



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública



LÍGIA MARIA FERREIRA

Análise da refratariedade do *Aedes aegypti* à
toxina binária do biolarvicida
Bacillus sphaericus

RECIFE

2009

LÍGIA MARIA FERREIRA

Análise da refratariedade do *Aedes aegypti* à toxina binária do biolarvicida *Bacillus sphaericus*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha

Co-orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

RECIFE

2009

LÍGIA MARIA FERREIRA

Análise da refratariedade do *Aedes aegypti* à toxina binária do biolarvicida *Bacillus sphaericus*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Data de aprovação: 24/03/2009

BANCA EXAMINADORA

Dr. Herbert Álvaro Abreu de Siqueira
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Rafael Dhalia
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Giovanni Rota Bertani
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

À minha família

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida e por sempre me indicar os melhores caminhos a seguir.

À minha mãe, Odete, e aos meus irmãos, Levi, Lívio e Lênio, pelo apoio e carinho demonstrados e por serem diretamente responsáveis pela concretização de mais esta etapa da minha vida.

À minha orientadora, Dra. Maria Helena, pela dedicação e paciência e pela oportunidade de fazer parte da sua equipe.

Ao Dr. Osvaldo Pompílio, pela co-orientação e contribuição com o desenvolvimento do trabalho.

À MSc. Tatiany Romão por ter sido também a co-orientadora deste trabalho e pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos.

Ao MSc. Christian Reis, pela valiosa ajuda com os experimentos de *pull down*, o que foi fundamental na finalização do trabalho.

À Dra. Catherine Borgouin e Dra. Isabelle Thiery do Centro de Produção e Infecção de anofelinos (CEPIA) do Instituto Pasteur pelo fornecimento das amostras de *An. gambiae*.

A Alaíde Silva e Andréa Neves, da equipe do insetário do Departamento de Entomologia, pela contribuição com as amostras biológicas utilizadas no estudo.

À equipe do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM pela contribuição com o sequenciamento das amostras de DNA utilizadas no estudo.

A todos do Departamento de Entomologia, pela contribuição com os experimentos no dia-a-dia e pelos momentos agradáveis durante esses dois anos de trabalho.

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

Aos amigos, Ana Paula, Diogo, Flávio, Liliane, Maíra, Mariana, Marina, Marília, Narjara e Rodrigo pelos momentos de diversão durante esses dois anos de mestrado.

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

Aos membros da banca pela valiosa contribuição na avaliação do trabalho.

A todos que, embora não citados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*Resta esse constante esforço para caminhar dentro do labirinto,
Esse eterno levantar-se depois de cada queda,
Essa busca de equilíbrio no fio da navalha,
Essa terrível coragem diante do grande medo, e esse medo
infantil de ter pequenas coragens.*

(Vinícius de Moraes)

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

RESUMO

O principal fator larvicida do *Bacillus sphaericus* (Bsp) para culicídeos é a protoxina Bin, produzida sob a forma de um cristal, durante a esporulação. Quando ingerido pelas larvas o cristal é processado e a toxina Bin reconhece e liga-se a receptores específicos do epitélio intestinal. O receptor em *Culex quinquefasciatus* é uma α -glicosidase de 60 kDa, ligada à membrana intestinal por uma âncora GPI, denominado Cqm1. Larvas de *Aedes aegypti* são consideradas refratárias ao Bsp, pois a toxina Bin não reconhece receptores no *microvilli* intestinal. No entanto, a análise do genoma do *Ae. aegypti*, revelou a presença do gene *aam1*, que codificaria uma proteína ortóloga e com 83% de similaridade ao receptor Cqm1. O principal objetivo deste estudo foi elucidar a base molecular da refratariedade do *Ae. aegypti* ao Bsp, determinada pela ausência de ligação da toxina Bin ao epitélio intestinal das larvas. Para tal, foi feita uma investigação da expressão da proteína Aam1 e do perfil de α -glicosidases de *Ae. aegypti*, tendo como referência o receptor Cqm1. Os resultados mostraram que larvas e adultos de *Ae. aegypti* expressam uma α -glicosidase de membrana de 70 kDa, reconhecida pelo anticorpo anti-Cqm1, e que provavelmente trata-se da proteína Aam1. Tal proteína é expressa no *microvilli* intestinal das larvas em níveis superiores à Cqm1, no entanto, não apresenta capacidade de ligação à toxina Bin. Em uma segunda etapa, a avaliação de proteínas Aam1 e Cqm1 recombinantes, produzidas em lisado de reticulócitos de coelho, mostrou que ambas não foram capazes de se ligar especificamente à toxina Bin. A falha na ligação da proteína Cqm1 à toxina Bin pode ser decorrente da ausência do processamento pós-traducional adequado neste sistema de expressão, indicando que certas modificações podem ser críticas para a sua funcionalidade. O tratamento da proteína Cqm1 nativa à temperatura de 100 °C aboliu a sua capacidade de ligação à toxina Bin, indicando que a conformação da proteína pode ser essencial para a sua funcionalidade. Os resultados obtidos demonstram que, apesar dos altos níveis de expressão da Aam1 nas larvas de *Ae. aegypti*, a proteína não é capaz de ligar-se à toxina Bin. Tal fato estar relacionado a outros fatores críticos para sua funcionalidade, tais como diferenças conformacionais e/ou modificações pós-traducionais que determinem o status de refratariedade do *Ae. aegypti*.

Palavras-Chave: Controle biológico de vetores, toxinas bacterianas, *Aedes*

FERREIRA, L. M. **Análise da refratariedade do *Aedes aegypti* à toxina binária do biolarvicida *Bacillus sphaericus***. 2009. Dissertation (Master of Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

ABSTRACT

Bacillus sphaericus produces crystalline inclusions which contain the Bin toxin, its major insecticidal factor against culicid larvae. After ingestion by larvae the crystal is processed and released in the midgut, where the Bin toxin recognizes and binds to specific receptors on the epithelium. The receptor in *Culex quinquefasciatus* is a 60-kDa midgut membrane bound α -glucosidase, named Cqm1. *Aedes aegypti* larvae are refractory to Bsp, due to the lack of functional receptors in the midgut epithelium. However, analysis of *Ae. aegypti* genome revealed the *aam1* gene that encodes a protein ortholog with 83% of similarity to Cqm1. The major goal of this study was to elucidate the molecular basis of *Ae. aegypti* refractoriness to Bsp. The first step was to evaluate the expression of the Aam1 protein, using the Cqm1 receptor as a reference. The results showed that a 70-kDa membrane-bound α -glucosidase, recognized by anti-Cqm1 polyclonal antibody, is expressed in larvae and adults of *Ae. aegypti*, and it could be Aam1. This protein is expressed on larvae midgut at higher levels than Cqm1, however, it does not bind to Bin toxin. In a second set of experiments, Aam1 and Cqm1 recombinant proteins were produced in a rabbit reticulocyte lysate system to assess its capacity to interact with Bin toxin. These proteins failed to bind to the toxin, and it is likely due the ineffective pos-translational processing of the protein by this system. Treatment of native Cqm1 at 100 °C abolished its binding capacity, possibly due structural changes related to protein folding, which might be essential for Bin toxin binding. This work showed that *Ae. aegypti* larvae express the Aam1 α -glucosidase at high levels on midgut, however, other critical factors that affect protein functionality, such as changes of protein structure and correct pos-translational processing, are associated with the toxin binding capacity and can underlie the *Ae. aegypti* refractoriness status.

