

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

NATHALY ALEXANDRE DO NASCIMENTO

CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO DE SINERGIA DE TOXINAS
INSETICIDAS DE *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* e *Lysinibacillus sphaericus*
COM AÇÃO EM LARVAS DE MOSQUITOS

RECIFE
2020

NATHALY ALEXANDRE DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO DE SINERGIA DE TOXINAS
INSETICIDAS DE *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* e *Lysinibacillus sphaericus*
COM AÇÃO EM LARVAS DE MOSQUITOS**

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha

Coorientadora: Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo

RECIFE

2020

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- N244c Nascimento, Nathaly Alexandre do.
Caracterização do mecanismo de sinergia de toxinas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* sorovar. israelensis e *Lysinibacillus sphaericus* com ação em larvas de mosquitos / Nathaly Alexandre Do Nascimento. - Recife: [s.n.], 2020.
120 p. : il., graf. ; 30 cm.
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.
Orientadora: Maria Helena Neves Lobo Silva Filha; coorientadora: Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo.
1. Toxinas bacterianas. 2. Mosquitos vetores. 3. Controle vetorial. 4. Resistência a inseticidas. 5. controle biológico de vetores. I. Silva Filha, Maria Helena Neves Lobo. II. Melo, Tatiany Patrícia Romão Pompílio de. III. Título..

NATHALY ALEXANDRE DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO DE SINERGIA DE TOXINAS
INSETICIDAS DE *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* e *Lysinibacillus sphaericus*
COM AÇÃO EM LARVAS DE MOSQUITOS**

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 22/04/2020

BANCA EXAMINADORA

Dra. Danielle Maria Nascimento Moura
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Bergmann Morais Ribeiro
Instituto de Ciências Biológicas/Universidade de Brasília

Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Virgínia Maria de Barros Lorena
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Renata e Francisco, por serem a minha base e terem contribuído de maneira extremamente significativa na minha formação acadêmica e pessoal, e por sempre me darem todo o amor do mundo. Ao meu irmão Thiago, pelo carinho e disposição para me ajudar nos momentos necessários. Ao meu lindo companheiro de quatro patas, Algodão, que sempre traz inúmeras alegrias e me ajuda a encarar a vida com mais leveza.

À toda minha família, que é muito especial para mim e sempre demonstrou seu amor e preocupação com o meu bem estar e esteve disposta a ajudar.

À minha orientadora, Dra. Maria Helena, que foi essencial durante toda a minha formação acadêmica, desde a iniciação científica com muita paciência e exigência compartilhando conhecimento e experiência profissional.

À minha coorientadora, Dra. Tatiany Romão, por sempre estar disposta a ajudar, responder meus questionamentos e por suas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus orientadores mexicanos, Dra. Alejandra Bravo e Dr. Mario Soberón (IBT-UNAM), que foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho e por me receberem tão bem em seu laboratório.

Ao Dr. Antonio Pereira Neves, pela sua paciência e ajuda nos experimentos relacionados à microscopia e também por realizar a análise estatística dos dados deste trabalho.

À Dra. Mary Carmen Torres, por sua ajuda no laboratório (IBT-UNAM) e nas análises de Probit deste estudo.

Aos estudantes Daniel Brandão e Samira López, pela colaboração na obtenção de dados deste estudo.

À Dra. Cássia Docena do NPT e ao LAVITE, pela ajuda nas análises iniciais de microscopia confocal.

À Dra. Sheilla Oliveira pelo apoio ao treinamento no exterior através da coordenação de projeto CAPES-FACEPE para apoio ao intercâmbio entre nosso laboratório e o IBT-UNAM.

À Dra. Virgínia Lorena, pela disponibilidade em ser parecerista deste trabalho e pela sua contribuição para o seu desenvolvimento.

Aos membros da banca, por aceitarem participar na avaliação do meu trabalho e pela

valiosa contribuição.

À Ana, Duschinka, Eli e Rose, técnicas do insetário, por sempre me ajudarem nos momentos que precisei. A todos do insetário que ajudaram na produção de ovos de mosquitos para apoio nos experimentos.

Aos meus amigos do lab, Derciliano, Elisama, Emanuel, Fernando, Lari Maciel, Suzane, Suzany e Tati, pela amizade e companheirismo, e principalmente nossas idas à Thorpe's nos momentos de estresse e comemoração de pequenas e grandes vitórias. Em especial à Karine por compartilhar comigo tantos momentos importantes nestes quatro anos de doutorado e pela sua amizade tão especial.

Aos meus amigos que fiz no México, em especial a Cinthia, Francine, Judith, Mary, Piere, Ruth, Samira, Susy, Victor e Yang, por serem a minha família mexicana. E em especial a Marcos, pelo seu apoio, companheirismo e por ser tão importante na minha vida.

Aos meus colegas da turma de doutorado pelo companheirismo durante estes quatro anos, sempre ajudando nas dificuldades do curso.

A todos que fazem parte do departamento de Entomologia pela colaboração, conversas e dia-a-dia sempre agradável.

A todos do laboratório da Dra. Alejandra Bravo e do Dr. Mario Soberón (IBT-UNAM), em especial a Alejandro, Dra. Isabel Gómez, Jorge, Liz, Mary Carmen, Paulina, Dr. Sabino Pacheco, Samira e Sergio, pela ajuda no laboratório e pela convivência em meu período de doutorado sanduíche.

À FACEPE, pela bolsa de doutorado.

Ao IAM, pela infraestrutura.

Ao IBT-UNAM, pela infra-estrutura.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, neste trabalho.

NASCIMENTO, N. A. **Caracterização do mecanismo de sinergia de toxinas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* e *Lysinibacillus sphaericus* com ação em larvas de mosquitos.** 2020. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

RESUMO

Lysinibacillus sphaericus (Lsp) é um larvicida biológico efetivo para o controle de mosquitos, mas a resistência dos insetos limita a sua utilização. A resistência à toxina Bin do Lsp em *Culex quinquefasciatus* é causada por mutações que levam à ausência de receptores no epitélio intestinal. Já foi demonstrado que a toxina Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) restaura a toxicidade da Bin para larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes e de *Aedes aegypti*, naturalmente refratárias, pois não têm o receptor para a Bin. O objetivo deste trabalho foi elucidar o mecanismo de sinergia entre as toxinas Bin e Cyt1Aa em larvas resistentes. Neste estudo, foi demonstrado que diferentes misturas de toxinas Bin e Cyt1Aa apresentam toxicidade *in vivo* para larvas resistentes. Esta atividade foi correlacionada à internalização celular da Bin, apenas quando as larvas foram tratadas com a toxina Cyt1Aa. O efeito sinérgico observado entre as toxinas Bin e Cyt1Aa não depende da ligação entre elas, contrastando com o mecanismo previamente descrito entre a Cyt1Aa e as toxinas Cry de Bti. A sinergia entre Cyt1Aa e Bin depende da Cyt1Aa funcional, já que a mutante Cyt1AaV122E, que é afetada na sua capacidade de oligomerização e inserção na membrana, não foi capaz de sinergizar a toxina Bin em larvas resistentes. O mecanismo de sinergia revelado neste estudo é inédito mostrando que a toxina Cyt1Aa pode superar as falhas de ligação entre a toxina Bin e o seu receptor, pois permite a internalização da toxina nas células intestinais. Neste estudo, foi ainda investigado o mecanismo de morte celular causado pela toxina Bin e foram observados indícios de envolvimento da via intrínseca de apoptose através da ativação da Caspase-3. Os dados deste estudo contribuem para o conhecimento do modo de ação destas toxinas e ajudam a desenvolver estratégias aprimoradas para explorar suas características inseticidas.

Palavras chave: Toxinas bacterianas. Mosquitos vetores. Controle vetorial. Resistência a inseticidas. Controle biológico de vetores.

NASCIMENTO, N. A. **Characterization of the synergy of insecticide toxins from *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* and *Lysinibacillus sphaericus* with action on mosquito larvae.** 2020. Thesis (Doctorate in Life Sciences and Biotechnology for Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

ABSTRACT

Lysinibacillus sphaericus is an effective biological larvicide used in mosquito control, but insect resistance limits its utilization. The Bin resistance in *Culex quinquefasciatus* is caused by mutations that lead to the absence of receptors in the midgut epithelium. It has been shown that the Cyt1Aa toxin of *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) restores the Bin toxicity to Bin-resistant *C. quinquefasciatus* larvae and to *Aedes aegypti* larvae, that are naturally refractory to the Bin toxin, due to the absence of Bin receptors. This study aimed to investigate the synergy mechanism between Bin and Cyt1Aa toxins to Bin-resistant larvae. In this study, it was shown that different mixtures of Bin and Cyt1Aa toxins display *in vivo* toxicity to Bin-resistant larvae. This activity was correlated to the cellular internalization of Bin toxin that it was only observed when the larvae were treated with Cyt1Aa toxin. The synergistic effect observed between Bin and Cyt1Aa toxins does not depend on their binding, contrasting with the mechanism previously described for the synergy between Cyt1Aa and Cry toxins from Bti. The synergy between Cyt1Aa and Bin depends on the functional Cyt1Aa, since the mutant Cyt1AaV122E, which is affected in oligomerization and membrane insertion, was unable to synergize the action of Bin toxin to Bin-resistant larvae. The synergy mechanism revealed in this study is inedit showing that the Cyt1Aa toxin can overcome the failures in the binding steps involving Bin-receptor, by allowing the internalization of Bin toxin into the midgut cells. In this study, the cell death mechanism caused by Bin toxin was also investigated and signs of involvement of intrinsic apoptosis pathway through activation of Caspase-3 were found. Findings from this work enlarge our knowledge about the mode of action of these mosquitocidal toxins and would help to develop improved strategies to exploit their insecticidal features.

Keywords: Bacterial toxins. Mosquito vectors. Vector control. Insecticide resistance. Biological control of vectors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Representação do ciclo de vida de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	20
Figura 2	– Representação do ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> .	23
Figura 3	– <i>Lysinibacillus sphaericus</i> em fase de esporulação.	26
Figura 4	– Estrutura tridimensional (cristalografia) da toxina Bin.	30
Figura 5	– <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i> (Bti) em fase de esporulação.	33
Figura 6	– Estrutura tridimensional (cristalografia) da toxina Cry4Ba.	34
Figura 7	– Estrutura tridimensional (cristalografia) da toxina Cyt1Aa.	35
Figura 8	– Sistema digestivo de larvas de mosquito.	37
Figura 9	– Modelagem predita da proteína Cqm1 selvagem através do I-TASSER.	38
Figura 10	– Representação esquemática a nível molecular do modo de ação de toxinas Cry.	39
Quadro 1	– Receptores de toxinas mosquitocidas produzidas por <i>Lysinibacillus sphaericus</i> (Lsp), <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i> (Bti) e <i>B. thuringiensis</i> sorovar. <i>jegathesan</i> (Btjg).	40
Figura 11	– Desenho esquemático da sinergia entre toxinas Cry e Cyt.	45
Figura 12	– Desenho esquemático hipotético da interação entre as toxinas Bin e Cyt1Aa.	47
Figura 13	– Etapas dos procedimentos metodológicos.	53
Quadro 2	– Atividade de toxinas Bin (subunidades BinA e BinB), Cyt1Aa, Cyt1AaV122E e suas misturas para larvas do 3º instar das colônias de <i>Culex quinquefasciatus</i> (suscetível e resistente à Bin) e de <i>Aedes aegypti</i> após 48h de exposição.	68
Gráfico 1	– Atividade de toxinas Bin, Cyt1Aa e Cyt1AaV122E e suas misturas para larvas do 3º instar das colônias de <i>Culex quinquefasciatus</i> (suscetível e resistente à Bin) e <i>Aedes aegypti</i> após 48h de exposição.	69
Figura 14	– Perfil eletroforético das proteínas Bin, BinA, BinB, Cyt1Aa, Cry11Aa e Cry1Ab recombinantes.	70
Figura 15	– Ensaio de interação (<i>pull down</i>) entre as toxinas Bin imobilizada em esferas (esf. Bin) e a toxina Cyt1Aa.	71

Gráfico 2	– Ensaio de interação (ELISA) entre a proteína Cyt1Aa imobilizada na placa e incubada com as toxinas Bin, BinA, BinB, Cry11Aa e Cry1Ab.	72
Figura 16	– Ensaio de interação entre amostras de proteínas do intestino de larvas (BBMF) de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetíveis e resistentes à Bin e <i>Aedes aegypti</i> (Aae) com as toxinas Bin e Cyt1Aa individuais ou em mistura.	73
Figura 17	– Perfil eletroforético das proteínas Bin, BinA e BinB marcadas com o fluoróforo Alexa.	74
Figura 18	– Localização subcelular <i>in vivo</i> da toxina Bin e de suas subunidades BinA e BinB no intestino de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetíveis à Bin.	75
Figura 19	– Localização subcelular <i>in vivo</i> das subunidades BinA e BinB da toxina Bin no intestino de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetíveis à Bin.	76
Figura 20	– Localização subcelular <i>in vivo</i> da toxina Bin no intestino de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistentes à Bin e <i>Aedes aegypti</i> .	76
Figura 21	– Perfil dos cristais de Cyt1Aa e Cyt1AaV122E marcados com o fluoróforo Alexa.	77
Figura 22	– Localização subcelular <i>in vivo</i> das toxinas Cyt1Aa e Cyt1AaV122E no intestino de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetíveis à Bin.	78
Figura 23	– Localização subcelular <i>in vivo</i> da toxina Bin e de suas subunidades BinA e BinB, na presença de Cyt1Aa, no intestino de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetíveis à Bin.	80
Figura 24	– Localização subcelular <i>in vivo</i> da toxina Bin, na presença de Cyt1Aa, no intestino de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistentes à Bin e <i>Aedes aegypti</i> .	81
Figura 25	– Localização subcelular <i>in vivo</i> da toxina Bin e de suas subunidades BinA e BinB, na presença de Cyt1AaV122E, no intestino de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> suscetíveis à Bin.	82
Figura 26	– Localização subcelular <i>in vivo</i> da toxina Bin, na presença de Cyt1AaV122E, no intestino de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	83

resistentes à Bin e *Aedes aegypti*.

- Figura 27** – Localização intracelular *in vivo* da toxina Bin e de mitocôndrias no intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis à Bin. 84
- Figura 28** – Localização intracelular *in vivo* da toxina Bin e de lisossomos no intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis à Bin. 85
- Gráfico 3** – Atividade enzimática da Caspase-3 em amostras de intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis à Bin. 86
- Figura 29** – Imunodeteção do maior fragmento da Caspase-3 clivada em amostras de intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis expostas à toxina Bin. 87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aae – Colônia de laboratório de *Aedes aegypti*

Aam1 – *Aedes aegypti* maltase 1

α -Gli – α -glicosidase

Agm3 – *Anopheles gambiae* maltase 3

ALP – Fosfatase alcalina

AMY – α -amilase

ANOVA – Análise de variância

APN – Aminopeptidase

BBMF – *Brush Border Membrane Fractions*

Bin – Binária

BP – População de campo de *Culex pipiens* (França) resistente ao *Lysinibacillus sphaericus*

BSA – *Albumin bovine serum*

Bt – *Bacillus thuringiensis*

Bti – *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis*

Btjeg – *Bacillus thuringiensis* sorovar. *jegathesan*

CAD – Caderina

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CNBr – Brometo de cianogênio

CL₅₀ – Concentrações letais de compostos para 50% dos indivíduos expostos

CL₉₀ – Concentrações letais de compostos para 90% dos indivíduos expostos

Cpm1 – *Culex pipien* maltase 1

Cqm1 – *Culex quinquefasciatus* maltase 1

CqR – Colônia de *C. quinquefasciatus* resistente ao *Lysinibacillus sphaericus* associada ao alelo *cqm1_{REC}*

CqRL/C3-41 – Colônia de *C. quinquefasciatus* (China) resistente ao *Lysinibacillus sphaericus* associada ao alelo *cqm1_R*

CqS – Colônia de *C. quinquefasciatus* suscetível ao *Lysinibacillus sphaericus*

Cry – *Crystal toxin*

Cyt – *Cytolytic toxin*

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano

DEVD-AFC – *Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin*

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DTT – Ditioneitol

E.C. – Código de enzimas dado pela *Enzyme Commission*

EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético

EGTA – Ácido etilenoglicol tetra-acético

ELISA – *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*

Fe₂(SO₄)₃ – Sulfato de ferro

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GEO – Colônia de *C. quinquefasciatus* (EUA) resistente a *Lysinibacillus sphaericus* associada ao alelo *cpm1_{GEO}*

GH – *Glycoside hydrolases*

GPI – Glicosil-fosfatidilinositol

GST – Glutathione S-transferase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

HCl – Ácido clorídrico

HCT – Meio de cultura específico para esporulação de *Bacillus thuringiensis*

IAM – Instituto Aggeu Magalhães

IBT – Instituto de Biotecnologia

IPTG – *Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*

K₂HPO₄ – Fosfato dipotássico

KCl – Cloreto de potássio

K_d – Constante de dissociação

kDa – Kilodalton

KH₂PO₄ – Fosfato monopotássico

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

LB – Luria-Bertani

Lsp – *Lysinibacillus sphaericus*

MDCK – *Madin-Darby Canine Kidney cells*

MET – Tampão composto por Manitol, EGTA e Tris

MgSO₄ . 7H₂O – Sulfato de magnésio heptahidratado

MnSO₄ . H₂O – Sulfato de manganês hidratado

Mtx – *Mosquitocidal Toxins*

Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio dibásico
NaCl – Cloreto de sódio
NaH₂PO₄ – Fosfato de sódio monobásico
NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
NaPi – Tampão fosfato de sódio
NPT – Núcleo de plataformas Tecnológicas
Nt – Nucleotídeos
OPD – *O-Phenylenediamine*
PBS – *Phosphate buffered saline*
PBS-T - *Phosphate buffered saline – Tween 20*
PCR – *Polymerase chain reaction*
PGEFL – Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática
PNEFL – Programa Nacional de Eliminação da Filariose Linfática
pH – Potencial Hidrogeniônico
PMSF – *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
pNaG – *p-nitrophenyl- α -D-glucanopyranoside*
PVDF – *Poly-1,1-difluoroethene*
R2362 - Colônia de *C. quinquefasciatus* (Brasil) resistente ao *Lysinibacillus sphaericus* associada aos alelos *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*
RGB – *Red, Green and Blue*
RMR – Região Metropolitana do Recife
SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
SUS – Sistema Único de Saúde
TA – Temperatura ambiente
TBS-T – *Tris buffered saline – Tween 20*
UNAM – Universidade Nacional Autônoma do México
UV – Ultravioleta
Vip – *Vegetative Insecticidal Proteins*
VNO – Vírus do Nilo Ocidental
ZnSO₄ . 7H₂O – Sulfato de zinco heptahidratado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Bioecologia de culicídeos	19
2.1.1 <i>Culex quinquefasciatus</i>	19
2.1.2 <i>Aedes aegypti</i>	22
2.2 Controle populacional de mosquitos	24
2.3 <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	25
2.4 Toxina binária do <i>L. sphaericus</i>	28
2.4.1 Componentes e domínios funcionais	28
2.4.2 Espectro e modo de ação	30
2.5 <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i>	32
2.6 Toxinas Cry e Cyt do Bti	33
2.7 Receptores da toxina Bin do Lsp	36
2.8 Receptores das toxinas Cry do Bti	38
2.9 Resistência de mosquitos a toxinas inseticidas bacterianas	41
2.10 Sinergia entre toxinas inseticidas	43
2.10.1 Sinergia entre toxinas Cry e Cyt de Bti	44
2.10.2 Sinergia entre as toxinas de Lsp e Bti	45
3 JUSTIFICATIVA	49
4 PERGUNTA CONDUTORA	50
5 HIPÓTESE	51
6 OBJETIVO GERAL	52
6.1 Objetivos específicos	52
7 MATERIAL E MÉTODOS	53
7.1 Colônias de culicídeos	53
7.2 Preparação de amostras de BBMF	54
7.3 Produção de proteínas	55
7.3.1 Toxinas Bin, Cyt1Aa, Cyt1AaV122E, Cry11Aa e Cry1Ab	55
7.3.2 Subunidades BinA e BinB	56
7.4 Bioensaios	58
7.5 Ensaios de interação <i>in vitro</i> entre Bin e Cyt1Aa	59

7.5.1 <i>Pull down</i>	59
7.5.2 Ensaio de ELISA	60
7.6 Ensaio de interação <i>in vitro</i> entre as toxinas e BBMF	61
7.7 Microscopia confocal	62
7.8 Ensaio de atividade caspase	63
8 RESULTADOS	65
8.1 Suscetibilidade de larvas ao produto combinado de Lsp e Bti	65
8.2 Suscetibilidade de larvas às toxinas Bin e Cyt1Aa	65
8.3 Interação entre as toxinas Bin e Cyt1Aa	70
8.4 Interação entre as toxinas e proteínas do epitélio intestinal de larvas	72
8.5 Localização subcelular da toxina Bin	74
8.6 Localização subcelular dos cristais das toxinas Cyt1Aa e Cyt1AaV122E	77
8.7 Localização subcelular da toxina Bin em mistura com cristais da Cyt1Aa e Cyt1AaV122E	79
8.8 Localização intracelular da toxina Bin e ativação da via de apoptose	83
9 DISCUSSÃO	88
10 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	96
APÊNDICE A – OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	117
APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS	119

1 INTRODUÇÃO

As espécies de mosquito *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* apresentam importância na saúde pública pois atuam como vetores de agentes etiológicos de doenças humanas. Larvicidas biológicos à base de bactérias entomopatógenas como *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) são importantes agentes de controle destas espécies. Na cidade do Recife, larvicidas à base de Lsp e Bti já vem sendo utilizados em programas de controle de *C. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*, respectivamente. Estas bactérias são Gram-positivas, esporulantes, aeróbicas e de distribuição cosmopolita em solos e ambientes aquáticos. Durante a esporulação, Lsp e Bti produzem cristais protéicos que contêm protoxinas com atividade larvicida para algumas espécies de culicídeos dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*. O modo de ação destas toxinas compreende as seguintes etapas: 1) ingestão das bactérias contendo os cristais proteicos pelas larvas em meio aquático; 2) solubilização dos cristais em pH intestinal alcalino e liberação das protoxinas no lúmen; 3) clivagem das protoxinas em toxinas ativas por proteases do intestino larval; 4) e ligação das toxinas a receptores específicos no epitélio intestinal. Esta última etapa é essencial para a atividade larvicida destes compostos pois leva à internalização das toxinas e efeitos citopatológicos. Nos cristais de Lsp, o principal fator inseticida é a protoxina Bin, enquanto que o cristal de Bti é composto por quatro protoxinas e as mais comumente encontradas são Cry11Aa, Cry4Aa, Cry4Ba e Cyt1Aa.

A toxina Bin do Lsp atua em *C. quinquefasciatus* através da ligação com receptor específico presente no epitélio intestinal, a α -glicosidase Cqm1. Larvicidas biológicos à base do Lsp vem sendo usados com sucesso para o controle de espécies dos gêneros *Culex* e *Anopheles* e suas principais vantagens são a elevada ação seletiva e persistência prolongada nos criadouros. Entretanto, *Ae. aegypti* é uma espécie naturalmente refratária ao Lsp o que limita o espectro de ação deste agente no campo do controle de vetores. Além disso, casos de resistência de *C. quinquefasciatus* e *Culex pipiens* já foram registrados, pois a toxina age em uma única classe de receptores, cujos genes podem apresentar mutações que levam à resistência. Até o momento, foram identificados oito alelos de resistência do gene que codifica a α -glicosidase Cqm1/Cpm1, receptor da toxina Bin. Mutações nestes alelos geram transcritos que, em sua maioria, codificam para proteínas truncadas que não estão disponíveis na membrana do intestino para ligação à toxina Bin, conferindo assim o *status* de resistência de larvas ao agente. Quatro destes alelos foram identificados e ocorrem em populações de *C. quinquefasciatus* da cidade do Recife.

Por outro lado, as quatro toxinas do cristal inseticida do Bti ligam-se a diferentes receptores do epitélio intestinal das larvas, tais como caderinas (CADs), aminopeptidases (APNs) e fosfatases alcalinas (ALPs). O Bti possui um modo de ação complexo com quatro toxinas que agem em sinergia, ou seja, as toxinas individuais têm ação inferior a do cristal completo. O principal protagonista da sinergia é a toxina Cyt1Aa, que tem a capacidade de funcionar como primeiro receptor das demais toxinas Cry, promovendo uma ligação de alta afinidade destas toxinas oligomerizadas com um segundo receptor, presente no epitélio intestinal das larvas. A ação da toxina Cyt1Aa como um receptor pode superar, por exemplo, as possíveis falhas de ligações das toxinas Cry aos receptores do intestino das larvas. Uma limitação do cristal do Bti é que a sua persistência em criadouros é apenas moderada, sendo mais vulnerável a fatores ambientais do que o Lsp, o que requer aplicações mais frequentes ou formulações mais efetivas para superar a fotólise e outros fatores que degradam o princípio ativo em condição de campo. Larvicidas biológicos à base de Bti têm sido utilizados para o controle de várias espécies de insetos vetores, inclusive para o *Ae. aegypti*, que é refratário ao Lsp.

Estudos prévios demonstraram que a associação de cristais de Lsp e Bti é uma estratégia excelente de controle vetorial, pois larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes à toxina Bin não exibem resistência cruzada ao Bti. Análises *in vivo* mostraram que misturas das toxinas Bin (Lsp) e Cyt1Aa (Bti) são ativas para larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes a Bin e também para *Ae. aegypti*, que é naturalmente refratário. Estes dados indicam que o uso associado das toxinas Bin e Cyt1Aa é uma estratégia recomendada para o manejo da resistência ao Lsp, além de oferecer um espectro de ação mais amplo para o controle de vetores que proliferam-se em áreas urbanas como *C. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*. O desenvolvimento do larvicida biológico Vectomax[®] foi resultado destes estudos que demonstraram que a associação das toxinas pode trazer vantagens, e a principal toxina responsável pela sinergia entre elas é a Cyt1Aa. Para larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes e *Ae. aegypti* que não possuem receptores para a toxina Bin, a ação letal da Bin pode ser mediada pela toxina Cyt1Aa, apesar de seu mecanismo ainda ser desconhecido.

Estudos prévios já elucidaram a base da sinergia entre a toxina Cyt1Aa e as toxinas Cry do próprio cristal do Bti. Neste caso, a toxina Cyt1Aa tem a capacidade de se inserir diretamente na membrana e atuar como receptor das toxinas Cry11Aa e Cry4Ba. Entre as toxinas Cyt1Aa e Cry11Aa, ocorre uma interação entre as moléculas que se ligam através de regiões específicas. Esta ligação induz a formação de oligômeros da Cry11Aa, os quais se ligam com maior afinidade aos receptores presentes no epitélio intestinal das larvas, que são

APNs e ALPs. A ação da toxina Cry4Ba também é favorecida pela sinergia com a Cyt1Aa, e a mesma região da toxina Cyt1Aa está envolvida na interação com as toxinas Cry11Aa e Cry4Ba.

Apesar das vantagens oferecidas pelas misturas de toxinas inseticidas, o seu uso deve ser fundamentado em estudos aprofundados de seus modos de ação. Neste contexto, o presente estudo visou elucidar o modo de ação da associação das toxinas Bin e Cyt1Aa, que estão presentes em novos produtos larvicidas biológicos, e que tem apresentado um excelente potencial para o controle conjunto de *Culex* e *Aedes* em áreas urbanas do Recife. Inicialmente, este trabalho considerou a hipótese que, em larvas desprovidas de receptores específicos, a toxina Cyt1Aa seria um potencial receptor da toxina Bin. Esta hipótese foi baseada no modo de sinergia já desvendado para as toxinas Cry e Cyt1Aa. Durante o desenvolvimento do trabalho, a hipótese inicial foi refutada e uma nova hipótese foi formulada: a sinergia entre as toxinas Bin e Cyt1Aa ocorre devido à funcionalidade e consequente atividade de formação de poro da Cyt1Aa selvagem, permitindo a internalização da toxina Bin. Portanto, para avaliar esta nova hipótese foram realizados ensaios *in vivo* e *in vitro* a fim de compreender o mecanismo de interação molecular destas toxinas com o epitélio intestinal das larvas. Além disso, também foram investigadas as organelas alvo das toxinas e a ativação da via de apoptose após a intoxicação pela toxina Bin. A compreensão e elucidação do modo de ação da sinergia entre as toxinas Bin e Cyt1Aa é relevante e pode contribuir para o uso racional de larvicidas biológicos e de associação de toxinas inseticidas para o controle de culicídeos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os mosquitos atuam como vetores de patógenos para o homem, apresentando importância na saúde pública (BERENGER; PAROLA, 2017). Espécies como *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* são importantes vetores alvos de ferramentas de controle no Brasil (FARAJOLLAHI *et al.*, 2011; KAUFFMAN; KRAMER, 2017). Doenças como filariose linfática, dengue, Chikungunya e zika, dentre outras que tem seus patógenos transmitidos por vetores, ainda representam um grande desafio para a Saúde Pública. Muitas vezes estas doenças não tem tratamento específico nem vacina, fazendo com que o controle da densidade populacional destes insetos seja uma ferramenta extremamente importante para o controle destas enfermidades (BRASIL, 2018; CARVALHO; MOREIRA, 2017; ROMANO *et al.*, 2011).

2.1 Bioecologia de culicídeos

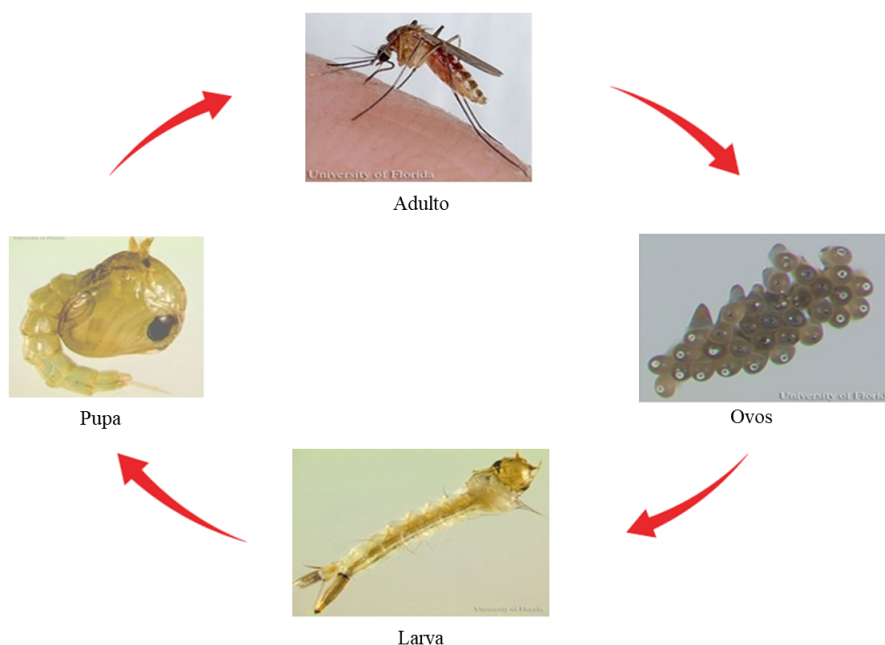
Os insetos *Culex quinquefasciatus* Say 1823 e *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 pertencem à Ordem Diptera, Família Culicidae e apresentam distribuição cosmopolita com maior concentração em áreas urbanas de regiões tropicais e subtropicais. São insetos holometábolos, ou seja, apresentam a metamorfose completa. O ciclo de vida inicia a partir de fêmeas que, após o acasalamento e o repasto sanguíneo, necessário para a produção e maturação dos ovos, fazem a oviposição em ambiente aquático para desenvolvimento dos estágios pré-imaginais (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). O hábito hematofágico das fêmeas e a co-evolução de patógenos, os quais necessitam fazer parte de seu desenvolvimento nos insetos, possibilitam a transmissão de agentes patogênicos ao homem e outros animais, tornando estes insetos vetores biológicos de grande importância na saúde pública (BERENGER; PAROLA, 2017). Apesar de pertencerem à mesma família, estas espécies apresentam particularidades que serão apresentadas nas próximas seções.

2.1.1 *Culex quinquefasciatus*

Esta espécie é antropofílica e, por este motivo, frequentemente apresenta forte comportamento endofílico em busca da alimentação sanguínea nas habitações humanas. O seu ciclo de vida (Figura 1) apresenta quatro diferentes fases: ovos, cuja deposição se dá de forma agrupada, assemelhando-se a uma jangada; larva, que passa por quatro estádios (L₁ a L₄);

pupa; adulto. A fase jovem ou pré-imaginal destes insetos ocorre no habitat aquático, onde as larvas se desenvolvem até atingirem a fase de pupa. Em seguida, ocorre a muda imaginal, ou seja as pupas passam para a fase alada. As fêmeas desta espécie têm preferência por fazer a oviposição em coleções aquáticas ao nível do solo com alta concentração de matéria orgânica (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994) tais como fossas sépticas, canais, córregos, entre outros. Este fator indica que esta espécie pode ser considerada tolerante a condições extremas incluindo pH elevado e um certo grau de salinidade (MCCALL; EATON, 2001; SANTANA-MARTÍNEZ; MOLINA; DUSSÁN, 2017). As larvas são filtradoras não-seletivas alimentando-se de matéria orgânica presente na água, enquanto os adultos se alimentam de seiva vegetal e néctar, necessários para a sobrevivência, metabolismo, longevidade e vôo. As fêmeas também realizam a hematofagia, necessária para a produção e maturação dos ovos e geralmente são antropofílicas, embora possam alimentar-se também em aves, bovinos, equinos e outros animais (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; FOSTER, 1995; GREENBERG *et al.*, 2013; NAYAR; SAUERMAN, 1971; NAYAR; VAN HANDEL, 1971).

Figura 1 – Representação do ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Hill e Connelly (2009).

Nota: Após a postura dos ovos agrupados sob a forma de jangada, as larvas eclodem e passam por quatro estádios, com média de 24h cada, transformam-se em pupas que, em até 48h, atingem a fase adulta. O ciclo tem duração média de dez dias sob condições ótimas de temperatura e disponibilidade de alimento.

No momento da alimentação sanguínea, as fêmeas podem adquirir agentes patogênicos que, após seu desenvolvimento, podem ser transmitidos para o homem e outros

animais, revelando sua importância epidemiológica. *C. quinquefasciatus* pode ser vetor biológico de diferentes patógenos como vermes nematódeos e vírus (FARAJOLLAHI *et al.*, 2011). No Brasil, o agente etiológico da filariose linfática, o nemátodo *Wuchereria bancrofti*, é transmitido pelo *C. quinquefasciatus*. A filariose é uma doença ainda considerada endêmica na Região Metropolitana do Recife (RMR) (BRANDÃO *et al.*, 2015; FONTES *et al.*, 2012). Além do Brasil, a filariose linfática também apresenta caráter endêmico em outras regiões do mundo e, devido a este cenário, foi implementado o Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL) com o objetivo de erradicar a doença até 2020 (OTTESEN *et al.*, 2000). Este programa apresenta dois componentes principais: interrupção da transmissão e controle da morbidade causada pela doença. A interrupção da transmissão deve ser alcançada através do tratamento em massa da população com drogas microfilaricidas além de medidas de controle vetorial (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018).

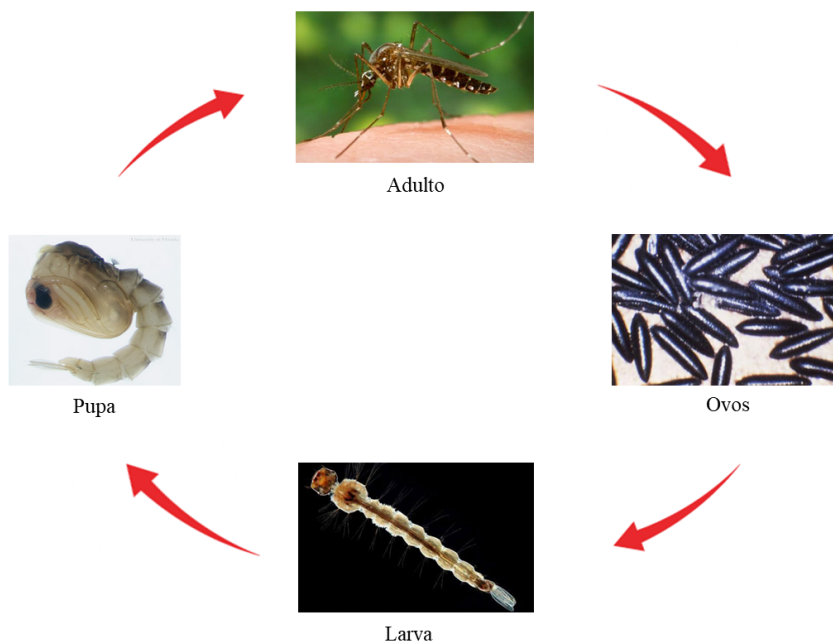
O programa já apresentou resultados promissores em alguns países e a doença já foi eliminada em algumas regiões da África, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental, entretanto, esforços são necessários para atingir o objetivo de eliminar globalmente a doença até 2020 (WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD, 2017; REBOLLO; BOCKARIE, 2017). Desde 2003, na cidade do Recife, ações para o controle de *C. quinquefasciatus* que incluem o uso de larvicidas biológicos à base de Lsp, têm sido executadas no âmbito do Programa Nacional para Eliminação da Filariose Linfática (PNEFL). Além do controle da população vetora, o programa também conta com o tratamento em massa da população humana, de forma focal com drogas microfilaricidas (Dietilcarbamazina) (ALBUQUERQUE; BRAGA; LYRA, 2013). Em 2015 na RMR, o xenomonitoramento para busca de fêmeas de mosquitos *C. quinquefasciatus* infectadas por *W. bancrofti* não detectou indivíduos positivos. Entretanto, não é possível afirmar que já não ocorre a transmissão deste patógeno (RAMESH *et al.*, 2018). Além disso, em 2016, tampouco foi observada transmissão de filariose em crianças de áreas com endemicidade incerta que circundam quatro cidades endêmicas da RMR. Além de avaliar áreas endêmicas, também é necessário fazer a vigilância em áreas não endêmicas devido ao fluxo de pessoas entre estes municípios (XAVIER *et al.*, 2019), além da imigração oriunda de pessoas de países endêmicos para o Brasil, tais como Haiti, República Dominicana e Senegal, que poderiam permitir a criação de novos focos ativos da doença (NUNES *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; ZUCHI *et al.*, 2017).

