovar H14 in *Aedes aegypti*: histopathological studies. **J. Invertebr. Pathol.** New York, n. 41, p. 104-116, 1983.

LECADET, M. M.; BLONDEL, M. O.; RIBIER, J. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715 using bacteriophage CP-54Ber. **J. Gen. Microbiol.**, London, v. 121, n. 1, p. 203-212, 1980.

LEE, H. H.; LEE, K. K.; LEE, M. W. Ultrastructure of midgut cells of *Culex pipiens* larvae ingested by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (HL-75) insecticidal endotoxin. **Korean J. Entomol.**, v. 21, p. 11-17, 1991.

LI, T. *et al.* Coexpression of *cytIAa* of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* with *Bacillus sphaericus* binary toxin gene in acrySTALLIFEROUS strain of *B. thuringiensis*. **Curr. Microbiol.**, New York, v. 40, p. 322-326, 2000.

LI, J.; KONI, P. A.; ELLAR, D. J. Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. **J. Mol. Biol.**, London, v. 257, n. 1, p. 129-152, 1996.

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.

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

LUO, K. *et al.* The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as "receptor A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxin binding and pore formation. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 27, n. 8-9, p. 735-743, 1997.

LÜTHY, P.; WOLFERSBERGER, M. G. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxins. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. **Entomopathogenic Bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 167-180.

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

MAHILLON, J. *et al.* IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review. **Genetica**, The Hague, v. 93, p. 13-26, 1994.

MARFIN, A. A. *et al.* Widespread West Nile virus activity, eastern United States, 2000. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 7, n. 4, p. 730-735, 2001.

MATTAR, S. *et al.* West Nile virus antibodies in Colombian horses. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 11, n. 9, p. 1497-1498, 2005.

MERRITT, R. W. *et al.* Lack of effects of *Bacillus sphaericus* (Vectolex) on nontarget organisms in a mosquito-control program in southeastern Wisconsin: a 3-year study. **J Am. Mosq. Control. Assoc.**, Fresno, v. 21, n. 2, p. 201-212, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Bancroftose. In: Conferência Nacional de Saúde, 6. 1977, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Ministério da Saúde, 1977. p. 83-91.

MITTAL, P. K. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. **J. Vector Borne Dis.**, New Delhi, v. 40, n. 1-2, p. 20-32, 2003.

MOHSEN, Z. H.; AL-CHALABI, B. M.; MEHDI, M. S. Midgut histopathology in *Culex quinquefasciatus* Say treated with *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus* 2362. **J. Biol. Sci. Res.** [Sem local], v. 18, p. 219-228, 1987.

MULLA, M. S. Activity, field efficacy, and use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitos. In: De Barjac, H.; Sutherland, D. J. **Bacterial control of mosquitoes and blackflies.** New Brunswick: Rutgers University Press, 1990. p. 134-160.

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

_____. Mosquito burden and impact on the poor: measures and costs for personal protection in some communities in Thailand. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, Fresno, v. 17, n. 3, p. 153-159, 2001.

NARASU, M. L.; GOPINATHAN, K. P. Effect of *Bacillus sphaericus* 1593 toxin on choline acetyl transferase and mitochondrial oxidative activities of the mosquito larvae. **Indian J. Biochem. Biophys.**, New Delhi, v. 25, p. 253-256, 1988.

NATAL, D.; PAGANELLI, C. H.; SANTOS, J. L. H. Composição da população adulta de *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823 em ecótopos próximos à represa Edgard de Souza, no município de Santana do Parnaíba, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Entomol.**, São Paulo, v. 35, p. 539-543, 1991.

NICOLAS, L.; DOSSOU-YOVO, J. Differential effects of *Bacillus sphaericus* strain 2362 on *Culex quinquefasciatus* and its competitor *Culex cinereus* in West Africa. **Med. Vet. Entomol.**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 23-27, 1987.

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

NICOLAS, L.; LECROISEY, A.; CHARLES, J. F. Role of the gut proteinases from mosquito larvae in the mechanism of action and the specificity of the *Bacillus sphaericus* toxin. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 36, n. 11, p. 804-807, 1990.

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

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

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

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

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

OEI, C.; HINDLEY, J.; BERRY, C. Binding of purified *Bacillus sphaericus* binary toxin and its deletion derivatives to *Culex quinquefasciatus* gut: elucidation of functional binding domains. **J. Gen. Microbiol.**, London, v. 138, n. 7, p.1515-1526, 1992.

OLIVEIRA, C. M. F. *et al.* Biological fitness of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, Fresno, v. 19, n. 2, p. 125-129, 2003.

_____. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* from China and Brazil (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 41, n.1, p. 58-64, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Expert Committee on Filariasis. **Lymphatic filariasis: the disease and its control: report.** 821. Geneva, 1992. (WHO - Technical Reports Series).

_____. **Lymphatic filariasis infection & disease: control strategies: report of a consultative meeting held at the Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia.** Geneva, 1994. (TDR/CTD/FIL/PENANG/94.1.).

_____. **Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as microbial larvicide.** Washington, 1985. Document TDR/BCV/SPHAERICUS/85.3, p. 1–24.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Lymphatic Filariasis Elimination in the Americas: Regional Program Manager's Meeting.** Port-Au-Prince, 2002. p. 40.

OPOTA, O., CHARLES, J. F., PAURON, D. The effects of a bacterial toxin are modulated by the regionalization of its specific receptor at the cell surface. In: Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 40th, 2007, Quebec. **Abstracts of the...** Quebec, 2007. p. 65.

OTTESEN, E. A.; RAMACHANDRAN, C.P. Lymphatic filariasis, infection and disease: Control strategies. **Parasitol. Today**, Cambridge, v. 11, p. 129-131, 1995.

PARK, H. W. et al. Recombinant larvicidal bacteria with markedly improved efficacy against culex vectors of west Nile virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 76, n. 6, p. 732-738, 2005.

PARTRIDGE, M. R.; BERRY, C. Insecticidal activity of the *Bacillus sphaericus* Mtx1 toxin against *Chironomus riparius*. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 79, n. 2, p. 135-136, 2002.

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

PAYNE, J. M.; DAVIDSON, E. W. Insecticidal activity of the crystalline parasporal inclusions and other components of the *Bacillus sphaericus* 1593 spore complex. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 43, n. 3, p. 383-388, 1984.

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

PÉREZ, 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.

_____. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 102, n. 51, p. 18303-18308, 2005.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 813-816, 2003.

PONCET, S. *et al.* Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. **J. Invertebr. Pathol.** New York, v. 66, p. 131-135, 1995.

_____. Improvement of *Bacillus sphaericus* toxicity against dipteran larvae by integration, via homologous recombination, of the Cry11A toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 63, n. 11, p. 4413-4420, 1997.

_____. Transfer and expression of the *cryIVB* and *cryIVD* genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *Bacillus sphaericus* 2297. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 117, p. 91-96, 1994.

PORTER, A. G.; DAVIDSON, E. W.; LIU, J. W. Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 57, p. 838-861, 1993.

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.

RACHOU, R. G.; DEANE, L. M. Human filariasis in Brazil; current knowledge of its geographical distribution and transmission. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 377-387, 1954.

RACHOU, R. G. Distribuição geográfica das filarioses humanas no Brasil. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Brasília, v. 9, p. 79-100, 1957.

_____. Concept and program of prevention of bancroftian filariasis in Brazil. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Brasília, v. 12, p. 11-39, 1960.

RANGEL, A.; DREYER, G. Estudo epidemiológico da filariose bancroftiana no Município de Olinda - PE. In: **Simpósio Nacional de Filariose**, Recife, 1988. *Anais*, p. 10.

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

RAVOAHANGIMALA, O.; CHARLES, J. F. In vitro binding of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* individual toxins to midgut cells of *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 362, n. 2, p. 111-115, 1995.

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

_____. Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Olinda, Brazil. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 94, n. 5, p. 488-492, 2000.

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

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

REY, D. *et al.* Comparative histopathology of some Diptera and Crustacea of aquatic alpine ecosystems, after treatment with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Entomol. Exp. Appl.**, Amsterdam, v. 88, p. 255-263, 1998.

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

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Insetos. In: RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 7. ed., São Paulo: Roca, 2005. 1168 p.

SEBO, P. *et al.* Delineation of minimal portion of the *Bacillus sphaericus* 1593M toxin required for the expression of larvicidal activity. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 194, p. 161-165, 1990.

SERVANT, P. *et al.* Production of Cry11A and Cry11Ba toxins in *Bacillus sphaericus* confers toxicity towards *Aedes aegypti* and resistant *Culex* populations. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 65, n. 7, p. 3021-3026, 1999.

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, p. 171-183, 2001.

SHAHABUDDIN, M.; PIMENTA, P.F. *Plasmodium gallinaceum* preferentially invades vesicular ATPase-expressing cells in *Aedes aegypti* midgut. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** Washington, v. 95, p. 3385-3389, 1998.

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

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

SILVA FILHA, M. H.; 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, p. 754-761, 1997.

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

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

SINÈGRE, G. *et al.* First field occurrence of *Culex pipiens* resistance to *Bacillus sphaericus* in southern France. In: European Meeting of the Society of Vector Ecology, 8th, 1994, Barcelona. **Abstracts of the VIIIth...** Barcelona, 1994. p. 17.

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

SINGER, S. Bacterial pathogens of Culicidae (mosquitos). **Bull. World Health Organ.**, Geneva, v. 55 Suppl 1, p. 47-56, 1977.

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

SMITHBURN, K. C. *et al.* A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 20, p. 471-492, 1940.

SOUZA-NETO, J. A. *et al.* Sugar digestion in mosquitoes: identification and characterization of three midgut alpha-glucosidases of the neo-tropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 147A, n. 4, p. 993-1000, 2007.

SUN, F. *et al.* Reduction of resistance of *Culex pipiens* larvae to the binary toxin from *Bacillus sphaericus* by coexpression of *cry4Ba* from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* with binary toxin gene. **World J. Microbiol. Biothecnol.**, [Sem local], v. 17, p. 385-389, 2001.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 109B, n. 1, p. 1-62, 1994.

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

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.