Key Words: *Bacillus sphaericus*, receptor, Bin toxin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<i>Página</i>
Figura 1. Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	20
Figura 2. Estrutura tridimensional das toxinas inseticidas produzidas pelo <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry3Aa e Cyt2Aa	24
Figura 3. Receptores de toxinas Cry do <i>Bacillus thuringiensis</i> caracterizados em larvas de insetos	26
Figura 4. Micrografia eletrônica do <i>Bacillus sphaericus</i>	29
Figura 5. Alinhamento múltiplo no programa Clustal W da sequência de aminoácidos do receptor da toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i> em <i>Culex quinquefasciatus</i>	34
Figura 6. Principais etapas dos procedimentos experimentais	41
Figura 7. Perfil de imunodeteção de α -glicosidases em extratos totais de larvas e adultos de <i>Aedes aegypti</i> (A) e <i>Culex quinquefasciatus</i> (B) com anti-Cqm1	54
Figura 8. Imunodeteção de proteínas do <i>microvilli</i> intestinal de larvas com o anticorpo anti-Cqm1	55
Figura 9. Perfil da atividade α -glicosidase em gel de amostras de extrato total de larvas e adultos de <i>Culex quinquefasciatus</i> e <i>Aedes aegypti</i>	56
Figura 10. Perfil da atividade α -glicosidase em gel de frações de <i>microvilli</i> intestinal de larvas de culicídeos	57

- Figura 11.** Ensaio de afinidade entre os extratos de proteínas de *microvilli* intestinal solubilizadas de *Culex quinquefasciatus* (Cq) e *Aedes aegypti* (Ae) e a toxina Bin do *Bacillus sphaericus*, imobilizada em suporte sólido, seguido de imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1 58
- Figura 12.** Separação eletroforética dos fragmentos de genes que codificam a proteína Aam1 e suas respectivas proteínas parálogas, amplificados nas reações de RT-PCR, a partir do mRNA de *Aedes aegypti* 59
- Figura 13.** Ensaio de afinidade entre as proteínas recombinantes Aam1 de *Aedes aegypti* e Cqm1 de *Culex quinquefasciatus* e a toxina Bin do *Bacillus sphaericus*, imobilizada em resina de sefarose, seguido de imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1 61
- Figura 14.** Separação eletroforética em SDS-PAGE 10% de proteínas Aam1-³⁵S e Cqm1-³⁵S de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, respectivamente, produzidas através de tradução *in vitro* em reticulócitos de coelho e visualizadas por autoradiografia 62
- Figura 15.** Ensaio de pull down entre as proteínas Cqm1-S³⁵ e Aam1-S³⁵ e a subunidade BinB da toxina e entre as proteínas LmEIFG3-S³⁵ e LmEIF4A1 de *Leishmania* sp., visualizados por autoradiografia 63
- Figura 16.** Ensaio de afinidade (*pull down*) entre os extratos-CHAPS de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* nativos (N) ou desnaturados (D) e a subunidade BinB imobilizada em resina glutatona sefarose (GS), seguido de imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1 64

LISTA DE TABELAS

	<i>Página</i>
Tabela 1. Receptores de toxinas inseticidas de bactérias entomopatógenas presentes no epitélio intestinal de lepidópteros	27
Tabela 2. Receptores de toxinas inseticidas de bactérias entomopatógenas presentes no epitélio intestinal de culicídeos vetores	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aam1	<i>Aedes aegypti</i> maltase 1
Agm3	<i>Anopheles gambiae</i> maltase 3
ALP	Fosfatase alcalina
APN	Aminopectidase-N
BB3	<i>Binding buffer</i> 3 – Tampão de ligação 3
BBMF	Frações de membrana de <i>microvilli</i> intestinal
Bin	Binária
BSA	Albumina sérica bovina
Bsp	<i>Bacillus sphaericus</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i>
CADR	Caderina
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropil)dimethylammonio]-1-propanosulfonato
Cpm1	<i>Culex pipiens</i> maltase 1
Cqm1	<i>Culex quinquefasciatus</i> maltase 1
CqSF	Colônia de <i>C. quinquefasciatus</i> sensível ao Bsp
Cry	Toxina do cristal
Cyt	Toxina citolítica
DDT	Dicloro-difenil-tricloro-etano
DEPC	Dimetil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucléico
E.C.	Código enzimas dado pela <i>Enzime Comission</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GPI	Glicosilfosfatidil inositol
GS	Glutaciona sefarose
GST	Glutaciona S-tranferase
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico
IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
kDa	Kilodalton
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
Mtx	Toxina mosquitocida

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> – Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NP-40	Nonidet P40 [®]
NPT	Núcleo de plataformas tecnológicas
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Tampão fosfato salina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoreto de fenilmetanilsulfonil
RecL	Colônia de <i>Ae. aegypti</i> Recife
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	<i>Reverse-transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase utilizando a transcriptase reversa.
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
TA	Temperatura ambiente
TBE	<i>Tris – borate</i> – EDTA – Tris - ácido bórico – EDTA
TBS-T	<i>Tris buffered saline</i> - Tween 20 – Tampão Tris salina - Tween 20
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 Biologia de culicídeos	20
2.1.1 <i>Culex quinquefasciatus</i> Say 1823	21
2.1.2 <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus 1762	21
2.2 Controle de vetores	22
2.3 Bactérias entomopatógenas e seu modo de ação	23
2.4 <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
2.4.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i>	24
2.4.2 Receptores das toxinas Cry	25
2.5 <i>Bacillus sphaericus</i>	29
2.5.1 Toxinas inseticidas	30
2.5.2 Toxina Bin	31
2.5.3 Receptor da toxina Bin em culicídeos	32
2.5.4 Resistência de <i>Culex</i> à toxina Bin	35
2.5.5 α -glicosidases ortólogas ao receptor Cqm1 em <i>Aedes aegypti</i>	35
3 JUSTIFICATIVA	37
4 PERGUNTA CONDUTORA	38
5 HIPÓTESE	39
6. OBJETIVOS	40
6.1. Objetivo geral	40
6.2. Objetivos específicos	40
7 MATERIAL E MÉTODOS	41
7.1 Procedimentos experimentais	41
7.2 Colônias de insetos	42
7.3 Análise da expressão da proteína Aam1 nativa	42
7.3.1 Preparação de proteínas nativas	42
7.3.1.1 <i>Extrato total de larvas e adultos</i>	43
7.3.1.2 <i>Frações ricas em microvilli intestinal (BBMF) de larvas</i>	43