C. quinquefasciatus também pode ser vetor de arbovírus como Nilo Ocidental (VNO), Saint Louis, Oropouche, Rocio, Mayaro entre outros (FIGUEIREDO, 2007; HEINEN *et al.*, 2015; MARTINEZ *et al.*, 2017; TURELL, 2012). O VNO pode causar uma severa

doença neurológica e mortes em humanos e cavalos, além da possibilidade de infecção em outros mamíferos. As aves silvestres são consideradas os principais reservatórios deste vírus (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). No Brasil, o VNO já foi detectado em frangos e em cavalos, mas não em aves selvagens (LUGARINI *et al.*, 2017; OMETTO *et al.*, 2013). O primeiro caso humano de VNO relatado no Brasil ocorreu no Piauí em 2014, mas não foi esclarecido se o caso foi autóctone ou importado (VIEIRA *et al.*, 2015). Mais recentemente, *C. quinquefasciatus* também foi relatado como um vetor competente do vírus Zika, sendo o vírus isolado a partir de amostras coletadas em campo na RMR (Pernambuco, Brasil), no México e na China (AYRES, *et al.*, 2019; ELIZONDO-QUIROGA *et al.*, 2018; EPELBOIN *et al.*, 2017; FU *et al.*, 2017; GUEDES *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2017).

2.1.2 *Aedes aegypti*

Assim como *C. quinquefasciatus*, a espécie *Ae. aegypti* é sinantrópica e antropofílica, tendo o homem como principal fonte de alimentação sanguínea. O seu ciclo de vida é similar (Figura 2), apresenta quatro fases de desenvolvimento (ovo, larva, pupa e adulto) que também ocorre no ambiente aquático, até a emergência do adulto para a fase alada. Diferente de *C. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* tem preferência em fazer a oviposição em recipientes com água considerada limpa, ou seja, com baixa quantidade de matéria orgânica (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). A oviposição também tem características distintas, pois as fêmeas depositam ovos individuais de forma dispersa em diferentes criadouros, comportamento denominado de oviposição em saltos ou “skip oviposition”. Uma característica importante dos ovos desta espécie é a sua forte resistência à dessecação mantendo-se viáveis por períodos prolongados (meses), cuja eclosão das larvas pode acontecer quando o ambiente estiver favorável após o contato com água (REITER, 2007). Devido a este fator, populações de *Ae. aegypti* podem ser transportadas de forma passiva, pois os ovos podem ser levados para diferentes localidades através do deslocamento humano e comércio mundial de mercadorias (DÍAZ-NIETO *et al.*, 2016; FLACIO *et al.*, 2015).

Figura 2 – Representação do ciclo de vida de *Aedes aegypti*.

Fonte: Zettel e Kaufman (2008).

Nota: Após a postura dos ovos, as larvas eclodem e passam por quatro estádios, com média de 24h cada, transformam-se em pupas que, em até 48h, atingem a fase adulta. O ciclo tem duração média de dez dias sob condições ótimas de temperatura e disponibilidade de alimento.

Assim como ocorre com *C. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* tem destacada importância na saúde pública devido ao seu *status* de vetor biológico de diversos arbovírus como dengue, febre amarela, chikungunya, Zika, entre outros (KAUFFMAN; KRAMER, 2017; ZETTEL; KAUFMAN, 2008). As arboviroses, infecções associadas a estes vírus, representam um desafio para a saúde pública pois não possuem um tratamento específico e não há cobertura vacinal realizada pelo SUS, exceto para febre amarela em áreas endêmicas para o ciclo silvestre em primatas não humanos (BRASIL, 2018). Portanto, a principal forma de controle destas doenças é através do controle da densidade populacional do vetor (CARVALHO; MOREIRA, 2017; ROMANO *et al.*, 2011). Atualmente no Brasil, dengue, febre do vírus Zika e febre de chikungunya apresentam uma grande importância epidemiológica, sendo doenças de notificação compulsória. Comparando o número de casos prováveis entre janeiro e agosto de 2018 e 2019, foi registrado um aumento para as três doenças, com valores mais expressivos para dengue (aproximadamente 600%) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019). A situação da dengue é, sem dúvida, a mais alarmante pela circulação de quatro sorotipos virais e endemicidade da doença com expressivas epidemias nas últimas três décadas (FARES *et al.*, 2015; PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018). Com relação à febre pelo vírus Zika, é importante ressaltar que esta

doença pode trazer complicações neurológicas, tendo sido identificado como agente etiológico de um novo agravo denominado “Síndrome Congênita do vírus Zika”. Esta síndrome acomete recém-nascidos e é caracterizada por inúmeras malformações neurológicas com sérias consequências no desenvolvimento, devido à infecção viral da mãe durante a gravidez (ARAÚJO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

2.2 Controle populacional de mosquitos

O controle de diversas doenças, que tem seus patógenos transmitidos por mosquitos, compreende o uso de métodos para redução da densidade populacional do inseto vetor na área afetada, através de controle mecânico, manejo ambiental, uso de larvicidas e/ou adulticidas, abordagens de controle genético e comportamental (ACHEE *et al.*, 2015; KILLEEN *et al.*, 2017). Entretanto, o controle de culicídeos é um desafio devido às suas características biológicas como adaptação ao ambiente, ciclo de vida curto e elevada taxa reprodutiva que podem favorecer a sua rápida proliferação, sobretudo, associadas à precariedade das condições ambientais e urbanas e o clima tropical (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; REGIS *et al.*, 2008). O uso de inseticidas químicos de síntese permanece como uma das principais ferramentas de controle desde a sua descoberta e o início do uso do organoclorado dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). Em seguida, outras classes de inseticidas químicos (organofosforados, carbamatos e piretróides) foram descobertas e também passaram a ser utilizadas. No entanto, devido à toxicidade destes compostos para organismos não-alvo e à seleção de populações resistentes, seu uso vem sofrendo restrições e agentes com ação mais seletiva e segura vêm sendo estudados (CHAREONVIRIYAPHAP *et al.*, 2013; DOBROKHOTOV, 1991; HEMINGWAY; RANSON, 2000; MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2012).

Agentes de controle biológico, por exemplo, vêm sendo utilizados com sucesso na redução populacional de insetos. Nesta abordagem, podem ser empregados parasitas, predadores, patógenos, competidores ou toxinas produzidas por estes agentes, sendo este método considerado sustentável e seguro para o ambiente por ser mais seletivo (LACEY *et al.*, 2015). Os agentes de controle biológico mais utilizados são as bactérias entomopatógenas, produtoras de toxinas inseticidas com ação contra dípteros, lepidópteros, coleópteros, além de alguns nemátodos. Durante a esporulação, as bactérias entomopatógenas produzem cristais proteicos que contêm as toxinas inseticidas cujo mecanismo de ação ocorre através de ligação a receptores específicos localizados no epitélio intestinal de larvas (BRAVO *et al.*, 2011).

Larvicidas biológicos produzidos à base de duas espécies de bactérias se destacam no âmbito de controle de insetos vetores: *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) e *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp). Ambas apresentam alta toxicidade para culicídeos e os larvicidas biológicos à base de Bti são mais utilizados para os gêneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes*, enquanto que aqueles à base de Lsp são mais utilizados para os gêneros *Culex* e *Anopheles* (LACEY, 2007; POOPATHI; ABIDHA, 2010; REGIS *et al.*, 2001).

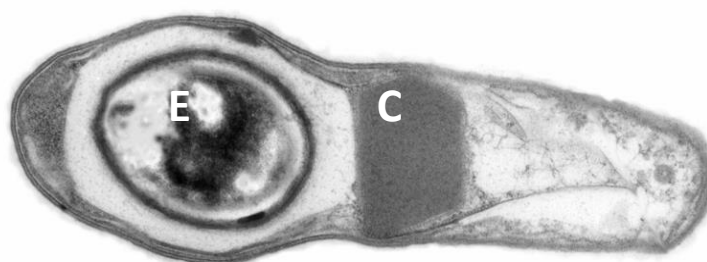
O uso de larvicidas biológicos à base destas bactérias é uma ferramenta extremamente importante no controle de mosquitos visto que apresenta diversas vantagens como a facilidade operacional, ação rápida, seletividade para organismo alvo e, sobretudo, a segurança ambiental em vista do rigor e exigências das legislações ambientais mais avançadas (LACEY *et al.*, 2007). No contexto do controle de *C. quinquefasciatus*, devido às suas características ecobiológicas, as quais permitem mapear criadouros com alta densidade populacional, o uso destes larvicidas biológicos pode ter um impacto significativo na densidade populacional, sendo a principal medida de controle vetorial (BARBAZAN *et al.*, 1997; HOUGARD *et al.*, 1993; MOISE; RIEGEL; MUTURI, 2018; REGIS *et al.*, 1995; SILVA-FILHA *et al.*, 2001; SKOVMAND *et al.*, 2011). Já para *Ae. aegypti*, o uso convencional de larvicidas em criadouros é importante, mas deve ser associado a outros métodos de controle, tendo em vista a dificuldade de mapear criadouros desta espécie devido ao seu comportamento disperso de oviposição, além da ampla variedade de microcriadouros, sendo alguns crípticos que não são alcançados pelo método convencional de aplicação focal de larvicidas (BARRERA *et al.*, 2018; REGIS *et al.*, 2013; REITER, 2007).

2.3 *Lysinibacillus sphaericus*

A bactéria *Lysinibacillus sphaericus* Neide (Lsp), previamente denominada *Bacillus sphaericus* (AHMED *et al.*, 2007), é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica e esporulante com distribuição cosmopolita, podendo ser encontrada em solos e ambientes aquáticos (DAVIDSON, 1984). Durante a esporulação, esta bactéria produz cristais proteicos que contêm toxinas inseticidas para larvas de algumas espécies de mosquitos, sendo portanto, classificada como um entomopatógeno (MITTAL, 2003). Na região terminal do esporângio, que é caracterizado pela sua forma de raquete, estão localizados os esporos e, próximos a eles, ficam os cristais (Figura 3). O isolamento da primeira linhagem de Lsp com atividade larvicida foi feito a partir de larvas moribundas de *Culiseta incidens* coletadas em 1963 nos Estados Unidos (KELLEN *et al.*, 1965). Depois, outras cepas com alto poder larvicida para

culicídeos foram caracterizadas como: 1593 da Indonésia (SINGER, 1974); 2297 do Sri Lanka (WICKREMESINGHE; MENDIS, 1980); 2362 da Nigéria (WEISER, 1984); e C3-41 da China (ZHANG *et al.*, 1987). As cepas de *Lsp* são classificadas em cinco grupos (I-V) com base na homologia de seu DNA. O grupo II sofreu uma subdivisão de acordo com a patogenicidade para larvas de mosquitos, sendo o subgrupo IIA o que contém as cepas com esta característica, o qual inclui as cepas citadas acima (KRYCH; JOHNSON; YOUSTEN, 1980).

Figura 3 – *Lysinibacillus sphaericus* em fase de esporulação.



Fonte: Modificado de Kalfon *et al.* (1984).

Legenda: Visão longitudinal em micrografia eletrônica. E = esporo; C = cristal protéico.

Até o momento, algumas toxinas com ação inseticida foram identificadas em *Lsp*: Binária (Bin), *Mosquitocidal toxins* (Mtx), Cry e a Sphaericolisina. Estas toxinas podem ser produzidas em diferentes fases do desenvolvimento da bactéria (vegetativa ou de esporulação) e por diferentes cepas (BERRY, 2012). As toxinas Mtx são produzidas durante a fase vegetativa do crescimento do *Lsp* e são classificadas em três tipos: Mtx1 (100 kDa), Mtx2 (32 kDa) e Mtx3 (36 kDa) (LIU; PORTER; WEE, 1996; THANABALU *et al.*, 1991; THANABALU; PORTER, 1996). Foi observado que estas toxinas sofrem degradação por proteases durante o crescimento no meio de cultura para esporulação, subsequente à fase vegetativa de crescimento, fazendo com que elas sejam instáveis e tenham baixa atividade tóxica. Entretanto, a toxina Mtx1 expressa sob a forma recombinante modificada para ausência de expressão da protease apresentou alta toxicidade para larvas de *C. quinquefasciatus* na fase vegetativa e durante a esporulação (THANABALU; PORTER, 1995). Outro estudo também mostrou que as toxinas Mtx1 e Mtx2, expressas sob a forma recombinante em *Escherichia coli*, apresentaram de moderada a alta atividade larvicida para culicídeos (WEI; CAI; YUAN, 2006; WIRTH *et al.*, 2007). Adicionalmente, foi observada a sinergia de toxinas Mtx com toxinas Cry de Bti, e algumas combinações de misturas destas

duas toxinas proporcionaram a supressão da resistência a toxinas Cry em *C. quinquefasciatus* (WIRTH *et al.*, 2007, 2014).

As toxinas Cry são caracteristicamente produzidas por subespécies de *Bacillus thuringiensis* (BRAVO *et al.*, 2011; CRICKMORE *et al.*, 1998), no entanto, duas toxinas desta família, denominadas Cry48Aa (135 kDa) e Cry49Aa (53 kDa), foram identificadas na cepa IAB59 de Lsp (JONES *et al.*, 2007). Estas são protoxinas contidas em cristais produzidos durante a esporulação. Também são consideradas uma toxina binária pois agem em sinergia, necessitando de concentrações equimolares de cada componente para atingir a toxicidade máxima para larvas. No entanto, em cepas nativas, o componente Cry48Aa apresenta baixa acumulação e a produção dos fatores tóxicos não é equimolar (JONES *et al.*, 2007). Desta forma, a produção desta toxina binária, por si só, não é capaz de proporcionar uma alta atividade tóxica para estas cepas. Quando as toxinas Cry48Aa e Cry49Aa são obtidas de forma purificada e aplicadas em concentrações equimolares, elas possuem uma alta atividade larvicida para *C. quinquefasciatus*, comparável àquela detectada para a toxina Bin. Estudos preliminares mostraram que o espectro de ação desta toxina se limita ao gênero *Culex*, não ocorrendo ação tóxica para larvas de *Ae. aegypti* e *Anopheles gambiae* (JONES *et al.*, 2008). Por outro lado, a principal particularidade desta toxina é que ela tem atividade tóxica para larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes à toxina Bin, indicando que a toxina Cry48Aa/Cry49Aa se liga a diferentes receptores (MELO *et al.*, 2009). Os ligantes desta toxina no epitélio intestinal de *C. quinquefasciatus* foram identificados através de uma análise proteômica e compreendem fosfatases alcalinas, aminopetidases e outras proteínas de membrana (REZENDE *et al.*, 2017).

A Sphaericolisina, toxina detectada na cepa A3-2 de Lsp, foi a mais recentemente identificada. A toxina é uma citolisina dependente de colesterol, com um peso molecular de 53 kDa e que apresenta toxicidade quando injetada em *Blattella germanica* (Blattodea) e, em menor intensidade, em *Spodoptera litura* (Lepidoptera). Além disso, a Sphaericolisina já foi isolada a partir de um órgão digestivo da formiga-leão *Myrmeleon bore* (NISHIWAKI *et al.*, 2007). A família de proteínas da Sphaericolisina é aparentemente conservada entre as cepas de Lsp e esta toxina também foi encontrada em cepas fora do subgrupo IIA, que é o subgrupo relacionado à atividade inseticida (FROM; GRANUM; HARDY, 2008).

2.4 Toxina binária do *L. sphaericus*

A toxina Bin é o principal componente tóxico presente no cristal protéico do *L. sphaericus* e será mais detalhada nesta seção.

2.4.1 Componentes e domínios funcionais

A toxina Bin é o principal fator tóxico de Lsp e é encontrada nas cepas que tem alta atividade larvicida para culicídeos, tais como a 1593 e a 2362. Por este motivo, os cristais produzidos por cepas contendo esta toxina são o princípio ativo dos larvicidas comercialmente disponíveis (BERRY, 2012; LACEY, 2007; REGIS *et al.*, 2001). A toxina Bin é produzida durante a esporulação, sob a forma de uma protoxina heterodimérica, formada pelas subunidades BinA (42 kDa) e BinB (51 kDa) (BAUMANN; BROADWELL; BAUMANN, 1988). A protoxina é produzida sob a forma de inclusões cristalinas que contém uma alta e equimolar concentração das duas subunidades. A toxina é denominada binária pois os dois componentes são necessários em concentrações equimolares para provocar uma alta ação larvicida em algumas espécies de mosquitos (BAUMANN *et al.*, 1991; NICOLAS *et al.*, 1993). Os cristais proteicos de Lsp tem ação por via oral e são ingeridos pelas larvas durante a alimentação por filtração de partículas em suspensão no ambiente aquático. Após a ingestão, ocorre a solubilização dos cristais em pH intestinal alcalino ($\cong 10$), liberando as protoxinas no lúmen intestinal. Em seguida, ocorre a ativação da protoxina em forma ativa devido à clivagem realizada pelas serina-proteases. Neste processo, os polipeptídeos BinA e BinB de 42 e 51 kDa são convertidos em fragmentos ativos de 39 e 43 kDa, respectivamente (BROADWELL; BAUMANN, 1987).

Para que a ação da toxina Bin ocorra, é essencial a sua ligação com receptores presentes no epitélio intestinal. Em *C. quinquefasciatus*, esta importante função é realizada pelo componente BinB, já o componente BinA é responsável pela toxicidade (CHARLES *et al.*, 1997; NICOLAS *et al.*, 1993). As sequências de aminoácidos de BinA e BinB apresentam 28% de identidade e 46% de similaridade (COLLETIER *et al.*, 2016). Entre estas toxinas, as sequências de aminoácidos altamente conservadas são também as principais regiões hidrofóbicas, que estão frequentemente localizadas na porção interna da proteína e possivelmente estão envolvidas na interação com a membrana celular (BAUMANN; BROADWELL; BAUMANN, 1988). Estudos *in vitro* demonstraram que as protoxinas BinA e BinB são monoméricas e que, quando ativadas, podem formar um heterodímero,

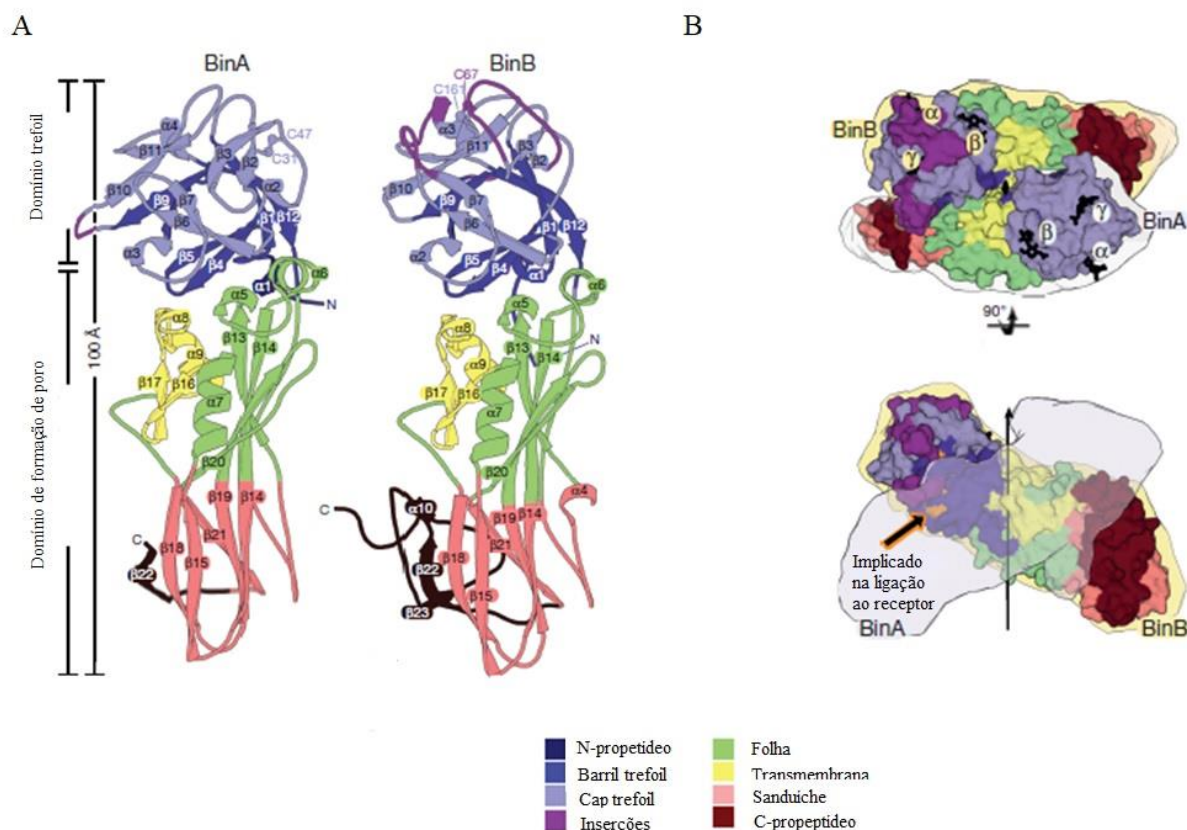
possivelmente é sob esta forma que a toxina interage com o receptor no epitélio intestinal, pois a alta toxicidade em culicídeos só ocorre quando os componentes estão em quantidades equimolares (BAUMANN *et al.*, 1991; SURYA *et al.*, 2016). Além disso, já foi observado que, para a sua ação nas células, estas toxinas não necessitam formar oligômeros, tal como já foi demonstrado para as toxinas Cry (HIRE *et al.*, 2014).

O componente BinA, com 370 aminoácidos, tem o seu domínio C-terminal fortemente associado à toxicidade para as células e pode estar implicado também na capacidade de formação de poros no epitélio intestinal, favorecendo a internalização da toxina (ELANGO VAN *et al.*, 2000). Adicionalmente, já foi demonstrado que resíduos de cisteína (31, 47 e 195), triptófano (222 e 226), ácido glutâmico (98 e 114) e arginina (97 e 101) presentes nesta subunidade, são necessários para a sua toxicidade (KUNTHIC *et al.*, 2011; PROMDONKOY *et al.*, 2008; SANITT; PROMDONKOY; BOONSERM, 2008). Além disso, o domínio C-terminal também apresenta um importante papel para a ligação com a subunidade BinB, como demonstrado *in vitro* através de ensaios de interação de dois fragmentos deste domínio com a BinB (LIMPANAWAT; PROMDONKOY; BOONSERM, 2009). Análises de dicroísmo circular e de cristalografia apontaram a predominância de folhas β na estrutura da BinA como observado na figura 4 (COLLETIER *et al.*, 2016; SRISUCHARITPANIT *et al.*, 2012).

A subunidade BinB possui 448 aminoácidos, sendo a região N-terminal responsável pela interação com receptores presentes no epitélio intestinal, enquanto a região C-terminal é necessária para a interação com o componente BinA (ELANGO VAN *et al.*, 2000; OEI; HINDLEY; BERRY, 1992). Estudos prévios mostraram que o segmento N-terminal da subunidade BinB localizado entre os aminoácidos N33 a L158 é essencial para a ligação da toxina ao receptor. Neste segmento, os aminoácidos ⁸⁵IRF₈₇, ¹⁴⁷FQF₁₄₉ e Y150 são críticos para esta interação (ROMÃO; DE-MELO-NETO; SILVA-FILHA, 2011; SINGKHAMANAN *et al.*, 2010, 2013). Assim como a BinA, a estrutura da subunidade BinB tem predominância de folhas β , com o domínio N-terminal com uma estrutura globular e o C-terminal mais alongado (Figura 4). O domínio N-terminal apresenta resíduos de cisteína necessários para a sua conformação funcional e contém características conservadas, quando comparado com outras proteínas que tem função de ligação a carboidratos, corroborando a hipótese de que esta região pode estar envolvida na interação com os receptores. Já o domínio C-terminal, tem um *cluster* de resíduos aromáticos e uma maior presença de resíduos de serina e treonina. A estrutura heterodimérica BinAB indica que uma modificação

conformacional expõe a região de interação com o receptor, como mostrado na Figura 4 (COLLETIER *et al.*, 2016; SRISUCHARITPANIT *et al.*, 2014).

Figura 4 – Estrutura tridimensional (cristalografia) da toxina Bin.



Fonte: Modificado de Colletier *et al.* (2016).

Legenda: A = estrutura das toxinas BinA e BinB, formadas por dois domínios: trefoil e de formação de poro. B = representação da superfície do dímero BinAB demonstrando que a exposição do sítio de interação se dá após modificação conformacional da toxina.

2.4.2 Espectro e modo de ação

A toxina Bin tem ação larvicida para várias espécies de dípteros dos gêneros *Culex*, *Anopheles*, *Aedes*, *Mansonia*, além de outros, sendo as espécies do gênero *Simulium* refratárias (SILVA-FILHA; BERRY; REGIS, 2014). O complexo *Culex pipiens* compreende as espécies mais suscetíveis à toxina Bin, enquanto no gênero *Aedes* ocorre uma grande variação no padrão de suscetibilidade. *Ae. aegypti*, por exemplo, é considerado refratário ao Lsp pois a concentração letal para esta espécie é cerca de 100 a 1000 vezes superior à concentração letal para *Culex pipiens* (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). A refratariedade de larvas de *Ae. aegypti* é devido à ausência de receptores específicos no epitélio intestinal das larvas, o que impede a ligação da toxina Bin. Estas larvas expressam

uma proteína ortóloga ao receptor Cqm1 (Aam1) no epitélio, entretanto, esta proteína não apresenta capacidade de ligação específica com a toxina Bin (FERREIRA *et al.*, 2010). Por outro lado, outras espécies do gênero *Aedes* são suscetíveis ao Lsp tais como *Aedes atropalpus*, *Aedes triseriatus* e *Aedes vexans* (BERRY *et al.*, 1993; WRAIGHT; MOLLOY; SINGER, 1987). Larvicidas biológicos à base de Lsp são utilizados principalmente para o controle de *Culex* e *Anopheles* em diversas partes do mundo (LACEY, 2007; REGIS *et al.*, 2001), inclusive na cidade do Recife para o controle de *C. quinquefasciatus* (SANTOS *et al.*, 2018; SILVA-FILHA *et al.*, 2008).

A interação da toxina Bin com o receptor presente no epitélio intestinal das larvas e sua afinidade de ligação é a condição que define o grau de suscetibilidade de cada espécie analisada. Em larvas altamente suscetíveis como *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus*, a toxina Bin se liga especificamente a receptores presentes no *microvilli* do epitélio intestinal com alta afinidade e constante de dissociação (K_d) de cerca de 5-20 nM (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA *et al.*, 2004, 2008; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997, 1999). Para espécies de anofelinos moderadamente suscetíveis, tais como *Anopheles stephensi* e *Anopheles gambiae*, o valor de K_d é cerca de 30-100 nM (SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997). Já em *Ae. aegypti*, espécie considerada refratária, não foi detectado um nível significativo de ligação específica da toxina Bin ao epitélio intestinal, demonstrando o importante papel da presença dos receptores para ação da toxina Bin (FERREIRA *et al.*, 2010; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992).

Uma vez internalizada nas células do epitélio intestinal, a toxina Bin causa efeitos citopatológicos que podem contribuir para a morte da larva, entretanto o mecanismo molecular pelo qual a toxina Bin causa a letalidade ainda é desconhecido. Dados da literatura mostram que em uma linhagem celular de mamíferos (MDCK) que expressava o receptor Cpm1 da toxina Bin já foi observado vacuolização citoplasmática originada a partir de autolisossomos como consequência da indução de autofagia (OPOTA *et al.*, 2011). Com relação à morte celular por apoptose, este mecanismo pode ser induzido através da ativação de caspases por duas principais vias de sinalização, a via extrínseca e a via intrínseca (mitocondrial) (LI; YUAN, 1999; SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1998). Em um trabalho realizado com larvas de *C. quinquefasciatus* expostas à Bin, a ação da toxina foi relacionada à indução de apoptose através da ativação da Caspase-9 e Caspase-3, levando à fragmentação do DNA e ativação da cascata de apoptose pela via mitocondrial, possivelmente relacionada às alterações ultraestruturais observadas principalmente em mitocôndrias (TANGSONGCHAROEN *et al.*, 2015). Foram ainda relatados danos no retículo

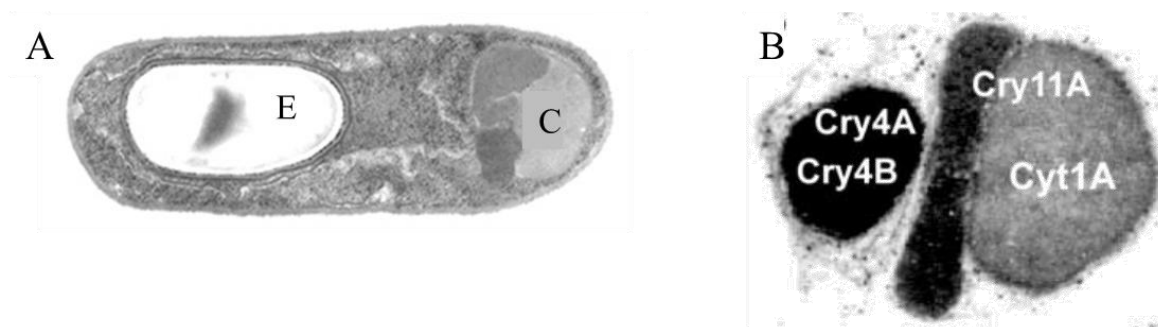
endoplasmático, destruição de microvilosidades e formação de grandes vacúolos citoplasmáticos (MELO *et al.*, 2008; SILVA-FILHA; PEIXOTO, 2003). Uma análise do transcriptoma de larvas de *C. quinquefasciatus* expostas e ou não à Bin, demonstrou uma resposta transcricional diferencial relacionada à ativação de autofagia (vacuolização autofágica) e apoptose (via mitocondrial) nas larvas tratadas (TANGSONGCHAROEN *et al.*, 2017).

2.5 *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis*

Antes do isolamento do *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti), diferentes sorovariedades da bactéria entomopatígena *Bacillus thuringiensis* (Bt) já tinham sido caracterizadas e vinham sendo empregadas, sobretudo para o controle de pragas agrícolas (BRAVO *et al.*, 2011; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; DE BARJAC, 1978). Esta bactéria produz diversas toxinas, dentre elas as toxinas Cry, classificadas em dezenas de grupos pelo Comitê de Nomenclatura de Toxinas de Bt (Cry1-Cry78), produzidas por diversas cepas (CRICKMORE *et al.*, 2018). A atual classificação das toxinas Cry pode ser consultada em <http://www.btnomenclature.info/>. As principais toxinas produzidas por Bt podem ser divididas em toxinas do cristal protéico produzidas durante a esporulação (Cry e Cyt) e proteínas inseticidas secretadas na fase vegetativa (*Vegetative Insecticidal Proteins*/Proteínas Vegetativas Inseticidas - Vip) do crescimento bacteriano (toxina binária Vip1/Vip2, Vip3, Vip4 e Sip) (PALMA *et al.*, 2014). O grupo das proteínas Cry é o principal grupo de toxinas produzidas por Bt e estas possuem ação tóxica para diversas ordens de insetos como lepidópteros, coleópteros e dípteros, além de nemátodos, e são usadas como princípio ativo de produtos comerciais (FRANKENHUYZEN, 2009).

A bactéria entomopatígena Bti, isolada a partir de larvas moribundas de *Culex* coletadas em uma coleção de água em Israel, foi a primeira subespécie de Bt a ter ação tóxica para dípteros (DE BARJAC, 1978). Bti é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica, esporulante e que pode ser encontrada em solos e ambientes aquáticos (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2003; MARTIN; TRAVERS, 1989). Assim como o Lsp, esta bactéria produz cristais proteicos durante a esporulação (Figura 5) os quais contêm proteínas tóxicas para larvas de algumas espécies de insetos, sendo classificada como bactéria entomopatígena (LACEY, 2007).

Figura 5 – *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) em fase de esporulação.



Fonte: Modificado de Charles; de Barjac (1982) e Federici *et al.* (2003).

Legenda: A = Visão longitudinal do Bti em micrografia eletrônica. B = Corpo paraesporal de Bti mostrando a composição de suas principais toxinas. E = esporo; C = cristal protéico.

2.6 Toxinas Cry e Cyt do Bti

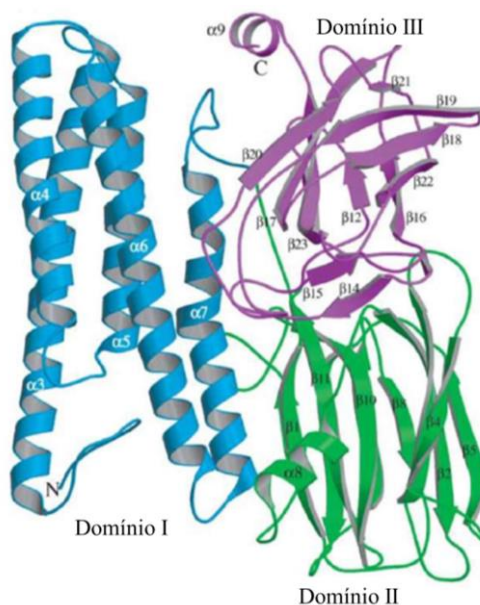
O espectro de ação do cristal de Bti inclui vários artrópodes dentro da subordem Nematocera, como culicídeos, simulídeos e quironomídeos (CAVADOS *et al.*, 2004; DE BARJAC, 1978; PING *et al.*, 2005). Além disso, há espécies em outras ordens de insetos que possuem algum grau de suscetibilidade ao Bti como Hemiptera, Coleoptera e Lepidoptera, entretanto os principais alvos estão dentro da ordem Diptera com destaque para os gêneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* e *Simulium* (BEN-DOV, 2014). Uma das características mais importantes do Bti é a complexidade dos cristais, pois as cepas mais representativas contêm quatro protoxinas de duas famílias: três componentes da família Cry de três domínios e uma protoxina citolítica. O perfil de protoxinas mais comum encontrado nos cristais de cepas que proporcionam atividade larvicida para dípteros são: Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa (Figura 5) (BEN-DOV, 2014). A ação destas toxinas ocorre em sinergia, pois possuem alta toxicidade juntas, enquanto que as toxinas individuais têm baixa atividade (CRICKMORE *et al.*, 1995). As toxinas também possuem um mecanismo de interação com o epitélio intestinal bastante complexo, pois possuem múltiplos receptores além da própria toxina Cyt1Aa que também funciona como receptor das toxinas Cry, como será descrito na seção 2.8.

Estas toxinas, assim como a Bin, são produzidas sob a forma de protoxinas contidas em inclusões cristalinas, atuam por ingestão e necessitam de ativação proteolítica no intestino das larvas para a sua ação tóxica (SOBERÓN *et al.*, 2010). Entretanto, é importante ressaltar que as toxinas dos cristais inseticidas do Bti e a toxina Binária do Lsp não possuem nenhuma relação estrutural ou filogenética, conforme as informações descritas. A solubilização do cristal ocorre devido ao pH alcalino das larvas e a ativação se dá por meio da ação de proteases presentes no intestino das larvas, sobretudo tripsinas e quimiotripsinas. Após esta

clivagem protéica, as protoxinas Cry4Aa e Cry4Ba, que possuem cerca de 130 kDa são convertidas em dois fragmentos ativos de cerca de 46 e 18 kDa; a protoxina Cry11Aa de 68 kDa é convertida para dois fragmentos de 36 e 32 kDa e a protoxina Cyt1Aa de 28 kDa se converte à forma ativa de 24 kDa (AL-YAHYAE; ELLAR, 1995; KOMANO *et al.*, 1998; YAMAGIWA *et al.*, 2002).

As toxinas Cry4Aa, Cry4Ba e Cry11Aa pertencem à família de toxinas Cry que são moléculas globulares com estrutura de três domínios, unidos por ligantes simples (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). O domínio I é formado por um agrupamento de sete α -hélices composto por seis hélices anfipáticas envolvendo a α -hélice 5. Foi demonstrado que este domínio está envolvido na oligomerização, inserção na membrana e formação de poro. O domínio II é composto por 11 folhas- β com regiões expostas (alças ou *loops*) que estão relacionadas à ligação específica a proteínas presentes no epitélio larval e o domínio III também apresenta estrutura β e também está envolvido no reconhecimento do receptor e estabilidade da toxina (Figura 6) (BRAVO *et al.*, 2011). Estas proteínas de três domínios são descritas como toxinas que podem induzir a morte celular através da formação de poros na membrana de células epiteliais no intestino das larvas que são seus alvos, causando um desequilíbrio osmótico (SOBERÓN *et al.*, 2010).

Figura 6 – Estrutura tridimensional (cristalografia) da toxina Cry4Ba.