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

_____. The introduction into *Bacillus sphaericus* of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* Cyt1Ab1 gene results in higher susceptibility of resistant mosquito larva populations to *B. sphaericus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 64, n. 10, p. 3910-3916, 1998.

THOMAS, W. E.; ELLAR, D. J. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. **J. Cell. Sci.**, London, v. 60, p. 181-97, 1983.

TRISRISOOK, M. *et al.* Molecular cloning of the 130-kilodalton mosquitocidal δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *Bacillus sphaericus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 56, p. 1710-1716, 1990.

VAN RIE, J., *et al.* Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, Washington, v. 247, p. 72-74, 1990.

VON TERSCH, M. A. *et al.* Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIb2 and CryIIIb2 domain I peptide. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 60, n. 10, p. 3711-3717, 1994.

WAALWIJK, C. *et al.* Molecular cloning and the nucleotide sequence of the Mr 28 000 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 13, n. 22, p. 8207-8217, 1985.

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. **Zent. Bl. Mikrobiol.**, Jena, v. 139, p. 57-60, 1984.

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

WIRTH, M. C. *et al.* Evolution of resistance toward *Bacillus sphaericus* or a mixture of *B. sphaericus*+Cyt1A from *Bacillus thuringiensis*, in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 88, n. 2, p. 154-162, 2005.

_____. 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.

_____. 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.

_____. Synergy between toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 41, n. 5, p. 935-941, 2004.

WIRTH, M. C., FEDERICI, B. A.; WALTON, W. E. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 66, n. 3, p. 1093-1097, 2000.

WIRTH, M. C.; GEORGHIOU, G. P.; FEDERICI, B. A. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 94, n. 20, p. 10536-10540, 1997.

WIRTH, M. C.; WALTON, W. E.; FEDERICI, B. A. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* restores toxicity of *Bacillus sphaericus* against resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 37, n. 3, p. 401-407, 2000.

WOODRING, J.; DAVIDSON, E. W. Biological control of mosquitoes. In: MARQUARDT, B. J. B. W. C. **The biology of disease vectors**. Colorado: University Press of Colorado, 1996. p. 530-548.

WU, D.; JOHNSON, J. J.; FEDERICI, B. A. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 13, n. 6, p. 965-972, 1994.

YOUSTEN, A. A.; DAVIDSON, E. W. Ultrastructural analysis of spores and parasporal crystals formed by *Bacillus sphaericus* 2297. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 44, n. 6, p. 1449-1455, 1982.

YUAN, Z. *et al.* High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. **Biocontrol Sci. Technol.**, Abingdon, v. 10, n. 1, p. 41-49, 2000.

_____. 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.

ZHANG, X. *et al.* A mechanism of cell death involving an adenyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 103, n. 26, p. 9897-9902, 2006.

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

APÊNDICES

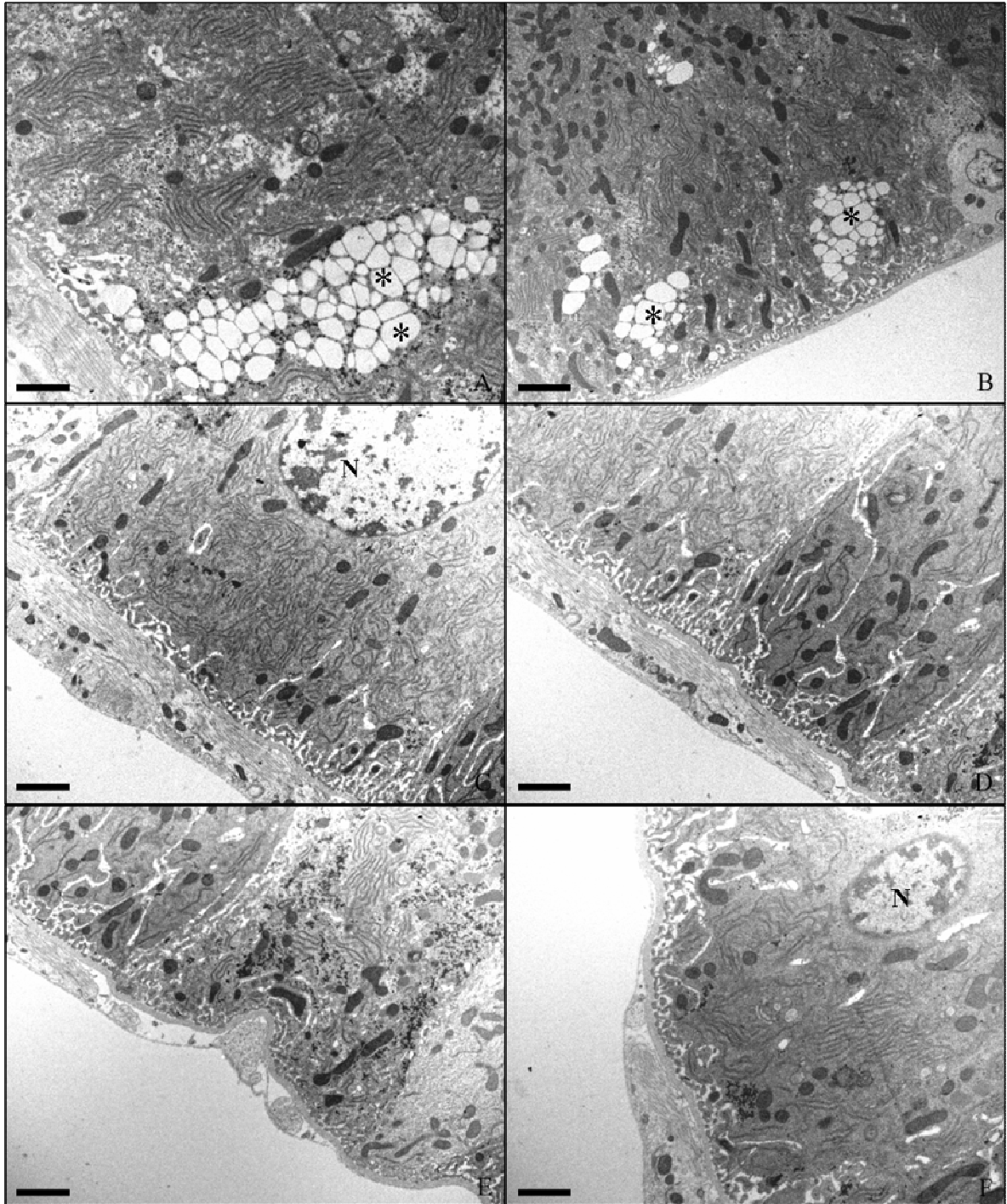
Apêndice A. Resultados complementares**Apêndice A1. Detecção de inclusões lipídicas nas células epiteliais do intestino de *Culex quinquefasciatus***

Figura S – Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* susceptível (S) à toxina Bin do *Bacillus sphaericus*, fixadas 6 h após a muda para o 4º estágio. A-B. Células positivas para a presença de inclusões lipídicas (*), entre 20 analisadas. C-F. Aspecto típico da maioria das células analisadas com ausência de inclusões lipídicas (*) na região basal. Barra de escala = 1 μ m.

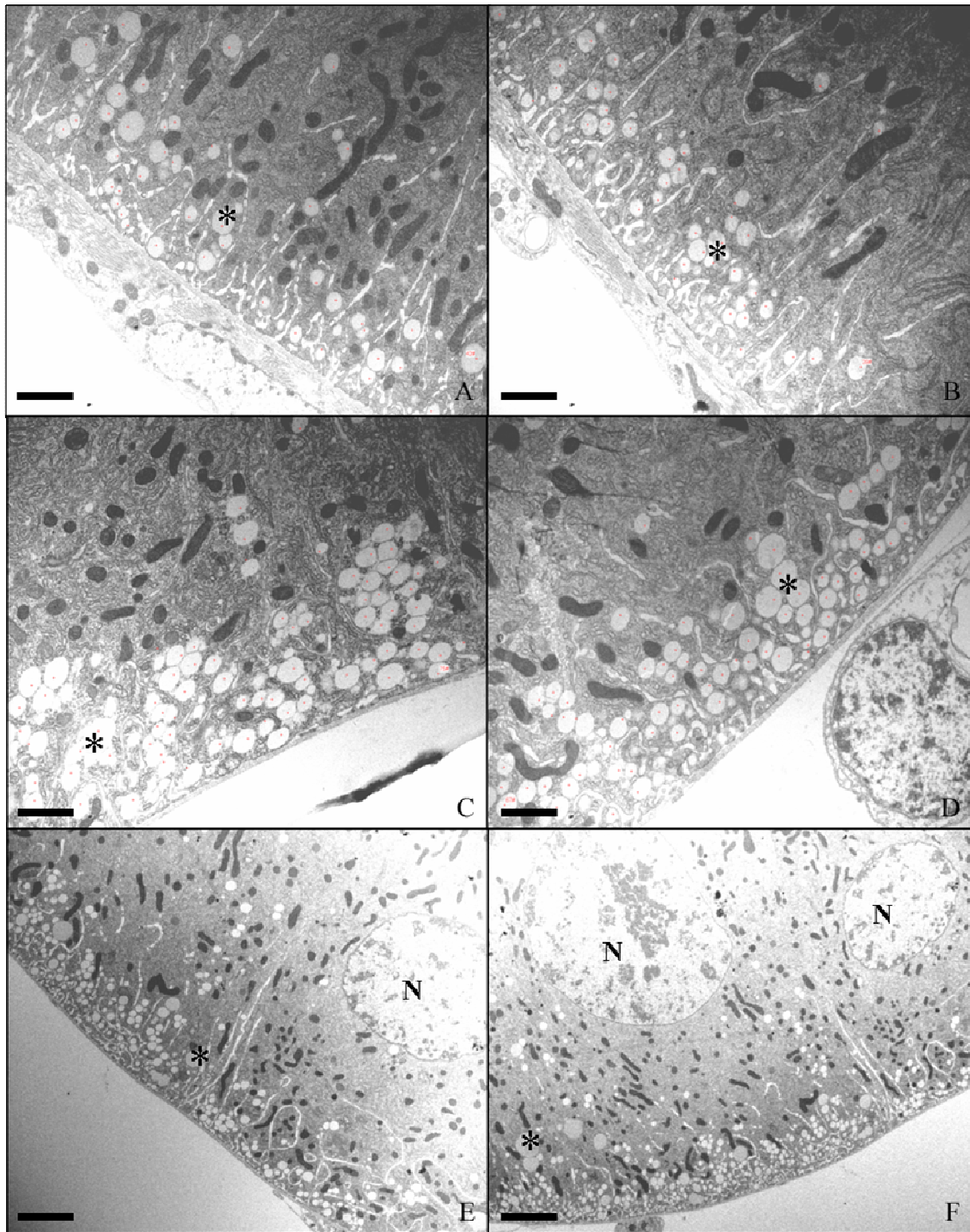


Figura R2362 – Seções transversais ultrafinas do estômago posterior de larvas de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente (R2362) à toxina Bin do *Bacillus sphaericus*, fixadas 6 h após a muda para o 4º estágio. A-F. Aspecto característico de todas as células analisadas, exibindo a presença de um grande número de inclusões lipídicas (*) na região basal. Barra de escala = 1 μm .