7.3.1.3 Frações de proteínas de BBMF solubilizadas (extratos-CHAPS)	44
7.3.2 Ensaio de imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1	44
7.3.3 Perfil de α -glicosidases em gel	45
7.4 Clonagem e expressão das maltases Aam1 e Cqm1	45
7.4.1 Extração de RNA, RT-PCR e PCR do gene <i>aam1</i>	46
7.4.2 Clonagem e sequenciamento do gene <i>aam1</i>	46
7.4.3 Expressão e purificação de proteínas em <i>Escherichia coli</i>	47
7.4.4 Mutagênese sítio-dirigida	48
7.4.5 Transcrição e tradução <i>in vitro</i>	49
7.5 Ensaio de ligação com a toxina Bin	50
7.5.1. Ensaio de afinidade	50
7.5.2 Ensaio de <i>pull-down</i>	51
7.6 Influência da conformação protéica na capacidade de ligação á toxina Bin	51
8 RESULTADOS	53
8.1 Avaliação de proteínas nativas	53
8.1.1 Imunodeteção de proteínas com anticorpo anti-Cqm1	53
8.1.2 Perfil de α -glicosidases	55
8.1.3 Interação de proteínas nativas com a toxina Bin	57
8.2 Avaliação de proteínas recombinantes	58
8.2.1 Clonagem do gene <i>aam1</i>	59
8.2.2 Expressão das proteínas Aam1 e Cqm1 recombinantes em <i>E. coli</i>	60
8.2.3 Avaliação das proteínas Aam1 e Cqm1 produzidas em <i>E. coli</i>	60
8.2.4 Expressão das proteínas Aam1 e Cqm1 em lisado de reticulócitos de coelho	61
8.2.5 Avaliação das proteínas Aam1 e Cqm1 produzidas em lisado de reticulócitos de coelho	62
8.2.6 Influência da conformação protéica na capacidade de ligação á toxina Bin	63
9 DISCUSSÃO	65
10 CONCLUSÕES	71

REFERÊNCIAS	72
APÊNDICE A – Manuscrito de artigo para submissão	82

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Biolarvicidas à base das bactérias *Bacillus sphaericus* (Bsp) e *Bacillus thuringiensis* (Bt) são eficazes para o controle de culicídeos e simulídeos, e têm sido utilizados em vários países, inclusive no Brasil. O Bsp apresenta ação inseticida para culicídeos devido à produção de cristais que causam a morte das larvas quando ingeridos. O principal fator tóxico do Bsp, contido no cristal, é a toxina Bin. Este fator é produzido sob a forma de uma protoxina heterodimérica, composta pelos polipeptídeos de 42- e 51- kDa, denominados BinA e BinB, respectivamente. Após a ingestão pelas larvas, o cristal protéico é solubilizado em pH alcalino intestinal e a protoxina Bin é liberada no lúmen, onde é clivada por serina-proteases em polipeptídeos de 39- e 43-kDa, que constituem a forma ativa da toxina. A toxina Bin reconhece e liga-se a receptores específicos no epitélio intestinal das larvas, para promover o efeito inseticida. A ligação da toxina aos receptores é uma etapa essencial no modo de ação do Bsp em espécies susceptíveis tais como *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus*, *An. stephensi* e *An. gambiae*. Em *Ae. aegypti*, uma espécie naturalmente refratária ao Bsp, a ligação da toxina aos receptores do *microvilli* intestinal de larvas (BBMF) não foi detectada. O principal objetivo deste estudo foi identificar os mecanismos moleculares envolvidos na refratariedade do *Ae. aegypti* ao Bsp.

O receptor da toxina Bin em *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus* já foi caracterizado e é uma α -glicosidase de 60 kDa, ancorada à membrana apical do epitélio intestinal por uma molécula de glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Em *An. gambiae* verificou-se que a α -glicosidase Agm3 (*Anopheles gambiae* maltase 3), ortóloga ao receptor Cqm1 e expressa no epitélio intestinal das larvas desta espécie, foi capaz de ligar-se à toxina Bin *in vitro* (OPOTA et al., 2008). A análise das seqüências de nucleotídeos, a partir da disponibilidade do genoma do *Ae. aegypti*, revelou que essa espécie apresenta genes que codificam moléculas com substancial similaridade à Cqm1, dentre elas, uma α -glicosidase que apresentou 83% de similaridade, denominada neste estudo *Aedes aegypti* maltase 1 (Aam1), que poderia ser, portanto, uma molécula com capacidade de interagir com a toxina Bin.

A identificação da proteína Aam1 em *Ae. aegypti* gerou um importante questionamento acerca dos mecanismos que determinam a refratariedade desse culicídeo ao Bsp, que podem trazer conhecimentos importantes sobre o modo de ação do Bsp a nível molecular. Embora a análise de seqüências revele a presença do gene *aam1*, que codifica uma

molécula candidata ao receptor da toxina Bin em *Ae. aegypti*, estudos anteriores demonstraram que não há ligação da toxina ao epitélio intestinal das larvas desse inseto. Tal fato pode resultar da ausência de expressão desse gene nos insetos, da expressão em outra fase do desenvolvimento, da expressão em níveis reduzidos, da produção de uma proteína desprovida de âncora GPI e, portanto, expressa sob a forma solúvel, ou ainda de diferenças estruturais nas proteínas que sejam críticas para o seu reconhecimento e ligação com a toxina Bin. A resistência de larvas de *Culex* ao Bsp, por exemplo, pode ser decorrente de mutações no gene *Cqm1*, que passa a codificar proteínas *Cqm1* desprovidas de âncora GPI e, portanto, ausentes do *microvilli* intestinal. Uma outra possibilidade é que a proteína *Aam1* seja expressa nas larvas de *Ae. aegypti* e não possua a capacidade de interagir com a toxina Bin, o que pode ser decorrente de diferenças na sequência primária de aminoácidos ou de alterações na conformação da proteína *Aam1* que impeçam a interação.