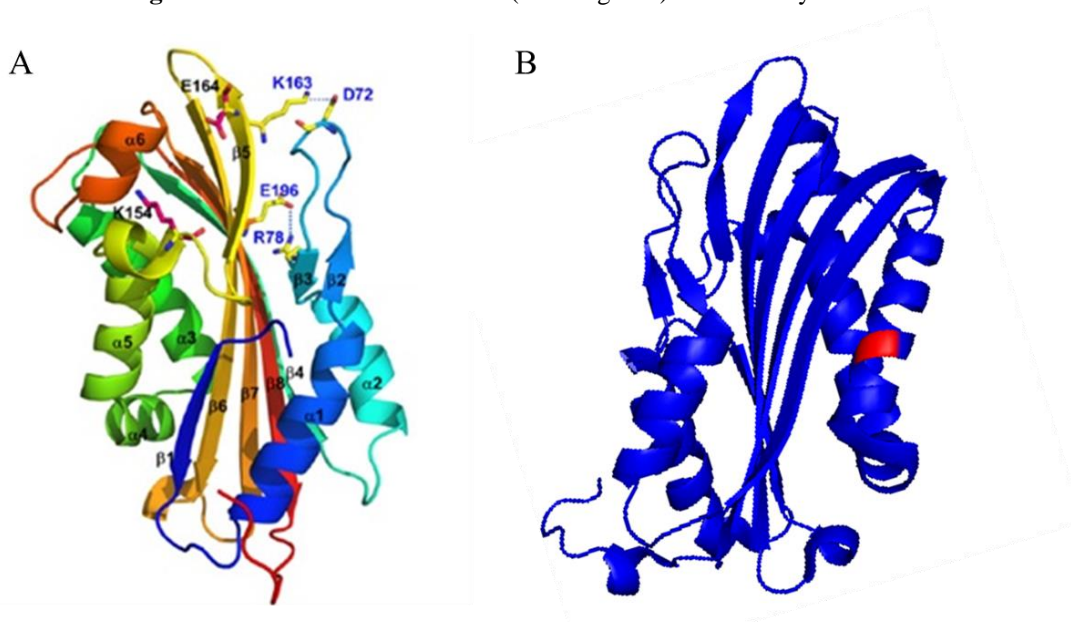
Fonte: Modificado de Boonserm *et al.* (2005).

Nota: Diagrama Ribbon da toxina Cry4Ba. A estrutura é formada por três domínios (I, II e III).

A Cyt1Aa é uma toxina que faz parte da família de toxinas citolíticas sendo classificada como uma toxina formadora de poros (*Pore Forming Toxin*) na membrana

celular. Entretanto, diferente das toxinas Cry, a toxina Cyt1Aa interage diretamente com fosfolipídeos da própria membrana e não necessita de receptores específicos disponíveis no epitélio intestinal para tal interação (BRAVO *et al.*, 2011; THOMAS; ELLAR, 1983). Como dito anteriormente, a toxina Cyt1Aa também necessita de ativação proteolítica para proporcionar ação larvicida (AL-YAHYAEE; ELLAR, 1995). A estrutura tridimensional da toxina Cyt1Aa, com um único domínio que apresenta duas camadas de α -hélice envolvendo uma folha- β (Figura 7A), revela que ela necessita de modificações conformacionais para apresentar ação tóxica pois, após estas modificações, ocorre a exposição da região que irá interagir com os fosfolipídeos presentes na membrana celular (COHEN *et al.*, 2011). Foi demonstrado ainda que os domínios N- e C-terminal da toxina Cyt1Aa apresentam diferentes funções. A região N-terminal está envolvida na oligomerização da toxina, enquanto o domínio C-terminal está envolvido na interação da toxina com a membrana lipídica (RODRIGUEZ-ALMAZAN *et al.*, 2011). A Figura 7B mostra a mutação V122E que afeta a capacidade de oligomerização e inserção na membrana da toxina Cyt1Aa, importante mutante usada neste trabalho (LÓPEZ-DÍAZ *et al.*, 2013)

Figura 7 - Estrutura tridimensional (cristalografia) da toxina Cyt1Aa.



Fonte: Adaptado de Cohen *et al.* (2011).

Legenda: A: Diagrama Ribbon da toxina Cyt1Aa. A estrutura é formada por um monômero que contém os domínios N e C-terminal. B: Destaque em vermelho da localização da mutação V122E na α -hélice 3.

A toxina Cyt1Aa atua através da formação de poros na membrana celular. O modelo da formação de poro foi proposto para a toxina Cyt2Aa1. Este propõe que duas camadas externas de α -hélice (α -1 e α -2) se movem, expondo a estrutura de folhas- β que entrará em

contato com a membrana celular para se inserir. Em seguida, ocorre a oligomerização que formará um poro de β -barril (β -5, β -6 e β -7) dentro da membrana, que causará a lise osmótica coloidal e danos celulares (LI; KONI; ELLAR, 1996; PROMDONKOY; ELLAR, 2000, 2003). Há outro modelo que propõe a ação detergente da toxina Cyt1Aa, no qual ocorre uma agregação não específica de toxina na membrana celular com consequente desestruturação na bicamada lipídica (BUTKO, 2003) e consequentemente da membrana. Apesar de serem etapas necessárias, o processamento da protoxina, a interação com a membrana e a formação de oligômeros não são suficientes para a toxicidade da Cyt1Aa que individualmente é baixa. O papel mais importante da toxina Cyt1Aa parece ser a sua capacidade de sinergizar as outras toxinas, inclusive atuando como receptor de toxinas Cry do Bti, como será tratado adiante no item 2.10.1 (SOBERÓN; LÓPEZ-DÍAZ; BRAVO, 2013).

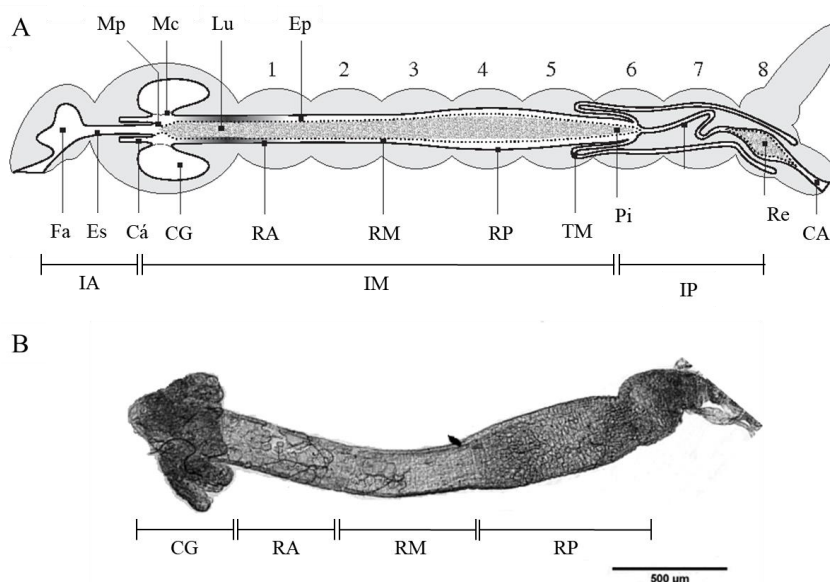
2.7 Receptores da toxina Bin do Lsp

Os receptores da toxina Bin já foram caracterizados em larvas de *C. quinquefasciatus*, *C. pipiens* e *An. gambiae* e são α -glicosidases (E.C. 3.2.1.20) que foram denominadas Cqm1, Cpm1 e Agm3, respectivamente. Estas α -glicosidases são proteínas ortólogas de cerca de 66 kDa, que estão ligadas à membrana do epitélio intestinal via uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (CHARLES *et al.*, 1997; DARBOUX *et al.*, 2001; OPOTA *et al.*, 2008; ROMÃO *et al.*, 2006; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999). Também foi identificada uma proteína ortóloga em *Ae. aegypti*, denominada Aam1, que apresenta 80% de similaridade e 74% de identidade à Cqm1, entretanto ela não apresenta capacidade de interação com a toxina Bin (FERREIRA *et al.*, 2010), o que explica a base da refratariedade *in vivo* de larvas desta espécie à toxina Bin (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992).

Em *C. quinquefasciatus*, o receptor Cqm1 é codificado pelo gene *cqm1*, que contém 1870 nucleotídeos (nt), com uma região codificante (1743 nt) e dois íntrons (ROMÃO *et al.*, 2006). A proteína Cqm1 é uma α -glicosidase e tem, portanto, como função primordial atuar na digestão de carboidratos no inseto, entretanto, a sua caracterização foi feita no contexto dos estudos que identificaram esta molécula como receptor da toxina Bin. Esta α -glicosidase liga-se à toxina Bin com alta afinidade e é essencial para mediar a sua ação larvicida (DARBOUX *et al.*, 2001; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999). Em termos de localização, a Cqm1 é encontrada nos cecos gástricos e região posterior do intestino médio (Figura 8) (DAVIDSON, 1989; SILVA-FILHA;

PEIXOTO, 2003). A conformação da proteína Cqm1 é essencial para ligação à Bin, pois já foi observado que, após a desnaturação, a proteína não tem mais habilidade de interação (FERREIRA *et al.*, 2010). Foi demonstrado que a região N-terminal da proteína Cqm1, entre os resíduos S129 e A312, é necessária para que ocorra a interação da Cqm1 com a Bin, e os resíduos $_{155}PATGG_{160}$ são críticos para a ligação com a toxina. Esta região específica, envolvida na interação, é formada por α -hélices e está situada em uma alça (Figura 9), sendo uma localização favorável para interações com proteínas, como pode ser observado na modelagem estrutural de Cqm1 (FERREIRA *et al.*, 2014). Deve ser ressaltado que a ausência deste receptor para a toxina no epitélio intestinal, que pode ser causada por mutações do gene *cqm1*, leva à total resistência das larvas à toxina Bin, e este mecanismo será tratado detalhadamente no item 2.9. A proteína Cqm1 também teve a atividade maltase detectada, reforçando o seu papel no metabolismo de carboidratos no inseto (FERREIRA *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2017; SHARMA; GUPTA; KUMAR, 2018a). Além disso, novas informações sobre sua estrutura também corroboram a sua importância na digestão dos insetos devido à presença de domínios catalíticos e resíduos conservados dentro da família GH-13 das α -glicosidasas (SHARMA; GUPTA; KUMAR, 2018a; SHARMA; KUMAR, 2019).

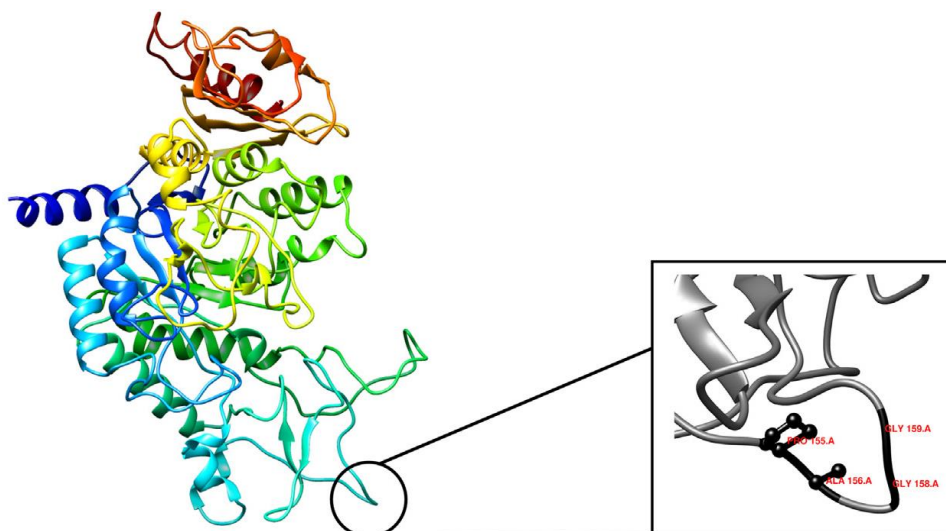
Figura 8 – Sistema digestivo de larvas de mosquito.



Fonte: Adaptado de Clements (1992).

Legenda: A: Desenho esquemático do canal alimentar de larva de mosquito. B: Imagem composta por fotos de microscopia confocal do tubo digestivo de larva de *Culex quinquefasciatus* destacando as regiões do intestino médio. Cá: cárdia. CA: canal anal. CG: cecos gástricos. Ep: espaço peritrófico. Es: esôfago. Fa: faringe. IA: intestino anterior. IM: intestino médio. IP: intestino posterior. Lu: lúmen intestinal. Mc: membrana cecal. Mp: membrana peritrófica. Pi: píloro. RA: região anterior. RM: região média. RP: região posterior. TM: túbulo de Malpighi. 1-8: segmentos abdominais.

Figura 9 – Modelagem predita da proteína Cqm1 selvagem através do I-TASSER.

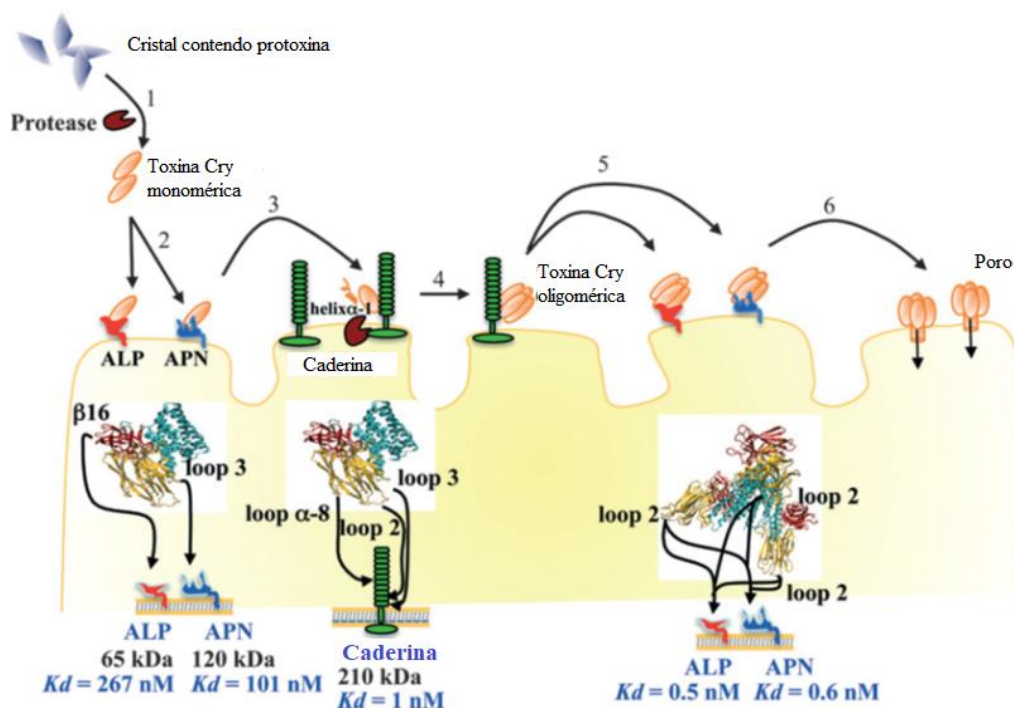


Fonte: Ferreira *et al.*, (2014).

Nota: Diagrama Ribbon da proteína Cqm1 selvagem. O quadrado destaca os resíduos localizados na alça que estão implicados na interação com a toxina Bin.

2.8 Receptores das toxinas Cry do Bti

O modelo proposto do modo de ação das toxinas Cry mais aceito é o de formação de poro após ligação sequencial a duas classes de receptores. Este modelo foi estabelecido a partir da ação da toxina Cry1Ac no intestino de larvas do lepidóptero *Manduca sexta*, e está representado na figura 10 (PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013). Após a ativação da protoxina em toxina, esta, ainda sob a forma monomérica, pode ligar-se com baixa afinidade às aminopeptidases (APNs) e fosfatases alcalinas (ALPs), mas ela também liga-se com alta afinidade aos primeiros receptores do tipo caderina (CAD), induzindo à formação de oligômeros. Esta mudança conformacional é resultado da clivagem da α -hélice 1 do domínio 1 das toxinas Cry que ocorre após a ligação com o primeiro receptor. Em seguida, os oligômeros da toxina Cry interagem com alta afinidade com segundos receptores, que são as APNs, ALPs e maltases, provocando a inserção na membrana e formação de poros que levarão à morte do inseto (BRAVO *et al.*, 2004; DE MAAGD *et al.*, 2003; SCHNEPF *et al.*, 1998). No modelo de ação das toxinas do Bti, tem sido sugerido que a toxina Cyt1Aa poderia funcionar como 1º receptor da toxina Cry, tal como uma caderina (SOBERÓN; LÓPEZ-DÍAZ; BRAVO, 2013). O mecanismo molecular deste sinergismo entre a toxina Cyt e algumas toxinas Cry será abordado mais detalhadamente na seção 2.10.

Figura 10 – Representação esquemática a nível molecular do modo de ação de toxinas Cry.

Fonte: Adaptado de Pardo-López e Soberón; Bravo (2013).

Legenda: Após a ingestão do cristal contendo a protoxina pela larva, este será solubilizado liberando as protoxinas que serão ativadas em toxina por proteases (1). Em seguida, a toxina Cry monomérica interage com receptores do tipo APN e ALP com baixa afinidade (2). A toxina se liga a receptores do tipo CAD com maior afinidade e esta interação induz à clivagem proteolítica da porção N-terminal da toxina (3). A toxina clivada pode se oligomerizar em uma estrutura de pré-poro (4). A toxina oligomérica se liga com alta afinidade a receptores do tipo ALP e APN (5). Em seguida, acontece a inserção da estrutura pré-poro na membrana causando a formação do poro (6).

Alguns receptores de toxinas Cry, já foram identificados em lepidópteros tais como CADs, ALPs, APNs e α -amilases (LIKITVIVATANAVONG *et al.*, 2011; ZHANG; HUA; ADANG, 2017). O quadro 1 sumariza os principais receptores de toxinas Bin (Lsp) e Cry (Bti) já caracterizados em mosquitos. É importante notar que a toxina Bin liga-se a uma única classe de receptores e as toxinas Cry a diversas classes de receptores. Este quadro também mostra receptores caracterizados para a toxina Cry11Ba produzida pelo *B. thuringiensis* sorovar. *jegathesan* (Btjg), outra sorovarietade com ação para larvas de mosquitos, mas que ainda não foi empregada para a produção de larvicidas em larga escala. Além disso, como mencionado anteriormente, a toxina Cyt1Aa também pode atuar como receptor de toxinas Cry (SOBERÓN; LÓPEZ-DÍAZ; BRAVO, 2013). Com relação à toxina Cyt1Aa, como dito anteriormente, esta não apresenta receptores específicos no epitélio intestinal e atua através da sua interação com fosfolípídeos (BRAVO *et al.*, 2011; THOMAS; ELLAR, 1983).

Quadro 1 – Receptores de toxinas mosquitocidas produzidas por *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp), *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) e *B. thuringiensis* sorovar. *jegathesan* (Btjeg).

Patógeno	Toxina	Receptor/Ligante		Espécie	Referências			
		Classe	kDa					
Lsp	Bin	α -Gli ¹ (Cpm1)	66	<i>Culex pipiens</i>	DARBOUX <i>et al.</i> , 2001; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999			
		α -Gli (Cqm1)		<i>Culex quinquefasciatus</i>	ROMÃO <i>et al.</i> , 2006			
		α -Gli (Agm3)		<i>Anopheles gambiae</i>	OPOTA <i>et al.</i> , 2008			
Bti	Cry11Aa	APN ² (AaeAPN1)	140	<i>Aedes aegypti</i>	CHEN <i>et al.</i> , 2009b			
		APN (AaeAPN2)	104		CHEN <i>et al.</i> , 2013			
		CAD ³ (AaeCad)	250		CHEN <i>et al.</i> , 2009a; LEE <i>et al.</i> , 2015			
		ALP ⁴ (ALP1)	65		CHEN; AIMANOVA; GILL, 2017; JIMÉNEZ <i>et al.</i> , 2012			
		AMY ⁵ (Aamy1)	70		<i>An. albimanus</i>	FERNANDEZ-LUNA <i>et al.</i> , 2010		
	Cry4Ba	ALP (ALP1)	65	<i>Ae. aegypti</i>	JIMÉNEZ <i>et al.</i> , 2012			
		ALP (Aa-mALP)	58		DECHKLAR <i>et al.</i> , 2011			
		APN (2778)	112		AROONKESORN <i>et al.</i> , 2015; SAENGWIMAN <i>et al.</i> , 2011			
		APN (2783)	107					
		APN (5808)	108					
		CAD (AgCad1)	200		<i>An. gambiae</i>	HUA <i>et al.</i> , 2008		
		CAD (BT-R3)	200			IBRAHIM; GRIKO; BULLA, 2013		
		Btjeg	Cry11Ba		ALP (AaeALP1)	65	<i>Ae. aegypti</i>	LIKITVIVATANAVONG <i>et al.</i> , 2011
					APN (AaeAPN1)	140		
CAD	88							
AMY (Agamy1)	70			<i>An. gambiae</i>	ZHANG <i>et al.</i> , 2013a			
α -Gli (Agm3)	66							
ALP (AgALP1)	65				HUA <i>et al.</i> , 2009			
APN (AgAPN2)	106				ZHANG <i>et al.</i> , 2013b			
CAD (AgCad2)	208				HUA <i>et al.</i> , 2013			
	APN (APN _{anq} 100)	100	<i>An. quadrimaculatus</i>	ABDULLAH; VALAITIS; DEAN, 2006				

Fonte: A autora.

Legenda: ¹ α -glicosidase. ²Aminopeptidase. ³Caderina. ⁴Fosfatase alcalina. ⁵ α -amilase. kDa = kilodaltons.

2.9 Resistência de mosquitos a toxinas inseticidas bacterianas

Larvicidas à base de bactérias entomopatógenas têm sido amplamente utilizados em campo para o controle de insetos vetores. No Brasil, por exemplo, produtos à base de Lsp têm sido utilizados na RMR para o controle de *C. quinquefasciatus* (SANTOS *et al.*, 2018), onde atua como vetor da *W. bancrofti*, causador da filariose linfática. Além da cidade do Recife, o Lsp também tem sido utilizado para o controle de *C. quinquefasciatus* no Rio Pinheiros em São Paulo (SILVA-FILHA *et al.*, 2008) e no controle de anofelinos na região Norte (FERREIRA *et al.*, 2015; GALARDO; ZIMMERMAN; GALARDO, 2013). Larvicidas biológicos à base de Bti são amplamente utilizados para o controle de simúlideos no Rio Grande do Sul desde 1982 (MARDINI *et al.*, 2000; RUAS-NETO *et al.*, 1985) e também tem sido adotado em vários municípios para o controle de *Ae. aegypti*, a exemplo do programa de controle na cidade do Recife (ARAÚJO *et al.*, 2013).

Como consequência da utilização em larga escala de larvicidas à base de Lsp em campo, estudos apontaram a ocorrência de resistência em populações de espécies do complexo *Culex pipiens* que são o principal alvo deste agente de controle (MULLA *et al.*, 2003; NIELSEN-LEROUX *et al.*, 2002; SILVA-FILHA *et al.*, 1995). A partir destes achados, colônias também foram selecionadas artificialmente com o Lsp em laboratório e foram alcançados elevados níveis de resistência à toxina Bin (razão de resistência ~10.000). A análise de colônias e/ou populações das espécies *C. quinquefasciatus* e *C. pipiens* resistentes à toxina Bin apontou que o principal mecanismo é a ausência de seus receptores Cqm1 e Cpm1, respectivamente, no epitélio intestinal das larvas (NIELSEN-LEROUX *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2004; SILVA-FILHA *et al.*, 2004). O modo de ação do Lsp, baseado em uma única toxina (Bin) que interage com uma única classe de receptores (α -glicosidases), favorece o surgimento de resistência, sobretudo, devido à alteração ou ausência do sítio-alvo/receptor (FERREIRA; SILVA-FILHA, 2013). A resistência pode ser causada por falha de ligação à toxina Bin que é provocada por mutações no gene que codifica o receptor. Até o momento, foram descritos oito alelos do gene *cpm1* ou *cqm1* que estão associados à resistência ao Lsp (DARBOUX *et al.*, 2002, 2007; CHALEGRE *et al.*, 2012, 2015; GUO *et al.*, 2013; ROMÃO *et al.*, 2006).

Na colônia de *C. pipiens* denominada GEO, a primeira caracterizada molecularmente, foi identificado o alelo *cpm1*_{GEO}, que possui uma mutação “nonsense” na posição T1706A. Este gera um códon de parada da tradução prematuro e codifica a produção de uma proteína truncada com 568 aminoácidos, portanto desprovida de âncora GPI que é necessária para

manter a proteína ligada ao epitélio (DARBOUX *et al.*, 2002). Em uma população de campo resistente na França (BP), foram identificados os alelos de resistência à toxina Bin *cpm1_{BP}* e *cpm1_{BP}-del*. No alelo *cpm1_{BP}* ocorre uma mutação “nonsense” Gln396Stop, que também codifica uma proteína truncada sem âncora GPI. Enquanto que no alelo *cpm1_{BP}-del* ocorre a inserção de um elemento transponível no éxon 2, gerando uma deleção de 198 nt, produzindo uma proteína de 514 aminoácidos que possui âncora GPI, entretanto a perda de 66 aminoácidos impossibilita a sua interação com a toxina Bin (DARBOUX *et al.*, 2007). Em uma colônia da China (CqRL/C3-41), foi identificado o alelo *cqm1_R*, que apresenta uma deleção na posição C445, que leva à formação de um códon de parada da tradução prematuro mais à frente, codificando para uma proteína de 194 aminoácidos também desprovida de âncora GPI (GUO *et al.*, 2013).

Em populações/colônias de *C. quinquefasciatus* da cidade do Recife, quatro alelos do gene *cqm1* que conferem resistência foram identificados. Dois deles, *cqm1_{REC}* e *cqm1_{REC-2}*, foram identificados em uma colônia selecionada em nosso laboratório com o Lsp (cepa 2362), denominada R2362. O alelo *cqm1_{REC}* apresenta uma deleção de 19 nt na posição 1334-1352, causando uma mudança do quadro de leitura que gera um códon de parada da tradução prematuro na posição 443. A proteína expressa é truncada, apresenta 442 aminoácidos e não possui âncora GPI (ROMÃO *et al.*, 2006). O alelo *cqm1_{REC-2}* apresenta uma transição (G1292A) que gera um códon de terminação da tradução prematuro, na posição 431 e, a exemplo do alelo *cqm1_{REC}*, codifica uma proteína truncada com 430 aminoácidos (CHALEGRE *et al.*, 2015). Estes alelos também foram detectados em campo no Recife, em populações tratadas e não tratadas, com frequência média da ordem de 10^{-3} (*cqm1_{REC}*) e 10^{-4} (*cqm1_{REC-2}*) (CHALEGRE *et al.*, 2009; CHALEGRE *et al.*, 2012; MENEZES *et al.*, 2016). Dois outros alelos, denominados *cqm1_{D-16}* e *cqm1_{D-25}*, foram detectados diretamente a partir de larvas coletadas em populações de campo na cidade do Recife. Os alelos *cqm1_{D-16}* e *cqm1_{D-25}* apresentam, respectivamente, deleções de 16 (1306-1321) e 25 (1276-1300) nt, e ambas levam a um códon de parada de tradução prematuro e as proteínas expressas não apresentam âncora GPI (CHALEGRE *et al.*, 2012). Com exceção do alelo *cpm1_{BP}-del*, os demais alelos de resistência do gene *cqm1* provocam a ausência de receptor presente no epitélio intestinal disponível para ligação à toxina Bin.

Com relação ao Bti, a situação é distinta pois, até o momento, não foi detectada resistência de culicídeos ao cristal contendo as suas toxinas, tanto em populações tratadas em campo quanto em laboratório após tentativas de seleção artificial. O cristal do Bti apresenta um baixo potencial de resistência devido ao seu modo de ação complexo que compreende

quatro toxinas que agem em sinergia com vários receptores (CARVALHO, *et al.*, 2018; CRICKMORE *et al.*, 1995; DESPRÉS; CHRISTOPHE; ROGER, 2011). Mesmo após o seu uso em diversos programas de controle de vetores, não há relatos em campo de resistência ao Bti, inclusive após uso prolongado na Alemanha, Suíça, França e Brasil (ARAÚJO *et al.*, 2013; BECKER; LUDWIG; SU, 2018; GUIDI *et al.*, 2011). O papel da toxina Cyt1Aa que pode atuar como receptor de toxinas Cry é um fator preponderante para desfavorecer o surgimento e seleção de resistência, como será detalhado na seção seguinte.

Os únicos trabalhos que registram a resistência associada ao Bti, referem-se, de fato, à resistência a toxinas individuais. Nestes casos, os insetos são expostos continuamente a uma única toxina do Bti, podendo exibir níveis de resistência a estas toxinas. Em alguns casos, também foram observadas alterações na expressão de receptores de toxinas Cry tais como APNs, ALPs e CADs. Um estudo, por exemplo, mostrou que a resistência de uma colônia de *Ae. aegypti* selecionada com a toxina Cry11Aa, também apresentou redução na expressão gênica de ALPs e redução de atividade e de quantidade de APNs (LEE; AIMANOVA; GILL, 2014). Em outro estudo, foi feito um monitoramento de resistência a toxinas individuais em populações de campo de *Aedes rusticus*, *Aedes sticticus* e *Ae. vexans* da França. Neste trabalho não foi observada resistência ao Bti, entretanto foi observada uma alta tolerância em uma população de *Ae. sticticus* a Cry4Aa e Cry11Aa. O conjunto de estudos já publicado confirma a ausência de resistência ao cristal do Bti em campo mesmo depois de décadas de tratamento com este larvicida biológico (TETREAU *et al.*, 2013).

O único trabalho na literatura que suscita a resistência ao Bti em larvas de populações de *C. pipiens* do estado de Nova Iorque (EUA) não fornece comprovação sólida (PAUL *et al.*, 2005). A significância dos dados deste estudo é limitada devido à falta de informações cruciais como a suscetibilidade da população antes dos tratamentos com o Bti para comprovar a associação do tratamento com a redução da suscetibilidade.

2.10 Sinergia entre toxinas inseticidas

As interações entre diferentes agentes ou toxinas podem apresentar um efeito de sinergismo, aditivo ou antagonismo. O efeito aditivo se refere à simples adição do efeito de dois agentes, enquanto no sinergismo ocorre efeito cumulativo maior do que o aditivo. Já no antagonismo o efeito cumulativo é menor em relação ao aditivo (FOLT *et al.*, 1999; HAY, 1996; HAY; KAPPEL; FENICAL, 1994).

2.10.1 Sinergia entre toxinas Cry e Cyt de Bti

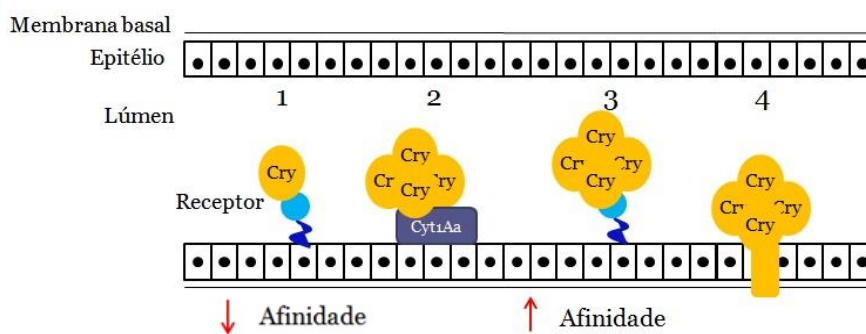
A existência da sinergia entre as toxinas do cristal do Bti para atingir uma alta atividade larvicida já era uma característica conhecida, a partir de estudos que determinaram a atividade individual e conjunta dos componentes do cristal (CRICKMORE *et al.*, 1995). Entretanto, apenas recentemente foi desvendado o papel essencial desempenhado pela toxina Cyt1Aa neste mecanismo, visto que ela atua como um receptor de toxinas Cry, sendo esta uma característica determinante para desfavorecer a seleção de resistência ao Bti (SOBERÓN; LÓPEZ-DÍAZ; BRAVO, 2013; WIRTH; GEORGHIOU; FEDERICI, 1997). O primeiro trabalho que demonstra a base molecular da sinergia foi realizado com as toxinas Cyt1Aa e Cry11Aa (PÉREZ *et al.*, 2005). Este estudo demonstrou que a Cyt1Aa interage diretamente com a membrana em células do intestino de *Ae. aegypti* e funciona como um receptor primário da Cry11Aa, ligando-se a ela através de regiões e aminoácidos específicos: S259 e E266 da Cry11Aa e os aminoácidos K198, E204 e K225 da Cyt1Aa. Assim, após a inserção da toxina Cyt1Aa na membrana, ela liga-se à Cry11Aa de forma específica e induz a formação de oligômeros da Cry11Aa, devido à clivagem da α -hélice 1 do seu domínio I. Estes oligômeros interagem com maior afinidade aos receptores do epitélio das larvas, tais como APNs, ALPs e outros (PÉREZ *et al.*, 2005, 2007).

Ainda com relação à sinergia entre Cyt1Aa e Cry11Aa, já foi demonstrado que a oligomerização da toxina Cyt1Aa é essencial para sua inserção na membrana e toxicidade para a larva, entretanto não é necessária para a sinergia com a Cry11Aa em larvas de *Ae. aegypti*, visto que mutantes afetadas neste aspecto ainda foram capazes de provocar toxicidade para larvas em conjunto com a toxina Cry11Aa. Neste estudo, foram produzidas as mutantes Cyt1AaV122E e Cyt1AaV126E afetadas na oligomerização e inserção na membrana, conseqüentemente estas proteínas mutantes não apresentaram toxicidade para larvas de *Ae. aegypti* (LÓPEZ-DÍAZ *et al.*, 2013). Estes dados mostram que, considerando o modelo de ligação sequencial descrito na seção 2.8, a toxina Cyt1Aa pode funcionar como uma caderina, ou seja, o primeiro receptor da interação que promove a formação de oligômeros e respectiva ligação de alta afinidade das toxinas Cry com o segundo receptor tais como APNs e ALPs.

A toxina Cyt1Aa também atua sinergicamente com a toxina Cry4Ba em larvas de *Ae. aegypti*, aumentando a sua oligomerização, e as mesmas regiões envolvidas na interação com a toxina Cry11Aa estão envolvidas na interação com a toxina Cry4Ba (CANTÓN *et al.*, 2011; ELLEUCH *et al.*, 2015). Neste modelo de sinergia da toxina Cyt1Aa com as toxinas Cry11Aa

e Cry4Ba, foi demonstrado que a Cyt1Aa liga-se às toxinas Cry através de regiões específicas, promovendo a mudança conformacional de toxinas Cry monoméricas para oligômeros, e estes por sua vez ligam-se com alta afinidade com os receptores do epitélio intestinal (Figura 11). Um outro estudo das toxinas Cyt1Aa e Cry2Aa, que são naturalmente tóxicas para lepidópteros, em combinação podem passar a exibir toxicidade para larvas de *C. quinquefasciatus* (BIDESHI *et al.*, 2013). Há outros relatos de sinergismo da toxina Cyt1Aa com outras toxinas mas estes foram avaliados apenas a nível da ação larvicida para os insetos. A sinergia das toxinas Cyt1Aa, Cry4Aa, Cry4Ba e Cry11Aa já foi observada em larvas de *Simulium* spp. (MONNERAT *et al.*, 2014), e das toxinas Cyt1Aa e Cry10Aa para larvas de *Ae. aegypti* (HERNÁNDEZ-SOTO *et al.*, 2009).

Figura 11 – Desenho esquemático da sinergia entre toxinas Cry e Cyt.



Fonte: A autora.

Legenda: Modelo de sinergia entre as toxinas Cry e Cyt. 1 = Ligação da toxina Cry ao receptor presente no epitélio intestinal com baixa afinidade. 2 = Ligação da toxina Cry à toxina Cyt que atua como receptor de Cry na membrana e promove sua oligomerização. 3 = Oligômero de toxina Cry liga-se ao receptor-GPI presente no epitélio intestinal com alta afinidade. 4 = Formação do poro e inserção na membrana do oligômero de toxina Cry.

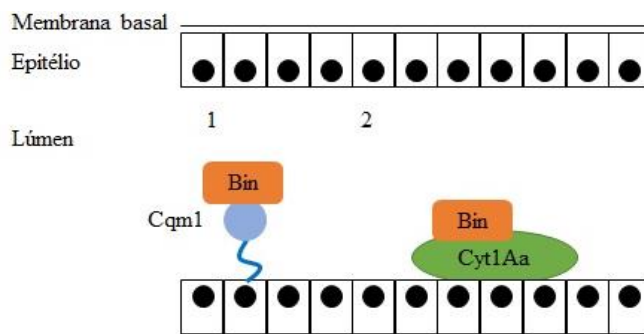
2.10.2 Sinergia entre as toxinas de Lsp e Bti

Foi descoberto que a toxina Cyt1Aa, além de sinergizar com toxinas do próprio Bti e de outras sorovariedades de Bt, pode sinergizar a toxina Bin do Lsp, apesar de a Cyt1Aa e a Bin serem toxinas não relacionadas. Estes estudos foram desenvolvidos a partir da ausência de detecção de resistência cruzada de toxinas do Bti para larvas resistentes à toxina Bin, visto que já foi demonstrado que larvas de *C. quinquefasciatus* altamente resistentes à toxina Bin são suscetíveis ao Bti (NIELSEN-LEROUX *et al.*, 1995; PEI *et al.*, 2002; YUAN *et al.*, 2003). A partir destes achados, foi possível estabelecer que a associação de cristais de Lsp e Bti é uma estratégia excelente para evitar a seleção de resistência. Isto ocorre devido ao fato

do cristal do Bti apresentar toxinas distintas e com alvos diferentes da toxina Bin, conforme apresentado no item 2.8.