Apêndice A2. Produção de anticorpos contra o componente BinB

A.2.1 Objetivo

O anticorpo contra o componente BinB da toxina Binária do Bsp foi produzido em camundongos para a realização de experimentos de co-localização com o receptor Cqm1, cujo anticorpo já foi produzido previamente em coelhos e está disponível no laboratório de Entomologia (ROMÃO et al., 2006).

A2.2 Material e Métodos

A.2.2.1 Imunização

A toxina Bin do *B. sphaericus* cepa 1593 foi produzida sob a forma recombinante no Bti cepa 4Q2-81 que foi transformado com o plasmídeo pGSP10 contendo os genes para as subunidades BinA e BinB. A biomassa obtida das culturas esporuladas foi produzida e processada *in vitro*, segundo NIELSEN-LEROUX e CHARLES (1992). A dosagem de proteínas das amostras de toxina ativa foi feita segundo o método de Bradford (1976). Amostras com cerca de 800 µg de proteína foram separados em gel preparativo de eletroforese (SDS-PAGE), a 10% e visualizadas como corante Azul de Comassie. A banda de 51 kDa referente ao polipeptídeo BinB foi excisada do gel e emulsionada em 400 µL de PBS. Em cada imunização uma amostra contendo 100 µg de proteína foi inoculada em camundongos da linhagem Swiss Webster, machos, com idade de 45 dias através de três inóculos aplicados subcutaneamente no dorso do animal. Foram realizados quatro pulsos de imunização com intervalo de 15 dias entre eles. Uma semana após o último pulso foi realizada a sangria dos animais por punção cardíaca, coleta do soro e avaliação de sua capacidade de reconhecimento do componente BinB por Western-blot. O soro coletado foi armazenado em alíquotas a -70 °C, contendo azida sódica a 0,02%.

A.2.2 Avaliação do soro contra o componente BinB

Para a avaliação do soro policlonal anti-BinB, 30 µg da proteína Bin 2362 foi separada em gel preparativo de eletroforese (SDS-PAGE), a 10%, e transferida para uma membrana Hybond ECL. A membrana contendo a proteína imobilizada foi fracionada em tiras. Cada amostra da membrana foi bloqueada com solução de leite desnatado a 5%, em tampão TBS-T (Tris-HCl 1,5M, pH 7,6, NaCl 5 mM, Tween 20 0,1%). Em seguida a mesma foi lavada em TBS-T e incubada com o primeiro anticorpo diluídos em tampão TBS-T (1:1.000, 1:5.000, 1:15.000, 1:50.000), durante toda a noite, a 4 °C. As amostras foram posteriormente lavadas em tampão TBS-T e incubadas com o segundo anticorpo (anti-IgG de camundongo) conjugado à peroxidase, na diluição de 1:10.000, durante 1 hora, à TA. A especificidade e o título do anticorpo foram avaliados após a revelação da membrana pelo sistema de luninescência ECL®, (Amershan Biotech).

A2.3 Resultado

O anticorpo produzido em camundongos foi capaz de reconhecer com especificidade a banda de 51 kDa correspondente ao componente BinB da toxina Bin. (Fig. A). O reconhecimento foi observado em todas as concentrações usadas e o sinal obtido na diluição de 1:50.000 (Fig. A, pista 5) mostrou a especificidade do anticorpo. O nível de reação não específica detectado foi muito baixo.

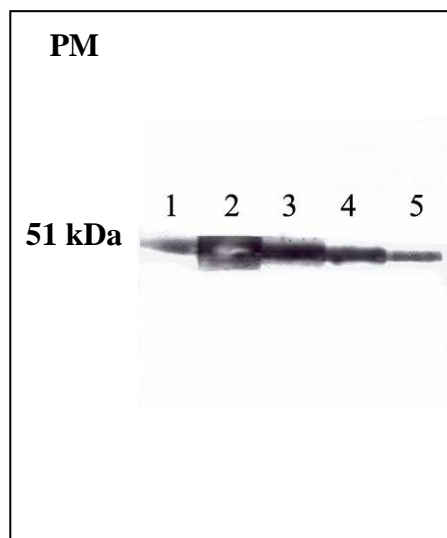


Figura A – Avaliação da especificidade e titulação do anticorpo anti-BinB produzido em camundongos. Amostras da toxina Bin foram separadas em SDS-PAGE a 10%, transferidas para membrana Hybond ECL® e submetidas à detecção com soro policlonal anti-BinB produzido em camundongos. Pista 1- controle (anticorpo anti-BinB diluído 1:10.000, produzido em coelho no Instituto Pasteur); Pista 2- 1:1.000; Pista 3- 1:5.000; Pista 4- 1:10.000; Pista 5- 1:50.000. PM: peso molecular em kDa.

Apêndice A3. Produção de anticorpos contra o componente Cry49Aa

A.3.1 Objetivo

O anticorpo anti-Cry49Aa foi produzido em coelho para sua utilização em futuros experimentos de imunolocalização desta proteína, por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia óptica confocal a laser.

A.3.2 Material e métodos

A.3.2.1 *Imunização*

Para a imunização foi utilizada a proteína Cry49Aa sob a forma recombinante produzida no Bti cepa 4Q7 transformada com o plasmídeo pHTP49, contendo o gene que codifica a toxina Cry49Aa. Cerca de 100 mg da biomassa da cultura esporulada, obtida segundo protocolo descrito na seção 4.2, foram dissolvidas em um volume de água destilada suficiente para 450 μ L e adicionado 50 μ L de PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride) a 100 mM. A amostra foi posteriormente solubilizada em 500 μ L de NaOH a 100 mM, por 1 h, sob agitação. Após esta etapa a amostra foi centrifugação a 13.000 rpm, por 30 min, a 4°C e o sobrenadante com a toxina solubilizada foi submetido à dosagem de proteína (Bradford, 1976). Cerca de 200 μ g de proteína foram separadas em gel preparativo de eletroforese (SDS-PAGE), a 10%, e visualizadas com Azul de Comassie. A banda de 49 kDa foi excisada e usada para preparar uma emulsão em 500 μ L de PBS e 500 μ L de adjuvante de Freud incompleto. A imunização foi feita em coelho da linhagem Nova Zelândia, com idade entre 3 e 4 meses. Foram realizados 4 pulsos de imunização, através da injeção subcutânea de 1 mL da emulsão distribuído em 4 pontos no dorso do animal, com intervalo de 15 dias entre cada pulso. Uma semana pós a última imunização, uma alíquota de 4 mL de sangue foi coletada do animal para teste da resposta imune do soro por Western-blot. Posteriormente foi realizada a sangria do animal para a coleta do soro total.

A.3.2.2 Purificação do anticorpo anti-Cry49Aa

O anticorpo policlonal anti-Cry49Aa foi purificado por imunoadsorção para melhorar a qualidade das imunodeteções e diminuir as reações inespecíficas observadas com o uso do soro total. Uma amostra de 200 µg da proteína Cry49Aa foi submetida à SDS-PAGE e em seguida transferida para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi corada com vermelho Ponceau e a banda correspondente à Cry49Aa foi excisada e incubada com 1 ml do soro total durante toda a noite, a 4 °C, sob agitação. Em seguida o soro depletado de anticorpos foi removido por centrifugação e a membrana foi lavada com glicina-HCl 0.1 M, pH 2.5, para a eluição do anticorpo purificado. O pH da amostra foi neutralizado com 20 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8.0 e o anticorpo obtido foi armazenado em alíquotas a -70 °C.

A.3.2.3 Avaliação do soro contra a proteína Cry49Aa imunoadsorvido

A concentração e especificidade do soro anti-Cry49Aa purificado foi avaliada através de ensaios de Western-blot. Para tal foi realizada uma curva de diluição da proteína Cry49Aa (0,5, 1,0 e 5,0 µg) e as amostras resultantes foram separadas em gel SDS-PAGE a 10% e transferidas para uma membrana Hybond ECL. A membrana contendo as proteínas imobilizadas foi bloqueada com solução de leite desnatado a 5%, Tween 20 a 0,05% em PBS. Em seguida foi lavada com o tampão TBS-T e incubada em duas diferentes concentrações do primeiro anticorpo (1:100 e 1:500) em solução de leite desnatado em TBS-T, durante 1 hora. Após incubação com o primeiro anticorpo a membrana foi lavada em TBS-T e incubada com o segundo anticorpo (anti-IgG de coelho) conjugado à peroxidase, na concentração de 1:10.000, durante 1 hora, a TA. A especificidade e o título do anticorpo foram avaliados após a revelação da membrana pelo sistema de luminescência ECL® (Amershan Biotech).

A.3.3 Resultado

O soro policlonal anti-Cry49Aa produzido em coelho e imunoadsorvido foi capaz de detectar as três concentrações do antígeno testadas (0,5, 1,0 e 5,0 µg), apresentando um padrão forte e específico de reconhecimento das mesmas em ambas as diluições, 1:100 e 1:500, do anticorpo (Fig. B).