A partir dos dados disponíveis, o objetivo desse estudo foi identificar os mecanismos envolvidos na refratariedade do *Ae. aegypti*. Inicialmente foi realizada uma avaliação da expressão da proteína *Aam1* em todas as fases do desenvolvimento do *Ae. aegypti* e uma investigação da sua presença dentre as α -glicosidases expressas nessa espécie. Em seguida, proteínas *Aam1* e *Cqm1* recombinantes foram produzidas e submetidas a ensaios de interação para avaliar a sua capacidade de interação com a toxina Bin. O conjunto de características apresentadas por *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, espécies refratária e susceptível, respectivamente, constituem um modelo ímpar de estudo, que pode trazer conhecimentos relevantes para a elucidação do modo de ação do Bsp. A compreensão da base da refratariedade dessa espécie pode oferecer subsídios para ampliar o espectro de ação e aperfeiçoar o uso do Bsp.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biologia de culicídeos

Os culicídeos pertencem à ordem Diptera e possuem grande importância médica por estarem envolvidos na transmissão de agentes etiológicos de doenças para o homem. Espécies dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes* podem ser vetores de patógenos humanos responsáveis pela filariose, malária e dengue, respectivamente. Os culicídeos são holometábolos e o seu desenvolvimento compreende as fases de ovo, quatro estágios larvais, pupa e adulto (Figura 1). A fase pré-imaginal ocorre no ambiente aquático onde as fêmeas depositam os ovos. O ciclo de vida dura cerca de dez dias, desde o ovo até a emergência do adulto, embora possa haver variações devido à influência de fatores como nutrição, temperatura, fotoperíodo e umidade. Os insetos adultos se alimentam de seiva vegetal e as fêmeas realizam também hematofagia, que é necessária para o desenvolvimento dos ovos. Após o desenvolvimento embrionário, as larvas do 1º estágio (L1) eclodem e evoluem, passando por mais três estágios (L2, L3 e L4) até chegarem à fase de pupa, a partir da qual ocorre a emergência da forma adulta. As fêmeas podem realizar de quatro a cinco ciclos gonadotróficos durante a vida e, devido ao seu hábito hematofágico, são capazes de adquirir agentes etiológicos de doenças e transmiti-los de um hospedeiro vertebrado para outro (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

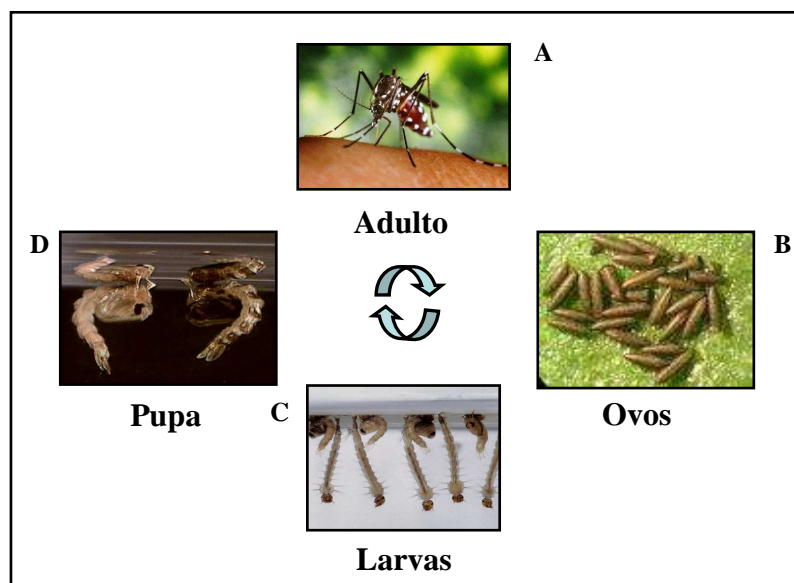


Figura 1. Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Após o repasto sanguíneo as fêmeas (A) depositam os ovos (B) na superfície da água. Estes eclodem e liberam as larvas (C), que em seguida evoluem para a fase de pupa (D), a partir da qual emergem os adultos.

2.1.1 *Culex quinquefasciatus* Say 1823

O *C. quinquefasciatus* é uma espécie cosmopolita que ocorre nas porções meridionais da Ásia, na África, nas Américas e na Oceania. Possui ampla diversidade de criadouros, com preferência pelos depósitos artificiais com água rica em matéria orgânica em decomposição e detritos como os sistemas de esgoto, fossas e valetas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). É uma espécie altamente antropofílica e endofílica e predomina nas áreas urbanas do Brasil, sendo encontrada com mais frequência nos meses quentes e chuvosos. As fêmeas realizam repasto sanguíneo no período crepuscular ou noturno e depositam cerca de 150 ovos agrupados sob a forma de jangada. Esta espécie é o vetor primário do nemátodo *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose linfática no Brasil, a segunda doença mais comum transmitida por vetores. Estima-se que cerca de 120 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasita e que mais de um bilhão se encontre sob risco em mais de 80 países (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en/>). A ampla distribuição da doença está associada ao crescimento desordenado da população e às condições precárias de saneamento, que favorecem o desenvolvimento do vetor. Além da filariose, o *C. quinquefasciatus* também pode ser vetor primário de alguns arbovírus como o vírus do Nilo ocidental, Oropouche, Saint Louis entre outros (FIGUEIREDO, 2007; GODSEY et al., 2005; MONDINI et al., 2007).

2.1.2 *Aedes aegypti* Linnaeus 1762

Originariamente descrito no Egito, o *Ae. aegypti* é considerado uma espécie cosmopolita de ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, e foi introduzido no Brasil no final do século XV, provavelmente em embarcações com os primeiros navegantes europeus. O *Ae. aegypti* foi erradicado de várias cidades brasileiras na década de 30 (SOPER, 1963), mas foi reintroduzido devido à falta de manutenção das medidas de controle (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007). No Brasil a espécie ocorre, sobretudo, em áreas urbanas, geralmente no domicílio ou peridomicílio humano. Seus criadouros preferenciais são os recipientes artificiais em locais com pouca iluminação, que contenham água pobre em matéria orgânica. A densidade populacional do *Ae. aegypti* é diretamente

influenciada pela presença de chuvas e densidades elevadas são encontradas nas estações com maiores índices pluviométricos. As fêmeas possuem hábitos hematófagos diurnos, ao contrário do *C. quinquefasciatus*, porém compartilham com esta espécie a predileção pelo ambiente domiciliar, o que facilita o contato com o homem. A estratégia de oviposição do *Ae. aegypti* é diferente daquela adotada pelo *C. quinquefasciatus*, pois em cada postura as fêmeas depositam ovos isolados, distribuídos em diversos criadouros (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). É o vetor primário do vírus da dengue no Brasil e em diversos países, além de ser capaz de disseminar e transmitir o vírus da febre amarela no ciclo urbano da doença (MUTEBI et al., 2004).