O primeiro trabalho que investigou a sinergia entre estas toxinas mostrou que a inserção da Cyt1Ab produzida pelo *Bacillus thuringiensis* sorovar. *medellin* em Lsp restaurou parcialmente a suscetibilidade de *C. quinquefasciatus* resistente ao Lsp (THIÉRY *et al.*, 1998). Em outro trabalho, a toxina Bin do Lsp, em associação com as toxinas Cyt1Ab e Cyt2Ba1 de Bti, apresentou toxicidade para larvas de *Ae. aegypti*, naturalmente refratárias à Bin, e para larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes a esta toxina (WIRTH; DELÉCLUSE; WALTON, 2001). A sinergia da toxina Bin de Lsp com a toxina Cyt1Aa de Bti também foi avaliada, pois estas misturas foram tóxicas tanto para *Ae. aegypti* quanto para *C. quinquefasciatus* resistente ao Lsp (WIRTH *et al.*, 2004; WIRTH; FEDERICI; WALTON, 2000; WIRTH; WALTON; FEDERICI, 2000). Além destes estudos, já foi observado também que uma linhagem de bactéria recombinante expressando os cristais de Lsp e Bti apresenta atividade tóxica para larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes ao Lsp (PARK *et al.*, 2005). Estes trabalhos demonstram que estas combinações podem apresentar uma maior complexidade no seu modo de ação, ampliando o espectro da atividade larvicida e potencialmente desfavorecendo a evolução de resistência ao Lsp.

É importante ressaltar que todos estes trabalhos demonstram que a sinergia de Lsp e Cyt ocorre através dos ensaios de atividade das misturas *in vivo*, entretanto, o mecanismo molecular desta interação ainda não foi investigado. A hipótese inicial é que a Cyt1Aa aumenta a toxicidade da Bin através de auxílio na interação com a membrana epitelial, funcionando como receptor, a exemplo do que ocorre quando a Cyt1Aa sinergiza as toxinas Cry (Figura 12) (WIRTH; FEDERICI; WALTON, 2000). Um estudo prévio demonstrou que em larvas resistentes à Bin alimentadas com uma mistura de toxinas Bin e Cyt1Aa, a toxina Bin pode ser detectada no citoplasma de células do epitélio intestinal, sugerindo que a Cyt1Aa possibilita a sua internalização (FEDERICI *et al.*, 2003).

Figura 12 – Desenho esquemático hipotético da interação entre as toxinas Bin e Cyt1Aa.

Fonte: A autora.

Legenda: Modelo hipotético de sinergia entre as toxinas Bin e Cyt1Aa. 1 = Interação entre a toxina Bin e o seu receptor (proteína Cqm1) presente no epitélio intestinal. 2 = Toxina Cyt atuando como receptor da toxina Bin em epitélio desprovido da Cqm1, permitindo a ação tóxica da Bin.

A existência de sinergia entre as toxinas de Lsp e Bti é um achado de grande relevância, pois pode superar duas limitações relacionadas à toxina Bin: a resistência de *C. quinquefasciatus* e a limitação do espectro inseticida para algumas importantes espécies de mosquito como *Ae. aegypti*. Com base nestes achados, foram desenvolvidos larvicidas biológicos combinados, que contêm cristais de Lsp e Bti. O uso associado destes princípios ativos para o controle de larvas de mosquitos de diferentes gêneros e em diferentes ambientes, tais como áreas urbanas e silvestres, tem apresentado resultados promissores (AFRANE *et al.*, 2016; CETIN *et al.*, 2015; DRITZ *et al.*, 2011; FONTOURA *et al.*, 2019; IBAÑEZ-JUSTICIA *et al.*, 2018; KAHINDI *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018).

Larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes e de *Ae. aegypti* não possuem receptores para a toxina Bin, e a ação da toxina Bin na presença da Cyt1Aa aponta a sinergia entre as toxinas que ainda não foi elucidada, apesar do uso destas toxinas em combinação já ser uma prática recomendada. Na cidade do Recife, a experiência piloto do uso do Vectomax® comprovou a sua eficácia no controle da densidade populacional de *Culex* e *Aedes* (SANTOS *et al.*, 2018), além de ser detectada uma menor frequência dos alelos de resistência à toxina Bin em *C. quinquefasciatus* (SANTOS *et al.*, 2019). Por outro lado, são necessários mais estudos relativos ao uso destas misturas de toxinas pois, apesar de suas vantagens, podem ocorrer consequências inesperadas como evolução de resistência. Com relação a estudos com *C. quinquefasciatus*, foi observado que a sinergia de Lsp com Bti é benéfica para reduzir a taxa e a magnitude da evolução da resistência, entretanto pode ocorrer uma tolerância das larvas às toxinas (WIRTH *et al.*, 2005; WIRTH; WALTON; FEDERICI, 2015). Em outro estudo com *Plutella xylostella*, lepidóptero de grande importância na agricultura, uma linhagem resistente à toxina Cry1 de *Bacillus thuringiensis* (Bt) não teve redução significativa

na evolução da resistência, após o uso de misturas de toxinas de Bt (RAYMOND *et al.*, 2013). Portanto, aspectos básicos do efeito de misturas de toxinas inseticidas devem ser analisados.

3 JUSTIFICATIVA

A filariose linfática e arboviroses, que têm seus agentes etiológicos transmitidos por *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, respectivamente, são agravos de grande importância na cidade do Recife. Larvicidas à base de *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) têm sido utilizados no controle de *C. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*, respectivamente, nos dois programas de controle de insetos vetores desenvolvidos pela Secretaria de Saúde do Recife. Estudos prévios apontam que o uso associado das toxinas do Lsp e do Bti pode trazer vantagens, superando as principais limitações de cada composto usado individualmente, embora o mecanismo de ação sinérgica ainda não seja compreendido. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a sinergia entre as duas principais toxinas destas bactérias e elucidar o seu modo de ação molecular, gerando conhecimentos para subsidiar o uso racional da estratégia de misturas de toxinas inseticidas para o controle de culicídeos.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Qual o modo de ação molecular das toxinas Bin de *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) isoladas e em associação em larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*?

5 HIPÓTESE

As toxinas Bin de *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) atuam de forma sinérgica, através de interação direta entre elas, onde a Cyt1Aa atua como receptor para a Bin, sendo eficaz contra insetos resistentes (*Culex quinquefasciatus*) ou refratários (*Aedes aegypti*) desprovidos de receptores para a toxina Bin.

6 OBJETIVO GERAL

Avaliar o mecanismo de sinergia de misturas de toxinas Bin (*Lysinibacillus sphaericus* - Lsp) e Cyt1Aa (*Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* - Bti) em larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*.

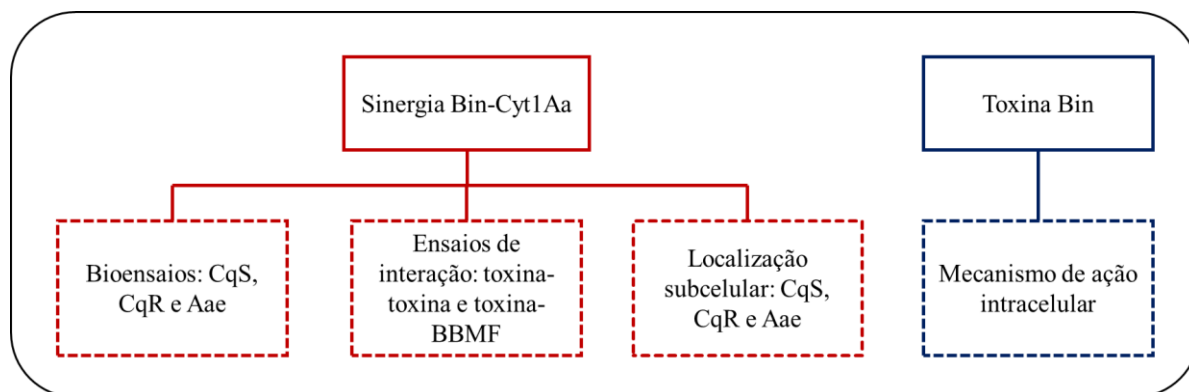
6.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar a ação *in vivo* de um produto combinado de cristais de Bti e Lsp, e de misturas de toxinas Bin e Cyt1Aa (selvagem e mutante), para larvas de *C. quinquefasciatus* suscetíveis (CqS) e resistentes à toxina Bin (CqR) e de *Ae. aegypti* (Aae);
- b) Investigar a ocorrência de ligação *in vitro* entre a toxina Bin, ou suas subunidades, com a toxina Cyt1Aa;
- c) Investigar a ocorrência de ligação *in vitro* da toxina Bin, Cyt1Aa e misturas destas toxinas com o *microvilli* intestinal de larvas de *C. quinquefasciatus* (CqS, CqR) e *Ae. aegypti* (Aae);
- d) Avaliar a localização subcelular da toxina Bin e suas subunidades em larvas de *C. quinquefasciatus* (CqS e CqR) e de *Ae. aegypti* (Aae), na presença de toxinas Cyt1Aa, selvagem e mutante;
- e) Investigar as organelas alvo da toxina Bin e a ativação da via de apoptose.

7 MATERIAL E MÉTODOS

A figura 13 apresenta uma sinopse das abordagens realizadas neste trabalho para avaliação da sinergia entre as toxinas Bin e Cyt1Aa e toxicidade da Bin.

Figura 13 – Etapas dos procedimentos metodológicos.



Fonte: A autora.

Legenda: CqS = *Culex quinquefasciatus* suscetível ao Lsp. CqR = *C. quinquefasciatus* resistente ao Lsp. Aae = *Aedes aegypti* refratário natural ao Lsp. BBMf = *Brush Border Membrane Fractions* – Frações da membrana do intestino.

7.1 Colônias de culicídeos

Neste trabalho, foram utilizadas três colônias de insetos, sendo duas de *Culex quinquefasciatus* e uma de *Aedes aegypti*, abaixo descritas, e mantidas no insetário sob as seguintes condições: temperatura de 26 ± 1 °C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo 12:12 h (dia/noite). As larvas foram mantidas em água potável e alimentadas com ração para gatos (Whiskas®). Os adultos foram alimentados com solução de sacarose a 10% e as fêmeas fizeram o repasto sanguíneo a partir de alimentação artificial com sangue desfibrinado de coelho, uma vez por semana. As colônias utilizadas neste trabalho foram:

- **CqS.** Colônia de *C. quinquefasciatus* suscetível ao larvicida biológico à base de *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp), estabelecida a partir de ovos coletados em criadouros localizados na Região Metropolitana do Recife (RMR), mantida há mais de 10 anos no insetário do IAM (CHALEGRE *et al.*, 2015).
- **CqR.** Colônia de *C. quinquefasciatus* selecionada em laboratório com o larvicida biológico à base de Lsp (cepa 2362) e que exibe um alto nível de resistência à toxina

Bin. A colônia é composta por indivíduos homozigotos para o alelo de resistência *cqm1_{REC}* e vem sendo mantida há mais de 10 anos no insetário do IAM (CHALEGRE *et al.*, 2015). Os indivíduos desta colônia não expressam o receptor da toxina Bin, a alfa-glicosidase Cqm1, na membrana no epitélio intestinal e este mecanismo confere a alta resistência à toxina Bin (CHALEGRE *et al.*, 2015).

- **Aae.** Colônia de *Aedes aegypti*, que é naturalmente refratária ao Lsp (FERREIRA; SILVA-FILHA, 2013; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992), estabelecida a partir de ovos coletados na Região Metropolitana do Recife (RMR), e mantida há mais de 15 anos no insetário do IAM (MELO-SANTOS *et al.*, 2009).

7.2 Preparação de amostras de BBMF

Para avaliar a interação das toxinas Bin e Cyt1Aa com o epitélio intestinal foram obtidas frações de membranas apicais de células do intestino (BBMF, *Brush Border Membrane Fractions*) de larvas de 4º estágio das colônias estudadas (SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997). As amostras de larvas (3-5 g) utilizadas para obtenção desta preparação foram previamente congeladas a – 80° C. O protocolo para obtenção de BBMF consiste na precipitação seletiva usando cátions divalentes e centrifugações diferenciais em tampão MET (300 mM Manitol, 5 mM EGTA, 20 mM Tris, pH 7.3). Após a obtenção das amostras de BBMF, foi feita a quantificação de proteínas (BRADFORD, 1976) e avaliação do enriquecimento de membranas apicais do epitélio intestinal na BBMF, a partir da comparação da atividade específica de alfa-glicosidase (E.C 3.2.1.20) nesta amostra com a respectiva atividade da amostra inicial da preparação, correspondente ao extrato total de larvas utilizado. Esta enzima é um marcador de membrana do epitélio intestinal de larvas destas espécies. A reação foi feita em tampão citrato-fosfato de sódio (100 mM, pH 7.5) contendo 2 mM do substrato sintético p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (pN α G, Sigma-Aldrich #N1377) durante 1h a 37° C. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 405 nm. Uma atividade de alfa-glicosidase na amostra de BBMF entre 3 e 6 vezes maior do que a amostra inicial é considerada adequada para comprovar que a amostra final está enriquecida em *microvilli* intestinal (FERREIRA *et al.*, 2010).

7.3 Produção de proteínas

Neste tópico, estão descritas as etapas para a produção de proteínas recombinantes em *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) ou *Escherichia coli*.

7.3.1 Toxinas Bin, Cyt1Aa, Cyt1AaV122E, Cry11Aa e Cry1Ab

As toxinas recombinantes usadas neste estudo foram produzidas a partir de uma cepa acristalífera de Bti (cepa 4Q7) transformadas com as construções plasmidiais contendo os genes codificantes das toxinas Bin (pGSP10), Cyt1Aa e Cyt1AaV122E (pWF45), Cry11Aa (pHT606) e Cry1Ab (pHT315) (PÉREZ *et al.*, 2005; ROMÃO *et al.*, 2006). Cada linhagem, transformada com um dos respectivos plasmídeos, foi utilizada para a produção de biomassa bacteriana contendo esporos e cristais contendo as respectivas protoxinas. Papelotes impregnados com biomassa bacteriana foram inoculados em 10 mL de meio HCT específico para esporulação de Bt, adaptado de um protocolo previamente descrito (LECADET; BLONDEL; RIBIER, 1980). O meio HCT é composto por: bacto peptona 0,75%; 100 mL de solução I (KH_2PO_4 0,5 M); 10 mL de solução II ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mM, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 mM, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,6 mM); 10 mL de solução III ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 4,7 mM, H_2SO_4 56 mM); 10 mL de solução IV (CaCl_2 0,1M) para um volume final de 1 L de meio de cultura. O pH foi ajustado para 7,4 com solução de NaOH 0,5 M. Antes da inoculação, o meio foi suplementado com glicose (concentração final 0,1%) e com antibióticos de acordo com a marca de resistência de cada plasmídeo nas concentrações finais conforme descrito a seguir: 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina para pGSP10; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de eritromicina para pHT606; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de eritromicina para pWF45 e pHT315. A cultura foi submetida a um choque térmico (75° C por 8 min, resfriamento em gelo ~2° C por 5 min) e, em seguida, foi incubada a 30° C por 72 h com agitação (200 rpm) até a esporulação e liberação de esporos e cristais, monitorada por inspeção ao microscópio óptico. A biomassa esporulada foi utilizada como pré-inóculo para cultivos de 100 mL de meio em Erlemeyer (1L). Os procedimentos de suplementação do meio de cultura, choque térmico e incubação foram repetidos para obtenção da cultura esporulada.

A cultura final esporulada da linhagem produtora da toxina Bin foi centrifugado (10.000 g, 25 min, 4° C) e lavado duas vezes, sendo a primeira lavagem com NaCl 1M/EDTA 10 mM pH 8 e a segunda com EDTA 10 mM pH 8. Em seguida, a biomassa bacteriana foi ressuspensa em EDTA (10 mM, pH 8) e armazenada em alíquotas a -80° C. Os cultivos para Cyt1Aa, Cyt1AaV122E, Cry11Aa e Cry1Ab foram submetidos a três lavagens com água

destilada com pH ajustado para 4 usando HCl 5 M, seis lavagens com NaCl 300 mM/EDTA 10 mM pH 8 e três lavagens com água contendo o inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF, concentração final 1 mM). Entre cada lavagem a amostra foi centrifugada (13.000 g, 10 min, 10° C). Por fim, a biomassa foi ressuspensa com solução aquosa de PMSF (concentração final 1 mM) e armazenada a 4° C. Os cristais das biomassa de Cyt1Aa e Cyt1AaV122E também foram purificados de acordo com o protocolo de gradiente de sacarose, para posterior marcação com fluoróforo Alexa e visualização em microscopia confocal (THOMAS; ELLAR, 1983), como descrito no item 7.7.

Para obtenção de toxinas ativadas, as biomassa contendo os cristais foram processadas através de etapas de solubilização e ativação *in vitro*. A solubilização (1h, 30° C) foi feita com NaOH 50 mM (para Bin ou Cry11Aa) ou com Na₂CO₃ 50 mM pH 10,5 contendo β-mercaptoetanol 0.02% (para Cyt1Aa, Cyt1AaV122E ou Cry1Ab) sob agitação (200 rpm). Em seguida, as protoxinas solubilizadas presentes no sobrenadante foram recuperadas após centrifugação (12,857 g, 10 min, 4° C) e o pH foi ajustado para ~8.5 através da adição de 1:4 (v/v) de uma solução de Tris-HCl 1 M pH 8. A ativação das protoxinas foi feita usando tripsina na proporção 1:50 (Cyt1Aa, Cyt1AaV122E, Cry11Aa e Cry1Ab) ou 1:100 (Bin). A ativação foi feita através da incubação por 1h a 30° C e, após este período, foi adicionado PMSF (concentração final 1 mM) para interromper o processo. A amostra contendo as toxinas ativadas foi centrifugada e dialisada *overnight* com incubação em tampão fosfato de sódio NaPi 20 mM (Na₂HPO₄ 20 mM, ajustado para pH 8 com NaH₂PO₄ 20 mM). A quantificação de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford e armazenadas a 4° C. Em seguida, as amostras foram separadas eletroforicamente em SDS-PAGE 10% para confirmar a integridade das toxinas e eficiência da ativação.

7.3.2 Subunidades BinA e BinB

Para realizar os experimentos com as subunidades individuais da toxina Bin, BinA e BinB, estas foram clonadas e expressas em uma linhagem transformada de *E. coli*. As sequências codificantes destas proteínas foram amplificadas por PCR usando *primers* específicos para a BinA (*forward* 5'- GGATCCATGAGAAATTTGGATTTTATTGATTC-3', *reverse* 5'- CTCGAGGTTTTGATCATCTGTAATAATCTTTGT-3') e para BinB (ROMÃO; DE-MELO-NETO; SILVA-FILHA, 2011). Os *primers* para BinA contêm sítios de restrição (sublinhados) para as endonucleases *Bam*HI e *Xho*I. Os fragmentos amplificados dos genes foram submetidos à purificação com o kit GFX DNA and Gel Band Purification® (GE

Healthcare) e, em seguida, os fragmentos foram inseridos no vetor plasmidial pGEM®-T Easy (Promega), segundo as instruções do fabricante. Para a obtenção dos clones, os plasmídeos recombinantes foram transformados em células de *E. coli* TOP10 quimiocompetentes através de choque térmico. A partir das células transformadas, foram obtidas preparações de DNA plasmidial usando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) para obtenção dos clones de interesse. O DNA plasmidial obtido foi digerido com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Xho*I a 37° C e os fragmentos liberados foram purificados e, em seguida, subclonados no vetor plasmidial pET21a (Novagen). Células de *E. coli*, cepa BL21 quimiocompetentes, foram transformadas com o vetor pET21a posteriormente para expressão proteica. Antes de realizar a expressão proteica, foi feita a confirmação da identidade dos genes *binA* e *binB* contidos no plasmídeo pET21a através do sequenciamento automático no ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do IAM-FIOCRUZ.

Para realizar a expressão proteica, as células transformadas foram inoculadas em meio de cultivo Luria-Bertani (LB) e a expressão recombinante de proteína foi induzida com 0,1 mM de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) por 4h a 30° C. Após a indução, as células foram centrifugadas (9600 g, 10 min, 4° C), ressuspensas em tampão de lise e equilíbrio (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, imidazol 20 mM, pH 8) e lisadas através de sonicação no processador ultrassônico SONICS Vibra-Cell™ VC 505–VC 750 (6 pulsos de 30 seg, amplitude de 40%, potência de 750 W, no gelo). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (3300 g, 10 min, 4° C) e as proteínas do sobrenadante foram purificadas usando a resina de níquel Ni-NTA® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, para a purificação, a amostra de sobrenadante obtida após a sonicação foi incubada com a resina de níquel por 1h a 4° C. Em seguida, a resina contendo a proteína foi recuperada através de centrifugação (3300 g, 10 min, 4° C) e lavada duas vezes por 5 min com 1 mL do tampão de lavagem (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, imidazol 30 mM, pH 6), sendo cada lavagem intercalada de uma centrifugação (20000 g, 30 seg, 4° C). As proteínas foram eluídas da resina com 500 μ l do tampão de eluição (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, imidazol 1 M, pH 4.5) por 30 min a 4° C e dialisadas como descrito anteriormente (7.3.1) em tampão fosfato de sódio (NaPi 20 mM, pH 8). As amostras de proteínas purificadas obtidas nesta etapa também tiveram sua integridade verificada e a concentração proteica dosada como descrito acima. As amostras foram armazenadas a – 80° C até o uso.

7.4 Bioensaios

Como etapa inicial deste estudo, foi feita a avaliação da atividade larvicida de um produto comercial (Vectomax[®], Valent Biosciences) que é um combinado à base de cristais do Lsp e do Bti, em larvas das três colônias estudadas neste trabalho (CqS, CqR e Aae, item 7.1), através de bioensaios de dose-resposta. Na ausência de um pó-técnico contendo apenas o princípio ativo do produto, foi necessário preparar uma suspensão-mãe a 70 g/L do Vectomax[®], que equivale a uma suspensão de 5 g/L de princípio ativo (concentração padrão para uso em bioensaios), visto que o pó granulado do produto contém um total de 7,2% de princípio ativo (2,7% de Lsp e 4,5% de Bti). A suspensão-mãe foi homogeneizada por 3 min em vortex e incubada por 72h a TA sob agitação pois a formulação do produto é de liberação lenta (“*water dispersible granules*” – grânulos dispersíveis em água). Amostras desta solução-mãe foram usadas para obter as concentrações finais usadas para tratar as larvas nos bioensaios. Cada unidade experimental foi composta de 20 larvas em fase inicial do 4^o estágio (L₄ jovens) em um recipiente contendo 100 ml de água destilada em triplicata. Os grupos teste foram tratados com cinco a sete concentrações (0,005-0,5 mg/L), em triplicatas, além dos grupos controle não tratados.

Nos bioensaios para avaliar a toxicidade das toxinas Bin e Cyt1Aa (selvagem e mutante Cyt1AaV122E) individuais ou em misturas (3:1 Bin:Cyt), foram utilizadas diluições a partir de suspensões-mãe (5 g/L) de biomassas bacterianas obtidas previamente (item 7.3.1). Estes bioensaios foram realizados com unidades experimentais de 20 larvas em fase inicial do 3^o estágio (L₃ jovens) em 20 mL de água destilada, tratadas com concentrações em diferentes intervalos de acordo com as toxinas utilizadas (0,005-25 mg/L para Bin; 0,25-50 mg/L para Cyt1Aa selvagem ou mutante; 0,005-70 mg/L para misturas de Bin e Cyt1Aa selvagem ou mutante) obtidas a partir de diluições seriadas da suspensão-mãe das toxinas.

Os bioensaios da atividade larvicida das subunidades BinA e BinB foram feitos a partir de amostras de proteínas recombinantes purificadas (item 7.3.2) de forma individual, ou em mistura com amostras de biomassa bacteriana (esporos-cristais) das toxinas Cyt1Aa selvagem e mutante. Devido à disponibilidade reduzida de toxinas BinA e BinB recombinantes produzidas em *E. coli*, estes bioensaios foram adaptados para unidades experimentais de 5 larvas L₃ jovens em 2 mL de água destilada, usando placas de 24 poços. As larvas foram tratadas com diferentes concentrações de toxinas (2,5-80 mg/L).

Para os bioensaios realizados neste trabalho, a mortalidade larval foi verificada 48 horas após a exposição às toxinas. A morte larval foi definida pela ausência de mobilidade, ou

movilidade limitada, após estímulo físico no tegumento das larvas. Cada bioensaio foi repetido pelo menos duas vezes e a concentração letal para 50% (CL₅₀) das larvas foi estimada através da análise de Probit usando o software Polo Plus Probit and Logit Analysis versão 1.0 LeOra Software. O teste estatístico ANOVA (programa GraphPad Prism versão 7.04) foi usado para comparar os valores de percentual de mortalidade dos bioensaios.

7.5 Ensaios de interação *in vitro* entre Bin e Cyt1Aa

Neste tópico, estão descritos os ensaios de interação proteína-proteína realizados neste trabalho.

7.5.1 *Pull down*

Para avaliar a ocorrência de ligação entre as toxinas Bin e Cyt1Aa, foi realizado um ensaio de *pull down* adaptado de protocolo descrito previamente (ZHOU *et al.*, 2016). Para a realização deste ensaio, foram preparadas microesferas de sefarose (CNBr Activated Sepharose® 4B, GE Healthcare) com a toxina Bin adsorvida (esferas-Bin), de acordo com instruções do fabricante.

Para o uso das microesferas, estas foram inicialmente hidratadas (HCl 1 mM) e, em seguida, foram feitas cinco lavagens com tampão NaHCO₃ 0,2 M, pH 8,3, intercaladas de centrifugações (200 g, 30 seg, 4° C). As microesferas foram ressuspensas em um volume de 500 µl de tampão de lavagem e incubadas *overnight* a 4° C com toxina Bin ativada (3 mg), para adsorção da proteína. Posteriormente, foram realizadas cinco lavagens com tampão de lavagem e 1 lavagem com Tris-HCl 0,1 M pH 8. Em seguida, foi feito o bloqueio de grupos reativos com Tris-HCl 0,1 M pH 8 por 2h a TA. Após este bloqueio, foram feitos três ciclos de lavagens alternadas com solução de pH ácido (ácido acético/acetato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 4) e de pH alcalino (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 8), intercalados de centrifugações a 20.000 g, 10 min, 4° C. Em seguida, foram feitas duas lavagens com tampão PBS (Na₂HPO₄ 7,7 mM, K₂HPO₄ 1,1 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, pH 7,4), intercaladas de centrifugação (200 g, 30 seg, 4° C) e então as esferas foram armazenadas em 500 µl de PBS a 4° C. Além das esferas-Bin, também foram preparadas, de acordo com o mesmo protocolo descrito acima, esferas imobilizadas com as proteínas GST (1 mg, proteína recombinante produzida em *E. coli* gentilmente cedida por Tatiana Rezende, colaboradora do

departamento de Entomologia/IAM) e BSA (1 mg, Sigma-Aldrich A-3803) que foram utilizadas como controle negativo.

Para realização do ensaio de *pull down*, a toxina Cyt1Aa (100 µg) foi incubada com uma amostra de esferas-Bin, esferas-BSA ou esferas-GST (150 µl) por 2 h, a TA, com agitação leve. Após a incubação, foi realizada uma centrifugação (20.000 g, 10 min, 4° C) seguida de 10 lavagens em sequência, sendo cinco com PBS-NaCl 1M e cinco com PBS intercaladas de centrifugações (400 g, 30 seg, 4° C). Ao final, as amostras foram solubilizadas em uma amostra de 50 µl de tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970), incubadas (100° C, 5 min), submetidas à separação eletroforética em SDS-PAGE 10% e coradas com azul de Coomassie.

7.5.2 Ensaio de ELISA

O ensaio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* - Ensaio de imunoabsorção enzimática) foi realizado para avaliar a ocorrência de interação entre as toxinas Bin e Cyt1Aa por um método quantitativo. Neste ensaio, a placa de ELISA foi sensibilizada com a toxina Cyt1Aa (0.5 µg) em tampão carbonato (NaHCO₃ 0.05 M pH 9.6) e incubada *overnight* a 4° C. Em seguida, foi feito o bloqueio de reações inespecíficas com leite desnatado (2%) em PBS por 2h a 37° C. Após cada uma destas etapas, foram feitas cinco lavagens com PBS. Após o bloqueio, foi feita a incubação (1h, 37° C) com concentrações crescentes (0.25, 0.5, 1 e 2 µg/ml) das toxinas individuais Bin, BinA, BinB, Cry11Aa (controle positivo) e Cry1Ab (controle negativo) em um volume de reação de 100 µl/poço, para avaliar a interação com a toxina Cyt1Aa. Para detecção de ligação, os poços das placas foram incubados (1h, 37° C) com o respectivos anticorpos primários específicos em tampão PBS contendo Tween-20 a 0,1% (PBS-T) para cada toxina testada: anti-Bin/BinB (1:1.000), produzido em camundongo no IAM-FIOCRUZ (MELO, 2008); anti-BinA (1:20.000), produzido em coelho no Instituto Pasteur (Paris, França); anti-Cry11Aa (1:10.000) e anti-Cry1Ab (1:10.000), produzidos em coelho no Instituto de Biotecnologia da Universidade Nacional Autônoma do México (IBT-UNAM). Após esta etapa, foi feita a incubação com os respectivos anticorpos secundários conjugados à peroxidase em tampão PBS-T por 1h a 37° C como descrito a seguir: anti IgG de camundongo 1:10.000 para anti-Bin/BinB; anti IgG de coelho 1:20.000 para anti-BinA, anti-Cry11Aa e anti-Cry1Ab. Após cada uma destas etapas de incubação foram realizadas cinco lavagens da placa com tampão PBS-T. Ao final, foi feita a revelação com o substrato OPD (O-Fenilenodiamina C₆H₈N₂, 5 mg/mL) em tampão citrato-

fosfato (Na_2HPO_4 0,1 M, pH 5) acrescido de H_2O_2 (12 μl), em um volume final de 10 mL. Uma alíquota desta solução de revelação foi adicionada (100 μl) em cada poço e incubada (10 min, TA, protegido da luz). A reação foi interrompida com HCl 5 M (30 μl /poço) e a leitura da absorbância a 490 nm foi feita em espectrofotômetro de placas de ELISA. Os dados de interação específica foram comparados pelo teste estatístico ANOVA usando o programa GraphPad Prism versão 7.04.

7.6 Ensaio de interação *in vitro* entre as toxinas e BBMF

A capacidade de interação das toxinas individuais Bin ou Cyt1Aa e da combinação delas com o epitélio intestinal das larvas foi investigada através de ensaios de interação qualitativos *in vitro*. Para tal, amostras de BBMF (10 μg) de larvas das colônias avaliadas foram incubadas (*overnight*, TA) com a toxina ativada (0, 30, 100 nM), em tampão PBS Eisen (NaH_2PO_4 2.1 mM, Na_2HPO_4 14 mM, NaCl 150 mM pH 7.4) contendo BSA (0,1% final). Após o período de incubação, foram feitas duas lavagens com PBS Eisen intercaladas por centrifugação (20.000 g, 10 min, 4° C). Após as lavagens, as amostras foram solubilizadas em tampão de Laemmli (10 μl) (LAEMMLI, 1970), incubadas (100° C, 5 min), submetidas à separação eletroforética em SDS-PAGE 10%, transferidas para membrana de nitrocelulose e imunodetectadas. A imunodeteção da toxina Bin foi realizada pelo método de curta duração utilizando o sistema SnapId® (Millipore), segundo instruções do fabricante. Para a toxina Cyt1Aa, foi realizado o protocolo tradicional de imunodeteção.

No sistema SnapId®, com duração inferior à 1h, a membrana foi inicialmente hidratada com PBS e, em seguida, bloqueada com leite desnatado a 0,1% em tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%, pH 7,6) por cerca de 15 seg. Após esta etapa, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-Bin (1:500) por 20 min a TA, seguida de uma incubação com um anticorpo anti IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:5000, Jackson Immunochemicals) durante 10 min a TA. Após os procedimentos de bloqueio e incubação com os anticorpos, foram realizadas lavagens da membrana com o tampão TBS-T. Para a imunodeteção da toxina Cyt1Aa pelo método tradicional, com duração aproximada de 6 horas, a membrana foi bloqueada com leite 5% 2h TA, incubada com anticorpo primário anti-Cyt (1:30.000, produzido em coelho no IBT-UNAM) por 1h TA, seguida da incubação com o anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado à peroxidase (1:10.000, Jackson Immunochemicals), por 1h TA. Após os procedimentos de bloqueio e incubação com os anticorpos, foram realizadas lavagens da

membrana com o tampão TBS-T. A imunodeteção foi realizada por quimioluminescência, utilizando o reagente Luminata Forte[®] (Millipore) e a membrana revelada foi visualizada no iBright[™] CL1000 (Thermo Fisher Scientific).

7.7 Microscopia confocal

A localização subcelular da toxina Bin e de suas subunidades, BinA e BinB, nas regiões do intestino e nas células intestinais de larvas de *C. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* foi feita através de microscopia confocal usando as proteínas marcadas com os fluoróforos Alexa 546[®] ou Alexa 647[®] (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as proteínas foram incubadas com um dos fluoróforos por no mínimo 1h TA e, em seguida, foram dialisadas *overnight* em PBS a 4° C para remover o fluoróforo livre, não acoplado à proteína. Em seguida, as amostras de proteínas marcadas foram submetidas à separação eletroforética SDS-PAGE para avaliar a marcação fluorescente através de filtros RGB (*Red, green and blue* – Vermelho, verde e azul) no fotodocumentador Amersham[™] Imager 600 (GE Healthcare). Além das proteínas, foram também marcados os cristais purificados de Cyt1Aa e Cyt1AaV122E com o fluoróforo Alexa 647. Para estas amostras foi feita a visualização em SDS-PAGE e também em microscopia confocal.

Para evitar problemas de autofluorescência observados nas larvas alimentadas com ração para gatos, que é a dieta padrão usada para a criação (item 7.1), as larvas de 2° estágio foram alimentadas com grãos de aveia cozidos (marca Quaker[®] 25 mg/L fervidos em água destilada por 15 min) durante 3-5 dias até atingir o 4° estágio. Para o estudo de localização subcelular das toxinas, dez larvas L₄ jovens foram colocadas em 2 ml de água destilada sem alimento, contendo ou não toxina, em cada poço de placas de cultura de 24 poços (1,76 cm de diâmetro/poço). Os grupos tratados foram expostos a proteína marcada (Bin, BinA ou BinB, a 5 µg/mL concentração final) sozinhas ou em mistura com a biomassa contendo esporos e cristais de Cyt1Aa ou da mutante Cyt1AaV122E (0,5-1 µg/mL concentração final). O tratamento foi feito a TA, sob o abrigo da luz, com duração de 2h (*C. quinquefasciatus*) ou 16h (*Ae. aegypti*). No caso da Cyt1Aa, foi necessário usar a biomassa contendo esporos e cristais porque a toxina ativada sob a forma solúvel não apresenta toxicidade *in vivo* para as larvas.

Após a incubação, as larvas foram transferidas para água limpa contendo alimento (aveia) por 3h. Os intestinos das larvas foram dissecados e fixados em paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich) em PBS suplementado com sacarose 5% (Sigma-Aldrich) por 30 min TA.

Após a fixação, os tecidos foram lavados três vezes com PBS e montados em lâmina com Prolong[®] Gold antifade contendo DAPI (Sigma-Aldrich). Para avaliar a localização subcelular de Cyt1Aa e Cyt1AaV122E, as larvas foram alimentadas com 0,5 µg/mL de cristais marcados com Alexa 647 por 4h e, em seguida, processadas como descrito anteriormente. As proteínas marcadas com Alexa 546 foram excitadas a 543 nm e a emissão de fluorescência foi analisada a 568 nm, enquanto as proteínas marcadas com Alexa 647 foram excitadas com 633 nm e a emissão de fluorescência foi analisada a 665 nm. As imagens microscópicas foram registradas usando o microscópio confocal com varredura a laser (Olympus FV1000) no IBT-UNAM.

Neste estudo, também foram feitos ensaios para avaliar a colocalização da toxina Bin com organelas celulares e determinar potenciais alvos desta toxina em larvas CqS. Para avaliar este aspecto, as larvas foram tratadas com a toxina Bin marcada com Alexa 546 conforme descrito anteriormente. Após a exposição com a toxina marcada com fluoróforo, as larvas foram também tratadas, por 2h suplementares à TA, com os marcadores de lisossomos e mitocôndrias, LysoTracker[®] e MitoTracker Deep Red-647[®] a 1 µM (Thermo Fisher Scientific), respectivamente. Após a incubação, as larvas foram transferidas para água limpa contendo alimento (aveia) por 3h. Após estas etapas, os intestinos dissecados foram fixados, lavados e montados em lâmina com Prolong[®] Gold antifade contendo DAPI (Sigma-Aldrich), conforme descrito anteriormente.