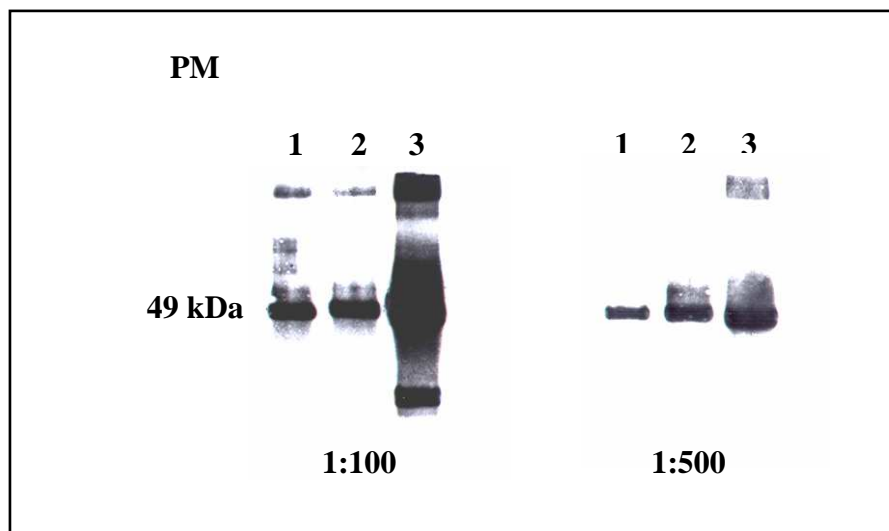


Figura B – Avaliação da especificidade e titulação do anticorpo anti-Cry49Aa imunoabsorvido. Amostras de 0,5 (1), 1,0 (2) e 5,0 (3) μ g da proteína Cry49Aa foram separadas em SDS-PAGE a 10%, transferidas para membrana Hybond ECL® e submetidas à imunodeteção com soro policlonal anti-Cry49Aa produzido em coelho, nas diluições de 1:100 e 1:500. PM: peso molecular em kDa.

Apêndice B. Artigo no prelo

+ Models
JMJC 1233 1-9

ARTICLE IN PRESS



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Micron xxx (2008) xxx-xxx

www.elsevier.com/locate/micron

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*

Q1 Janaina Viana de Melo, Romero Henrique Teixeira Vasconcelos, André Freire Furtado, Christina Alves Peixoto, Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha *

Q2 Department of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE 50670-420, Brazil

Received 21 November 2007; received in revised form 1 February 2008; accepted 2 February 2008

Abstract

The larvicidal action of the entomopathogen *Bacillus sphaericus* towards *Culex quinquefasciatus* is due to the binary (Bin) toxin present in crystals, which are produced during bacterial sporulation. The Bin toxin needs to recognize and bind specifically to a single class of receptors, named Cqm1, which are 60-kDa α -glucosidases attached to the apical membrane of midgut cells by a glycosylphosphatidylinositol anchor. *C. quinquefasciatus* resistance to *B. sphaericus* has been often associated with the absence of the α -glucosidase Cqm1 in larvae midgut microvilli. In this work, we aimed to investigate, at the ultrastructural level, the midgut cells from *C. quinquefasciatus* larvae whose resistance relies on the lack of the Cqm1 receptor. The morphological analysis showed that midgut columnar cells from the resistant larvae are characterized by a pronounced production of lipid inclusions, throughout the 4th instar. At the end of this stage, resistant larvae had an increased size and number of these inclusions in the midgut cells, while only a small number were observed in the cells from susceptible larvae. The morphological differences in the midgut cells of resistant larvae found in this work suggested that the lack of the Cqm1 receptor, which also has a physiological role as being an α -glucosidase, can be related to changes in the cell metabolism. The ultrastructural effects of Bin toxin on midgut epithelial cells from susceptible and resistant larvae were also investigated. The cytopathological alterations observed in susceptible larvae treated with a lethal concentration of toxin included breakdown of the endoplasmic reticulum, mitochondrial swelling, microvillar disruption and vacuolization. Some effects were observed in cells from resistant larvae, although those alterations did not lead to larval death, indicating that the receptor Cqm1 is essential to mediate the larvicidal action of the toxin.

This is the first ultrastructural study to show differences in the cell morphology of resistant larvae and further investigation is needed to understand the impact of the lack of expression of midgut enzymes on the physiology of resistant insects.

© 2008 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Binary toxin; Cqm1; α -Glucosidase; Receptor; Lipid inclusions

1. Introduction

Bacillus sphaericus Neide is an entomopathogenic bacterium that has been effectively used to control *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) that can play an important role as a vector of human diseases agents. The larvicidal activity of *B. sphaericus*, which is restricted to some Culicidae species, is due to the crystal inclusion synthesized during the sporulation. The crystal is the major insecticidal factor found in highly toxic strains since it contains the binary

protoxin (Bin) composed of two polypeptides, BinA (42-kDa) and BinB (51-kDa) (Baumann et al., 1985). Upon ingestion by *C. quinquefasciatus* larvae, the crystal is solubilized in the prevailing alkaline conditions of the midgut. The Bin toxin is released into the lumen and, after proteolytical activation, it binds specifically to a single class of receptors (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992). The receptor, named Cqm1, is a 60-kDa α -glucosidase attached to the apical membrane of epithelial cells by a glycosylphosphatidylinositol anchor (Silva-Filha et al., 1999; Darboux et al., 2001; Romão et al., 2006).

The optimal level of toxicity of *B. sphaericus* against *Culex* larvae is achieved in the presence of equimolar amounts of both Bin components (Oei et al., 1992; Nicolas et al., 1993; Charles et al., 1997). These act synergistically, BinB being responsible for the recognition and binding to the Cqm1 receptors localized

* Corresponding author at: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Department of Entomology, Av. Prof. Moraes Rêgo s/n, Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-420, Brazil.
Tel.: +55 81 21012553; fax: +55 81 21012516.

E-mail address: mhneves@cpqam.fiocruz.br (M.H.N.L. Silva-Filha).

57 on the epithelium of gastric caeca and posterior stomach
58 (Davidson, 1988, 1989), whereas BinA is related to the cell
59 toxicity (Nicolas et al., 1993; Charles et al., 1997). Bin
60 components seem to interact in solution before binding to the
61 receptor and are able to insert into the cell membrane, in order
62 to form pores or channels (Schwartz et al., 2001; Pauchet et al.,
63 2005; Boonserm et al., 2006). Several studies suggested that
64 after binding to the membrane receptors, the toxin components
65 could be internalized by the epithelial midgut cells, although
66 the mechanism that leads to the larval death has not yet been
67 completely elucidated (Davidson, 1988, 1989; Narasu and
68 Gopinathan, 1988; Oei et al., 1992; Silva-Filha and Peixoto,
69 2003). The cytopathological effects provoked by the Bin toxin
70 include lesions in the midgut, central nervous system and
71 skeletal muscles (Charles, 1987; Singh and Gil, 1988). The
72 alterations observed in intoxicated midgut epithelial cells were
73 the presence of large cytoplasmic vacuoles, an increased
74 number and size of lysosomes, disruption of the endoplasmic
75 reticulum and microvillar destruction (Charles, 1987; Davidson
76 and Titus, 1987; Singh and Gil, 1988; Silva-Filha and Peixoto,
77 2003).

79 *C. quinquefasciatus* resistance to *B. sphaericus* Bin toxin has
80 been reported and the most important mechanism that underlies
81 resistance is related to the absence of Cqm1 receptor on the
82 midgut microvilli, which is determined by a single recessively
83 inherited gene (Nielsen-LeRoux et al., 1995, 2002; Oliveira
84 et al., 2004; Silva-Filha et al., 2004). The molecular basis of this
85 resistance mechanism relies on mutations in the *cqm1* receptor
86 gene that lead to the formation of a truncated protein lacking a
87 segment of the C-terminus containing the GPI anchor,
88 consequently the protein is absent from the cell membrane
89 (Darboux et al., 2002; Romão et al., 2006). It has been also
90 shown that the insertion of a transposable element into the
91 receptor gene leads to the expression of an altered membrane-
92 bound protein, which is unable to bind to the Bin toxin
93 (Darboux et al., 2007).

94 The presence of a functional receptor in the midgut
95 microvilli is considered to be essential for the action of the
96 Bin toxin. In addition this molecule has a relevant physiological
97 role in larvae digestion (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992;
98 Nielsen-LeRoux et al., 2002; Silva-Filha et al., 2004). The aim
99 of this work was to investigate the morphology of midgut cells
100 from *C. quinquefasciatus* larvae, whose high resistance towards
101 *B. sphaericus* relies on the lack of the midgut membrane-bound
102 receptor Cqm1. In attempting to answer this question an
103 ultrastructural analysis was performed using larvae from a
104 susceptible and a *B. sphaericus*-resistant colony.

2. Materials and methods

2.1. *Culex quinquefasciatus* colonies

106 Fourth instar larvae from a susceptible colony (CqSF) and a
107 colony highly resistant to *B. sphaericus* strain 2362 (CqRL1/
108 2362), were used in this work. CqSF has been maintained for
109 more than 10 years in the insectarium of the Department of
110 Entomology/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. The
111

CqRL1/2362 colony was derived from CqSF and, after
laboratory selection with *B. sphaericus* strain 2362, it attained
a resistance ratio higher than 100,000-fold (Pei et al., 2002).
The resistance of CqRL1/2362 larvae relies on the lack of the
Cqm1 receptor in the apical membrane of midgut cells
(Oliveira et al., 2004; Romão et al., 2006). The colonies were
maintained at 26 ± 1 °C, 70% relative humidity and 12:12 h
(light:dark) photoperiod. Larvae were reared in dechlorinated
water and fed on cat food Whiskas[®] (McLean, VA, USA).
Adults were maintained on a 10% sugar solution and females
were also fed on chicken.

2.2. Recombinant binary toxin

B. thuringiensis serovar. *israelensis* strain 4Q2-81 (*Cry
minus*), transformed with the plasmid pGSP10 containing genes
for the BinA and BinB subunits from *B. sphaericus* strain 1593,
were used in this work (Bourgouin et al., 1990). Biomass from a
72-h sporulated culture was recovered by centrifugation and
washed with 1 M NaCl/10 mM EDTA and with 10 mM EDTA,
sequentially, and stored at -20 °C. The biomass was further
lyophilized and a powder containing a mixture of spore/crystals
was used to treat larvae submitted to the bioassays.