2.2 Controle de vetores

O controle populacional de vetores é uma ferramenta efetiva para interromper o ciclo de transmissão de doenças. Entretanto, devido a certas características biológicas peculiares dos culicídeos como elevada taxa reprodutiva, curto ciclo biológico e capacidade elevada de colonizar habitats temporários, a sua redução populacional é um desafio para os programas de controle de doenças como filariose e dengue. A partir da descoberta e utilização dos inseticidas sintéticos de ação residual, na década de 40, foi possível controlar algumas doenças provocadas por vetores e o diclorodifeniltricloroetano (DDT), da classe dos organoclorados, foi o primeiro inseticida a ser amplamente utilizado (HEMINGWAY; RANSON, 2000). As limitações desses inseticidas como o mecanismo de ação inespecífico e a ação em organismos não-alvo, bem como a seleção de populações de insetos resistentes decorrentes do seu uso prolongado (HEMINGWAY; RANSON, 2000), motivaram a busca por métodos de controle mais seletivos. O controle biológico pode ser uma alternativa eficaz e baseia-se na utilização de organismos vivos ou de suas toxinas para reduzir a densidade populacional dos insetos. Dentre estes organismos, as bactérias entomopatógenas são importantes agentes de controle biológico, sendo amplamente utilizadas em programas de controle de vetores (REGIS et al., 2001).

2.3 Bactérias entomopatógenas e seu modo de ação

Os larvicidas à base de bactérias entomopatógenas do gênero *Bacillus* possuem características que favorecem sua utilização em programas de controle, tais como modo de ação específico, segurança para o meio ambiente e facilidade de produção em larga escala. Os larvicidas bacterianos ocupam lugar de destaque desde a década de 70 e representam cerca de 90% do mercado de bioinseticidas. Os biolarvicidas à base das bactérias *Bacillus thuringiensis* (Bt) e *B. sphaericus* (Bsp) são eficazes para o controle de insetos de diferentes ordens, e têm sido utilizados em vários países, inclusive no Brasil (MITTAL, 2003; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1993; REGIS et al., 2001; THIÉRY et al., 1996). Ambas as bactérias são bacilos Gram-positivos, saprófitas de solos e ambientes aquáticos que, quando submetidas a condições adversas, produzem esporos. Durante a fase de esporulação são produzidos cristais que contêm protoxinas com alto poder inseticida. O princípio ativo das preparações de biolarvicidas é constituído por uma mistura de cristais ou esporos, e a sua eficácia pode ser influenciada por diversos fatores físico-químicos e ambientais (MITTAL et al., 1993). Os cristais agem por via oral e as larvas se alimentam no meio aquático por filtração, ingerindo os cristais. Em seguida, os cristais são solubilizados no intestino dos insetos alvo, graças ao pH alcalino ($\cong 10$), as protoxinas são liberadas no lúmen e, devido à ação de serina-proteases são convertidas à forma de toxinas ativas, que interagem com receptores específicos presentes no epitélio intestinal (LACEY, 2007). Tal interação desencadeia efeitos citopatológicos nas células epiteliais intestinais que culminam com a morte dos insetos.

2.4 *Bacillus thuringiensis*

O *B. thuringiensis* é uma bactéria entomopatógena que possui mais de 70 sorovarietades, cujos cristais contêm protoxinas das famílias Cry e Cyt, que possuem ação larvicida, sobretudo para lepidópteros, coleópteros e dípteros. As toxinas Cry são alvo de vários estudos acerca dos mecanismos que envolvem a interação toxina-receptor, devido à ampla utilização de biolarvicidas a base de Bt e de plantas transgênicas que expressam essas

toxinas (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). A ação das toxinas Cry e Cyt depende da interação com receptores específicos nas células do epitélio intestinal das larvas de insetos e, após a ligação aos receptores, ocorre a inserção da toxina na membrana, o que leva à formação de poros nas células apicais (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). A estrutura terciária de algumas toxinas Cry revelou a existência de três domínios. O domínio I (N-terminal) é formado por sete α -hélices e é responsável pela formação de poros na membrana, enquanto que os domínios II e III, constituídos por folhas β , estão envolvidos na ligação da toxina com receptores no epitélio intestinal (Figura 2, Cry3Aa). As toxinas Cyt são toxinas citolíticas e hemolíticas que possuem um único domínio α - β (Figura 2, Cyt2Aa). Tais moléculas atuam diretamente na membrana lipídica das células, podendo inserir-se na mesma e levar à formação de poros (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; GÓMEZ et al., 2007).

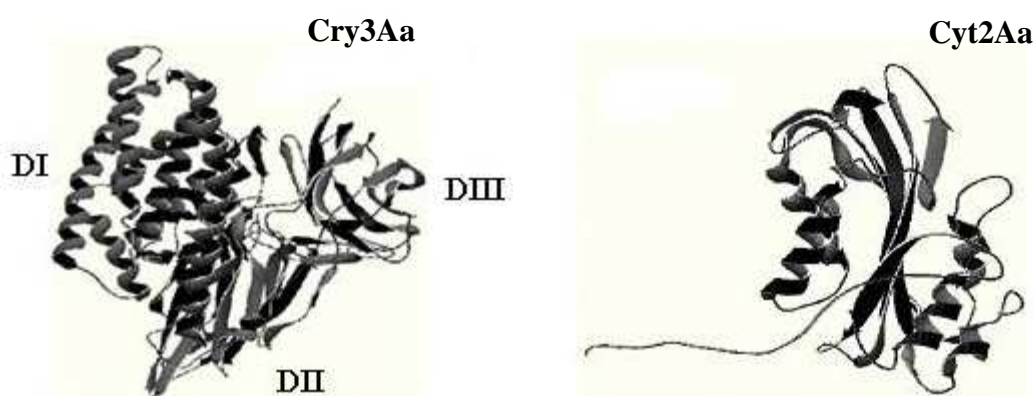


Figura 2. Estrutura tridimensional das toxinas inseticidas produzidas pelo *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa e Cyt2Aa.

Fonte: Bravo; Gill; Soberón, 2007, modificado.

Nota: **DI.** Domínio estrutural I. **DII.** Domínio estrutural II. **DIII.** Domínio estrutural III.

2.4.1 *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis*

O *Bacillus thuringiensis israelensis*, descoberto em 1976 por Goldberg e Margalit (1977) e identificado posteriormente por de Barjac (1978), é específico para larvas de dípteros e possui cristais com elevada toxicidade para larvas de mosquitos. Os cristais ativos contra mosquitos comumente contêm as toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa, que agem em sinergia para causar a ação larvicida (CRICKMORE et al., 1995). Além de possuírem ação

tóxica para larvas de culicídeos, as toxinas do Bti também são ativas contra larvas de simulídeos (LACEY, 2007). Os cristais devem ser ingeridos pelas larvas dos insetos-alvo para que as toxinas sejam liberadas no lúmen intestinal, ativadas pelas proteases ali presentes e interajam com receptores específicos para exercer a ação inseticida (PIGOTT; ELLAR, 2007). O Bti, hoje amplamente utilizado como larvicida, é eficaz para o controle do *Ae. aegypti* pela sua especificidade e alta atividade inseticida e representa uma alternativa ao uso dos organofosforados (LEE; ZAIRI, 2005).