7.8 Ensaios de atividade caspase

Neste trabalho, foram realizados ensaios para determinar a atividade de Caspase-3 como um marcador da ativação da via de apoptose. Um estudo prévio mostrou que em larvas de *C. quinquefasciatus* intoxicadas com a toxina Bin ocorre a ativação da apoptose com participação desta enzima (TANGSONGCHAROEN *et al.*, 2015). Foi feita uma análise quantitativa através do uso do kit fluorimétrico Caspase-3 Assay Kit (Abcam, ab39383) para mensurar a atividade da Caspase-3, além de uma análise qualitativa através da imunodeteção dos fragmentos clivados da Caspase-3 com o anticorpo *Cleaved Caspase-3* (Asp175) (Cell Signaling Technology). Para potencialmente induzir a atividade da Caspase-3 em larvas CqS estas foram alimentadas com a toxina Bin por 18h com uma dose equivalente à CL₅₀ (0.025 µg/mL) e outra letal para 100% das larvas após 48h (0.2 µg/mL). Além destes, foram usados um grupo de controle negativo sem exposição à toxina e um grupo de controle positivo de apoptose com larvas expostas à luz ultravioleta (UV) por 30 min. Cada grupo consistiu de 50

larvas de 4º estágio jovens e, após a incubação, os intestinos foram dissecados e colocados em 150 µl dos respectivos tampões de lise celular acrescidos de 7,5 µl de solução estoque (12,5X) de inibidor de protease cOmplete® (Roche). Para detecção quantitativa de atividade enzimática da Caspase-3, foi utilizado o tampão de lise Abcam (proveniente do kit acima mencionado), enquanto para a detecção qualitativa via imunodeteção dos fragmentos da Caspase-3 clivada, foi utilizado o tampão de lise Cell Lytic MT™ (Sigma-Aldrich, C3228). As amostras foram maceradas em gelo por 2 min, centrifugadas (20.000 g, 10 min, 4° C) e os sobrenadantes foram recuperados, dosados pelo método de Bradford e armazenados a – 80° C até o momento de realizar o experimento.

A avaliação quantitativa da atividade de Caspase-3 foi feita através da incubação do extrato de proteínas (25 µg), obtido como descrito anteriormente, com o substrato DEVD-AFC (Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluorometil cumarina, 200 µM) em tampão de reação 2X contendo o agente redutor Ditioneitol (DTT, 10 mM), fornecidos pelo kit fluorimétrico Caspase-3 Assay Kit (Abcam). A reação foi realizada em placas de 96 poços e foi incubada a 37° C por 1h e, em seguida, foi feita a leitura da intensidade de fluorescência em leitor de placas com excitação a 400 nm e emissão a 505 nm, a cada hora, até a leitura final de 4h.

Para a avaliação qualitativa, amostras de extrato protéico (50 µg) de cada grupo testado foram submetidas à separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) que foi submetida à imunodeteção com anticorpo que reconhece o maior fragmento resultante da clivagem da Caspase-3. O procedimento de imunodeteção teve as seguintes etapas: lavagem da membrana com PBS por 5 min a TA; bloqueio com PBS-Tween 20 (PBS-T) a 2% durante 10 min TA; incubação com o anticorpo primário *Cleaved Caspase-3* (Asp175) em PBS-T a 0,05% (diluição 1:1000) a TA; incubação com o anticorpo secundário anti-rabbit conjugado à peroxidase (1:10000) 1h a TA em PBS-T a 0,05%. Após o bloqueio e incubações com os anticorpos, a membrana foi lavada 4 vezes por 5 min com PBS-T a 0,05%. A membrana foi revelada através da incubação com Luminol sc-2048® (Santa Cruz Biotechnology), segundo as instruções do fabricante. A visualização da membrana revelada foi feita no fotodocumentador Amersham™ Imager 600® (GE Healthcare).

8 RESULTADOS

Os próximos tópicos abordarão os resultados da tese.

8.1 Suscetibilidade de larvas ao produto combinado de Lsp e Bti

A toxicidade de um produto, o Vectomax[®], que contém cristais do *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e do *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) foi avaliada para as larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis (CqS), *C. quinquefasciatus* resistentes (CqR) e de *Aedes aegypti* (Aae), refratárias à toxina Bin. Este larvicida combinado apresentou toxicidade para as larvas das três colônias avaliadas neste trabalho, com concentrações letais crescentes para as larvas CqS, Aae e CqR (Tabela 1). Observa-se que os valores, tanto da CL₅₀ ou CL₉₀, para as larvas resistentes são apenas 1-4 vezes superiores ao valor observado para a colônia de referência, e mostram a atividade *in vivo* deste produto para as larvas desprovidas do receptor para a toxina Bin. Estes dados foram obtidos pelo aluno Daniel Brandão, colaborador do projeto no IAM-FIOCRUZ.

Tabela 1 – Toxicidade do Vectomax[®] para larvas de 4^o instar das colônias de *Culex quinquefasciatus* (suscetível e resistente à Bin) e de *Aedes aegypti* após 48h de exposição.

Colônia	N ^o larvas	CL ₅₀ (mg/L) ^a	CL ₉₀ (mg/L) ^a
CqS	480	0.026 (0.020-0.031)	0.071 (0.056-0.098)
CqR	420	0.094 (0.074-0.115)	0.238 (0.183-0.283)
Aae	560	0.041 (0.028-0.049)	0.089 (0.072-0.150)

Fonte: A autora.

Legenda: Vectomax[®] contém cristais de *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp - 2,7 %) e *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti - 4,5 %) e a concentração representa mg de ingrediente ativo/L. CqS = *Culex quinquefasciatus* suscetível ao Lsp. CqR = *C. quinquefasciatus* resistente ao Lsp. Aae = *Aedes aegypti* refratário ao Lsp. ^aMédia e intervalo de confiança 95%.

8.2 Suscetibilidade de larvas às toxinas Bin e Cyt1Aa

Para avaliar o sinergismo entre as toxinas Bin e Cyt1Aa, a atividade larvicida de suspensões de esporos e cristais contendo Bin e Cyt1Aa foi avaliada de forma individual e em misturas contra larvas de *C. quinquefasciatus* suscetível (CqS) e resistente à toxina Bin (CqR), além de *A. aegypti* (Aae) (Quadro 2). A toxina mutante Cyt1AaV122E (suspensão de esporos e cristais) também foi avaliada, já que estudos prévios desta mutante demonstraram que ela não tem a capacidade de oligomerização e inserção na membrana do epitélio intestinal

de *Ae. aegypti*. Apesar desta deficiência, a Cyt1AaV122E tem a capacidade de sinergizar a toxicidade de Cry11Aa neste inseto (LÓPEZ-DIAZ *et al.*, 2013). Inicialmente, foi avaliada a atividade de toxinas individuais para as colônias. A toxina Bin levou à alta mortalidade em larvas CqS com uma CL₅₀ de 0,026 mg/L, diferente do que foi observado em larvas CqR e Aae que não apresentaram mortalidade após o tratamento com a Bin, conforme o padrão esperado. A suspensão de esporos e cristais contendo a toxina Cyt1Aa mostrou uma toxicidade relativamente baixa para as larvas de todas as colônias estudadas, pois a concentração de 40-50 mg/L provocou apenas 40% de mortalidade, visto que sua ação é inespecífica. A toxina mutante Cyt1AaV122E na maior concentração utilizada nos bioensaios (50 mg/L) não provocou toxicidade (<5%) para as larvas testadas.

Quando a mistura de Bin-Cyt1Aa (3:1) foi testada, foi observada mortalidade nas colônias CqR (CL₅₀ 30 mg/L) e Aae (CL₅₀ 34 mg/L) comprovando que a toxina Cyt1Aa sinergiza a atividade *in vivo* da toxina Bin nestas larvas desprovidas de receptores específicos para esta toxina. Em contraste, a mistura das toxinas Bin-Cyt1AaV122E não provocou mortalidade para CqR e Aae, indicando que apenas a toxina Cyt1Aa no seu estado funcional é capaz de sinergizar a toxina Bin. Dados do grupo sugerem que a toxina mutante Cyt1AaV122E não possui a capacidade de formação de poros (dados não publicados) e este seria o principal mecanismo responsável pelo sinergismo promovido pela Cyt1Aa selvagem.

Para avaliar o sinergismo da Cyt1Aa em relação a cada subunidade da toxina Bin, foram feitos bioensaios de suas misturas. Inicialmente, a atividade *in vivo* das subunidades individuais BinA e BinB foram avaliadas contra larvas CqS, e elas não foram tóxicas individualmente, enquanto a sua mistura equimolar causou alta mortalidade (CL₅₀ 0.041 mg/L), confirmando o padrão já descrito na literatura da ação em sinergia entre estes componentes da toxina Bin. A ação larvicida da mistura BinA-Cyt1Aa mostrou que a Cyt1Aa também é capaz de sinergizar a atividade da BinA para larvas CqS (CL₅₀ 17 mg/L), CqR (CL₅₀ 10 mg/L) e Aae (CL₅₀ 54 mg/L). Enquanto a mistura BinA-Cyt1AaV122E não apresentou toxicidade para estas colônias, corroborando os resultados obtidos para a mistura Bin-Cyt1AaV122E. Em larvas suscetíveis, a BinA provoca toxicidade em CqS mediada pela interação BinB-receptor específico, e este estudo demonstrou que esta subunidade pode causar mortalidade *in vivo* em indivíduos desprovidos do receptor, graças à presença da toxina Cyt1Aa que sinergiza sua toxicidade. A mistura BinB-Cyt1Aa não causou mortalidade elevada em larvas CqS mesmo na maior concentração testada (60 mg/L), comprovando este achado. Portanto, foi observado que a atividade larvicida *in vivo* da toxina Bin ou da subunidade BinA contra larvas CqR e Aae ocorreu apenas na presença da Cyt1Aa funcional.

Uma visão geral do padrão de atividades das toxinas Bin, Cyt1Aa e a mutante Cyt1AaV122E está representada no Gráfico 1.

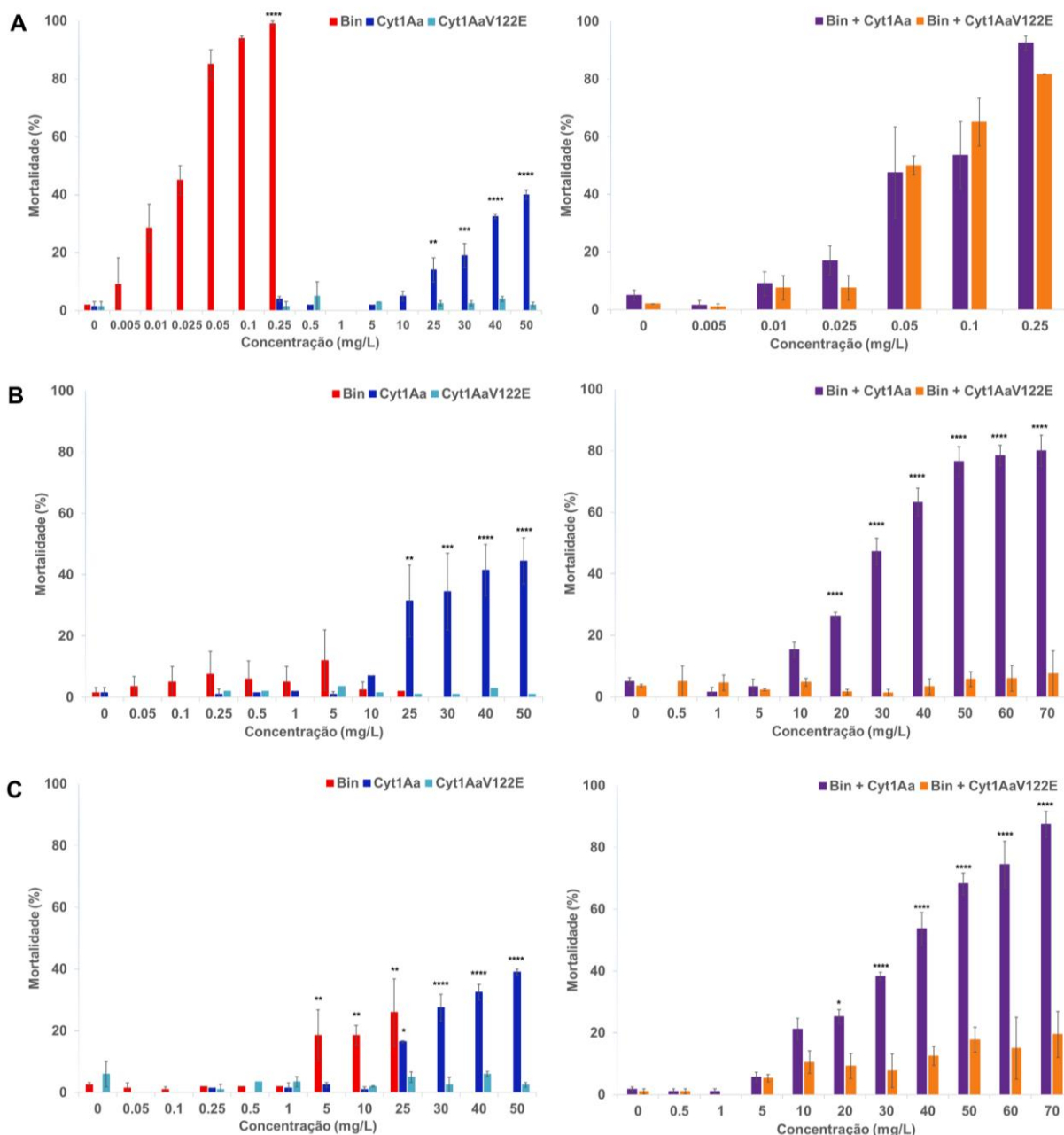
Quadro 2 – Atividade de toxinas Bin (subunidades BinA e BinB), Cyt1Aa, Cyt1AaV122E e suas misturas para larvas do 3º instar das colônias de *Culex quinquefasciatus* (suscetível e resistente à Bin) e de *Aedes aegypti* após 48h de exposição.

Toxinas	CL ₅₀ (mg/L) ^a		
	CqS	CqR	Aae
Bin	0.026 (0.017-0.036)	Não tóxica	Não tóxica
BinA ^b	Não tóxica	Não tóxica	Não tóxica
BinB ^b	Não tóxica	ND	ND
BinA ^b + BinB ^b (1:1)	0.041 (0.030-0.056)	Não tóxica	Não tóxica
Cyt1Aa	>50	>50	>50
Cyt1AaV122E	Não tóxica	Não tóxica	Não tóxica
Misturas Bin:Cyt1Aa (3:1)			
Bin + Cyt1Aa	0.073 (0.048-0.103)	30.304 (25.792-34.866)	33.929 (27.856-41.488)
BinA ^b + Cyt1Aa	17.203 (10.374-22.744)	10.605 (7.739-15.142)	54.113 (47.238-63.825)
BinB ^b + Cyt1Aa	>60	ND	ND
Bin + Cyt1AaV122E	0.073 (0.046-0.115)	Não tóxica	Não tóxica
BinA ^b + Cyt1AaV122E	Não tóxica	Não tóxica	Não tóxica

Fonte: A autora.

Legenda: ^aMédia e intervalo de confiança 95% determinados pela análise de Probit, valores de CL₅₀ baseados em massa/volume de suspensões de biomassa bacteriana contendo esporos e cristais, exceto quando informado. ^bValores de CL₅₀ baseados em massa/volume de protoxina solúvel purificada. CqS = *Culex quinquefasciatus* suscetível ao *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp). CqR = *C. quinquefasciatus* resistente ao Lsp. Aae = *Aedes aegypti* refratário ao Lsp. ND = não determinado.

Gráfico 1 - Atividade de toxinas Bin, Cyt1Aa e Cyt1AaV122E e suas misturas para larvas do 3º instar das colônias de *Culex quinquefasciatus* (suscetível e resistente à Bin) e *Aedes aegypti* após 48h de exposição.



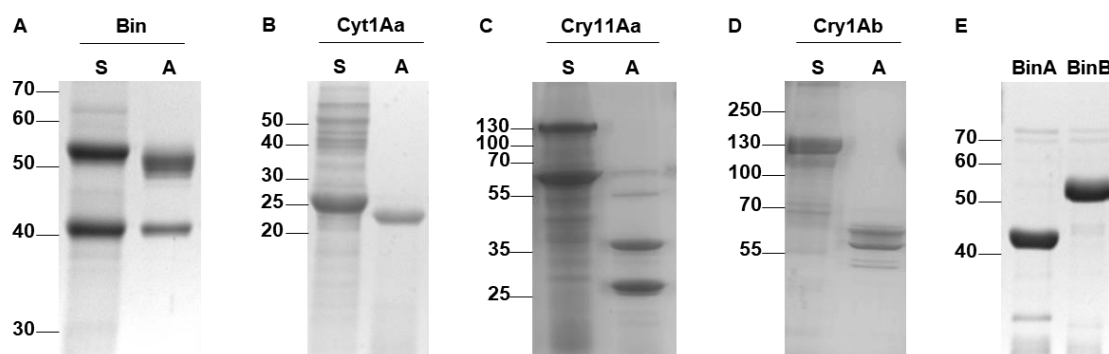
Fonte: A autora.

Legenda: Bioensaios feitos a partir de biomassas bacterianas contendo esporos e cristais com as toxinas Bin, Cyt1Aa e Cyt1AaV122E preparadas a partir de uma suspensão-mãe (5 g/L). Os bioensaios foram feitos com grupos de 20 larvas do estágio L₃ jovem em 20 mL de água destilada em triplicata. A. CqS = *Culex quinquefasciatus* suscetível ao *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp). B. CqR = *C. quinquefasciatus* resistente ao Lsp. C. Aae = *Aedes aegypti* refratário ao Lsp. Cada coluna representa a média de pelo menos seis replicatas e as barras mostram o erro padrão. Asteriscos indicam diferença estatística (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001) de acordo com teste ANOVA.

8.3 Interação entre as toxinas Bin e Cyt1Aa

A obtenção de protoxinas e toxinas com integridade e funcionalidade foi a primeira etapa necessária para avaliar a ocorrência de interação entre as toxinas Bin e Cyt1Aa, e destas com o epitélio intestinal. As protoxinas Bin, Cyt1Aa, Cry11Aa e Cry1Ab utilizadas nos ensaios foram produzidas sob a forma recombinante em *Bti* acristalífero e, em seguida, estas foram processadas *in vitro* para atingir a forma de toxina. Estas protoxinas foram expressas de forma íntegra com peso molecular esperado conforme apresentado na Figura 14: a protoxina Bin formada pelas subunidades de 42 e 51 kDa foram convertidas para a forma ativa de 39 e 43 kDa; a protoxina Cyt1Aa de 28 kDa foi convertida para 24 kDa; a protoxina Cry11Aa de 68 kDa foi convertida para fragmentos de 32 e 36 kDa; a protoxina Cry1Ab de 130 kDa foi convertida para fragmentos de 60 e 65 kDa. As subunidades BinA e BinB, produzidas individualmente em *Escherichia coli*, também foram expressas de forma íntegra com os pesos esperados de 42 kDa e 51 kDa, respectivamente.

Figura 14 – Perfil eletroforético das proteínas Bin, BinA, BinB, Cyt1Aa, Cry11Aa e Cry1Ab recombinantes.



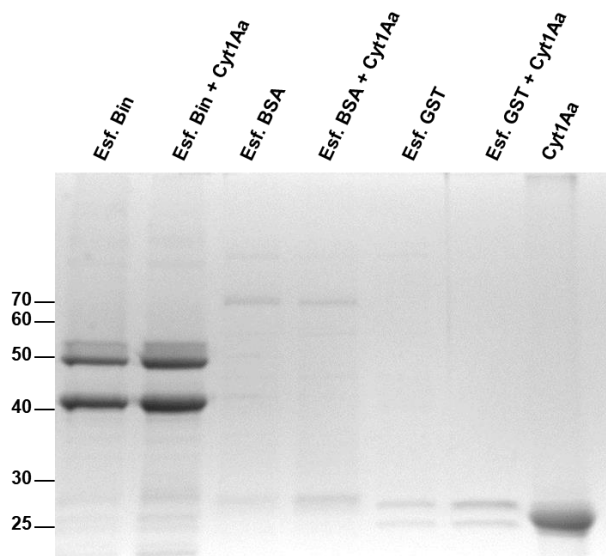
Fonte: A autora.

Legenda: Eletroforese em SDS-PAGE 10% (A, D e E) ou 12% (B e C) e visualização com azul de Coomassie. As protoxinas Bin, Cyt1Aa, Cry11Aa e Cry1Ab foram produzidas em *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* acristalífero e as subunidades da Bin, BinA e BinB, foram produzidas em *Escherichia coli*. Marcador de peso molecular (kDa) à esquerda. S = protoxina solubilizada. A = toxina ativada *in vitro*.

A interação entre as toxinas Bin e Cyt1Aa foi primeiramente avaliada através de ensaios de *pull down*, entre a toxina Bin adsorvida em microesferas de sefarose e a toxina Cyt1Aa solúvel. Através deste ensaio, não foi possível observar a interação entre as duas toxinas. Os controles negativos utilizados no ensaio, esferas adsorvidas com as proteínas BSA (~66 kDa) e GST (~25 kDa), não apresentaram ligação com a toxina Cyt1Aa como o esperado (Figura 15). A intensidade das proteínas usadas como controle negativo foi menor do que o esperado, porém, como as esferas-Bin não apresentaram qualquer sinal de ligação

com a toxina Cyt1Aa, este aspecto não foi considerado crítico para a interpretação dos resultados deste ensaio.

Figura 15 – Ensaio de interação (*pull down*) entre as toxinas Bin imobilizada em esferas (esf. Bin) e a toxina Cyt1Aa.

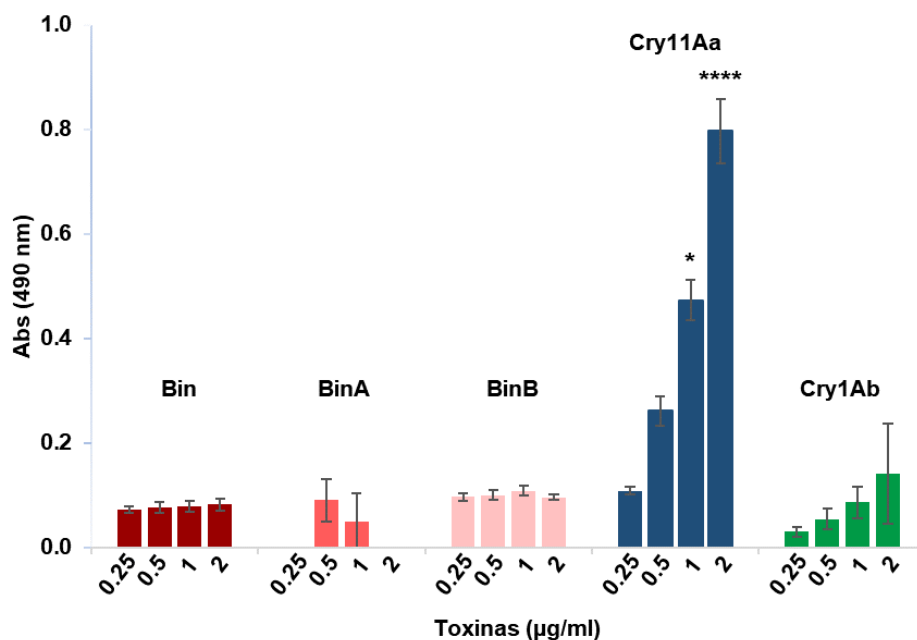


Fonte: A autora.

Legenda: As amostras de proteínas foram incubadas, lavadas, separadas em SDS-PAGE (10%) e coradas com azul de Coomassie. As proteínas BSA (esf. BSA) e GST (esf. GST) imobilizadas em esferas também foram incubadas com a toxina Cyt1Aa (controle negativo). Marcador de peso molecular (kDa) à esquerda.

Além do ensaio de *pull down*, foi realizado um ensaio de ELISA na tentativa de investigar a existência de ligação entre as toxinas Bin e Cyt1Aa através de um método mais sensível de natureza quantitativa. A interação entre cada subunidade, BinA e BinB, com a toxina Cyt1Aa também foi investigada. Neste ensaio, não foi observada interação entre a Cyt1Aa com a Bin, nem com as suas subunidades (Gráfico 2), pois o nível de ligação é baixo e não apresenta um padrão crescente de dose-resposta. O controle positivo utilizado mostrou um padrão de ligação específico entre as toxinas Cyt1Aa e Cry11Aa, com sinal de detecção dose-crescente. O controle negativo também foi validado visto que não houve um padrão de ligação específica entre Cyt1Aa e Cry1Ab.

Gráfico 2 – Ensaio de interação (ELISA) entre a proteína Cyt1Aa imobilizada na placa e incubada com as toxinas Bin, BinA, BinB, Cry11Aa e Cry1Ab.



Fonte: A autora.

Legenda: A proteína Cyt1Aa foi imobilizada e incubada com concentrações crescentes das proteínas Bin, BinA, BinB, Cry11Aa (controle positivo) e Cry1Ab (controle negativo). Em seguida, foi feita a imunodeteção com os anticorpos primários específicos para cada proteína: anti-BinB (1:1.000); anti-BinA (1:20.000); anti-Cry11Aa (1:10.000); e anti-Cry1Ab (1:10.000). Cada coluna representa a média de ligação específica de pelo menos cinco replicatas e as barras representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferença estatística (* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$) de acordo com teste ANOVA.

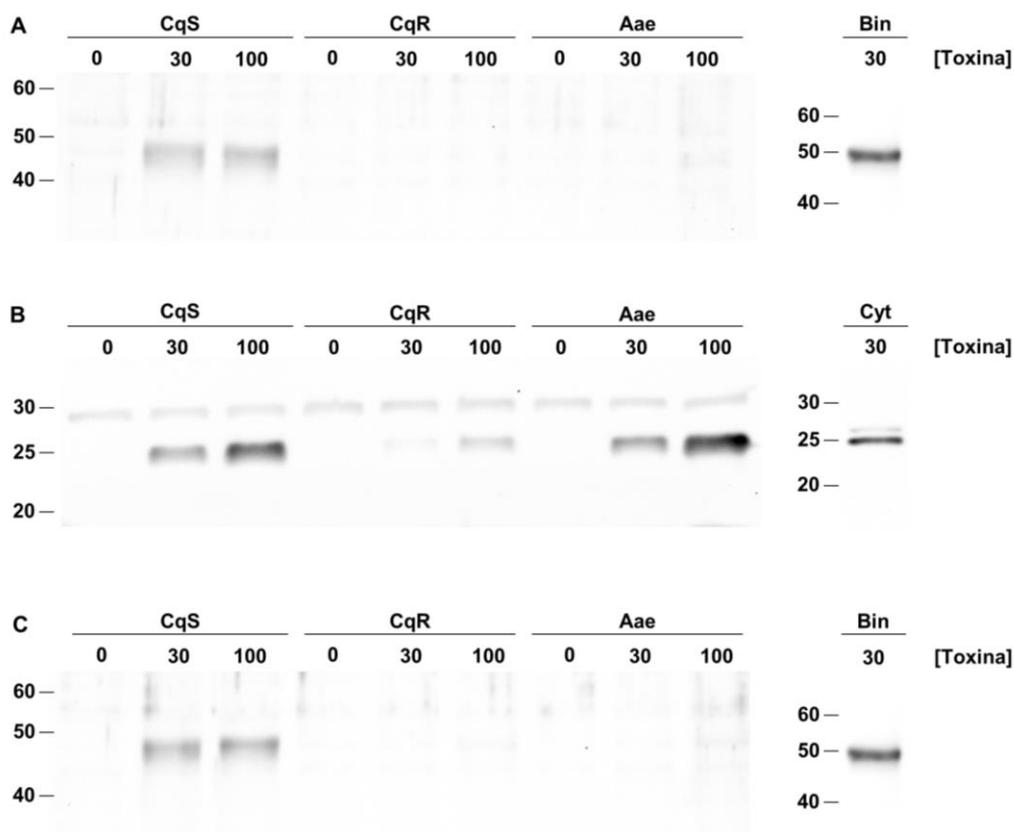
8.4 Interação entre as toxinas e proteínas do epitélio intestinal de larvas

A interação entre as toxinas Bin, Cyt1Aa e mistura das toxinas Bin-Cyt1Aa, com proteínas do intestino das larvas, utilizando amostras de frações ricas em microvilosidades do epitélio intestinal (BBMF) de larvas das colônias CqS, CqR e Aae foi investigada. Estes experimentos foram realizados para analisar se, na presença da Cyt1Aa, a toxina Bin tem capacidade de interagir com o epitélio intestinal de larvas CqR ou Aae, que são desprovidas de receptores específicos para a toxina Bin, e assim ser detectada nestas amostras de *microvilli* intestinal.

Nestes ensaios, as toxinas Bin, Cyt1Aa ou suas misturas (3:1) foram incubadas com as amostras de BBMF. Em seguida, as amostras de BBMF recuperadas foram submetidas à imunodeteção da toxina Bin ou Cyt1Aa ligada à BBMF, usando os anticorpos específicos para cada toxina. A toxina Bin mostrou interação específica com a BBMF de larvas CqS nas duas concentrações utilizadas, enquanto não foi observada interação com BBMF de larvas CqR e Aae (Figura 16A), o que é o padrão esperado de acordo com o *status* de suscetibilidade destas larvas. A toxina Cyt1Aa mostrou interação com amostras de BBMF de todas as larvas

testadas (Figura 16B), padrão esperado visto que a Cyt1Aa é capaz de se inserir nas membranas celulares e não depende de interação específica com receptores de membrana. A interação da Cyt1Aa com BBMF de larvas CqR parece mais fraca quando comparada às colônias CqS e Aae, visto que foi melhor observada na maior concentração usada. Quando a mistura de toxinas Bin e Cyt1Aa foi testada, a Bin foi detectada ligada à membrana do epitélio intestinal de larvas CqS, mas não para as amostras de BBMF CqR e Aae (Figura 16C), embora esta mistura tenha atividade *in vivo* como mostrado nos bioensaios (Quadro 2, Gráfico 1). Os dados mostram que a toxina Bin, mesmo na presença da Cyt1Aa, que deve estar ligada às amostras de BBMF conforme demonstrado na Fig. 16B, não foi detectada nestas membranas (Figura 16C). Estes resultados indicam que a ligação entre estas toxinas não ocorre e corroboram os resultados obtidos pelos ensaios de interação (seção 8.3).

Figura 16 – Ensaio de interação entre amostras de proteínas do intestino de larvas (BBMF) de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis e resistentes à Bin e *Aedes aegypti* (Aae) com as toxinas Bin e Cyt1Aa individuais ou em mistura.



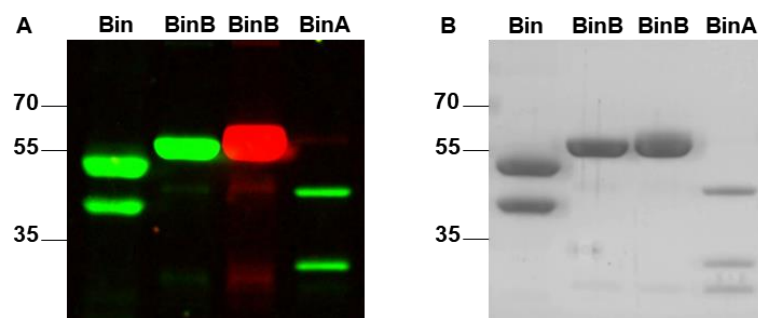
Fonte: A autora.

Legenda: As amostras de BBMF (10 µg) foram incubadas com as toxinas Bin (A), Cyt1Aa (B) ou pré-incubadas com a toxina Cyt1Aa, seguida de incubação com a toxina Bin na proporção 3:1 Bin:Cyt1Aa (C) em diferentes concentrações (0, 30, 100 nM). Em seguida, as amostras foram separadas em SDS-PAGE (A e C 10%, B 12%), transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à imunodeteção com anticorpo anti-BinB (A e C, diluição 1:500) ou anti-Cyt1Aa (B, diluição 1:30.000). Controles positivos de imunodeteção de Bin e Cyt1Aa foram incluídos em cada ensaio e estão mostrados à direita. Marcador de peso molecular (kDa) à esquerda.

8.5 Localização subcelular da toxina Bin

Neste estudo, foi feita uma avaliação da localização subcelular da toxina Bin marcada com fluoróforos Alexa[®] através de microscopia confocal, na presença e ausência de esporos e cristais contendo a protoxina Cyt1Aa selvagem ou de sua mutante Cyt1AaV122E, deficiente na capacidade de formação de poro. A primeira etapa foi a obtenção de toxinas funcionais marcadas com o fluoróforo Alexa. Foram obtidas proteínas íntegras, com peso molecular esperado (Figura 17), cuja toxicidade *in vivo* foi testada antes das toxinas serem utilizadas.

Figura 17 – Perfil eletroforético das proteínas Bin, BinA e BinB marcadas com o fluoróforo Alexa.



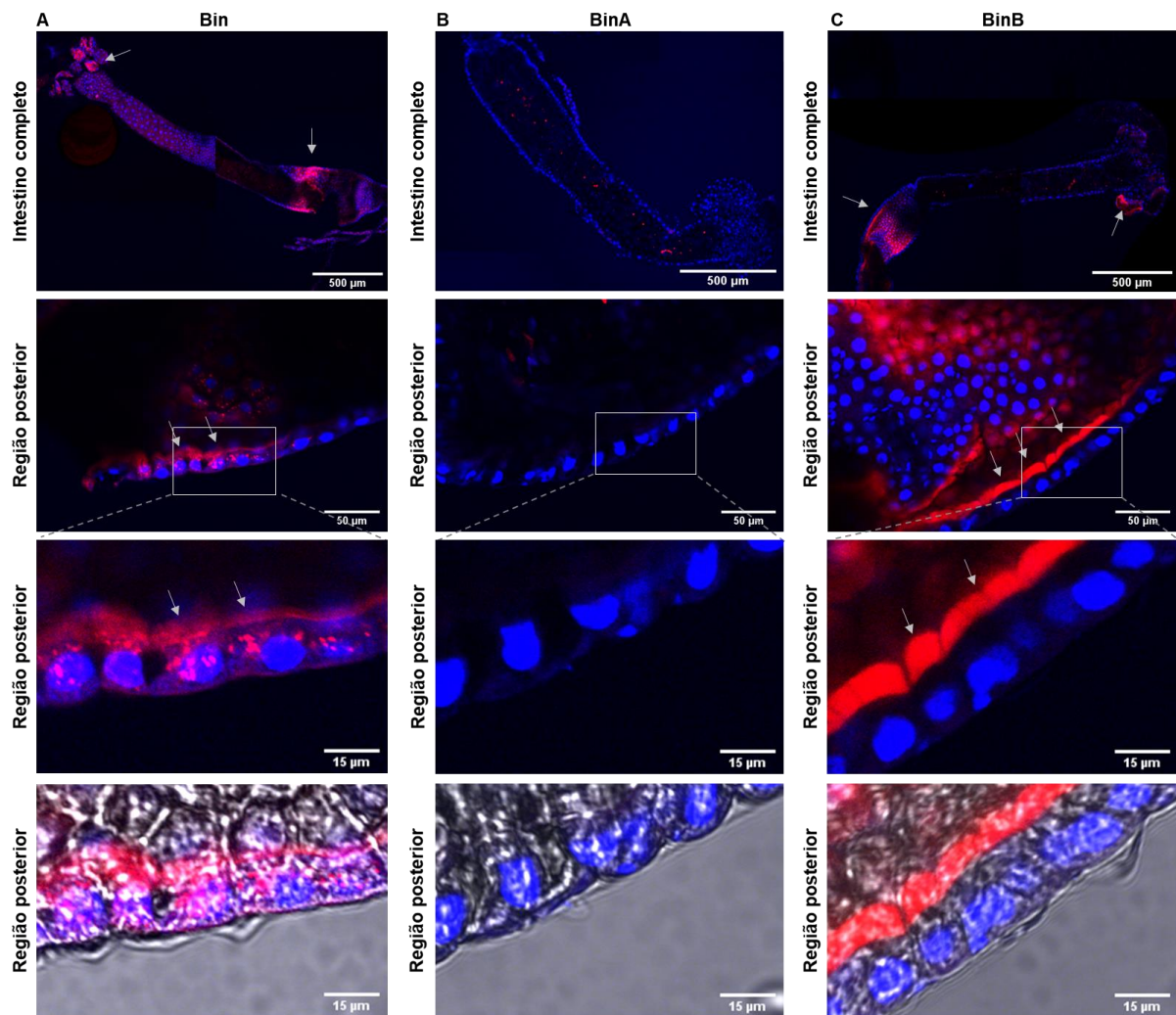
Fonte: A autora.

Legenda: As proteínas foram marcadas com Alexa546 (Bin, BinA e BinB) e com Alexa647 (BinB), separadas em SDS-PAGE 10% e visualizadas em fotodocumentador com filtro RGB (A) ou com Azul de Coomassie (B). Marcador de peso molecular (kDa) à esquerda.

Com relação à localização subcelular da toxina Bin-Alexa546 administrada às larvas CqS, foi observado um padrão regional de localização desta toxina nos cecos gástricos e na região posterior do intestino (Figura 18A). A nível celular, a toxina Bin foi encontrada na superfície bem como internalizada em células epiteliais do intestino (Figura 18A). Quando larvas CqS foram alimentadas com a subunidade BinA-Alexa546, observou-se uma ausência de marcação (Figura 18B), indicando que a BinA não interage com os receptores presentes no epitélio intestinal. Em contraste, a subunidade BinB-Alexa647 foi fortemente detectada no *microvilli* nos cecos gástricos e na região posterior do intestino, e ausente no interior das células (Figura 18C), confirmando o seu papel funcional de ligação específica com os receptores Cqm1 do epitélio destas larvas. A avaliação da localização subcelular das subunidades BinA-Alexa546 e BinB-Alexa647 administradas em mistura equimolar (1:1) para larvas CqS confirmou estes achados. Neste caso, foi observada a internalização da BinA, enquanto a BinB foi localizada ligada ao epitélio intestinal e em menor proporção também dentro das células (Figura 19). Em contraste, quando as larvas CqR (Figura 20A) e Aae

(Figura 20B) foram tratadas com a Bin-Alexa546, esta não foi detectada ligada à membrana ou internalizada nas células. Os resultados da detecção da toxina Bin no epitélio intestinal de larvas CqS (Figuras 18 e 19) e ausência nas larvas CqR e Aae (Figura 20) são compatíveis, respectivamente, com a presença e ausência de receptores para a toxina nas células do epitélio intestinal.