2.3. *In vivo* toxicity assays

Bioassays were performed according to the standard method
recommended by the World Health Organization (WHO, 1985).
Groups of 20 early 4th instar larvae placed in 100 mL of
distilled water in plastic cups, were used in the assays.
Susceptible larvae were treated with the respective aliquot of
the bacterial suspension at 5 g/L, in order to induce 90%
mortality of larvae after 48 h exposure (LC₉₀ 0.1 mg/L),
previously determined for the CqSF colony. Resistant larvae
from CqRL1/2362 colony were treated with a concentration
100-fold higher the LC₉₀ for the CqSF colony. A control group
tested with water alone was run in each experiment. All larvae
were fed with a small amount of macerated cat food. Larvae
from treated and untreated groups were collected after different
exposure periods to the Bin toxin and were processed for
transmission electron microscopy, as described below. The
remaining experimental groups were kept to record larval
mortality after a 48-h exposure to Bin toxin.

2.4. Dissection and processing for transmission electron microscopy

In order to analyze the morphology of midgut cells, groups
of untreated larvae from susceptible and resistant colonies were
dissected at 30 min, 4, 6 and 48 h after the 4th instar moult.
To compare the Bin toxin effects on midgut cells, early 4th instar
larvae from both colonies that were submitted to the bioassays,
were dissected 1 and 6 h after treatment. Ten larvae from each
experimental group were chilled on ice and the midguts were
excised under a binocular microscope. After removing the food
enclosed by the peritrophic membrane and the Malpighian
tubules, the posterior stomach was processed for transmission

162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174

electron microscopic analysis. Specimens were fixed overnight at 4 °C, with 3% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. After fixation, samples were washed twice in the same buffer and post-fixed in 1% osmium tetroxide, 5 mM CaCl₂ and 0.8% potassium ferricyanide in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. Samples were then dehydrated in acetone and embedded in Epon[®] 812 resin (Sigma, St. Louis, MO, USA). Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a ZEISS EM 109 transmission electron microscope. Semi-thin sections were stained with Toluidine blue and observed with a ZEISS AXIOPHOT light microscope, to determine the overall aspect of larvae midgut.

2.5. Cytochemistry

175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187

A cytochemical assay used to detect unsaturated fatty acids was performed according to Angermüller and Fahimi (1982). Larvae were fixed 48 h after the 4th instar moult for 2 h at room temperature with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. Samples were washed twice in the same buffer, once in 0.1 M imidazole buffer pH 7.2, and post-fixed for 30 min at room temperature with 2% osmium tetroxide in 0.1 M imidazole buffer, pH 7.5. Subsequently, the specimens were washed in imidazole buffer, dehydrated in acetone, and embedded in Epon[®] 812 resin. Thin sections were analyzed without staining with a ZEISS EM 109 transmission electron microscope.

3. Results

188

3.1. Morphology of the midgut cells

189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214

The first aspect investigated in this work was the morphology of midgut epithelial cells from untreated larvae of a susceptible and a *B. sphaericus*-resistant colony, at different times after the 4th instar moult. Semi-thin sections were obtained to observe the overall aspect of the midgut by light microscopy (Fig. 1A) and showed a monolayer epithelium composed of numerous columnar and sparse regenerative cells (Fig. 1B). These later were small cells that did not present microvilli and were basally distributed in the epithelium, as shown by transmission electron microscopy (Fig. 1C). A thin basal lamina surrounded the circular digestive tube and separated the epithelium from the longitudinal and transverse muscles and other structures (Fig. 2A). Myoid cells with rounded mitochondria and numerous myofilaments were frequently observed (Fig. 2A, B and D). The epithelial cells presented abundant rough endoplasmic reticulum and elongated and rounded mitochondria (Fig. 2A-E). Susceptible larvae dissected 48 h after moult presented some electron-lucent inclusions at the basal region (Fig. 2B), but not at the apical region of columnar epithelial cells (Fig. 2C).

The cells from resistant larvae dissected 30 min and 4 h after the 4th instar moult, presented a general morphology similar to the cells from susceptible larvae analyzed at the same times (data not shown). At 6 h after moult the cells from resistant larvae showed the basal lamina, the rough endoplasmic

reticulum and mitochondria with a normal aspect, however, contrary to that observed in susceptible larvae at this stage of aging, numerous electron-lucent inclusions were observed at the basal side of the cells (Fig. 2D). Larvae from both colonies were analyzed for the number of these inclusions observed in the midgut columnar cells, 6 h after the moult. Resistant larvae showed an average of 185 inclusions per cell versus six inclusions per cell detected in susceptible larvae (Table 1). Moreover, most cells of susceptible larvae analyzed at that time period did not contain any inclusions. This morphological aspect was a characteristic of the cells from resistant larvae and, in individuals dissected 48 h after moult these inclusions became more abundant and increased in size (Fig. 2E). Midguts of resistant larvae dissected 48 h after moult were submitted to a cytochemical assay to investigate the nature of the electron-lucent inclusions. Samples fixed in imidazole-buffered osmium tetroxide solution exhibited a high density inside the inclusions, revealing their lipid content (Fig. 2F).

3.2. Effects of the Bin toxin on the midgut cells

The analysis of the midgut cell morphology was followed by the comparison of the Bin toxin action on the cells of early 4th instar larvae from a susceptible and a *B. sphaericus*-resistant colony. The treated groups of susceptible larvae showed close to 90% mortality after 48 h of treatment, as expected, whereas the treated groups of resistant larvae and the untreated control groups of larvae from both colonies did not show significant mortality levels (Table 2). The midgut of non-treated susceptible larvae possesses a well-preserved layer of epithelial cells rich in mitochondria and rough endoplasmic reticulum (Fig. 3A). Glycogen reserve granules were present in the basal region of the polarized epithelial cell and, at the opposite side, the surrounding basal lamina was underneath the basal labyrinth (Fig. 3A). The gut lumen was lined by a brush border membrane composed of numerous and regularly placed microvilli (Fig. 3B). The initial damage in susceptible cells was found 1 h after treatment. The integrity of the rough endoplasmic reticulum was disrupted forming numerous small vesicles in the cytoplasm (Fig. 3C) and the mitochondria present at the basal side of the epithelial cells showed a swollen matrix, compared to the mitochondria present in the myoid cells (Fig. 3D). The presence of electron-dense granules was also observed (data not shown). The major cytopathological alterations were found in susceptible larvae dissected 6 h after treatment. Large vacuoles of different sizes and containing broken membranes were detected in the cytoplasm, at the apical side of the epithelial cells (Fig. 3E). The mitochondrial swelling and extensive cellular microvillar disruption were also detected (Fig. 3E and F).

The comparative analysis of the midgut cells from untreated resistant larvae generated similar data to that from untreated susceptible larvae (Fig. 4A). Some effects were detected in the cells from treated resistant larvae, despite of the absence of the Cqm1 receptor on the midgut cell membrane. Resistant larvae analyzed 1 and 6 h after treatment showed the presence of electron-dense granules with disruption of the rough endoplas-

214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232

233

234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262263
264
265
266
267
268
269

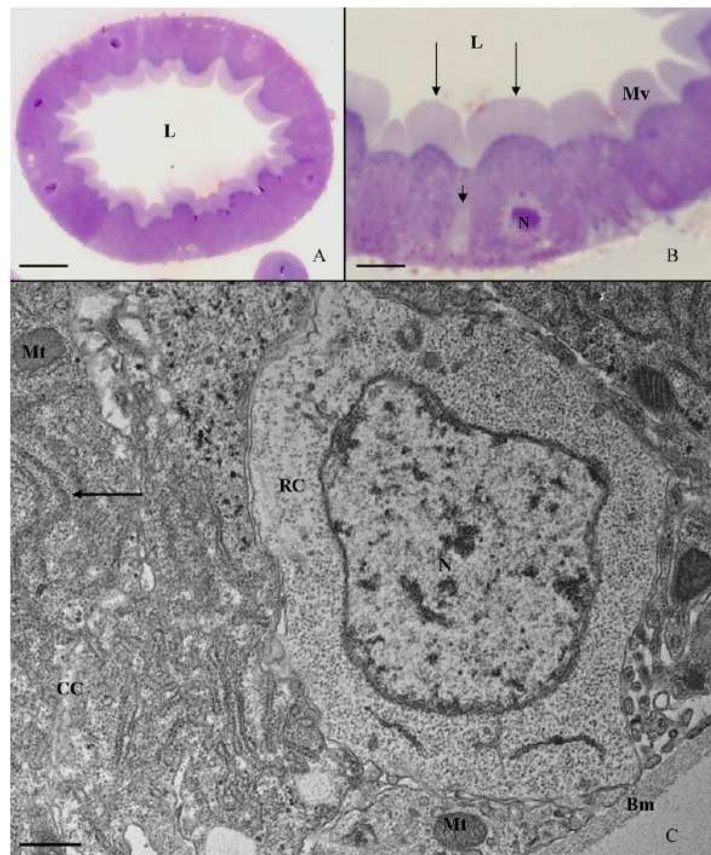


Fig. 1. Midgut cells of *Culex quinquefasciatus* larvae from a susceptible colony. (A) Light micrograph of a transverse semi-thin section showing the general aspect of the posterior stomach epithelium; lumen (L). Scale bar = 25 μm . (B) Columnar cells rich in microvilli (long arrows) and a basal regenerative cell (short arrow) from the section showed in (A); nucleus (N); lumen (L); microvilli (Mv). Scale bar = 10 μm . (C) Transmission electron micrograph of a transverse ultrathin section showing a regenerative cell (RC) at the basal side of a columnar cell (CC) rich in rough endoplasmic reticulum (arrow) and mitochondria (Mt); nucleus (N); basal membrane (Bm). Scale bar = 1 μm .

269

270 mic reticulum, producing ribosome-coated vesicles (Fig. 4B and
271 C). At 6 h the mitochondria at the basal (Fig. 4C) and apical
272 (Fig. 4D) sides of the cells were swollen and the inner
273 mitochondrial membrane became disorganized, while microvilli
274 were still intact and vacuoles were not observed (Fig. 4D). As
275 previously mentioned, the treated groups of resistant larvae did
276 not show significant mortality ($\approx 4\%$).