2.4.2 Receptores das toxinas Cry

A ação inseticida específica das toxinas Cry é devida à sua interação com receptores presentes no epitélio intestinal das larvas alvo. Estudos acerca do seu modo de ação têm demonstrado que algumas enzimas digestivas de insetos funcionam como receptores para as toxinas Cry (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). Estudos realizados em lepidópteros demonstraram que a diminuição ou ausência de receptores no *microvilli* intestinal está relacionada ao desenvolvimento de resistência, o que comprova a importância da interação toxina-receptor (JURAT-FUENTES; ADANG, 2004). Dentre as moléculas já caracterizadas como receptores do Bt estão caderinas (CADR), aminopeptidases-N (APN), fosfatases alcalinas (ALP), glicoconjugados e algumas metaloproteases (Figura 3; Tabela 1) (JURAT-FUENTES; ADANG, 2004; KNIGHT et al., 1994; OCHOA-CAMPUZANO et al., 2007; VADLAMUDI et al., 1995; VAILATIS et al., 2001). As caderinas representam uma ampla família de glicoproteínas envolvidas nos processos de adesão e sinalização celular e, em lepidópteros como *Manduca sexta* e *Bombyx mori*, caderinas são receptores da toxina Cry1A (GÓMEZ et al., 2007). As aminopeptidases estão principalmente localizadas no epitélio intestinal de insetos e exercem funções essenciais na digestão de proteínas. Uma aminopeptidase-N de membrana de 120 kDa é o receptor da toxina Cry1Ac no lepidóptero *M. sexta* (KNIGHT et al., 1994, 1995; SANGADALA et al., 1994) e, em espécies de anofelinos, duas outras aminopeptidases também foram identificadas como receptores das toxinas Cry do Bti (HUA et al., 1998; LEHNINGER; NELSON; COX, 1993; REED; CHANDLER; SANDEMAN, 1999; WANG; ZHANG, 2005; ZHANG et al., 2008) (Tabela 2).

A maior parte dos receptores foi descrita para as toxinas Cry com ação para larvas de lepidópteros, ao passo que a caracterização em larvas de dípteros tem sido escassa. Apenas recentemente, o receptor da toxina Cry11Aa do Bti em *Ae. aegypti* foi caracterizado como uma fosfatase alcalina de 65 kDa (FERNANDEZ, et al., 2005). Esta molécula se localiza predominantemente em células intestinais, nas regiões do ceco gástrico e intestino posterior das larvas, e está ligada à membrana por uma âncora GPI (FERNANDEZ, et al., 2006). O atual conhecimento sobre as toxinas do Bt, bem como dos seus respectivos sítios-alvo no intestino das larvas de insetos gerou grandes avanços para o uso de biolarvicidas à base destas bactérias. Apesar da sua importância como agentes de controle, os biolarvicidas Bti e Bsp, usados no controle de mosquitos, apresentam vários aspectos do seu modo de ação ainda não elucidados.

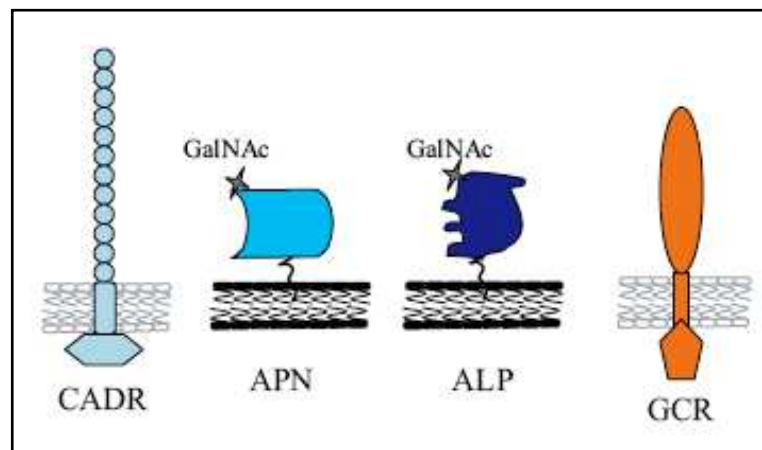


Figura 3. Receptores de toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* caracterizados em larvas de insetos.

Fonte: Bravo; Gill; Soberón, 2007.

Nota: **CADR.** Caderina, **APN.** Aminopeptidase-N, **ALP.** Fosfatase alcalina, **GCR.** Glicoconjugado.

Tabela 1. Receptores de toxinas inseticidas de bactérias entomopatógenas presentes no epitélio intestinal de larvas de lepidópteros.

Espécie	Toxina	Receptores	Peso (kDa)	Referência
<i>Bombix mori</i>	Cry1Aa	CADR ¹ (Bt-R ₁₇₅)	175	Nagamatsu et al., 1999
		APN ²	110	Hua et al., 1998
<i>Helicoverpa armigera</i>	Cry1Ac	APN	120	Ingle et al., 2001
<i>Heliothis virescens</i>	Cry1Ac	APN	170	Luo et al., 1997
		ALP ³	68	Jurat-Fuentes; Adang, 2004
		CADR	210	Jurat-Fuentes; Adang, 2006
<i>Lymantria dispar</i>	Cry1Aa Cry1Ab	Glicoconjugado	270	Valaitis et al., 2001
<i>Manduca sexta</i>	Cry1Ac	APN	120	Knight et al., 1994
	Cry1Ab	CADR (Bt-R ₁)	210	Vadlamudi et al., 1995
<i>Pectinophora gossypiella</i>	Cry1Ac	CADR (BtR)	ND ⁴	Fabrick; Tabashnik, 2007

Fonte: Elaborado pelo autor.

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

Tabela 2. Receptores de toxinas inseticidas de bactérias entomopatógenas presentes no epitélio intestinal de larvas de culicídeos.

Espécie	Toxina	Receptores	Peso (kDa)	Referência
<i>Aedes aegypti</i>	Cry11Aa	ALP ¹	65	Fernandez et al., 2006
<i>Anopheles gambiae</i>	Bin	α -Gli ² (Agm3)	67	Opota et al., 2008
<i>Anopheles gambiae</i>	Cry11Ba	APN ³	106	Zhang et al., 2008
<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	Cry11Ba	APN	100	Abdullah; Valaitis; Dean, 2006
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Bin	α -Gli (Cqm1)	60	Romão et al., 2006
<i>Culex pipiens</i>	Bin	α -Gli (Cpm1)	60	Silva-Filha et al., 1999; Darboux et al., 2001

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: ¹ALP - Fosfatase alcalina; ² α -Gli - α -Glicosidase; ³APN – Aminopeptidase.