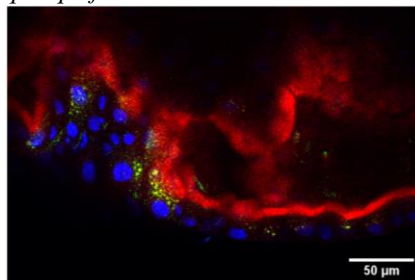
Figura 18 – Localização subcelular *in vivo* da toxina Bin e de suas subunidades BinA e BinB no intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis à Bin.



Fonte: A autora.

Legenda: As larvas foram alimentadas com 5 µg/ml de Bin-Alexa546 (A), BinA-Alexa546 (B), BinB-Alexa647 (C) por 2h. Em seguida, foram deixadas em água limpa sem toxina por 3h e então seus intestinos foram dissecados, fixados (paraformaldeído 4%, sacarose 5% em PBS pH 7.2) e montados em lâminas com Prolong® Diamond antifade contendo DAPI (núcleos em azul). A localização da proteína marcada com fluoróforo (vermelho) foi feita em microscópio confocal com varredura a laser. As setas apontam a toxina marcada ligada ao epitélio intestinal ou internalizada nas células. Imagens de microscopia de contraste de fase em conjunto com fluorescência estão mostradas ao final de cada painel.

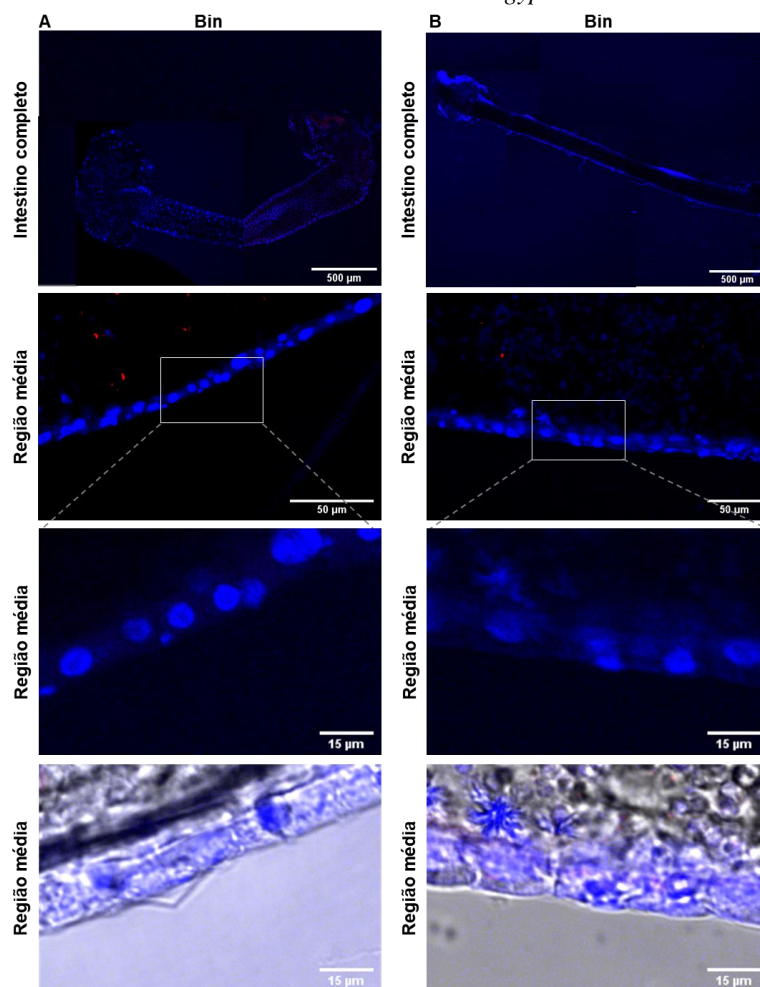
Figura 19 - Localização subcelular *in vivo* das subunidades BinA e BinB da toxina Bin no intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis à Bin.



Fonte: A autora.

Legenda: As larvas foram alimentadas com 5 μg/ml de BinA-Alexa546 (verde) e BinB-Alexa647 (vermelho) por 2h. Em seguida, foram deixadas em água limpa sem toxina por 3h e então seus intestinos foram dissecados, fixados (paraformaldeído 4%, sacarose 5% em PBS pH 7.2) e montados em lâminas com Prolong® Diamond antifade contendo DAPI (núcleos em azul). A localização da proteína marcada com fluoróforo foi feita em microscópio confocal com varredura a laser. A colocalização das cores verde e vermelho está mostrada em amarelo.

Figura 20 - Localização subcelular *in vivo* da toxina Bin no intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* resistentes à Bin e *Aedes aegypti*.



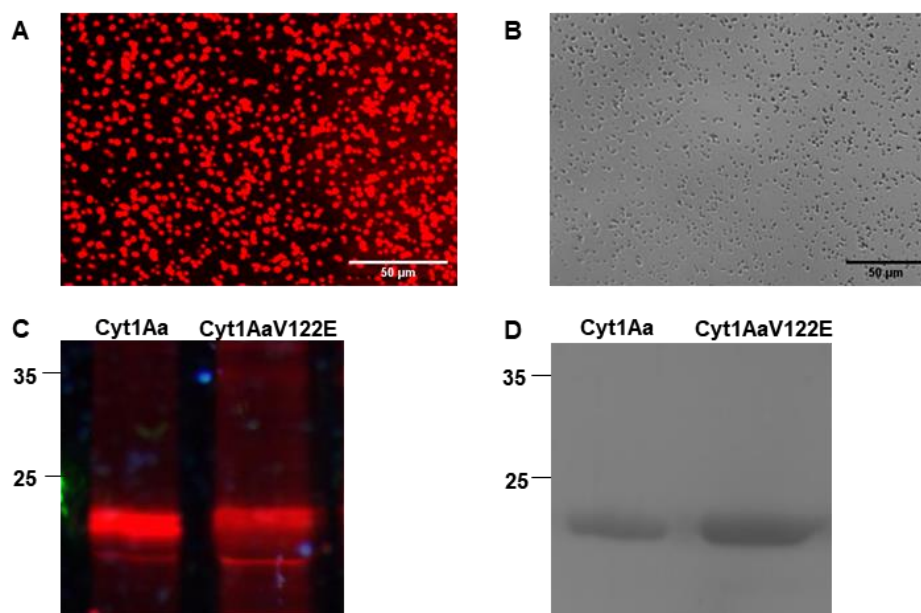
Fonte: A autora.

Legenda: As larvas foram alimentadas com 5 μg/ml de Bin-Alexa546 por 2h (A – CqR) e 12h (B – Aae). Em seguida, foram deixadas em água limpa sem toxina por 3h e então seus intestinos foram dissecados, fixados (paraformaldeído 4%, sacarose 5% em PBS pH 7.2) e montados em lâminas com Prolong® Diamond antifade contendo DAPI (núcleos em azul). A localização da proteína marcada com fluoróforo (vermelho) foi feita em microscópio confocal com varredura a laser. Imagens de microscopia de contraste de fase em conjunto com fluorescência estão mostradas ao final de cada painel.

8.6 Localização subcelular dos cristais das toxinas Cyt1Aa e Cyt1AaV122E

A localização subcelular das toxinas Cyt1Aa e Cyt1AaV122E foi feita a partir da marcação dos cristais purificados com fluoróforo Alexa. Foi necessário marcar os cristais pois, como descrito na metodologia, a toxina ativada na forma solúvel não apresenta atividade *in vivo* para as larvas. A marcação dos cristais contendo a protoxina Cyt1Aa selvagem e a mutante Cyt1AaV122E foi obtida com sucesso pela aluna Samira Molina, colaboradora do projeto no IBT-UNAM (Figura 21).

Figura 21 – Perfil dos cristais de Cyt1Aa e Cyt1AaV122E marcados com o fluoróforo Alexa.

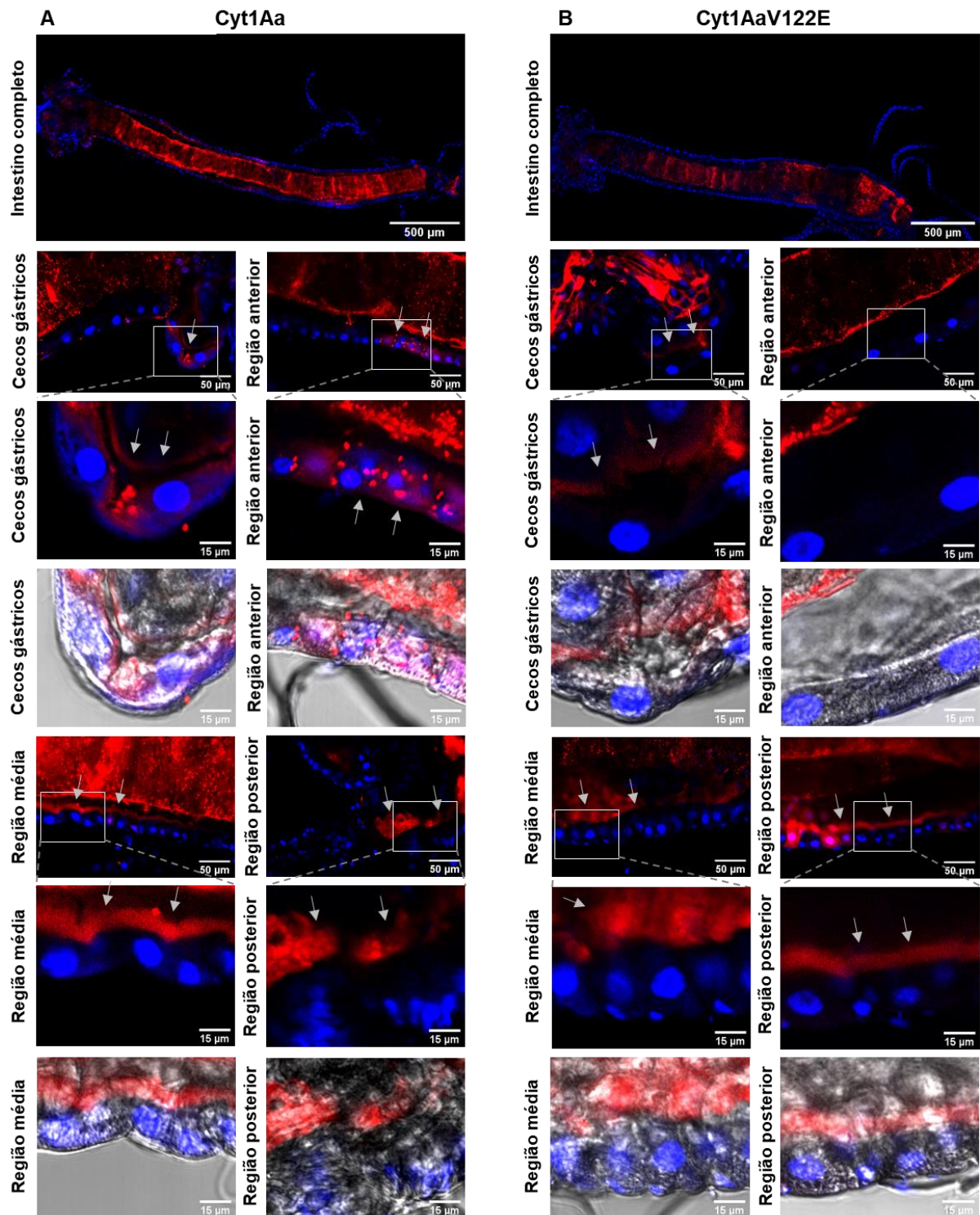


Fonte: A autora.

Legenda: Os cristais foram marcados com Alexa647 (vermelho) através de incubação com o fluoróforo por 6h a TA protegido da luz. Os cristais marcados foram visualizados em microscópio confocal com varredura a laser (A) e também em microscopia de contraste de fase (B). Além disso, as proteínas foram separadas eletroforéticamente em SDS-PAGE 15% e as bandas fluorescentes foram visualizadas em fotodocumentador com filtro RGB (C) e, em seguida, o gel foi corado com Azul de Coomassie (D). Marcador de peso molecular (kDa) à esquerda.

Em larvas CqS alimentadas com Cyt1Aa-Alexa647, foi possível detectar a toxina ao longo do epitélio de todo o intestino incluindo os cecos gástricos e regiões anterior, média e posterior, o que é compatível com o padrão de ligação inespecífico da toxina Cyt1Aa. A Cyt1Aa também foi encontrada dentro das células da região anterior do intestino (Figura 22A). Quando as larvas foram alimentadas com a toxina mutante Cyt1AaV122E-Alexa647, esta foi localizada apenas no epitélio intestinal dos cecos gástricos e das regiões média e posterior. Diferente do que foi observado com a toxina Cyt1Aa, a mutante não foi encontrada no *microvilli* ou dentro das células da região anterior do intestino (Figura 22B).

Figura 22 – Localização subcelular *in vivo* das toxinas Cyt1Aa e Cyt1AaV122E no intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis à Bin.



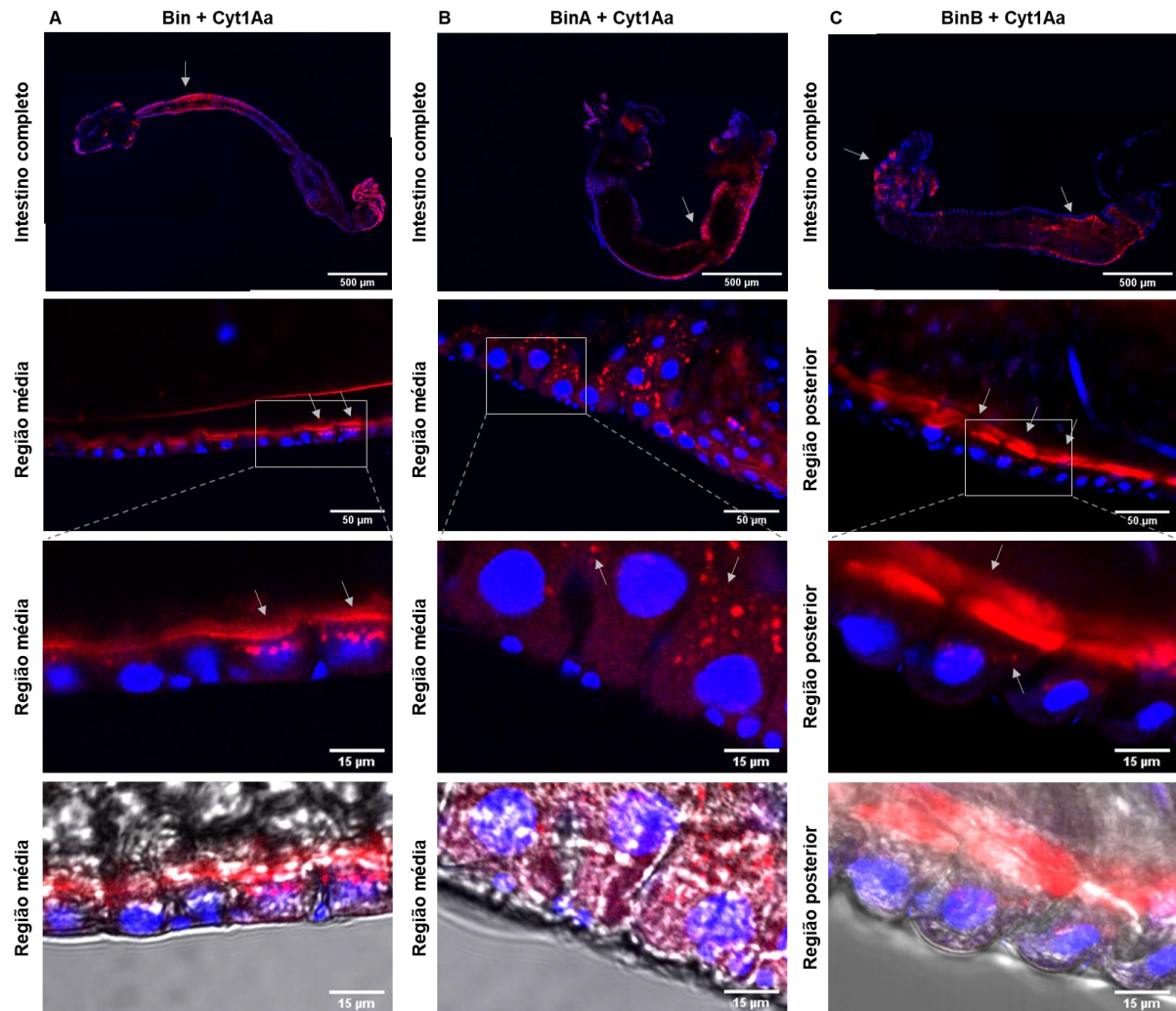
Fonte: A autora.

Legenda: As larvas foram alimentadas com 0,5 µg/ml de cristais marcados de Cyt1Aa (A) ou Cyt1AaV122E (B) por 4h. Em seguida, seus intestinos foram dissecados, fixados (paraformaldeído 4%, sacarose 5% em PBS pH 7.2) e montados em lâminas com Prolong® Diamond antifade contendo DAPI (núcleos em azul). A localização da proteína marcada com fluoróforo (vermelho) foi feita em microscópio confocal com varredura a laser. As setas apontam a toxina marcada ligada ao epitélio intestinal ou internalizada nas células. Imagens de microscopia de contraste de fase em conjunto com fluorescência estão mostradas ao final de cada painel.

8.7 Localização subcelular da toxina Bin em mistura com cristais da Cyt1Aa e Cyt1AaV122E

A localização da Bin-Alexa546 em mistura com cristais de Cyt1Aa ou Cyt1AaV122E (não marcados) foi investigada. Em larvas CqS tratadas com a mistura de Bin-Alexa546 e cristais de Cyt1Aa, foi observado que a Bin também estava presente nas regiões anterior e média do intestino ligada à membrana e internalizada nestas células (Figura 23A). Com relação às subunidades BinA e BinB na presença de Cyt1Aa em larvas CqS, foi visto que a BinA estava internalizada nas células da região anterior do intestino (Figura 23B), enquanto a BinB manteve o padrão de localização nos cecos gástricos e região posterior (Figura 23C). Em larvas CqR e Aae, a análise de Bin-Alexa546 na presença de Cyt1Aa revelou que a toxina Bin se encontrava nas regiões anterior e média do intestino e estava internalizada nestas células (Figuras 24A e 24B). Estes resultados mostram que a Cyt1Aa permite a internalização da toxina Bin nas células independente da presença de receptores específicos. Pode-se notar que a internalização da Bin foi observada em regiões mais amplas, tais como a anterior e o intestino médio de larvas CqS, CqR e Aae, padrão que é diferente daquele que depende da presença de receptores cuja localização está concentrada nas regiões do ceco gástrico e intestino posterior.

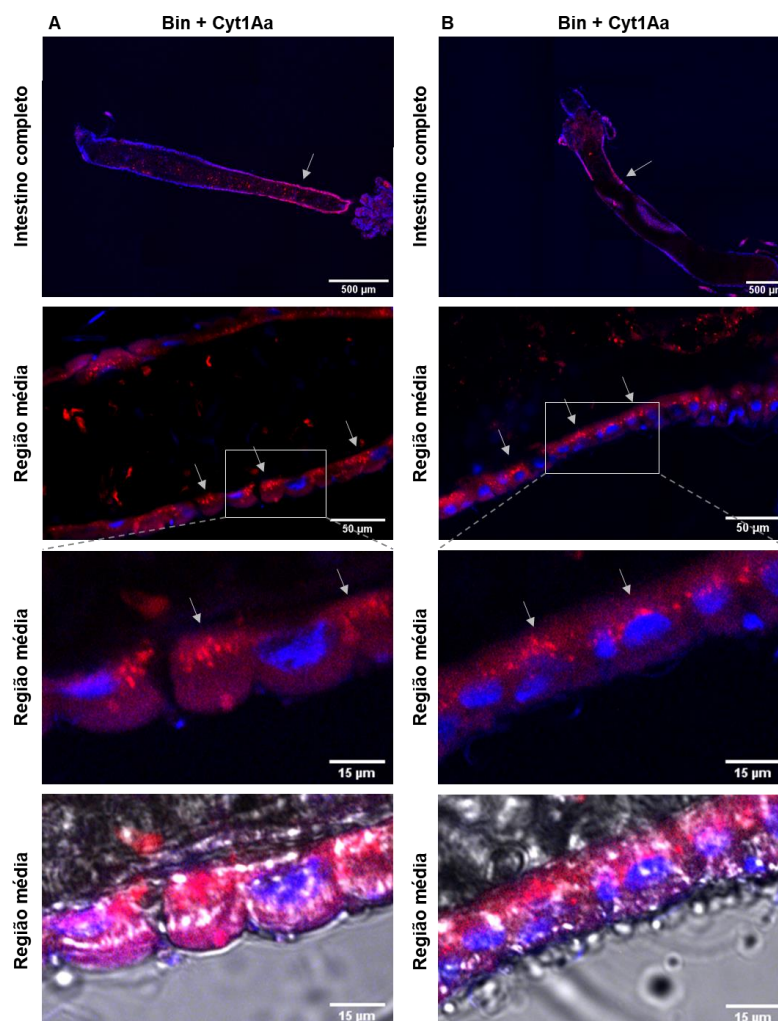
Figura 23 - Localização subcelular *in vivo* da toxina Bin e de suas subunidades BinA e BinB, na presença de Cyt1Aa, no intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis à Bin.



Fonte: A autora.

Legenda: As larvas foram alimentadas com 5 $\mu\text{g/ml}$ de Bin-Alexa546 (A), BinA-Alexa546 (B), BinB-Alexa647 (C) na presença de 1 $\mu\text{g/ml}$ de Cyt1Aa por 2h. Em seguida, foram deixadas em água limpa sem toxina por 3h e então seus intestinos foram dissecados, fixados (paraformaldeído 4%, sacarose 5% em PBS pH 7.2) e montados em lâminas com Prolong[®] Diamond antifade contendo DAPI (núcleos em azul). A localização da proteína marcada com fluoróforo (vermelho) foi feita em microscópio confocal com varredura a laser. As setas apontam a toxina marcada ligada ao epitélio intestinal ou internalizada nas células. Imagens de microscopia de contraste de fase em conjunto com fluorescência estão mostradas ao final de cada painel.

Figura 24 – Localização subcelular *in vivo* da toxina Bin, na presença de Cyt1Aa, no intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* resistentes à Bin e *Aedes aegypti*.



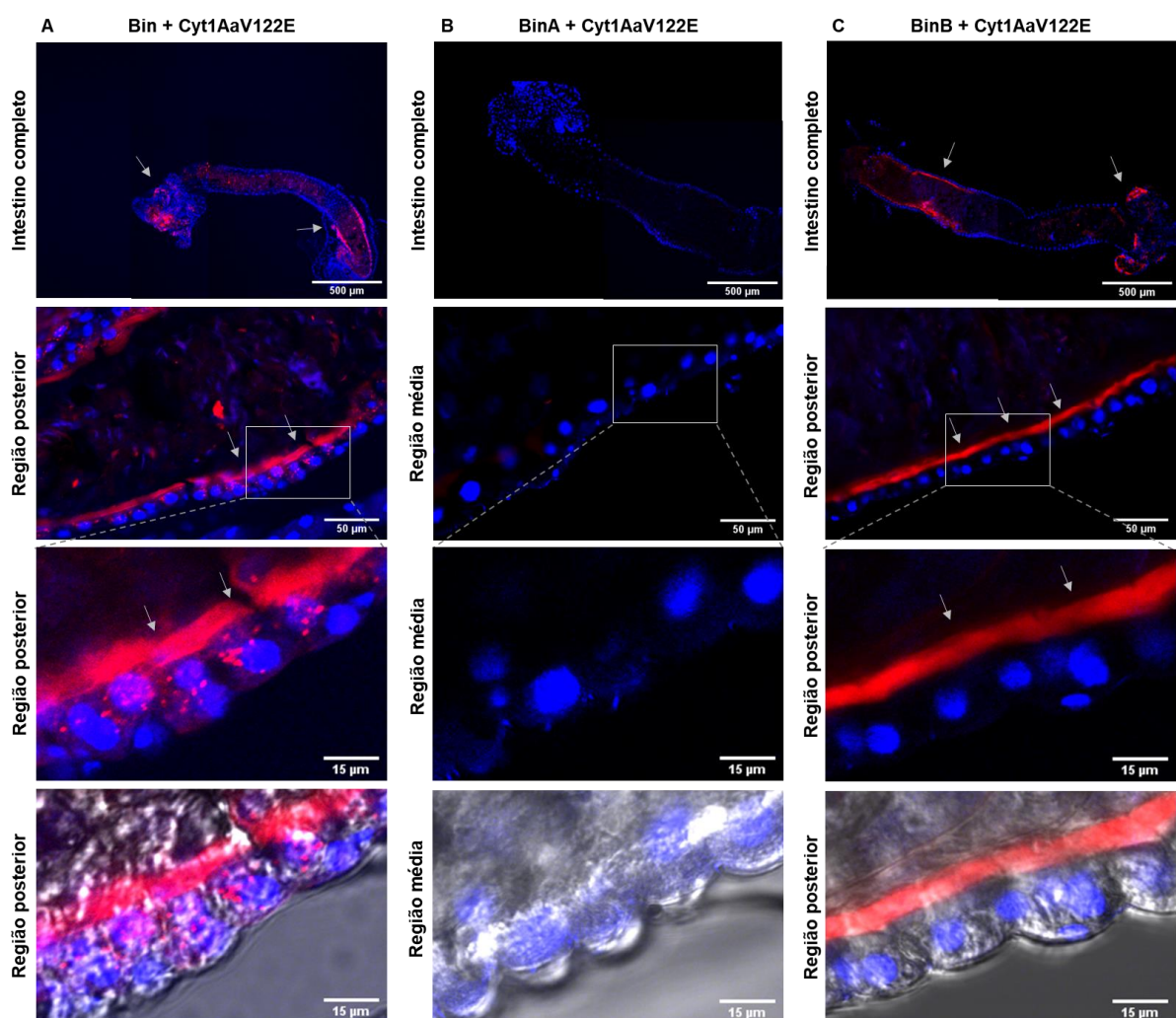
Fonte: A autora.

Legenda: As larvas foram alimentadas com 5 µg/ml de Bin-Alexa546 por 2h (A – CqR) e 12h (B – Aae) na presença de 1 µg/ml de Cyt1Aa. Em seguida, foram deixadas em água limpa sem toxina por 3h e então seus intestinos foram dissecados, fixados (paraformaldeído 4%, sacarose 5% em PBS pH 7.2) e montados em lâminas com Prolong® Diamond antifade contendo DAPI (núcleos em azul). A localização da proteína marcada com fluoróforo (vermelho) foi feita em microscópio confocal com varredura a laser. Imagens de microscopia de contraste de fase em conjunto com fluorescência estão mostradas ao final de cada painel.

Posteriormente, foi avaliada a localização subcelular da Bin na presença de cristais (não marcados) contendo a Cyt1AaV122E para investigar se a atividade de formação de poro está envolvida na internalização celular da Bin. Em larvas CqS, a toxina Bin, na presença da Cyt1AaV122E, foi detectada dentro de células dos cecos gástricos e da região posterior do intestino (Figura 25A), diferente do padrão de internalização na região anterior, a qual não apresenta receptores para a Bin, que foi observado na presença de Cyt1Aa (Figura 23A). A localização das subunidades BinA e BinB na presença de Cyt1AaV122E em larvas CqS também foi analisada. A subunidade BinA não foi internalizada nas células (Figura 25B),

enquanto a subunidade BinB foi detectada concentrada na membrana de células dos cecos gástricos e da região posterior do intestino (Figura 25C). Além disso, a toxina Bin, na presença da Cyt1AaV122E, não foi detectada nas células de larvas CqR (Figura 26A) nem de Aae (Figura 26B). Estes resultados em conjunto mostram que a toxina Cyt1Aa pode induzir a internalização da Bin e da BinA nas células desprovidas de receptores específicos possivelmente devido à sua capacidade de formação de poros.

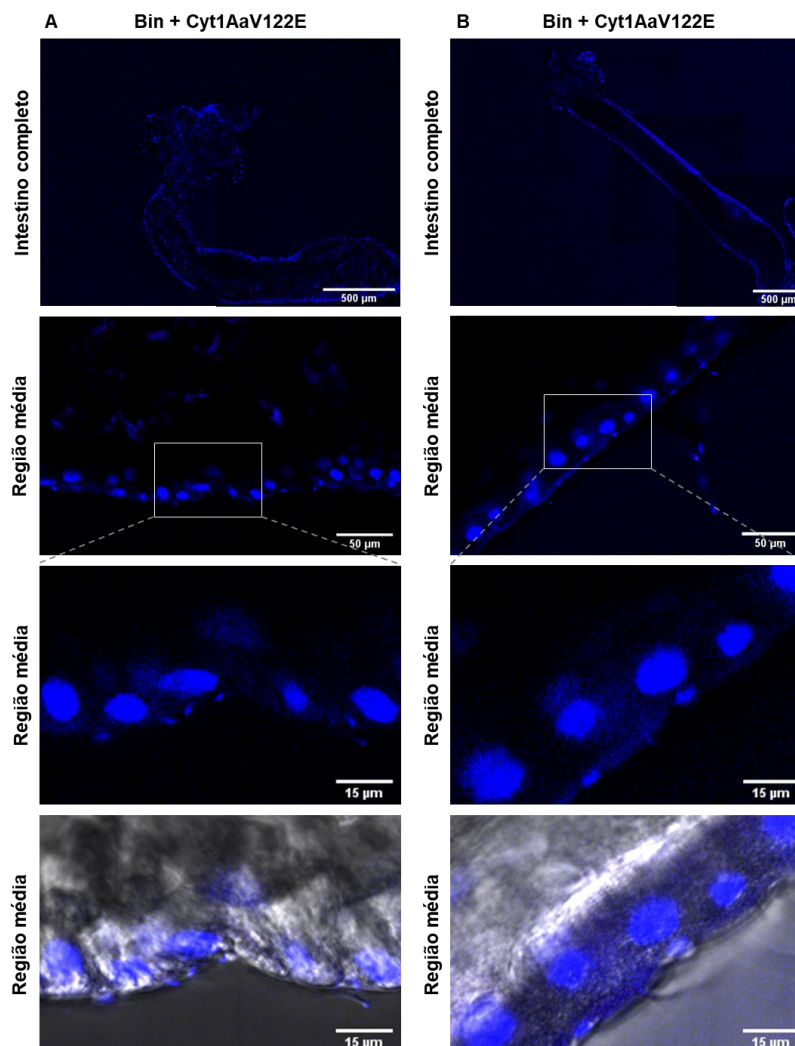
Figura 25 – Localização subcelular *in vivo* da toxina Bin e de suas subunidades BinA e BinB, na presença de Cyt1AaV122E, no intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis à Bin.



Fonte: A autora.

Legenda: As larvas foram alimentadas com 5 µg/ml de Bin-Alexa546 (A), BinA-Alexa546 (B), BinB-Alexa647 (C) na presença de 1 µg/ml de Cyt1AaV122E por 2h. Em seguida, foram deixadas em água limpa sem toxina por 3h e então seus intestinos foram dissecados, fixados (paraformaldeído 4%, sacarose 5% em PBS pH 7.2) e montados em lâminas com Prolong[®] Diamond antifade contendo DAPI (núcleos em azul). A localização da proteína marcada com fluoróforo (vermelho) foi feita em microscópio confocal com varredura a laser. As setas apontam a toxina marcada ligada ao epitélio intestinal ou internalizada nas células. Imagens de microscopia de contraste de fase em conjunto com fluorescência estão mostradas ao final de cada painel.

Figura 26 – Localização subcelular *in vivo* da toxina Bin, na presença de Cyt1AaV122E, no intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* resistentes à Bin e *Aedes aegypti*.



Fonte: A autora.

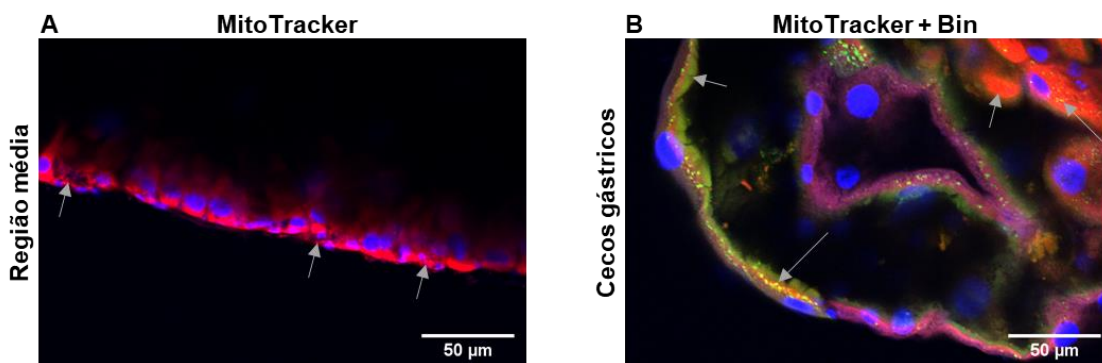
Legenda: As larvas foram alimentadas com 5 µg/ml de Bin-Alexa546 por 2h (A – CqR) e 12h (B – Aae) na presença de 1 µg/ml de Cyt1AaV122E. Em seguida, foram deixadas em água limpa sem toxina por 3h e então seus intestinos foram dissecados, fixados (paraformaldeído 4%, sacarose 5% em PBS pH 7.2) e montados em lâminas com Prolong® Diamond antifade contendo DAPI (núcleos em azul). A localização da proteína marcada com fluoróforo (vermelho) foi feita em microscópio confocal com varredura a laser. Imagens de microscopia de contraste de fase em conjunto com fluorescência estão mostradas ao final de cada painel.

8.8 Localização intracelular da toxina Bin e ativação da via de apoptose

Neste estudo, a localização da toxina Bin em duas estruturas celulares foi investigada utilizando marcadores de mitocôndrias e lisossomos com o intuito de observar uma colocalização da toxina Bin nestas organelas em células do intestino de larvas CqS. Estas organelas foram escolhidas devido à detecção de alterações ultraestruturais já relatadas na literatura (OPOTA *et al.*, 2011; TANGSONGCHAROEN *et al.*, 2015). Com relação às mitocôndrias, a marcação foi muito intensa, não permitindo a individualização da organela.

Na Figura 27A, as setas apontam pontos fluorescentes onde houve menor intensidade de marcação e melhor visualização das mitocôndrias. Na Figura 27B, as setas curtas apontam a marcação individual da toxina Bin (verde) e das mitocôndrias (vermelho), enquanto as setas longas apontam pontos fluorescentes amarelos que podem indicar a colocalização da Bin com as mitocôndrias. Com relação aos lisossomos, é possível visualizá-los através da observação de pontos fluorescentes indicados pelas setas na Figura 28A, apesar da observação de autofluorescência na imagem. Na Figura 28B, as setas curtas indicam a toxina Bin (verde) e os lisossomos (vermelho), já a seta mais longa destaca um ponto fluorescente amarelo que indica a colocalização da Bin com esta organela. Ainda assim, são necessários ajustes de tempo de incubação e concentração dos marcadores de organelas a fim de obter resultados com maior qualidade e especificidade para padronizar o padrão de cada marcador nas células. Em seguida, será possível avaliar se ocorre uma colocalização da toxina Bin com seus possíveis alvos intracelulares em indivíduos suscetíveis e, em seguida, investigar o padrão da Bin na presença da Cyt1Aa em indivíduos resistentes.

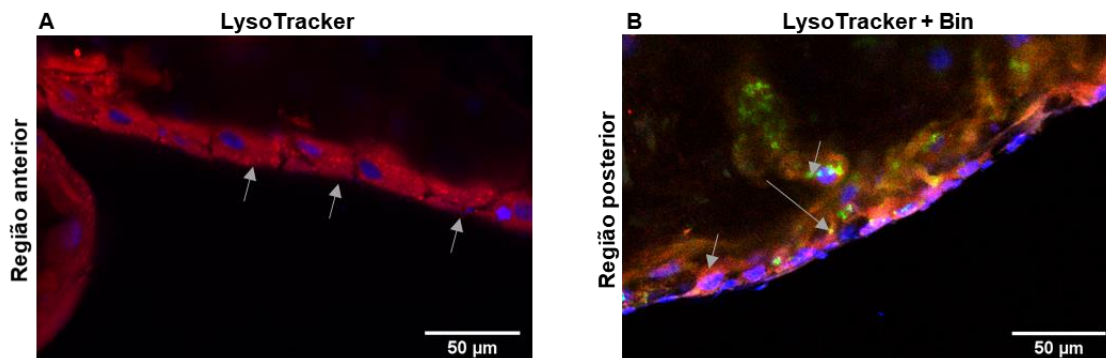
Figura 27 – Localização intracelular *in vivo* da toxina Bin e de mitocôndrias no intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis à Bin.