4. Discussion

277

278 An ultrastructural comparison of the midgut epithelial cell
279 morphology of *C. quinquefasciatus* larvae from a susceptible
280 and a *B. sphaericus*-resistant colony was performed in this
281 work. The general appearance of the larval midgut was similar

281 to that described previously for *Aedes aegypti* adult mosquitoes
282 (Houk, 1977; Clements, 1992; Shahabuddin and Pimenta,
283 1998), although only two types of cells, columnar and
284 regenerative, were identified. A few hours after the 4th instar
285 moult, the cells from susceptible and resistant larvae presented
286 similar morphology, however, by the 6 h after moult the
287 accumulation of lipid inclusions in the midgut columnar cells
288 clearly distinguished resistant from susceptible larvae. The
289 significant production of inclusions throughout the 4th instar,
290 whose increase was directly correlated to larvae age, suggested
291 an alteration in the metabolism of resistant larvae. This is the
292 first report of morphological alterations on the midgut cells of
293 larvae, whose resistance to bacterial toxins is related to the lack
294 of membrane-bound receptors that have a physiology role.
295

Please cite this article in press as: de Melo, J.V., et al., Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*, Micron (2008), doi:10.1016/j.micron.2008.02.002

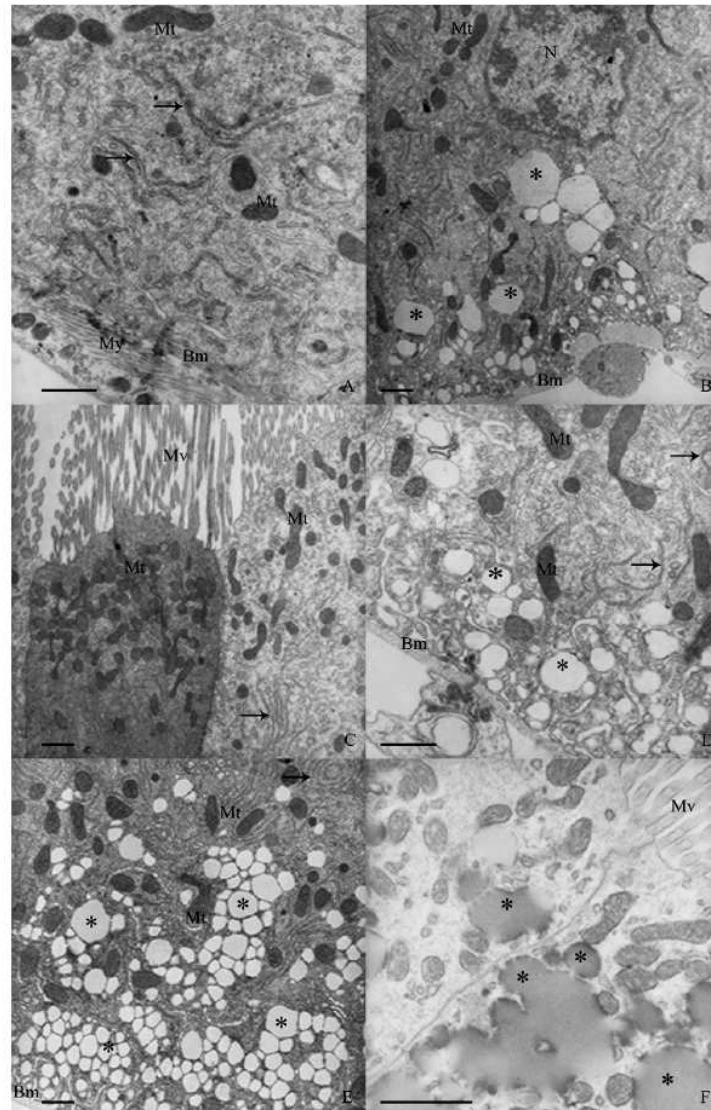


Fig. 2. Transverse ultrathin sections of the posterior stomach of *Culex quinquefasciatus* larvae, from a susceptible and a *Bacillus sphaericus*-resistant colony, analyzed in different time periods after the 4th instar moult. (A) Cell from susceptible larvae fixed 6 h after moult; the basal membrane (Bm) surrounds the cell, rich in rough endoplasmic reticulum (arrows); elongated and rounded mitochondria (Mt) are present in the cytoplasm and inside the myoid cell (My). (B) Cell from susceptible larvae fixed 48 h after moult; presence of electron-lucent inclusion (*) in the basal region of the cell; basal membrane (Bm) and mitochondria (Mt) are well preserved; nucleus (N) at the basal position. (C) Apical region of a cell from susceptible larvae 48 h after moult; numerous mitochondria (Mt) and extensive rough endoplasmic reticulum (arrow) is present; electron-lucent inclusions are not present in this region of the cell; microvilli (Mv). (D) Cell from resistant larvae fixed 6 h after moult; electron-lucent inclusions (*) are present close to the basal region; rough endoplasmic reticulum (arrows) and mitochondria (Mt) are well preserved; basal membrane (Bm) lining the cell shows normal features. (E) Cell from resistant larvae fixed 48 h after moult; electron-lucent inclusions (*), present in increased number and size, are concentrated in the basal region of the cell; rough endoplasmic reticulum (arrow) and mitochondria (Mt) are not altered; basal membrane (Bm). (F) Cell from resistant larvae fixed 48 h after moult; the lipid nature of the electron-lucent inclusions (*) revealed by the osmium-imidazole complex method; mitochondria (Mt); microvilli (Mv). Scale bars = 1 µm.

Please cite this article in press as: de Melo, J.V., et al., Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*, Micron (2008), doi:10.1016/j.micron.2008.02.002

Table 1
Number of lipid inclusions present in midgut epithelial cells of *Culex quinquefasciatus* larvae from a susceptible (CqSF) and a *Bacillus sphaericus*-resistant colony (CqRL1/2362), analyzed 6 h after the 4th instar moult

Colony	No. of cells	No. of cells with inclusions	No. of inclusions	Inclusions per cell $\bar{X} \pm S.D.$
CqSF	20	2	120	6.0 \pm 18.81
CqRL1/2362	10	10	1854	185.4 \pm 47.72

295

296 Insect receptors of entomopathogenic bacterial toxins have
297 proven to be, in most cases, midgut enzymes such as
298 aminopeptidases, alkaline phosphatases and glucosidases
299 (Knight et al., 1994; Luo et al., 1997; Silva-Filha et al.,
300 1999; Fernandez et al., 2006; Abdullah et al., 2006). The Cqm1
301 receptor belongs to the group of α -glucosidases (EC 3.2.1.20,
302 α -glucosidase glucohydrolase), which is essential in the
303 metabolic pathway catalyzing the hydrolysis of α -glucosyl
304 residues from the non-reducing end of α -linked substrates, to
305 release α -glucose (Terra et al., 1996). The fact that these
306 receptors might have a primary role in the midgut physiology
307 suggests that molecules with overlapping or similar functions
308 could compensate for their absence or reduction. Van Rie et al.
309 (1989) studying the resistance of *Plodia interpunctella*
310 (Lepidoptera: Pyralidae) to *B. thuringiensis* Cry1Ab toxin,
311 suggested that the loss of a receptor could be compensated by
312 others, with similar functions. Likewise, previous data
313 indicated that the total α -glucosidase activity detected in
314 midgut microvillar samples from CqRL1/2362 resistant larvae
315 was similar to susceptible ones (Romão et al., 2006).
316 Hypothetically, the similar level of α -glucosidase activity
317 found could be explained if the expression of the remaining α -
318 glucosidases is increased to compensate the lack of Cqm1 or,
319 instead, Cqm1 could be a minor component of this enzyme
320 group. Corroborating the findings of Romão et al. (2006) that
321 showed that not one but a group of α -glucosidases expressed in
322 *C. quinquefasciatus* larvae, a recent study demonstrated that
323 three α -glucosidase isoforms are synthesized in the midgut of
324 *Anopheles aquasalis* (Souza-Neto et al., 2007).

325 On the other hand, if the lack of the Cqm1 α -glucosidase is
326 not critical and unrelated to changes on the cell metabolism, it is
327 likely that resistance, although monogenic, could involve the
328 activation of secondary genes potentially responsible for the
329 alterations observed in resistant individuals. The nutritional
330 storage during the larval stage is essential for the adult survival

and the resistant CqRL1/2362 colony, despite the fact that it has
been maintained under laboratory conditions for more than 5
years, showed reduction of fitness cost in two respects. The
development time from egg to egg was longer, and most
females from the resistant colony required two blood meals
prior to laying the first batch of eggs, in contrast to 60% of
susceptible females, that needed only one blood meal (Oliveira
et al., 2003). Data from the present work relating to aspects of
biological performance suggest that CqRL1/2362 resistant
insects might have characteristics involving nutritional storage
that could differ from the susceptible insects.

Ultrastructurally, the posterior stomach cells from susceptible
larvae treated with the toxin showed major cytopathological
alterations, such as endoplasmic reticulum breakdown,
mitochondrial swelling, cytoplasmic vacuolation and micro-
villar disruption. The Bin toxin actions on the cells of *C.*
quinquefasciatus larvae observed in this work were in
agreement with those previously reported in the literature,
except for the fact that changes were detected from 1 h after
treatment in this work, whereas other publications recorded
alterations as soon as 15 min after toxin ingestion (Charles,
1987; Singh and Gil, 1988; Silva-Filha and Peixoto, 2003).
Data on the mode of action of *B. sphaericus* towards *C.*
quinquefasciatus larvae showed that larvicidal action depends
on the binding of the Bin toxin to Cqm1 midgut receptor
(Nielsen-LeRoux and Charles, 1992; Nielsen-LeRoux et al.,
1995, 2002; Silva-Filha et al., 2004). Our work showed that
midgut cells from resistant larvae lacking the Cqm1 receptor
displayed alterations when treated with the Bin toxin, however,
some effects were different to those observed in susceptible
larvae in that they did not lead to larval death. The presence of
electron-dense granules and mitochondrial swelling, that were
the major effects observed in the cells from resistant larvae 6 h
after treatment, could be due to the direct exposure to a high
concentration of Bin toxin used in the bioassays. Mitochondrial
swelling and breakdown of the endoplasmic reticulum, were
also observed in the larvae of a naturally refractory species *A.*
aegypti, when treated under similar conditions (Charles, 1987).
This could be explained by the direct action of the BinA
component that is able to provoke some level of toxicity when
high doses are ingested, independently of the binding between
BinB and the cell receptor (Nicolas et al., 1993). In the case of
our study, the cell alterations observed in the midgut of resistant
larvae are not likely to be relevant for larvae survival and data

Table 2

Mortality of *Culex quinquefasciatus* 4th instar larvae from a susceptible (CqSF) and a *Bacillus sphaericus*-resistant colony (CqRL1/2362) that were exposed to a high concentration of lyophilized powder containing crystals of *B. sphaericus* recombinant Binary toxin

Colony	Treated groups			Untreated groups		
	Bioassays ^a		EM samples ^b	Bioassays ^a		EM samples ^b
	N	% Mortality	N	N	% Mortality	N
CqSF	160	86.3	80	160	3.1	40
CqRL1/2362	180	3.8	80	200	4.4	80

^a Mortality was recorded in the treated and untreated groups of larvae after a 48-h period.