2.5 *Bacillus sphaericus*

O *Bacillus sphaericus* (Bsp) é uma bactéria Gram-positiva, saprófita de solos e ambientes aquáticos que, quando submetida a condições adversas, produz esporos arredondados, localizados na região terminal do esporângio em forma de raquete (Fig. 4). A primeira linhagem inseticida do Bsp foi isolada em 1965, a partir de larvas mortas de *Culiseta incidens*, entretanto esta linhagem possuía baixa atividade para larvas de mosquitos (KELLEN, 1965). Posteriormente, novas linhagens com alto potencial larvicida foram isoladas, incluindo a 1593 da Indonésia (SINGER, 1977), 2297 do Sri Lanka (WICKREMESINGHE; MENDIS, 1980), 2362 da Nigéria (WEISER, 1984) e C3-41 da China (ZHANG *et al.*, 1987), o que levou ao desenvolvimento de biolarvicidas comerciais à base dessa bactéria. As cepas do Bsp são agrupadas de acordo com as características morfológicas e bioquímicas. A reação de aglutinação flagelar é o método de classificação mais utilizado e reúne as cepas em diferentes sorotipos, sendo o mais importante o H5a5b, que agrupa as cepas 1593, 2362 e C3-41, utilizadas para a produção industrial de biolarvicidas. As toxinas produzidas pelo Bsp são eficazes contra espécies de *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia* e *Aedes* e possuem grande potencial como agente para o controle de larvas de mosquitos, sendo amplamente utilizadas em programas de controle (LACEY, 2007). No caso específico do *Ae. aegypti*, o Bsp não apresenta atividade larvicida, portanto, o controle biológico deste vetor é realizado principalmente com o Bti, conforme descrito na seção 2.4.1.

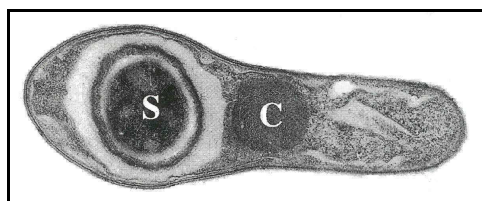


Figura 4. Micrografia eletrônica do *Bacillus sphaericus* em fase de esporulação.

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

Nota: S. esporo. C. cristal protéico que possui ação larvicida para dípteros

2.5.1 Toxinas inseticidas

O Bsp possui três classes de toxinas que apresentam atividade larvicida para dípteros: as toxinas Mtx (toxinas mosquitocidas), produzidas na fase de crescimento vegetativo, a toxina Bin (toxina binária) e as toxinas Cry48Aa e Cry49Aa, que são produzidas durante a esporulação (CHARLES et al., 1996; JONES, et al, 2007).

Os principais tipos descritos da toxina Mtx são as proteínas Mtx1 (100 kDa), Mtx2 (31 kDa) e Mtx3 (36 kDa). Estas toxinas não apresentam uma contribuição importante para a atividade larvicida de culturas esporuladas do Bsp, pois sofrem degradação por proteases, visto que são secretadas no meio durante sua produção na fase vegetativa (CHARLES et al., 1996; THANABALU; PORTER, 1995). Entretanto, quando expressas sob a forma recombinante em *Escherichia coli*, as toxinas possuem alto poder larvicida para larvas de dípteros (PARTRIDGE; BERRY, 2002; WEI et al., 2006).

Uma nova toxina binária, formada pelas toxinas Cry48Aa e Cry49Aa foi identificada na cepa IAB59 do Bsp. A toxina Cry48Aa/Cry49Aa apresenta alta toxicidade para *C. quinquefasciatus* quando administrada de forma purificada e em concentrações equimolares. No entanto, cepas nativas que expressam essa nova toxina não possuem atividade larvicida elevada, devido ao baixo nível de acúmulo da Cry48Aa, impedindo a atividade tóxica que só ocorre na razão molar de 1:1 (JONES et al., 2007).

A toxina Bin é o principal fator responsável pela ação larvicida do Bsp para culicídeos e se localiza no cristal, sob a forma de uma protoxina heterodimérica, composta por polipeptídeos de 42- e 51- kDa (BinA/BinB), produzidos de forma equimolar (BAUMANN, et al., 1988; CHARLES, 1987). A toxicidade máxima é observada quando ambos os componentes da toxina estão presentes em concentrações equimolares, o que indica a atuação sinérgica entre eles e justifica a natureza binária desta toxina (CHARLES, 1997; NICOLAS et al., 1993). Em larvas do gênero *Culex*, o componente BinB é responsável pelo reconhecimento e ligação aos receptores nas células do epitélio intestinal, enquanto BinA parece estar envolvido no mecanismo de toxicidade (NICOLAS et al., 1993).

2.5.2 Toxina Bin

A toxina Bin constitui o principal fator inseticida do Bsp e os biolarvicidas disponíveis comercialmente são obtidos a partir de cepas produtoras dessa toxina, como a 1593, 2362 e C3-41. A toxina Bin possui atividade inseticida decrescente para larvas dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes* e a sua ação depende da interação com receptores no *microvilli* intestinal das larvas. A atividade do Bsp para diferentes espécies do gênero *Aedes* é variável, porém, larvas de *Ae. aegypti* são consideradas refratárias à ação do Bsp, pois requerem concentrações letais cerca de 100 vezes mais elevadas que aquelas utilizadas para larvas de *Culex* (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992).

Após a ingestão do cristal protéico, o mesmo é solubilizado em pH alcalino intestinal ($\cong 10$) e a protoxina é liberada no lúmen. Graças à ação de serina-proteases, os componentes BinA e BinB de 42 e 51 kDa, respectivamente, são clivados e atingem a sua forma ativa, constituída de polipeptídeos de 39- e 43-kDa, respectivamente, que interagem com receptores específicos do epitélio intestinal das larvas e promovem o efeito letal (BAUMANN et al., 1985; BROADWELL; BAUMANN, 1987; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). Os principais efeitos citopatológicos observados em células intestinais de larvas tratadas com Bsp são danos nas microvilosidades, intumescimento das cristas mitocondriais, fragmentação do retículo endoplasmático e vacuolização citoplasmática (CHARLES et al., 1987; de MELO et al., 2008; SILVA-FILHA; PEIXOTO, 2003; SINGH; GIL, 1988). Demonstrou-se ainda que o componente BinA da toxina é capaz de formar poros em membranas fosfolipídicas artificiais (SCHWARTZ et al., 2001). O componente BinB também pode, em menor extensão, promover estas alterações, embora o seu principal papel seja o reconhecimento e interação com os receptores do *microvilli* (NICOLAS et al., 1993).