Fonte: A autora.

Legenda: As larvas foram alimentadas com 5 µg/mL de toxina Bin-Alexa546 (verde) por 2h TA. Em seguida, foram alimentadas por 2h com MitoTracker Deep Red-647 (vermelho) a 1 µM (Thermo Fisher Scientific). Então seus intestinos foram dissecados, fixados (paraformaldeído 4%, sacarose 5% em PBS pH 7.2) e montados em lâminas com Prolong® Diamond antifade contendo DAPI (núcleos em azul). A localização das proteínas marcadas com fluoróforo foi feita em microscópio confocal com varredura a laser. As setas curtas apontam a marcação individual da toxina Bin e da mitocôndria e as setas longas apontam uma possível colocalização entre a Bin e a organela.

Figura 28 – Localização intracelular *in vivo* da toxina Bin e de lisossomos no intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis à Bin.

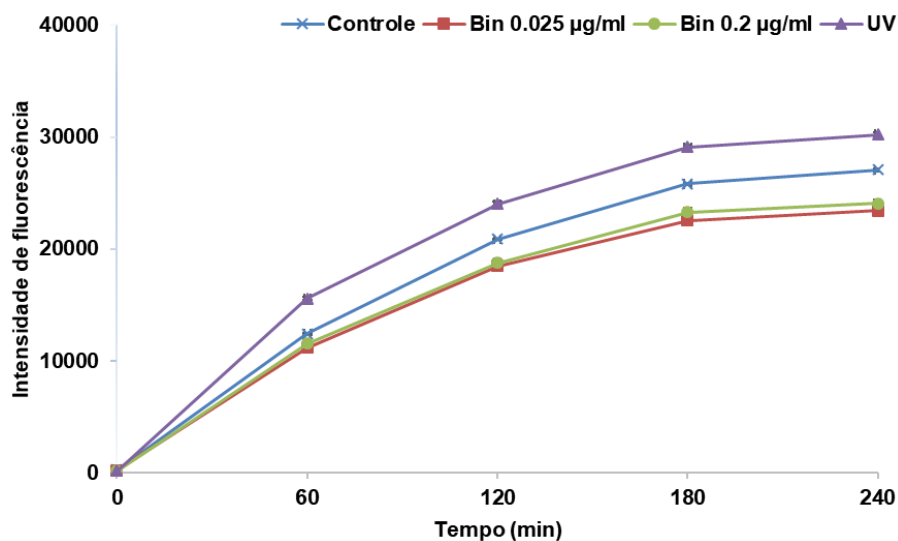


Fonte: A autora.

Legenda: As larvas foram alimentadas com 5 µg/mL de toxina Bin-Alexa546 (verde) por 2h TA. Em seguida, foram alimentadas por 2h com LysoTracker Deep Red-647 (vermelho) a 1 µM (Thermo Fisher Scientific). Então seus intestinos foram dissecados, fixados (paraformaldeído 4%, sacarose 5% em PBS pH 7.2) e montados em lâminas com Prolong® Diamond antifade contendo DAPI (núcleos em azul). A localização das proteínas marcadas com fluoróforo foi feita em microscópio confocal com varredura a laser. As setas curtas apontam a marcação individual da toxina Bin e do lisossomo e a seta longa aponta uma possível colocalização entre a Bin e a organela.

Outro importante aspecto no contexto do modo de ação da toxina Bin é avaliar se esta toxina é capaz de ativar a via de apoptose nas larvas estudadas, na ausência e na presença da toxina Cyt1Aa. Para tal, foi feita uma análise da atividade da Caspase-3 que está envolvida nesta via e é um dos principais fatores ativados em resposta ao mecanismo intrínseco de apoptose. Os experimentos foram feitos utilizando intestinos dissecados de larvas de *C. quinquefasciatus* suscetíveis expostas à toxina Bin, além do controle negativo sem nenhum tipo de exposição e do controle positivo de indução de apoptose utilizando larvas expostas à luz UV. Primeiramente, foi feita uma análise quantitativa através de um teste fluorimétrico com um substrato específico para a Caspase-3, a fim de medir a atividade desta Caspase. Entretanto, estes experimentos não forneceram dados consistentes visto que as respostas obtidas parecem ser inespecíficas. No caso, não foi possível determinar uma atividade diferencial entre as amostras de larvas expostas à toxina ou luz UV, comparada à atividade detectada para o controle negativo (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Atividade enzimática da Caspase-3 em amostras de intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis à Bin.

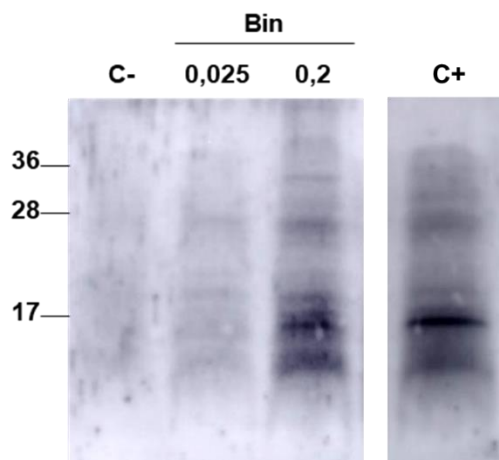


Fonte: A autora.

Legenda: As larvas foram expostas à toxina Bin (0,025 e 0,2 µg/mL), à luz ultravioleta (UV) por 30 min como controle positivo de apoptose e larvas sem nenhum tipo de exposição foram usadas como controle negativo. Os intestinos foram dissecados, macerados em tampão de lise celular, centrifugados e o sobrenadante foi recuperado. A atividade enzimática da Caspase-3 foi avaliada através da leitura da intensidade de fluorescência após a incubação do extrato protéico de intestino com o substrato DEVD-AFC usando o kit Caspase-3 Assay Kit (Abcam).

Em seguida, foi realizada uma análise qualitativa através da imunodeteção do maior fragmento (17 kDa) da Caspase-3 clivada pelo anticorpo *Cleaved Caspase-3* (Asp175) com amostras de larvas expostas à toxina Bin, controle negativo (larvas não expostas) e controle positivo de apoptose (larvas expostas à luz UV). As caspases são sintetizadas como um zimógeno (pró-enzima) e, após a sua clivagem proteolítica que ocorre durante a sua participação no processo de apoptose, são gerados dois fragmentos ativos denominados p12 e p17. A clivagem ocorre em um sítio específico e este anticorpo reconhece o maior fragmento (p17), clivado adjacente ao sítio Asp175 e que possui 17 kDa. A imunodeteção demonstrou que nas amostras de larvas expostas à Bin na dose mais alta (amostra teste) e expostas à UV (controle positivo) foi possível visualizar uma banda de maior intensidade e com um peso aproximado de 17 kDa que corresponde ao maior fragmento da Caspase-3 clivada (Figura 29). Estes dados indicam, de forma preliminar, a ativação de apoptose em larvas tratadas pela toxina Bin. Entretanto, mais análises são necessárias para observação da ativação de apoptose, incluindo análises de larvas resistentes expostas à Bin na presença e ausência de Cyt1Aa.

Figura 29 – Imunodeteção do maior fragmento da Caspase-3 clivada em amostras de intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus* suscetíveis expostas à toxina Bin.



Fonte: A autora.

Legenda: As larvas foram expostas à toxina Bin (0,025 e 0,2 $\mu\text{g/mL}$), à luz ultravioleta por 30 min como controle positivo de apoptose (C+) e larvas sem nenhum tipo de exposição foram usadas como controle negativo (C-). Os intestinos foram dissecados, macerados em tampão de lise celular, centrifugados e o sobrenadante foi recuperado. Os extratos protéicos foram separados eletroforeticamente, transferidos para membrana de PVDF e imunodetectados com o anticorpo anti-caspase 3 (*Cleaved Caspase-3 Asp175*, Cell Signaling Technology). O marcador de peso molecular (kDa) está à esquerda.

9 DISCUSSÃO

Os larvicidas biológicos produzidos a partir de bactérias entomopatógenas como *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) vem sendo utilizados com sucesso para o controle de populações de insetos vetoras de patógenos (LACEY, 2007). Mais recentemente, larvicidas biológicos combinados contendo cristais inseticidas de Lsp e Bti têm apresentado resultados promissores para o controle simultâneo de populações de *Culex*, *Anopheles* e *Aedes* em áreas urbanas de regiões endêmicas (AFRANE *et al.*, 2016; CETIN *et al.*, 2015; FONTOURA *et al.*, 2019; IBAÑEZ-JUSTICIA *et al.*, 2018; KAHINDI *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018). Neste estudo, foi avaliada a eficácia de um produto combinado para larvas de duas colônias resistentes/refratárias à toxina Bin isolada, comparada às larvas suscetíveis, sob condições controladas de laboratório. A avaliação deste produto comprovou a sua eficácia mostrando uma alta mortalidade para larvas das três colônias, dotadas ou não de receptores específicos para a toxina Bin, que é um dos ingredientes ativos mais tóxico do produto. Este resultado corrobora dados da literatura que recomendam o uso de larvicidas biológicos combinados como uma estratégia para o controle simultâneo de diferentes espécies que co-habitam criadouros, trazendo vantagens em relação à facilidade operacional e à redução do risco de seleção de resistência (ANDERSON *et al.*, 2011; DRITZ *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2019).

Apesar das vantagens do uso de misturas de toxinas, é extremamente importante investigar o seu modo de ação para compreender se há risco em seu uso para evitar o surgimento de consequências indesejadas. No estudo de Raymond *et al.* (2013), por exemplo, foi observado que o uso de misturas de toxinas de Bt para *Plutella xylostella* não foi associado a uma redução significativa na evolução da resistência à toxina Cry1. Esse tipo de investigação é essencial, por exemplo, no campo do controle de insetos-praga de importância agrícola que já adota a estratégia de plantas transgênicas que expressam diferentes toxinas para o controle de pragas com o intuito de minimizar o potencial de seleção de resistência (CARRIÈRE; CRICKMORE; TABASHNIK, 2015; WEI; ZHANG; AN, 2019). A combinação de toxinas é uma abordagem eficaz neste sentido mas também está sujeita a limitações. Já foi reportada a resistência em campo do lepidóptero *Helicoverpa zea* a um milho transgênico expressando várias toxinas Cry (KAUR *et al.*, 2019). Outro problema foi detectado em plantas de algodão transgênicas que, durante o envelhecimento, podem sofrer um declínio na concentração de toxinas Cry e consequentemente favorecer a seleção de alelo

de resistência em *H. zea* devido à exposição dos insetos a doses subletais (CARRIÈRE *et al.*, 2019).

Os produtos combinados à base de Bti e Lsp contêm um complexo de cinco toxinas, e estudos prévios mostraram que a mistura de duas destas toxinas, a Bin do Lsp e Cyt1Aa do Bti, são suficientes para exibir atividade larvicida para *C. quinquefasciatus* resistente à Bin e para *Ae. aegypti*, demonstrando a habilidade destas toxinas de atuarem em sinergia em indivíduos desprovidos de receptores específicos para a Bin (WIRTH; FEDERICI; WALTON, 2000; WIRTH; WALTON; FEDERICI, 2000). Entretanto, o mecanismo molecular de ação destas duas toxinas atuando em conjunto é desconhecido, sendo o principal objetivo deste trabalho. Este estudo confirmou que a toxina Bin apresenta alta toxicidade apenas para larvas suscetíveis e as subunidades BinA e BinB individuais não apresentam toxicidade, apenas quando administradas em conjunto corroborando dados da literatura (NICOLAS *et al.*, 1993). Com relação à Cyt1Aa, foi observada uma baixa toxicidade *in vivo* para as larvas das três colônias estudadas, devido à sua ação inespecífica. Enquanto as misturas da toxina Bin, ou de sua subunidade BinA, com a toxina Cyt1Aa apresentou atividade tóxica *in vivo* também para larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes à Bin e de *Ae. aegypti*, demonstrando que a toxina Cyt1Aa sinergiza a toxina Bin. Adicionalmente, a ausência de atividade tóxica da mistura BinB-Cyt1Aa comprova a função da BinB de atuar apenas na interação com o receptor específico presente no epitélio intestinal (CHARLES *et al.*, 1997).

Assim, a avaliação da atividade larvicida *in vivo* comprovou que a toxina Cyt1Aa pode sinergizar a ação da toxina Bin em larvas resistentes estudadas e este mecanismo foi investigado neste trabalho. Estudos prévios que associaram a ação da toxina Bin em larvas resistentes com a entrada da Bin em células do intestino desprovidas de receptores, na presença da toxina Cyt1Aa (FEDERICI *et al.*, 2003), também deram sustentação a esta hipótese. Além disso, houve embasamento a partir do sinergismo já conhecido da toxina Cyt1Aa com as toxinas Cry11Aa e Cry4Ba do Bti, no qual a toxina Cyt1Aa atua como receptor para estas toxinas Cry, ocorrendo uma ligação específica entre elas, que é uma condição necessária para ocorrer o sinergismo (CANTÓN *et al.*, 2011; PÉREZ *et al.*, 2005).

Portanto, neste trabalho, foi inicialmente hipotetizado que a toxina Cyt1Aa também poderia atuar como receptor para a toxina Bin em indivíduos cujas células do epitélio intestinal são desprovidas do receptor específico, havendo uma ligação entre elas como observado no modelo de sinergia anterior. No entanto, a ligação específica entre Cyt1Aa com Bin, ou com suas subunidades BinA e BinB, não foi detectada a partir de ensaios *in vitro*,

realizados para obter evidências experimentais da interação direta entre as toxinas. Os ensaios de ligação da toxina Bin com amostras do epitélio intestinal de larvas resistentes, previamente incubadas com a toxina Cyt1Aa, também demonstraram a ausência da toxina Bin nestas amostras. O resultado mostra que a toxina Bin não pode ligar-se ao epitélio desprovido de receptores e também não tem habilidade de ligar-se à toxina Cyt1Aa que já está comprovadamente ligada ao epitélio destas larvas. Estes dados sugerem fortemente que a toxina Cyt1Aa, portanto, não poderia atuar como receptor da toxina Bin. Portanto, os experimentos de interação direta entre as toxinas Bin (BinA e BinB) e Cyt1Aa demonstraram que elas não se ligam especificamente e, nos ensaios de interação com epitélio intestinal, a Bin não se colocou com a Cyt1Aa. Assim, pode-se concluir a partir das condições experimentais testadas, que os efeitos tóxicos provocados pela mistura destas toxinas não dependem da interação entre elas, sugerindo que ocorre um mecanismo de ação diferente da hipótese inicial do trabalho.

A partir destes resultados, foi formulada uma nova hipótese para elucidar o modo de sinergismo entre as toxinas Bin e Cyt1Aa, baseado na sua conhecida habilidade de formação de poros (SOBERÓN; LÓPEZ-DÍAZ; BRAVO, 2013). Para tal, foi utilizada uma toxina mutante, Cyt1AaV122E, que é deficiente na atividade de formação de poro devido a defeitos na oligomerização e inserção na membrana epitelial. Estudos prévios demonstraram que esta toxina mutante não apresenta toxicidade para larvas de *Ae. aegypti*, entretanto permanece capaz de sinergizar a atividade tóxica da Cry11Aa (LÓPEZ-DÍAZ *et al.*, 2013). Inicialmente, para avaliar esta nova hipótese, foram realizados bioensaios para avaliar a atividade *in vivo* de misturas das toxinas Bin e Cyt1AaV122E. Foi observado que, a mistura da Bin com a mutante Cyt1AaV122E não exibiu atividade larvicida para indivíduos resistentes. Estes dados de atividade *in vivo* indicam que apenas a toxina Cyt1Aa selvagem no seu estado funcional é capaz de sinergizar a ação da Bin. Este resultado difere do mecanismo de sinergismo entre as toxinas Cyt1Aa e Cry11Aa, no qual a Cyt1AaV122E ainda é capaz de potencializar a toxicidade da Cry11Aa (LÓPEZ-DÍAZ *et al.*, 2013). Além disso, estes dados sugerem que o sinergismo entre as toxinas Bin e Cyt1Aa é dependente da atividade de formação de poro da toxina Cyt1Aa.

Os estudos de localização subcelular, realizados através de microscopia confocal com toxinas marcadas com fluoróforo, corroboraram os dados de atividade *in vivo* e *in vitro*, além de fornecerem evidências para elucidar o mecanismo de sinergia entre as toxinas. Quando larvas de *C. quinquefasciatus* suscetíveis, usadas como controle positivo, foram tratadas com a toxina Bin marcada, esta foi encontrada na superfície dos cecos gástricos e na

região posterior do intestino (devido à subunidade BinB) e internalizada nas células destas regiões (devido à interação BinA-BinB), o que corrobora o padrão de localização esperado da toxina Bin e suas subunidades (CHARLES *et al.*, 1997; LEKAKARN; PROMDONKOY; BOONSERM, 2015; SILVA-FILHA; PEIXOTO, 2003). Após o tratamento de larvas suscetíveis com as subunidades individuais marcadas, foi observado que a BinB estava fortemente localizada na superfície celular destas duas regiões do intestino, enquanto a BinA não foi detectada dentro das células. Estes dados demonstram que a subunidade BinA necessita estar ligada à BinB, que por sua vez tem a função de interagir com os receptores específicos do epitélio, e estas etapas levam à internalização de ambas as subunidades nas células, como indicado previamente em estudos de localização subcelular e funcionalidade (LEKAKARN; PROMDONKOY; BOONSERM, 2015; OPOTA *et al.*, 2011; SILVA-FILHA; PEIXOTO, 2003).

Nas larvas de *C. quinquefasciatus* suscetíveis à Bin, a localização subcelular da toxina Cyt1Aa também foi avaliada. Esta foi encontrada ao longo de todo o epitélio intestinal, corroborando a sua inespecificidade de interação devido à ligação direta com fosfolipídeos presentes na bicamada lipídica (BRAVO *et al.*, 2011; THOMAS; ELLAR, 1983). A toxina Cyt1Aa selvagem foi encontrada dentro de células da região anterior do intestino, enquanto que a mutante Cyt1AaV122E não foi detectada internalizada nas células. O padrão de localização da mutante corrobora a ausência de toxicidade observada nos ensaios *in vivo* deste estudo e da literatura, e também sugere que esta toxina não tem capacidade de formação de poros na membrana celular, tal como a toxina selvagem (LÓPEZ-DIAZ *et al.*, 2013).

O sinergismo entre as toxinas Bin e Cyt1Aa em larvas de colônias de *C. quinquefasciatus* resistente à Bin e de *Ae. aegypti*, refratário natural à Bin também foi avaliado a partir da localização subcelular da toxinas. O tratamento destas larvas com a Bin individual marcada não mostrou interação desta toxina com as células do intestino, enquanto o tratamento da mistura de Bin com Cyt1Aa mostrou a localização da Bin, sendo esta encontrada no citoplasma de células das regiões anterior e média do intestino. Quando estes insetos resistentes foram tratados com a mistura da Bin com a mutante Cyt1AaV122E, a internalização da Bin não foi observada, indicando a necessidade da funcionalidade da Cyt1Aa, possivelmente em relação à sua atividade de formação de poro, para a internalização da toxina Bin nas células do epitélio intestinal de indivíduos resistentes.

O nosso estudo produziu evidências relevantes para a compreensão do mecanismo de sinergia entre as toxinas Bin e Cyt1Aa. Primeiramente, foi demonstrado que a toxina Cyt1Aa é capaz de superar a resistência à toxina Bin devido a falhas na expressão do seu receptor, em

razão da atividade *in vivo* detectada para as larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes e de *Ae. aegypti*. Ademais, demonstramos também que a Cyt1Aa facilita a internalização da toxina Bin em duas colônias resistentes, que corrobora dados obtidos com outras linhagens avaliadas anteriormente (FEDERICI *et al.*, 2003). Os estudos mostram pela primeira vez que a internalização promovida através da Cyt1Aa pode ocorrer em regiões adicionais do intestino, comparado ao padrão esperado da toxina Bin em indivíduos suscetíveis (CHARLES *et al.*, 1997; LEKAKARN; PROMDONKOY; BOONSERM, 2015; SILVA-FILHA; PEIXOTO, 2003). Este resultado comprova que o fenômeno está desvinculado à disponibilidade de receptores que ocorrem em regiões específicas. Quando larvas suscetíveis foram tratadas com uma mistura da toxina Bin, ou da subunidade BinA, com a toxina Cyt1Aa, elas foram encontradas dentro das células nas regiões anterior e média do intestino, ao invés de estarem localizadas apenas nos cecos gástricos e na região posterior, que são conhecidas pela presença dos receptores Cqm1 (DAVIDSON, 1988, 1989). É importante ressaltar que após o tratamento de larvas suscetíveis com a mistura de BinB e Cyt1Aa, a presença da subunidade BinB dentro das células foi muito menos evidente em relação à BinA, sendo a BinB encontrada principalmente na superfícies das células. Isso ocorre provavelmente devido à alta afinidade de ligação entre a BinB e seu receptor promovendo uma concentração da BinB na membrana celular onde estão localizados os receptores (CHARLES *et al.*, 1997; ROMÃO; DE-MELO-NETO; SILVA-FILHA, 2011; SINGKHAMANAN *et al.*, 2013), o que pode reduzir a sua potencial detecção dentro das células.

Neste trabalho, também foi demonstrado a toxicidade da mistura BinA-Cyt1Aa em larvas suscetíveis e resistentes à Bin, a qual está associada com a internalização da BinA em células do epitélio intestinal e é independente da interação BinB-receptor. Estes dados são concordantes com a atividade *in vivo* de uma proteína quimérica recombinante formada pelas toxinas BinA e Cyt1Aa para larvas de *C. quinquefasciatus* suscetíveis e resistentes à Bin e de *Ae. aegypti*, que mostram que o acesso da BinA ao citoplasma é suficiente para causar mortalidade (BIDESHI *et al.*, 2017). Os resultados do nosso trabalho indicam que a entrada da BinA na célula, possivelmente devido à formação de poro pela toxina Cyt1Aa, é suficiente para provocar a mortalidade e, portanto, para superar falhas relacionadas à etapa de interação específica BinB-receptor (CHARLES *et al.*, 1997; ROMÃO; DE-MELO-NETO; SILVA-FILHA, 2011; SINGKHAMANAN *et al.*, 2013; SRISUCHARITPANIT *et al.*, 2014). Isto apresenta um impacto significativo visto que indivíduos resistentes à toxina Bin devido à ausência de receptores apresentam elevados níveis de resistência, sendo o principal

mecanismo reportado (CHALEGRE *et al.*, 2012; DARBOUX *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2013; NIELSEN-LEROUX *et al.*, 1995, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

O mecanismo pelo qual a BinA atua em alvos intracelulares levando à morte larval possivelmente envolve os processos de autofagia e apoptose (OPOTA *et al.*, 2011; TANGSONGCHAROEN *et al.*, 2015), entretanto mais estudos são requeridos. Trabalhos anteriores forneceram evidências de que as duas subunidades, BinA e BinB, são detectadas dentro das células (LEKAKARN; PROMDONKOY; BOONSERM, 2015; OPOTA *et al.*, 2011; SILVA-FILHA; PEIXOTO, 2003), mas a ação intracelular bem como as organelas alvo destas subunidades permanecem não esclarecidas, em particular da subunidade BinB. Nossos dados corroboram outros estudos que determinaram o papel funcional das subunidades da Bin, mas também revelam que a BinA pode provocar mortalidade, sinergizada pela Cyt1Aa que permite sua internalização, independente de uma prévia interação com a BinB. Dados do nosso estudo também sugerem que a entrada da BinB na célula possivelmente não apresenta contribuição relevante para a toxicidade, mas este aspecto necessita de mais estudos. É interessante ainda notar, ao analisar os dados de toxicidade deste trabalho, que a ação da toxina Bin mediada pela interação BinB-receptor é mais eficiente que a sinergia entre a BinA e a Cyt1Aa. Assim, o complexo BinB-receptor na superfície da célula possivelmente tem um papel relevante para a toxicidade alcançada.

Um estudo recente do papel funcional da subunidade BinA revelou que ela pode interagir com glicoproteínas da membrana celular, ligando-se à subunidade BinB e também ao receptor Cqm1 (e sua âncora GPI) (SHARMA; GUPTA; KUMAR, 2018b). Entretanto, o papel funcional desta ligação BinA-Cqm1 ainda é desconhecido e possivelmente não exerce um impacto para sua internalização. Por outro lado, este estudo aponta que a citotoxicidade da BinA está associada com processos bioquímicos intracelulares que envolvem proteínas glicosiladas funcionalmente críticas e importantes para o desenvolvimento das larvas, visto que os glicoconjugados apresentam um papel extremamente importante em processos metabólicos, estruturais e biológicos (MÄRZ *et al.*, 1995; VARKI, 2017).

Neste contexto, aprofundar a investigação do mecanismo pelo qual as toxinas provocam a mortalidade dos insetos é outro aspecto relevante acerca do modo de ação das toxinas inseticidas. Estudos realizados com uma linhagem celular de mamíferos (MDCK), que expressavam o receptor Cpml, ortólogo do receptor Cqm1 em *Culex pipiens*, mostrou que em células tratadas com a toxina Bin houve vacuolização citoplasmática e indução de autofagia (OPOTA *et al.*, 2011). Sabe-se também que a toxina Bin pode induzir apoptose em larvas de *C. quinquefasciatus* através da ativação da Caspase-9 e Caspase-3, que levam à fragmentação

do DNA e indução da cascata da via de apoptose. Além disso, também foram observadas alterações ultraestruturais principalmente em mitocôndrias (TANGSONGCHAROEN *et al.*, 2015), corroborando a potencial colocalização da Bin com esta organela observada no nosso estudo, embora uma avaliação mais aprofundada seja necessária para confirmar este resultado. Em uma análise do transcriptoma de larvas de *C. quinquefasciatus* expostas e não expostas à Bin, foi observado que a Bin induziu uma resposta transcricional relacionada à autofagia e apoptose (TANGSONGCHAROEN *et al.*, 2017). Uma outra análise de comparação transcricional entre larvas de *C. quinquefasciatus* suscetíveis e resistentes à Bin mostraram um padrão de expressão diferencial significativa de genes de caspases e outros envolvidos na via de apoptose e em vias de replicação e reparo de danos ao DNA mostrando o seu envolvimento no modo de ação da toxina Bin (REZENDE *et al.*, 2019). No nosso trabalho, foram obtidos resultados indicativos de indução de apoptose após exposição das larvas suscetíveis à toxina Bin. Entretanto, mais estudos são requeridos para avaliar o mecanismo de morte celular decorrente da intoxicação de larvas de *C. quinquefasciatus* com a Bin, e sua comparação com o mecanismo causado pela mistura de toxinas Bin e Cyt1Aa no intestino de larvas desprovidas de receptor. Este é um elemento chave para a compreensão da ação molecular das toxinas nas larvas e de suas vantagens e limitações.

A principal contribuição deste trabalho é o mecanismo inédito de sinergia entre as toxinas Bin e Cyt1Aa, relacionado à atividade de formação de poro da Cyt1Aa. O modelo é distinto do mecanismo de sinergia já descrito na literatura entre a Cyt1Aa e toxinas Cry do cristal do Bti (CANTÓN *et al.*, 2011; PÉREZ *et al.*, 2005, 2007), que por sua vez não tem correlação com a habilidade de formação de poro da Cyt1Aa (FERNANDEZ-LUNA *et al.*, 2010; LÓPEZ-DIAZ *et al.*, 2013). Por este motivo, os dados do nosso estudo mostram que a Cyt1Aa sinergiza a toxina Bin, uma toxina larvicida não relacionada à Cyt1Aa, através de um novo mecanismo que não envolve interação específica entre elas, mas sim um transporte da toxina Bin para as células, possivelmente facilitado pela atividade de formação de poro da Cyt1Aa. A compreensão do mecanismo de ação molecular da sinergia entre estas toxinas é de extrema importância para o uso racional destas toxinas microbianas para o controle de insetos vetores.

10 CONCLUSÕES

- a) Produtos combinados à base de *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) são eficazes para larvas resistentes ou refratárias ao Lsp, superando a ausência de receptores para a toxina Bin;
- b) A toxina Cyt1Aa tem a capacidade de sinergizar ação da toxina Bin para larvas resistentes ou refratárias à Bin;
- c) A Cyt1Aa não sinergiza a toxina Bin atuando como seu receptor e a ação entre elas não depende de interação específica;
- d) O mecanismo de sinergismo entre as toxinas Bin e Cyt1Aa é inédito e depende da atividade de formação de poro da Cyt1Aa, que permite a internalização da Bin;
- e) O modo de ação da toxina Bin parece ativar a via de apoptose em vista do perfil de atividade da Caspase-3 em larvas de *Culex quinquefasciatus* tratadas.

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 Biochemistry**, London, v. 7, n. 16, p. 1–6, 2006.
- ACHEE, N. L. *et al.* A critical assessment of vector control for dengue prevention. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. 1–19, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003655>. Acesso em: 5 jan. 2018.
- AFRANE, Y. A. *et al.* Evaluation of long-lasting microbial larvicide for malaria vector control in Kenya. **Malaria Journal**, London, v. 15, p. 1–9, 2016.
- AHMED, I. *et al.* Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 57, n. 5, p. 1117–1125, 2007.
- AL-YAHYAE, S. A. S.; ELLAR, D. J. Maximal toxicity of cloned CytA d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* requires proteolytic processing from both the N- and C- termini. **Microbiology**, Reading, v. 141, p. 3141–3148, 1995.
- ALBUQUERQUE, M. de F. P. M.; BRAGA, C.; LYRA, T. M. **Filariose no Recife: indicador de pobreza e desigualdade social**. Disponível em: <http://dssbr.org/site/opinioes/filariose-no-recife-indicador-de-pobreza-e-desigualdade-social-urbana/>. Acesso em: 9 jul. 2019.
- ANDERSON, J. F. *et al.* Control of mosquitoes in catch basins in Connecticut with *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Bacillus sphaericus* and spinosad. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 27, n. 1, p. 45–55, 2011.
- ARAÚJO, A. P. *et al.* The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. **Parasites & Vectors**, London, v. 6, n. 297, p. 1–9, 2013.
- ARAÚJO, T. V. B. *et al.* Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. 12, p. 1356–1363, 2016.
- AROONKESORN, A. *et al.* Two specific membrane-bound aminopeptidase N isoforms from *Aedes aegypti* larvae serve as functional receptors for the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin implicating counterpart specificity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 461, n. 2, p. 300–306, 2015.
- AYRES, C. F. J. *et al.* Zika virus detection, isolation and genome sequencing through Culicidae sampling during the epidemic in Vitória, Espírito Santo, Brazil. **Parasites & Vectors**, London, v. 12, n. 220, p. 1–9, 2019.

BARBAZAN, P. *et al.* Control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) with *Bacillus sphaericus* in Maroua, Cameroon. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 13, n. 3, p. 263-269, 1997.

BARRERA, R. *et al.* Integrated vector control of *Aedes aegypti* mosquitoes around target houses. **Parasites & Vectors**, London, v. 11, n. 88, p. 1–8, 2018.

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. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 5, p. 2045–2050, 1988.

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

BECKER, N.; LUDWIG, M.; SU, T. Lack of resistance in *Aedes vexans* field populations after 36 years of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* applications in the Upper Rhine Valley, Germany. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 34, n. 2, p. 154–157, 2018.

BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. **Toxins**, Basel, v. 6, p. 1222–1243, 2014.

BERENGER, J.-M.; PAROLA, P. 12 – Arthropod Vectors of Medical Importance. In: COHEN, J.; POWDERLY, W. G.; OPAL, S. M. **Infectious diseases**. 4 ed. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2017. p. 104-112.

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

BERRY, C. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 109, p. 1–10, 2012.

BIDESHI, D. K. *et al.* Intermolecular interaction between Cry2Aa and Cyt1Aa and its effect on larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 23, n. 8, p. 1107–1115, 2013.

_____. Highly effective broad spectrum chimeric larvicide that targets vector mosquitoes using a lipophilic protein. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 3–9, 2017.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília: Ministério da Saúde, v. 50, n. 22, set. 2019. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/11/BE-arbovirose-22.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2019.

BOONSERM, P. *et al.* Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 348, n. 2, p. 363–382, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRANDÃO, E. *et al.* Lymphatic filariasis among children and adolescents: Spatial identification via socio-environmental indicators to define priority areas for elimination. **International Health**, Oxford, v. 7, p. 324–331, 2015.

BRAVO, A. *et al.* Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, Amsterdam, v. 1667, p. 38–46, 2004.

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, p. 423–435, 2007.

BRAVO, A. *et al.* *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 41, n. 7, p. 423–431, 2011.

BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 6, p. 1333–1337, 1987.

BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 5, p. 2415–2422, 2003.

CANTÓN, P. E. *et al.* Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. **Peptides**, New York, v. 32, n. 3, p. 595–600, 2011.

CARRIÈRE, Y.; CRICKMORE, N.; TABASHNIK, B. E. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology**, New York, v. 33, p. 161–168, 2015.

CARRIÈRE, Y. *et al.* Seasonal declines in Cry1Ac and Cry2Ab concentration in maturing cotton favor faster evolution of resistance to pyramided Bt Cotton in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 112, n. 6, p. 1–8, 2019.

CARVALHO, K. S. *et al.* Long-term exposure of *Aedes aegypti* to *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* did not involve altered susceptibility to this microbial larvicide or to other control agents. **Parasites & Vectors**, London, v. 11, n. 673, p. 1–11, 2018.

CARVALHO, F. D.; MOREIRA, L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so successful as a species? **Neotropical Entomology**, Dordrecht, v. 46, n. 3, p. 243–255, 2017.

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). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, p. 493–498, 2004.

CETIN, H. *et al.* Operational evaluation of Vectomax Wsp (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* + *Bacillus sphaericus*) against larval *Culex pipiens* in septic tanks. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 31, n. 2, p. 193–195, 2015.

CHALEGRE, K. D. M. *et al.* Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1044–1049, 2009.

_____. Novel mutations associated with resistance to *Bacillus sphaericus* in a polymorphic region of the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* gene. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 17, p. 6321–6326, 2012.

_____. Co-selection and replacement of resistance alleles to *Lysinibacillus sphaericus* in a *Culex quinquefasciatus* colony. **FEBS Journal**, Oxford, v. 282, p. 3592–3602, 2015.

CHAREONVIRIYAPHAP, T. *et al.* Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. **Parasites & Vectors**, London, v. 6, n. 1, n. 280, p. 1-28, 2013.

CHARLES, J. F.; DE BARJAC, H. Electron microscope study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sporulation and crystal biogenesis. **Annales de Microbiologie**, Paris, v. 133, n. 3, p. 425-442, 1982.

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 Microbiology Letters**, Oxford, v. 156, p. 153–159, 1997.

CHEN, J. *et al.* Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 39, n. 10, p. 688–696, 2009a.

_____. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Biochemical Journal**, London, v. 424, n. 2, p. 191–200, 2009b.

_____. A 104kDa *Aedes aegypti* aminopeptidase N is a putative receptor for the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 43, n. 12, p. 1201–1208, 2013.

CHEN, J.; AIMANOVA, K.; GILL, S. S. Functional characterization of *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 involved in the toxicity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *jegathesan*. **Peptides**, New York, v. 98, p. 78–85, 2017.

CLEMENTS, A. N. **The Biology of Mosquitoes: Development, nutrition and reproduction**. 1. ed. Oxford: CABI, 1992.

COHEN, S. *et al.* Cyt1Aa toxin: Crystal structure reveals implications for its membrane-perforating function. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 413, p. 804–814, 2011.

COLLETIER, J. P. *et al.* *De novo* phasing with X-ray laser reveals mosquito larvicide BinAB structure. **Nature**, London, v. 539, p. 43–47, 2016.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994.

CRICKMORE, N. *et al.* Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 131, p. 249–254, 1995.

_____. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 807–813, 1998.

_____. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Lewes, 2018. Disponível em: <http://www.btnomenclature.info/>. Acesso em: 29 jan. 2020.

DARBOUX, I. *et al.* The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: Molecular cloning and expression. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 31, p. 981–990, 2001.

_____. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 9, p. 5830–5835, 2002.

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

DAVIDSON, E. W. Microbiology, pathology and genetics of *Bacillus sphaericus*: biological aspects which are important to field use. **Mosquito News**, Albany, v. 44, n. 2, p. 147–152, 1984.

_____. Binding of the *Bacillus sphaericus* (Eubacteriales: Bacillaceae) toxin to midgut cells of mosquito (Diptera: Culicidae) larvae: relationship to host range. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 25, n. 3, p. 151–157, 1988.

_____. Variation in binding of *Bacillus sphaericus* toxin and wheat germ agglutinin to larval midgut cells of six species of mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 53, p. 251–259, 1989.

DE BARJAC, H. A new variety of *Bacillus thuringiensis* very toxic to mosquitoes: *B. thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D: Sciences naturelles**, Paris, v. 286, n. 10, p. 797–800, 1978.

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

DECHKLAR, M. *et al.* Functional expression in insect cells of glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: A *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 41, p. 159–166, 2011.

DESPRÉS, L.; CHRISTOPHE, L.; ROGER, F. Using the bio-insecticide *Bacillus thuringiensis israelensis* in mosquito control. *In: STOYCHEVA, M. Pesticides in the Modern World – Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*. London: IntechOpen, 2011. p. 93–126.

DÍAZ-NIETO, L. M. *et al.* Genetic evidence of expansion by passive transport of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in Eastern Argentina. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 9, p. 1-6, 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004839>. Acesso em: 2 jan. 2018.

DOBROKHOTOV, B. Alternatives to chemical methods for vector control. **Annales De La Societe Belge De Medecine Tropicale**, Bruxelles, v. 71, n. 1, p. 27–33, 1991.