^b Larvae from the treated groups, after different periods of exposure to the toxin, and from untreated groups were processed for transmission electron microscopy (EM).

Please cite this article in press as: de Melo, J.V., et al., Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*, Micron (2008), doi:10.1016/j.micron.2008.02.002

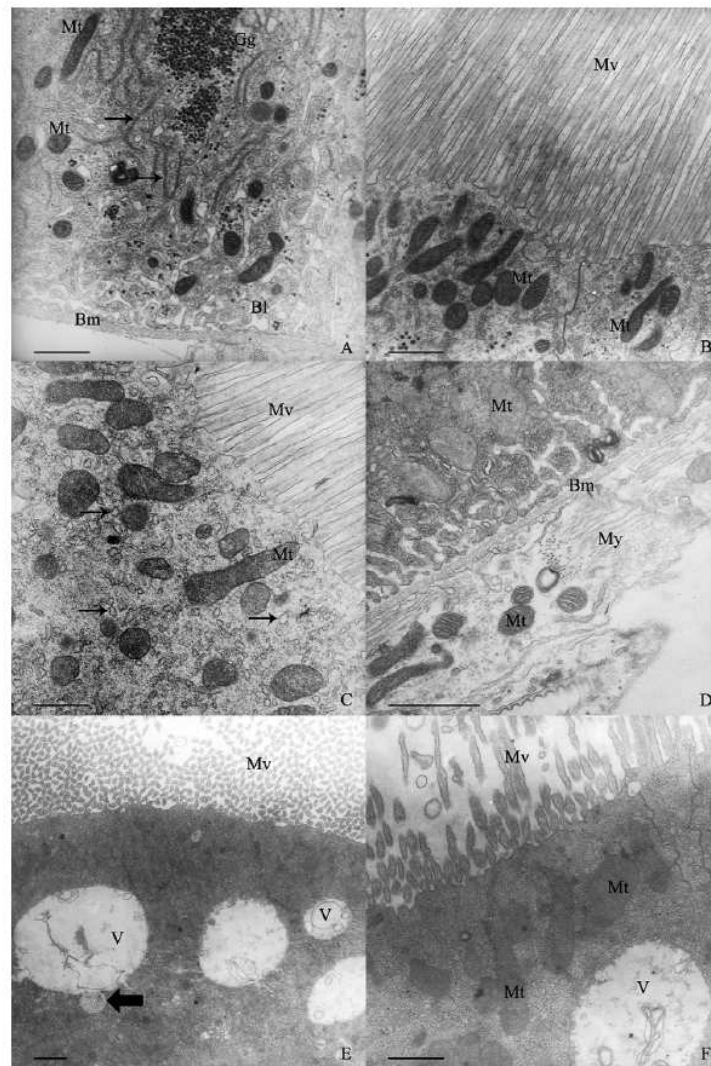


Fig. 3. Transverse ultrathin sections of the posterior stomach from 4th instar *Culex quinquefasciatus* susceptible larvae. (A) Columnar epithelial cell from untreated larvae rich in rough endoplasmic reticulum (arrows), mitochondria (Mt) and glycogen granules (Gg); basal labyrinth (Bl); basal membrane (Bm). (B) Apical region of the cell from untreated larvae showing numerous microvilli (Mv) in parallel lines and many mitochondria (Mt). (C) Rough endoplasmic reticulum breakdown (arrows) at the apical region of the cell from 1 h-treated larvae; mitochondria (Mt) are at an initial stage of swelling, but the microvilli (Mv) are still intact. (D) Swelling mitochondrial (Mt) at the basal side of the cell; mitochondria present in the myoid cell (My) are not damaged; basal membrane (Bm). (E) Cell from 6 h-treated larvae showing an increased number of vacuoles (V); a small vesicle containing electron-dense material is present, in fusion with a large vacuole (large arrow); disrupted microvilli (Mv). (F) Cell from 6 h-treated larvae showing severe microvillar (Mv) breakdown; a large vacuole (V) containing broken membranes is present and there is mitochondrial swelling (Mt). Scale bars = 1 μ m.

374
375
376
377

376
377
378
379

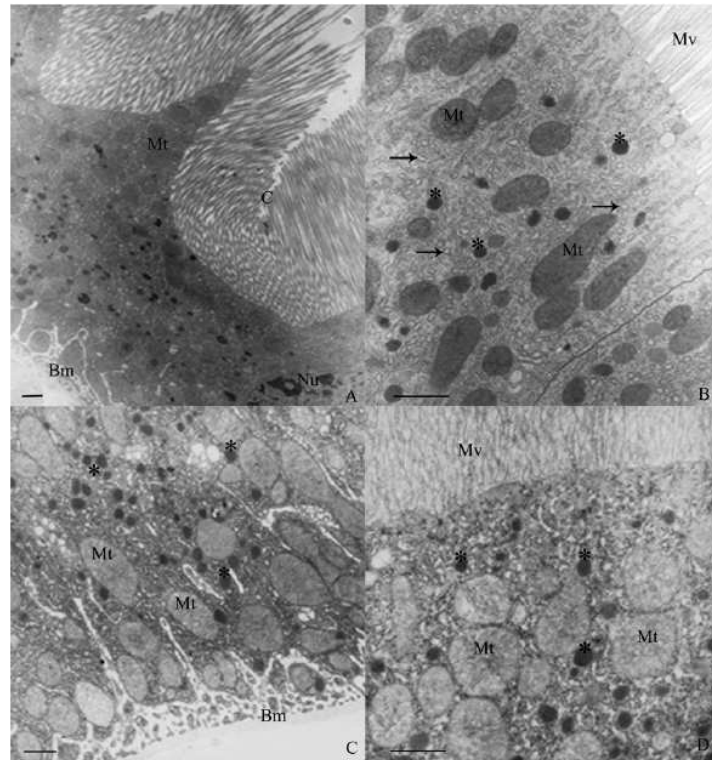


Fig. 4. Transverse ultrathin sections of the posterior stomach from 4th instar *Culex quinquefasciatus* larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. (A) Cell from untreated larvae showing numerous mitochondria (Mt) at the apical region; the microvilli occasionally invaginate into the epithelia to form crypts (C); basal membrane (Bm); nucleus (N). (B) Epithelial cell from 1 h-treated larvae showing electron-dense granules (*) and small ribosome-coated vesicles (arrows); the mitochondria (Mt) and microvilli (Mv) remain intact. (C) Cell from 6 h-treated larvae with a dense cytoplasm; mitochondria (Mt) are enlarged and contain a condensed matrix; presence of electron-dense granules (*). (D) Epithelial cell from 6 h-treated larvae with well preserved microvilli, enlarged mitochondria (Mt) and electron-dense granules (*). Scale bars = 1 μ m.

374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386

showed that, the Cqm1 α -glucosidase is essential to mediate the insecticidal action of Bin toxin. Our study has shown that cellular alterations produced by the Bin toxin in cells lacking membrane-bound receptors do not lead to larval death. Data suggested that the lethal action of the toxin is mediated by the Cqm1 receptor and might depend on more complex events at the intracellular level. This ultrastructural study indicates differences in the midgut cell morphology of resistant larvae, but further investigations are needed to understand the impact of the lack of expression of midgut enzymes on the physiology and fitness requirements of resistant insects.

Uncited references

387
388
389

Charles et al. (2002), Nielsen-LeRoux et al. (1997), Silva-Filha et al. (1997) and Van Rie et al. (1990).

Acknowledgments

We thank Raimundo Nazareno Contente Pimentel for the technical photographic support and Cláudia Maria Fontes de Oliveira for advising the bioassays procedures. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq grants 475647/2004-1 and 471119/2006-2) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

Abdullah, M.A., Valaitis, A.P., Dean, D.H., 2006. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. BMC Biochem. 7, 10-16.
Angermüller, S., Fahimi, H.D., 1982. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. Histochem. J. 14, 823-835.