DRITZ, D. A *et al.* Control of mosquito larvae in seasonal wetlands on a wildlife refuge using VectoMax CG. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 27, n. 4, p. 398–403, 2011.

ELANGOVAN, G. *et al.* Identification of the functional site in the mosquito larvicidal binary toxin of *Bacillus sphaericus* 1593M by site-directed mutagenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 276, n. 3, p. 1048–1055, 2000.

ELIZONDO-QUIROGA, D. *et al.* Zika Virus in salivary glands of five different species of wild-caught mosquitoes from Mexico. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 809, p. 1–7, 2018.

ELLEUCH, J. *et al.* Cry4Ba and Cyt1Aa proteins from *Bacillus thuringiensis israelensis*: Interactions and toxicity mechanism against *Aedes aegypti*. **Toxicon**, Oxford, v. 104, p. 83–90, 2015.

EPELBOIN, Y. *et al.* Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, p. 1-22, 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005933>. Acesso em: 2 jan. 2018.

FARAJOLLAHI, A. *et al.* “Bird Biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex Pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 7, p. 1577–1585, 2011.

FARES, R. C. G. *et al.* Epidemiological scenario of dengue in Brazil. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, p. 1–13, 2015.

FEDERICI, B. A. *et al.* Recombinant bacteria for mosquito control. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 206, p. 3877–3885, 2003.

FERNANDEZ-LUNA, M. T. *et al.* An α -amylase is a novel receptor for *Bacillus*

thuringiensis ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 746–757, 2010.

FERREIRA, F. A. S. *et al.* Effect of *Bacillus sphaericus* Neide on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and associated insect fauna in fish ponds in the Amazon. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 59, p. 234–239, 2015.

FERREIRA, L. M. *et al.* The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI-anchored α -glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 40, p. 604–610, 2010.

FERREIRA, L. M.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Bacterial larvicides for vector control: mode of action of toxins and implications for resistance. **Biocontrol Science and Technology**, London, v. 23, n. 10, p. 1137–1168, 2013.

FERREIRA, L. M. *et al.* Non conserved residues between Cqm1 and Aam1 mosquito α -glucosidases are critical for the capacity of Cqm1 to bind the Binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 50, p. 34–42, 2014.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 2, p. 224–229, 2007.

FLACIO, E. *et al.* Strategies of a thirteen year surveillance programme on *Aedes albopictus* (*Stegomyia albopicta*) in southern Switzerland. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 208, p. 1–18, 2015.

FOLT, C. L. *et al.* Synergism and antagonism among multiple stressors. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 44, p. 864–877, 1999.

FONTES, G. *et al.* Lymphatic filariasis in Brazil: Epidemiological situation and outlook for elimination. **Parasites & Vectors**, London, v. 5, n. 272, p. 1–11, 2012.

FONTOURA, P. S. *et al.* Field efficacy of VectoMax FG and VectoLex CG biological larvicides for Malaria vector control in Northwestern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, p. 1–5, 2019.

FOSTER, W. A. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 40, p. 443–474, 1995.

FRANKENHUYZEN, K. VAN. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 101, p. 1–16, 2009.

FROM, C.; GRANUM, P. E.; HARDY, S. P. Demonstration of a cholesterol-dependent cytolysin in a noninsecticidal *Bacillus sphaericus* strain and evidence for widespread distribution of the toxin within the species. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 286, p. 85–92, 2008.

FU, S. *et al.* Zika virus isolated from mosquitoes: a field and laboratory investigation in

China, 2016. **Science China. Life Sciences**, Beijing, v. 60, n. 12, p. 1364-1371, 2017.

GALARDO, A. K. R.; ZIMMERMAN, R.; GALARDO, C. D. Larval control of *Anopheles (Nyssorhynchus) darling* using granular formulation of *Bacillus sphaericus* in abandoned gold-miners excavation pools in the Brazilian Amazon Rainforest. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 46, n. 2, p. 172–177, 2013.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. **Microbial Ecology**, New York, v. 45, p. 302–316, 2003.

GREENBERG, J. A. *et al.* Identification of blood meal sources in *Aedes vexans* and *Culex quinquefasciatus* in Bernalillo County, New Mexico. **Journal of Insect Science**, Tucson, v. 13, p. 1–12, 2013.

GUEDES, D. R. D. *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes and Infections**, New York, v. 6, p. 1-11, 2017.

GUIDI, V. *et al.* Distribution of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in soil of a Swiss Wetland Reserve after 22 Years of mosquito control. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 11, p. 3663–3668, 2011.

GUO, Q. YUN *et al.* Single nucleotide deletion of *cqm1* gene results in the development of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 59, p. 967–973, 2013.

HAY, M. E.; KAPPEL, Q. E.; FENICAL, W. Synergisms in plant defenses against Herbivores: Interactions of chemistry, calcification, and plant quality. **Ecology**, Washington, v. 75, n. 6, p. 1714–1726, 1994.

HAY, M. E. Defensive synergisms? Reply to Pennings. **Ecology**, Washington, v. 77, n. 6, p. 1950–1952, 1996.

HEINEN, L. B. DA S. *et al.* Saint Louis Encephalitis Virus in Mato Grosso, Central-Western Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo v. 57, n. 3, p. 215–220, 2015.

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

HERNÁNDEZ-SOTO, A. *et al.* Parasporal body formation via overexpression of the Cry10Aa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and Cry10Aa-Cyt1Aa synergism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 14, p. 4661–4667, 2009.

HILL, S.; CONNELLY, R. **Southern house mosquito – *Culex quinquefasciatus* Say.**
Disponível em:

http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/southern_house_mosquito.htm#life. Acesso em: 2 jan. 2018.

HIRE, R. S. *et al.* An oligomeric complex of BinA/BinB is not formed in-situ in mosquito-

larvicidal *Lysinibacillus sphaericus* ISPC-8. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 122, p. 44–47, 2014.

HOUARD, J. M. *et al.* Campaign against *Culex quinquefasciatus* using *Bacillus sphaericus*: results of a pilot project in a large urban area of equatorial Africa. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 73, p. 367–375, 1993.

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

_____. *Anopheles gambiae* alkaline phosphatase is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis jegathesan* Cry11Ba toxin. **Biochemistry**, Hoboken, v. 48, n. 41, p. 9785–9793, 2009.

_____. AgCad2 cadherin in *Anopheles gambiae* larvae is a putative receptor of Cry11Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 43, p. 153–161, 2013.

IBAÑEZ-JUSTICIA, A. *et al.* The effectiveness of Asian Bush Mosquito (*Aedes japonicus japonicus*) control actions in colonised peri-urban areas in the Netherlands. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 55, n. 3, p. 673–680, 2018.

IBRAHIM, M. A.; GRIKO, N. B.; BULLA, L. A. The Cry4B toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* kills permethrin-resistant *Anopheles gambiae*, the principal vector of malaria. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 238, p. 350–359, 2013.

JIMÉNEZ, A. I. *et al.* *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 42, n. 9, p. 683–689, 2012.

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

_____. The Cry48Aa-Cry49Aa binary toxin from *Bacillus sphaericus* exhibits highly restricted target specificity. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 9, p. 2418–2424, 2008.

KAHINDI, S. C. *et al.* Efficacy and persistence of long-lasting microbial larvicides against malaria vectors in western Kenya highlands. **Parasites & Vectors**, London, v. 11, p. 1–10, 2018.

KALFON, A. *et al.* Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297: an electron microscope study of crystal-like inclusion biogenesis and toxicity to mosquito larvae. **Journal of General Microbiology**, London, v. 130, p. 893–900, 1984.

KAUFFMAN, E. B.; KRAMER, L. D. Zika Virus mosquito vectors: Competence, biology, and vector control. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 216, n. 10, p. S976–S990, 2017.

- KAUR, G. *et al.* Field-evolved resistance of *Helicoverpa zea* (Boddie) to transgenic maize expressing pyramided Cry1A.105/Cry2Ab2 proteins in northeast Louisiana, the United States. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 163, p. 11–20, 2019.
- KELLEN, W. R. *et al.* *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 7, p. 442–448, 1965.
- KILLEEN, G. F. *et al.* Measuring, manipulating and exploiting behaviours of adult mosquitoes to optimise malaria vector control impact. **BMJ Global Health**, London, v. 2, p. 1–10, 2017.
- KOMANO, T. *et al.* Activation process of the insecticidal proteins CryIVA and CryIVB produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Israel Journal of Entomology**, Beit Dagan, v. 32, p. 185–198, 1998.
- KRYCH, V. K.; JOHNSON, J. L.; YOUSTEN, A. A. Deoxyribonucleic acid homologies among strains of *Bacillus sphaericus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 30, n. 2, p. 476–484, 1980.
- KUNTHIC, T. *et al.* Essential role of tryptophan residues in toxicity of binary toxin from *Bacillus sphaericus*. **BMB Reports**, Seoul, v. 44, n. 10, p. 674–679, 2011.
- LACEY, L. A. *Bacillus Thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 23, n. 2, p. 133–163, 2007.
- LACEY, L. A. *et al.* Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 132, p. 1–41, 2015.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LECADET, M. M.; BLONDEL, M. O.; RIBIER, J. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* using Bacteriophage CP-54Ber. **Journal of General Microbiology**, London, v. 121, p. 203–212, 1980.
- LEE, S.-B.; AIMANOVA, K. G.; GILL, S. S. Alkaline phosphatases and aminopeptidases are altered in a Cry11Aa resistant strain of *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 54, p. 112–121, 2014.
- LEE, S.-B. *et al.* *Aedes* cadherin mediates the in vivo toxicity of the Cry11Aa toxin to *Aedes aegypti*. **Peptides**, New York, v. 68, p. 140–147, 2015.
- LEKAKARN, H.; PROMDONKOY, B.; BOONSERM, P. Interaction of *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin with mosquito larval gut cells: Binding and internalization. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 132, p. 125–131, 2015.
- LI, H.; YUAN, J. Deciphering the pathways of life and death. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 11, p. 261–266, 1999.

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

LIKITVIVATANAVONG, S. *et al.* Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 7, p. 2829–2838, 2011.

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

LIU, J. W.; PORTER, A. G.; WEE, B. Y. New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8-kilodalton mosquitocidal toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 6, p. 2174–2176, 1996.

LÓPEZ-DIAZ, J. A. *et al.* Oligomerization is a key step in Cyt1Aa membrane insertion and toxicity but not necessary to synergize Cry11Aa toxicity in *Aedes aegypti* larvae. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 15, n. 11, p. 3030–3039, 2013.

LUGARINI, C. *et al.* Lack of detection of Avian Influenza, Newcastle Disease, and West Nile Viruses in wild birds of Northeastern Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 54, n. 2, p. 1–4, 2017.

MACIEL-DE-FREITAS, R. *et al.* Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 6, p. 828–829, 2012.

MARDINI, L. B. L. F. *et al.* *Simulium* spp. control program in Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, p. 211–214, 2000.

MARTIN, P. A.; TRAVERS, R. S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 10, p. 2437–2442, 1989.

MARTINEZ, D. *et al.* West nile virus outbreak in Houston and Harris county, Texas, USA, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 23, n. 8, p. 1372–1376, 2017.

MÄRZ, L. *et al.* Protein glycosylation in insects. In: MONTREUIL, J.; Vliegenthart, J. F. G.; Schachter, H. **Glycoproteins**. 1 ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1995, p. 543-563.

MCCALL, P. J.; EATON, G. Olfactory memory in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 15, p. 197–203, 2001.

MELO-SANTOS, M. A. V. de *et al.* Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. **Biological Control**, San Diego, v. 49, p. 186–191, 2009.

MENEZES, H. S. G. *et al.* A new allele conferring resistance to *Lysinibacillus sphaericus* is detected in low frequency in *Culex quinquefasciatus* field populations. **Parasites & Vectors**,

London, v. 9, n. 70, p. 1–7, 2016.

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

MELO, J. V. *et al.* Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. **Micron**, Oxford, v. 39, p. 1342–1350, 2008.

_____. Cytopathological effects of *Bacillus sphaericus* Cry48Aa/Cry49Aa toxin on binary toxin-susceptible and -resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 14, p. 4782–4789, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre amarela – Guia para profissionais de saúde**, Brasília, 2018. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/26/Guia-febre-amarela-2018.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2020.

MITTAL, P. K. Biolarvicides in vector control: Challenges and prospects. **Journal of Vector Borne Diseases**, Delhi, v. 40, p. 20–32, 2003.

MONNERAT, R. *et al.* Synergistic activity of *Bacillus thuringiensis* toxins against *Simulium* spp. larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 121, p. 70–73, 2014.

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*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 19, n. 1, p. 39–46, 2003.

MOISE, I. K.; RIEGEL, C.; MUTURI, E. J. Environmental and social-demographic predictors of the southern house mosquito *Culex quinquefasciatus* in New Orleans, Louisiana. **Parasites & Vectors**, London, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2018.

NASCIMENTO, N. A. *et al.* N-glycosylation influences the catalytic activity of mosquito α -glucosidases associated with susceptibility or refractoriness to *Lysinibacillus sphaericus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 81, p. 62–71, 2017.

NAYAR, J. K.; SAUERMAN, D. M. Physiological effects of carbohydrates on survival, metabolism, and flight potential of female *Aedes taeniorhynchus*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 17, n. 264, p. 2221–2233, 1971.

NAYAR, J. K.; VAN HANDEL, E. The fuel for sustained mosquito flight. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 17, p. 471–481, 1971.

NICOLAS, L. *et al.* Respective role of the 42- and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 106, p. 275–280, 1993.

NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. **European**

Journal of Biochemistry, Berlin, v. 210, p. 585–590, 1992.

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

_____. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west Mediterranean countries. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 39, n. 5, p. 729–735, 2002.

NISHIWAKI, H. *et al.* Cloning, functional characterization, and mode of action of a novel insecticidal pore-forming toxin, sphaericolysin, produced by *Bacillus sphaericus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 10, p. 3404–3411, 2007.

NUNES, L. V. *et al.* Lymphatic filariasis: Surveillance action among immigrants from endemic areas, Acre State, Brazilian Amazon. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Hong Kong, v. 6, n. 7, p. 521–526, 2016.

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. **Journal of General Microbiology**, London, v. 138, p. 1515–1526, 1992.

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

OLIVEIRA, W. K. *et al.* Zika Virus infection and associated neurologic disorders in Brazil. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 376, n. 16, p. 1591–1593, 2017.

OMETTO, T. *et al.* West Nile virus surveillance, Brazil, 2008–2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 107, n. 11, p. 723–730, 2013.

OPOTA, O. *et al.* Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 149, p. 419–427, 2008.

_____. *Bacillus sphaericus* binary toxin elicits host cell autophagy as a response to intoxication. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. 1–12, 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0014682>. Acesso em: 5 jan. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **West Nile Virus**. Geneva: OMS, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs354/en/>. Acesso em: 2 jan. 2018.

_____. **Lymphatic filariasis**. Geneva: OMS, 2018. Disponível em: http://www.who.int/lymphatic_filariasis/epidemiology/en/. Acesso em: 2 jan. 2018.

OTTESEN, E. A. The global programme to eliminate lymphatic filariasis. **Tropical Medicine**

and International Health, Oxford, v. 5, n. 9, p. 591-594, 2000.

PAIXÃO, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. **BMJ Global Health**, London, v. 3, p. 1–25, 2018.

PALMA, L. *et al.* *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. **Toxins**, Basel, v. 6, p. 3296–3325, 2014.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 37, p. 3–22, 2013.

PARK, H. *et al.* Recombinant larvicidal bacteria with markedly improved efficacy against *Culex* vectors of West Nile Virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 72, n. 6, p. 732–738, 2005.

PAUL, A. *et al.* Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 21, n. 3, p. 305–309, 2005.

PEI, G. *et al.* A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 6, p. 3003–3009, 2002.

PÉREZ, C. *et al.* *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 51, p. 18303–18308, 2005.

_____. *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 12, p. 2931–2937, 2007.

PING, L. *et al.* Impact of environmental factors on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IPS82 to *Chironomus kiiensis*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 21, n. 1, p. 59–63, 2005.

POOPATHI, S.; ABIDHA, S. Mosquitocidal bacterial toxins (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*): Mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance. **Journal of Physiology and Pathophysiology**, Nairobi, v. 1, n. 3, p. 22–38, 2010.

PROMDONKOY, B.; ELLAR, D. J. Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical Journal**, London, v. 350, p. 275-282, 2000.

_____. Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical Journal**, London, v. 374, p. 255–259, 2003.

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

RAMESH, A. *et al.* Development of an urban molecular xenomonitoring system for lymphatic filariasis in the Recife Metropolitan Region, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 10, p. 1–24, 2018. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006816>. Acesso em: 12 dez. 2019.

RAYMOND, B. *et al.* The impact of strain diversity and mixed infections on the evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society**, London, v. 280, p. 1–9, 2013.

REBOLLO, M. P.; BOCKARIE, M. J. Can Lymphatic Filariasis be eliminated by 2020? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 83–92, 2017.

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

_____. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 377–380, 2001.

_____. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 1, p. 50–59, 2008.

_____. Sustained reduction of the dengue vector population resulting from an integrated control strategy applied in two brazilian cities. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. 1–12, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0067682>. Acesso em: 21 jan. 2020.

REITER, P. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: Implications for the efficacy of control strategies. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Mamaroneck, v. 7, n. 2, p. 261–273, 2007.

REZENDE, T. M. T. *et al.* Identification of Cry48Aa/Cry49Aa toxin ligands in the midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 88, p. 63–70, 2017.

_____. A differential transcriptional profile by *Culex quinquefasciatus* larvae resistant to *Lysinibacillus sphaericus* IAB59 highlights genes and pathways associated with the resistance phenotype. **Parasites & Vectors**, London, v. 12, n. 407, p. 1–17, 2019.

RODRIGUEZ-ALMAZAN, C. *et al.* The amino- and carboxyl-terminal fragments of the *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxin have differential roles on toxin oligomerization and pore formation. **Biochemistry**, Hoboken, v. 50, n. 3, p. 388–396, 2011.

ROMANO, A. P. M. *et al.* Febre amarela no Brasil: recomendações para a vigilância, prevenção e controle. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 101–106, 2011.

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, p. 1556–1568, 2006.

ROMÃO, T. P.; DE-MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. The N-terminal third of the BinB subunit from the *Bacillus sphaericus* binary toxin is sufficient for its interaction with midgut receptors in *Culex quinquefasciatus*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 321, p. 167–174, 2011.

RUAS-NETO, A. L. *et al.* Controle integrado de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832. 1. Utilização de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em três municípios do Rio Grande do Sul. **Boletim de Saúde**, Porto Alegre, v. 12, n. 2, p. 17-20, 1985.

SAENGWIMAN, S. *et al.* *In vivo* identification of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptors by RNA interference knockdown of glycosylphosphatidylinositol-linked aminopeptidase N transcripts in *Aedes aegypti* larvae. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 407, p. 708–713, 2011.

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

SANTANA-MARTÍNEZ, J. C.; MOLINA, J.; DUSSÁN, J. Asymmetrical competition between *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) coexisting in breeding sites. **Insects**, Basel, v. 8, p. 1-12, 2017.

SANTOS, E. M. de M. *et al.* The effectiveness of a combined bacterial larvicide for mosquito control in an endemic urban area in Brazil. **Biological Control**, San Diego, v. 121, p. 190–198, 2018.

_____. Frequency of resistance alleles to *Lysinibacillus sphaericus* in a *Culex quinquefasciatus* population treated with a *L. sphaericus*/Bti biolarvicide. **Biological Control**, San Diego, v. 132, p. 95-101, 2019.

SCHNEPF, E. *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 775–806, 1998.

SCHULZE-OSTHOFF, K. *et al.* Apoptosis signaling by death receptors. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 254, n. 3, p. 439–459, 1998.

SHARMA, M.; GUPTA, G. D.; KUMAR, V. Receptor protein of *Lysinibacillus sphaericus* mosquito-larvicidal toxin displays amyloamylase activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 93, p. 37–46, 2018a.

_____. Mosquito-larvicidal BinA toxin displays affinity for glycoconjugates: Proposal for Bin mediated cytotoxicity. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 156, p. 29–40, 2018b.

SHARMA, M.; KUMAR, V. Crystal structure of BinAB toxin receptor (Cqm1) protein and molecular dynamics simulations reveal the role of unique Ca(II) ion. **International Journal**

of **Biological Macromolecules**, Guildford, v. 140, p. 1315-1325, 2019.

SILVA-FILHA, M. H. *et al.* Low-level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 525–530, 1995.

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. **European journal of biochemistry**, Berlin, v. 247, p. 754–761, 1997.

_____. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 29, p. 711–721, 1999.

SILVA-FILHA, M. H.; PEIXOTO, C. A. Immunocytochemical localization of the *Bacillus sphaericus* binary toxin components in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 77, p. 138–146, 2003.

SILVA-FILHA, M. H. N. L. *et al.* Impact of a 26-month *Bacillus sphaericus* trial on the preimaginal density of *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Recife, Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 17, n. 1, p. 45-50, 2001.

_____. Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut receptor binding site: Implications for resistance of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) larvae. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 241, p. 185–191, 2004.

_____. *Culex quinquefasciatus* field populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. **Biological Control**, San Diego, v. 44, p. 227–234, 2008.

SILVA-FILHA, M. H. N. L.; BERRY, C.; REGIS, L. *Lysinibacillus sphaericus*: Toxins and mode of action, applications for mosquito control and resistance management. *In*: DHADIALLA, T. S.; GILL, S. S. **Advances in Insect Physiology**. Oxford: Academic Press, 2014. v. 47, p. 89–176.

SILVA, E. F. *et al.* *Wuchereria bancrofti* infection in Haitian immigrants and the risk of re-emergence of lymphatic filariasis in the Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 50, n. 2, p. 256–259, 2017.

SINGER, S. Entomogenous bacilli against mosquito larvae. **Developments in Industrial Microbiology**, Washington, v. 15, p. 187–194, 1974.

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

_____. *et al.* Amino acid residues in the N-terminal region of the BinB subunit of *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin play a critical role during receptor binding and membrane insertion. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 114, p. 65–70, 2013.

SKOVMAND, O. *et al.* Cos of integrated vector control with improved sanitation and road infrastructure coupled with the use of slow-release *Bacillus sphaericus* granules in a tropical urban setting. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 48, n. 4, p. 813-821, 2011.

SOBERÓN, M. *et al.* Pore formation by Cry toxins. *In*: ANDERLUH, G.; LAKEY, J. **Proteins Membrane Binding and Pore Formation**. Austin: Springer Nature, 2010. v. 677, p. 127–142.

SOBERÓN, M.; LÓPEZ-DÍAZ, J. A.; BRAVO, A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. **Peptides**, New York, v. 41, p. 87–93, 2013.

SONG, S. *et al.* Could Zika virus emerge in Mainland China? Virus isolation from nature in *Culex quinquefasciatus*, 2016. **Emerging Microbes and Infections**, New York, v. 6, p. 1-3, 2017.

SRISUCHARITPANIT, K. *et al.* Expression and purification of the active soluble form of *Bacillus sphaericus* binary toxin for structural analysis. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 82, n. 2, p. 368–372, 2012.

_____. Crystal structure of BinB: A receptor binding component of the Binary Toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. **Proteins**, New York, v. 82, n. 10, p. 2703–2712, 2014.

SURYA, W. *et al.* Binary toxin subunits of *Lysinibacillus sphaericus* are monomeric and form heterodimers after in vitro activation. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 6, p. 1–14, 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0158356>. Acesso em: 19 jan. 2018.

TANGSONGCHAROEN, C. *et al.* *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin induces apoptosis in susceptible *Culex quinquefasciatus* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 128, p. 57–63, 2015.

_____. Molecular analysis of *Culex quinquefasciatus* larvae responses to *Lysinibacillus sphaericus* Bin toxin. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 4, p. 1–17, 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175473>. Acesso em: 9 dez. 2019.

TETREAU, G. *et al.* Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 7, p. 894–900, 2013.

THANABALU, T. *et al.* Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 9, p. 2776–2785, 1991.

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

_____. A *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8 kDa. **Gene**, Amsterdam, v. 170, p. 85–89, 1996.

THIÉRY, I. *et al.* 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*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 10, p. 3910–3916, 1998.

THOMAS, W. E.; ELLAR, D. J. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal delta-endotoxin. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 154, n. 2, p. 362–368, 1983.

TURELL, M. J. Members of the *Culex pipiens* complex as vectors of viruses. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 28, n. 4, p. 123–126, 2012.

VARKI, A. Biological role of glycans. **Glycobiology**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 3–49, 2017.

VIEIRA, M. A. C. S. *et al.* West Nile Virus Encephalitis: The first human case recorded in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 93, n. 2, p. 377–379, 2015.

WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD. Geneva: Organização Mundial de Saúde, v. 92, n. 40, p. 589–608, 2017.

WEI, J.; ZHANG, Y.; AN, S. The progress in insect cross-resistance among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 102, n. 3, p. 1–15, 2019.

WEI, S.; CAI, Q.; YUAN, Z. Mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* induces stronger delayed effects than Binary Toxin on *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 43, n. 4, p. 726–730, 2006.

WEISER, J. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, Jena, v. 139, n. 1, p. 57–60, 1984.

WICKREMESINGHE, R. S. B.; MENDIS, C. L. *Bacillus sphaericus* spore from Sri Lanka demonstrating rapid larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus*. **Mosquito News**, Albany, v. 40, n. 3, p. 387–389, 1980.

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*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 10536–10540, 1997.

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

WIRTH, M. C.; WALTON, W. E.; FEDERICI, B. A. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* restores toxicity of *Bacillus sphaericus* against resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera:

Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 37, n. 3, p. 401–407, 2000.

WIRTH, M. C.; DELÉCLUSE, A.; WALTON, W. E. Cyt1Ab1 and Cyt2Ba1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* synergize *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* and resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Cul. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 7, p. 3280–3284, 2001.

WIRTH, M. C. *et al.* Synergy between toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 41, n. 5, p. 935–941, 2004.

_____. Evolution of resistance toward *Bacillus sphaericus* or a mixture of *B. sphaericus*+Cyt1A from *Bacillus thuringiensis*, in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 88, n. 2, p. 154–162, 2005.

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

_____. Mtx toxins from *Lysinibacillus sphaericus* enhance mosquitocidal cry-toxin activity and suppress cry-resistance in *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 115, n. 1, p. 62–67, 2014.

WIRTH, M. C.; WALTON, W. E.; FEDERICI, B. A. Evolution of resistance in *Culex quinquefasciatus* (Say) selected with a recombinant *Bacillus thuringiensis* strain-producing Cyt1Aa and Cry11Ba, and the binary toxin, Bin, from *Lysinibacillus sphaericus*. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 52, n. 5, p. 1028–1035, 2015.

WRAIGHT, S. P.; MOLLOY, D. P.; SINGER, S. Studies on the culicine mosquito host range of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* with notes on the effects of temperature and instar on bacterial efficacy. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 49, p. 291–302, 1987.

XAVIER, A. *et al.* Assessment of transmission in areas of uncertain endemicity for lymphatic filariasis in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 11, p. 1–14, 2019. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007836>. Acesso em: 16 dez. 2019.

YAMAGIWA, M. *et al.* Active form of Dipteran-specific insecticidal protein Cry11A produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 66, n. 3, p. 516–522, 2002.

YUAN, Z. M. *et al.* Cross-resistance between strains of *Bacillus sphaericus* but not *B. thuringiensis israelensis* in colonies of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 17, p. 251–256, 2003.

ZETTEL, C.; KAUFMAN, P. **Yellow fever mosquito - *Aedes aegypti* (Linnaeus)**. Gainesville, 2008. Disponível em:

http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/aedes_aegypti.htm. Acesso em: 2 jan. 2018.

ZHANG, Q. *et al.* Analyses of α -amylase and α -glucosidase in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*, as receptors of Cry11Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 43, n. 10, p. 907–915, 2013a.

ZHANG, Q.; HUA, G.; ADANG, M. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. **Insect Science**, Victoria, v. 24, p. 714–729, 2017.

ZHANG, R. *et al.* A 106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Biochemistry**, Hoboken, v. 47, n. 43, p. 11263–11272, 2013b.

ZHANG, Y. M. *et al.* Isolation of two high toxic *Bacillus sphaericus* strains. **Insecticidal Microorganisms**, [S.l.], v. 1, p. 98–99, 1987.

ZHOU, Z. *et al.* Identification of ABCC2 as a binding protein of Cry1Ac on brush border membrane vesicles from *Helicoverpa armigera* by an improved pull-down assay. **MicrobiologyOpen**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 659–669, 2016.

ZUCHI, A. *et al.* Screening and evaluation of lymphatic filariasis in immigrants from endemic countries residing in a focus where it is considered eliminated in the Southern Region of Brazil: A risk of reemergence? **Acta Tropica**, Basel, v. 176, p. 192–196, 2017.

APÊNDICE A – OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Doutorado sanduíche

- Treinamento e execução de experimentos pelo período total de 11 meses no laboratório do Instituto de Biotecnologia (IBT – UNAM) sob a orientação da Dra. Alejandra Bravo. Foram desenvolvidas atividades técnicas de ensaio de interação entre proteínas e localização subcelular de proteínas marcadas com fluoróforo através de microscopia confocal, além de otimização de protocolos usados neste projeto.

Participação em eventos

- 52° Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Maceió, 21 a 24 de agosto de 2016;
- VI Workshop on Genetics and Molecular Biology of Insect Vectors of Tropical Diseases, Meeting of the Society for Vector Ecology-Brazil (ENTOMOL6/SOVE-Brazil), Recife, 25 a 28 de outubro de 2016;
- Comissão organizadora da IV Semana de Biociências e Biotecnologia em Saúde: Ciência à Serviço da Sociedade. Recife, 12 a 16 de dezembro de 2016.

Produção bibliográfica

a) Resumos

- NASCIMENTO, N. A.; FERREIRA, L. M.; ROMÃO, T. P.; MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Avaliação do impacto de mutações da α -glicosidase Cqm1 de *Culex quinquefasciatus* na fisiologia de larvas. Resumo apresentado no 52° Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Maceió, 21 a 24 de agosto de 2016.

- NASCIMENTO, N. A.; CORREIA, D. M. C.; ROMÃO, T. P.; MELO-NETO, O. P.; REZENDE, A. M.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Influência da glicosilação na atividade catalítica de α - glicosidases de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*. Resumo apresentado no 52° Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Maceió, 21 a 24 de agosto de 2016.
- NASCIMENTO, N. A.; Ferreira, L. M. ; ROMÃO, T. P. ; CORREIA, D. M. C. ; VASCONCELOS, C. R. S. ; REZENDE, A. M. ; GENTA, F. A. ; COSTA, S. G. ; MELO NETO, O. P. ; SILVA-FILHA, M. H. N. L. . Influência da N-glicosilação na atividade catalítica de α -glicosidases de mosquitos associadas com a suscetibilidade ou refratariedade ao *Lysinibacillus sphaericus*. Resumo apresentado no VI Workshop on Genetics and Molecular Biology of Insect Vectors of Tropical Diseases, Meeting of the Society for Vector Ecology-Brazil (ENTOMOL6/SOVE-Brazil), Recife, 25 a 28 de outubro de 2016.
- NASCIMENTO, N. A.; TORRES-QUINTERO, M. C. ; PACHECO, S. ; ROMÃO, T. P. ; PEREIRA-NEVES, A. ; BRAVO, A. ; SOBERÓN, M. ; SILVA-FILHA, M. H. N. L. A new synergy mechanism between Bin and Cyt1Aa toxins is behind its mosquitocidal activity against Bin-resistant larvae. Resumo apresentado na 48° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia, 14 a 17 de maio de 2019.

b) Artigos

- Consultar Apêndice B

APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS



Applied and Environmental
Microbiology®

ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY



Functional *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa Is Necessary To Synergize *Lysinibacillus sphaericus* Binary Toxin (Bin) against Bin-Resistant and -Refractory Mosquito Species

Nathaly Alexandre Nascimento,^a Mary Carmen Torres-Quintero,^c Samira López Molina,^c Sabino Pacheco,^c Tatiany Patrícia Romão,^a Antonio Pereira-Neves,^b Mario Soberón,^c Alejandra Bravo,^c Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha^a

^aDepartment of Entomology, Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Recife-PE, Brazil

^bDepartment of Microbiology, Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Recife-PE, Brazil

^cMicrobiology Department, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

ABSTRACT The binary (Bin) toxin from *Lysinibacillus sphaericus* is effective to mosquito larvae, but its utilization is threatened by the development of insect resistance. Bin toxin is composed of the BinB subunit required for binding to midgut receptors and the BinA subunit that causes toxicity after cell internalization, mediated by BinB. *Culex quinquefasciatus* resistance to this toxin is caused by mutations that prevent expression of Bin toxin receptors in the midgut. Previously, it was shown that the Cyt1Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* restores Bin toxicity to Bin-resistant *C. quinquefasciatus* and to *Aedes aegypti* larvae, which are naturally devoid of functional Bin receptors. Our goal was to elucidate the mechanism involved in Cyt1Aa synergism with Bin in such larvae. *In vivo* assays showed that the mixture of Bin toxin, or its BinA subunit, with Cyt1Aa was effective to kill resistant larvae. However, no specific binding interaction between Cyt1Aa and the Bin toxin, or its subunits, was observed. The synergy between Cyt1Aa and Bin toxins is dependent on functional Cyt1Aa, as demonstrated by using the nontoxic Cyt1AaV122E mutant toxin affected in oligomerization and membrane insertion, which was unable to synergize Bin toxicity in resistant larvae. The synergism correlated with the internalization of Bin or BinA into anterior and medium midgut epithelial cells, which occurred only in larvae treated with wild-type Cyt1Aa toxin. This toxin is able to overcome failures in the binding step involving BinB receptor by allowing the internalization of Bin toxin, or its BinA subunit, into the midgut cells.

IMPORTANCE One promising management strategy for mosquito control is the utilization of a mixture of *L. sphaericus* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* insecticidal toxins. From this set, Bin and Cyt1Aa toxins synergize and display toxicity to resistant *C. quinquefasciatus* and to *A. aegypti* larvae, whose midgut cells lack Bin toxin receptors. Our data set provides evidence that functional Cyt1Aa is essential for internalization of Bin or its BinA subunit into such cells, but binding interaction between Bin and Cyt1Aa is not observed. Thus, this mechanism contrasts with that for the synergy between Cyt1Aa and the *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry toxins, where active Cyt1Aa is not necessary but a specific binding between Cry and Cyt1Aa is required. Our study established the initial molecular basis of the synergy between Bin and Cyt1Aa, and these findings enlarge our knowledge of their mode of action, which could help to develop improved strategies to cope with insect resistance.

KEYWORDS *Bacillus thuringiensis*, Bin toxin, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, synergism, resistance, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

Citation Nascimento NA, Torres-Quintero MC, Molina SL, Pacheco S, Romão TP, Pereira-Neves A, Soberón M, Bravo A, Silva-Filha MHN. 2020. Functional *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa is necessary to synergize *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin (Bin) against Bin-resistant and -refractory mosquito species. *Appl Environ Microbiol* 86:e02770-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02770-19>.

Editor Karyn N. Johnson, University of Queensland

Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

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

Received 5 December 2019

Accepted 21 January 2020

Accepted manuscript posted online 31 January 2020

Published 18 March 2020



N-glycosylation influences the catalytic activity of mosquito α -glucosidases associated with susceptibility or refractoriness to *Lysinibacillus sphaericus*



Nathaly Alexandre do Nascimento^a, Lígia Maria Ferreira^a, Tatianny Patrícia Romão^a, Darleide Maria da Conceição Correia^a, Crhisslane Rafaela dos Santos Vasconcelos^b, Antônio Mauro Rezende^b, Samara Graciane Costa^c, Fernando Ariel Genta^{c,d}, Osvaldo Pompílio de-Melo-Neto^b, Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha^{a,*}

^a Department of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife, PE 50740-465, Brazil

^b Department of Microbiology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife, PE 50740-465, Brazil

^c Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil

^d Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Rio de Janeiro, RJ 219-41-902, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 September 2016

Received in revised form

1 December 2016

Accepted 20 December 2016

Available online 23 December 2016

Keywords:

Cqm1

Aam1

Culex quinquefasciatus

Aedes aegypti

N-glycosylation

Glucosidases

ABSTRACT

Cqm1 and Aam1 are α -glucosidases (EC 3.2.1.20) expressed in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* larvae midgut, respectively. These orthologs share high sequence similarity but while Cqm1 acts as a receptor for the Binary (Bin) insecticidal toxin from *Lysinibacillus sphaericus*, Aam1 does not bind the toxin, rendering *Ae. aegypti* refractory to this bacterium. Aam1 is heavily glycosylated, contrasting to Cqm1, but little is known regarding how glycosylation impacts on its function. This study aimed to compare the N-glycosylation patterns and the catalytic activities of Aam1 and Cqm1. Mutant proteins were generated where predicted Aam1 N-glycosylation sites (N-PGS) were either inserted into Cqm1 or abrogated in Aam1. The mutants validated four N-PGS which were found to localize externally on the Aam1 structure. These Aam1 and Cqm1 mutants maintained their Bin binding properties, confirming that glycosylation has no role in this interaction. The α -glucosidase activity of both proteins was next investigated, with Aam1 having a remarkably higher catalytic efficiency, influenced by changes in glycosylation. Molecular dynamics showed that glycosylated and nonglycosylated Aam1 models displayed distinct patterns that could influence their catalytic activity. Differential N-glycosylation may then be associated with higher catalytic efficiency in Aam1, enhancing the functional diversity of related orthologs.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.