389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404

Please cite this article in press as: de Melo, J.V., et al., Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*, Micron (2008), doi:10.1016/j.micron.2008.02.002

- 405 Baumann, P., Unterman, B.M., Baumann, L., Broadwell, A.H., Abbene, S.J.,
406 Bowditch, R.D., 1985. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus*
407 *sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. *J. Bacteriol.*
408 163, 738–747.
- 409 Boonserm, P., Moonsom, S., Boonchay, C., Promdonkoy, B., Parthasarathy, K.,
410 Torres, J., 2006. Association of the components of the binary toxin from
411 *Bacillus sphaericus* in solution and with model lipid bilayers. *Biochem.*
412 *Biophys. Res. Commun.* 342, 1273–1278.
- 413 Bourgouin, C., Delécluse, A., de la Torre, F., Szulmajster, J., 1990. Transfer of
414 the toxin protein genes of *Bacillus sphaericus* into *Bacillus thuringiensis*
415 subsp. *israelensis* and their expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 56,
416 340–344.
- 417 Charles, J.F., 1987. Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with
418 *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiology* 138, 471–484.
- 419 Charles, J.F., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Humphreys, M.J., Berry,
420 C., 1997. Binding of the 51- and 42-kDa individual components from the
421 *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes
422 from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). *FEMS Microbiol. Lett.*
423 156, 153–159.
- 424 Charles, J.F., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., 2002. Mode of action of
425 *Bacillus sphaericus* on mosquito larvae: incidence on resistance. In:
426 Charles, J.F., Delécluse, A., Nielsen-LeRoux, C. (Eds.), *Entomopathogenic*
427 *Bacteria: From Laboratory to Field Application*. Kluwer Academic
428 Publishers, Dordrecht, pp. 237–252.
- 429 Clements, A.N., 1992. *The Biology of Mosquitoes*. 1st ed. Chapman & Hall,
430 New York, NY.
- 431 Darboux, I., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Pauron, D., 2001. The receptor
432 of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae)
433 midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31,
434 981–990.
- 435 Darboux, I., Pauchet, Y., Castella, C., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C.,
436 Charles, J.F., Pauron, D., 2002. Loss of the membrane anchor of the target
437 receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
438 *U.S.A.* 99, 5830–5835.
- 439 Darboux, I., Charles, J.F., Pauchet, Y., Warot, S., Pauron, D., 2007. Transposon-
440 mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of
441 *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cell. Microbiol.* 9, 2022–2029.
- 442 Davidson, E.W., 1988. Binding of the *Bacillus sphaericus* (Eubacteriales:
443 Bacillaceae) toxin to midgut cells of mosquito (Diptera: Culicidae) larvae:
444 relationship to host range. *J. Med. Entomol.* 25, 151–157.
- 445 Davidson, E.W., 1989. Variation in binding of *Bacillus sphaericus* toxin and
446 wheat germ agglutinin to larval midgut cells of six species of mosquitoes. *J.*
447 *Invertebr. Pathol.* 53, 251–259.
- 448 Davidson, E.W., Titus, M., 1987. Ultrastructural effects of the *Bacillus sphaericus*
449 mosquito larvicidal toxin on cultured mosquito cells. *J. Invertebr.*
450 *Pathol.* 50, 213–220.
- 451 Fernandez, L.E., Aimanova, K.G., Gill, S.S., Bravo, A., Soberon, M., 2006. A
452 GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of
453 Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. J.* 394, 77–84.
- 454 Houk, E.J., 1977. Midgut ultrastructure of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae)
455 before and after a bloodmeal. *Tissue Cell* 9, 103–118.
- 456 Narasu, M.L., Gopinathan, K.P., 1988. Effect of *Bacillus sphaericus* 1593 toxin
457 on choline acetyl transferase and mitochondrial oxidative activities of the
458 mosquito larvae. *Indian J. Biochem. Biophys.* 25, 253–256.
- 459 Nicolas, L., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Delécluse, A., 1993. Respective
460 role of the 42- and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus*
461 toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*
462 106, 275–280.
- 463 Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary
464 toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from
465 mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.* 210, 585–590.
- 466 Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Thiéry, I., Georghiou, G.P., 1995. Resistance
467 in a laboratory population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to
468 *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut
469 brush-border membranes. *Eur. J. Biochem.* 228, 206–210.
- 470 Nielsen-LeRoux, C., Pasquier, F., Charles, J.F., Sinègre, G., Gaven, B., Pasteur,
471 N., 1997. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms
472 in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) larvae. *J. Med. Entomol.* 34, 321–327.
- 473 Nielsen-LeRoux, C., Pasteur, N., Prêtre, J., Charles, J.F., Sheikh, H.B.,
474 Chevillon, C., 2002. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin
475 in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of West
476 Mediterranean countries. *J. Med. Entomol.* 39, 729–735.
- 477 Oei, C., Hindley, J., Berry, C., 1992. Binding of purified *Bacillus sphaericus*
478 binary toxin and its deletion derivatives to *Culex quinquefasciatus* gut:
479 elucidation of functional binding domains. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1515–
480 1526.
- 481 Oliveira, C.M., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Pei, G., Yuan, Z., Regis,
482 L., 2004. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in
483 *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. *J. Med.*
484 *Entomol.* 41, 58–64.
- 485 Pauchet, Y., Luton, F., Castella, C., Charles, J.F., Romey, G., Pauron, D., 2005.
486 Effects of a mosquitocidal toxin on a mammalian epithelial cell line
487 expressing its target receptor. *Cell. Microbiol.* 7, 1335–1344.
- 488 Pei, G., Oliveira, C.M.F., Yuan, Z., Nielsen-LeRoux, C., Silva-Filha, M.H., Yan,
489 J., Regis, L., 2002. A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower develop-
490 ment of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*
491 68, 3003–3009.
- 492 Romão, T.P., de Melo Chalegre, K.D., Key, S., Ayres, C.F., Fontes de Oliveira,
493 C.M., de-Melo-Neto, O.P., Silva-Filha, M.H., 2006. A second independent
494 resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* causes slower develop-
495 ment of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS J.* 273, 1556–1568.
- 496 Schwartz, J.L., Potvin, L., Coux, F., Charles, J.F., Berry, C., Humphreys, M.J.,
497 Jones, A.F., Bernhart, I., Dalla Serra, M., Menestrina, G., 2001. Permea-
498 bilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitocidal
499 binary toxin and its individual components. *J. Membr. Biol.* 184, 171–183.
- 500 Shahabuddin, M., Pimenta, P.F., 1998. Plasmodium gallinaceum preferentially
501 invades vesicular ATPase-expressing cells in *Aedes aegypti* midgut. *Proc.*
502 *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 3385–3389.
- 503 Silva-Filha, M.H., Peixoto, C.A., 2003. Immunocytochemical localization of
504 the *Bacillus sphaericus* binary toxin components in *Culex quinquefasciatus*
505 (Diptera: Culicidae) larvae midgut. *Pestic. Biochem. Physiol.* 77, 138–146.
- 506 Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 1997. Binding kinetics of
507 *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of
508 *Anopheles* and *Culex* sp. mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.* 247,
509 754–761.
- 510 Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 1999. Identification of
511 the receptor of *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border
512 membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Insect*
513 *Biochem. Mol. Biol.* 29, 711–721.
- 514 Silva-Filha, M.H., Oliveira, C.M., Regis, L., Yuan, Z., Rico, C.M., Nielsen-
515 LeRoux, C., 2004. Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut
516 receptor binding site: implications for resistance of *Culex pipiens* complex
517 (Diptera: Culicidae) larvae. *FEMS Microbiol. Lett.* 241, 185–191.
- 518 Singh, G.J., Gil, S.S., 1988. An electron microscope study of the toxic action of
519 *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*
520 52, 237–247.
- 521 Souza-Neto, J.A., Machado, F.P., Lima, J.B., Valle, D., Ribolla, P.E., 2007.
522 Sugar digestion in mosquitoes: identification and characterization of three
523 midgut alpha-glucosidases of the neo-tropical malaria vector *Anopheles*
524 *aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Comp. Biochem. Physiol. A, Mol. Integr.*
525 *Physiol.* 147, 993–1000.
- 526 Van Rie, J., McGaughey, W.H., Johnson, D.E., Barnett, B.D., Van Mellaert, H.,
527 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus*
528 *thuringiensis*. *Science* 247, 72–74.
- 529 World Health Organization (WHO), 1985. Informal Consultation on the
530 Development of *Bacillus sphaericus* as Microbial Larvae. TDR/BCV/
531 SPHAERICUS/85.3.1–24.
- 532

Apêndice C. Publicações, participação em congressos e resumos

Artigo Indexado

Melo, J.V. *et al.* Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. **Micron**, Oxford, 2008. No prelo.

Participação em Congressos

- 40th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and 1st International Forum on Entomopathogenic Nematodes and Symbiotic Bacteria. Québec, Agosto 2007.
- X SICONBIOL – Simpósio de Controle Biológico. Brasília, Julho 2007.
- Simpósio de Microscopia na Amazônia. Belém, Setembro 2006.
- II Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores de Doenças Tropicais. Recife, Agosto 2006.
- XXI Congresso Brasileiro de Entomologia. Recife, Agosto 2006.

Resumos

Melo, J.V., Vasconcelos, R.H.T., Peixoto, C.A., Furtado, A.F. and Silva-Filha, M.H.N.L. Ultrastructure of *Culex quinquefasciatus* midgut cells from susceptible and *Bacillus sphaericus*-resistant larvae: morphology and cytopathological effects. In: 40th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and 1st International Forum on Entomopathogenic Nematodes and Symbiotic Bacteria, 2007, Québec. Resumos do SIP, 2007, p. 37.

Melo, J.V., Vasconcelos, R.H.T., Jones, G., Berry, C., Furtado, A.F., Peixoto, C.A. and Silva-Filha, M.H.N.L. Efeitos citopatológicos de uma nova toxina do *Bacillus sphaericus* cepa IAB59 em larvas de *Culex quinquefasciatus*. In: X Siconbiol – Simpósio de Controle Biológico, 2007, Brasília. Resumos do X Siconbiol, 2007, n. 188.

Melo, J. V.; Vasconcelos, R. H. T.; Peixoto, C.A.; Silva-Filha, M.H. . Cytopathological effects of *Bacillus sphaericus* binary toxin on the midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae. In: Simpósio de Microscopia na Amazônia, 2006, Belém. Resumos do Simpósio de Microscopia na Amazônia, 2006. Disponível em CD Room.

Melo, J. V.; Amorim, L.B.; Peixoto, C.A.; Silva-Filha, M.H. Análise do mesêntero de larvas de *Culex quinquefasciatus* susceptíveis e resistentes ao *Bacillus sphaericus*. In: XXI Congresso Brasileiro de Entomologia, 2006, Recife. Resumos do XXI Congresso Brasileiro de Entomologia, 2006. v. 1. p. 854-2.

ANEXO A

Registro no Comitê de Ética/CPqAM/FIOCRUZ: 008/2007Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: "Caracterização ultraestrutural dos efeitos citopatológicos causados por toxinas de *Bacillus sphaericus* no intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus*"

Pesquisador responsável: Janaína Viana de Melo

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 26/03/2007

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 11/07

Registro no CAAE: 0011.0.095.000-07

PARECER Nº 008/2007

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, 04 de maio de 2007.



Dr^a Zulma Maria de Medeiros
Biomédica
Coordenadora
CEP/CPqAM/FIOCRUZ