A especificidade da ação do Bsp é determinada pela ligação da toxina Bin a uma classe de receptores específicos, presentes na membrana apical do epitélio intestinal de larvas de espécies susceptíveis dos gêneros *Culex* e *Anopheles* (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA et al., 1997). A toxina Bin se liga de forma específica a receptores presentes no *microvilli* intestinal de larvas de *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus*, *An. stephensi* e *An. gambiae* (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA et al., 1997, 2004). Em *Ae. aegypti*, espécie naturalmente refratária ao Bsp, não foi possível detectar uma ligação significativa da toxina às preparações de BBMF (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). O

padrão de ligação da toxina Bin aos receptores presentes em larvas de *Culex* ocorre de forma regionalizada no ceco gástrico e intestino posterior, ocorre de forma mais disseminada em *Anopheles*, e é praticamente nula em *Ae. aegypti* (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). Estudos de ligação da toxina Bin ao *microvilli* intestinal de larvas demonstram que a afinidade de ligação da toxina aos receptores e a concentração destes no *microvilli* está diretamente relacionada à susceptibilidade *in vivo* das larvas (SILVA-FILHA et al., 1997). Assim, em espécies do complexo *Culex*, que são altamente susceptíveis, a ligação é de alta afinidade e a concentração de receptores é elevada. Por outro lado, em espécies menos susceptíveis como algumas espécies de *Anopheles* a afinidade de ligação é inferior.

2.5.3 Receptor da toxina Bin em culicídeos

O receptor da toxina Bin em *C. quinquefasciatus* e *C. pipiens* é uma α -glicosidase (E.C. 3.2.1.20) de 60 kDa, ligada à membrana apical do epitélio intestinal através de uma molécula de glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (DARBOUX et al., 2001; PAUCHET et al., 2005; ROMÃO et al., 2006; SILVA-FILHA et al., 1999). As α -glicosidases desempenham um importante papel fisiológico na digestão de carboidratos e são produzidas como proteínas de membrana ou solúveis no intestino dos insetos (CARNEIRO et al., 2004; ERTHAL; SILVA; SAMUELS, 2007; SOUZA-NETO, et al., 2007). São responsáveis pela hidrólise de ligações α -1-4 entre resíduos de glicose, principalmente em dissacarídeos e oligossacarídeos, importantes componentes da dieta de insetos, e possuem atividade ótima em uma faixa de pH entre 5,0 e 6,5 (KRAZIKOV; KARELOV; FIRSOV, 2001; TERRA; FERREIRA, 1994).

As α -glicosidases de *Culex* identificadas como receptores da toxina Bin foram denominadas “*C. pipiens* maltase” 1 (Cpm1) e “*C. quinquefasciatus* maltase” 1 (Cqm1), devido à sua homologia com as moléculas desta família de enzimas depositadas no banco de dados de proteínas (SILVA-FILHA et al., 1999). A sequência protéica deduzida dos receptores Cqm1 e Cpm1 apresenta 580 aminoácidos e, a partir da comparação com outras seqüências depositadas no banco de dados de proteínas, podem ser encontradas maltases ortólogas com alta homologia. As seqüências de proteínas ortólogas de *C. pipiens* (Cpm1-*Culex pipiens* maltase 1) (AF222024), de *Ae. aegypti* (Aam1) (XP_001660909) e de *An. gambiae* (Agm3) (EAA14808) apresentaram similaridades de 98, 83 e 78, respectivamente

(Fig. 5) (ROMÃO et al., 2006). Recentemente demonstrou-se que uma proteína Agm3 recombinante de *An. gambiae* é capaz de ligar-se à toxina Bin *in vitro* (OPOTA et al., 2008). A seqüência completa do gene *cqm1*, obtida de *C. quinquefasciatus*, é composta de 1870 nucleotídeos, uma região codificante de 1743 pb, um primeiro íntron de 50 pb e um segundo que pode variar de 55 a 57 pb, e está disponível no GenBank sob o número de acesso DQ333335 (CHALEGRE, 2008; ROMÃO et al., 2006).

```

gi | 84621561 | gb | ABC59609.1 | _Cqm1    ---MRPLGAL SLVALL--AM TVNGLAIREP DSKDWMQHAT FYQIYPRSFL DSNGDGIGDL AGITSSKMKYL A-DIGIDATW LSPPPFKSPLK DFGYDVSDFY
gi | 15667644 | gb | AAL05443.1 | _Cpm1    ---MRPLGAL SLFALL--AT TVSGLAIREP DAKDWMQHAT FYQIYPRSFL DSNGDGIGDL AGITSSKMKYL A-DIGIDATW LSPPPFKSPLK DFGYDVSDFY
gi | 159792926 | gb | ABW98683.1 | _Agm3    MKFYRPLVTV SLTVALLSAC ALQAAEVREP DEKDWYQHAT FYQIYPRSFQ DSNGDGIGDL KGITARMEYL A-GLGIDATW LSPPPFVSPLA DFGYDVADFY
gi | 157126497 | ref | XP_001660909_Aam1    ---MR-LCSA GLLVTL--AV FASSFDIREP EQKDWYQHAT FYQIYPRSFK DSNGDGIGDL AGITSSKMSYL A-DIGIDATW LSPPPFKSPLR DFGYDVSDFY

gi | 84621561 | gb | ABC59609.1 | _Cqm1    AIQPEYGNLT DFDKLVEESH KNGIKLMLDF IPNHSSDOHE WFKSVARDE EYSDFYVWRP ----PA--TG GG-PPNNWIS VFGGSAWTYN TARGEYYLHQ
gi | 15667644 | gb | AAL05443.1 | _Cpm1    AIQPEYGNLT DFDKLVEEAH KNGIKLMLDF IPNHSSDOHE WFKSVARDE EYSEFYVWKP ----PA--TG GG-PPNNWIS VFGGPAWTYN AARGEYYLHQ
gi | 159792926 | gb | ABW98683.1 | _Agm3    DIQPEYGTLA DMEELIAEAH RHGIKLMLDF IPNHSSDEHD WFKVSANGVA KYRFYYIWRP GRQNSQ--TG ALEPPNNWIS VFGGPAWTYD ERRGEFYLHQ
gi | 157126497 | ref | XP_001660909_Aam1    DIQPEYGTLE SFDELVQEAH KNGIKLMLDF IPNHSSDEHD WFKVSAERNE TKRDFYVWHP GRQNAE--TG KLDPPNNWIS VFGGPAWTYH EGRQEFYLHQ

gi | 84621561 | gb | ABC59609.1 | _Cqm1    FTPQQPDLNY RNPKVLAEMT KMLFFWLDRG VDGFRLDAIN HMFEDEQ--- --FRDEPLSG WQQ-SGEYDS LDHIYTKDIP DVYDVVYNWR DQMDKYSAEK
gi | 15667644 | gb | AAL05443.1 | _Cpm1    FTPQQPDLNY RNPKLLAEMT KMLFFWLDRG VDGFRLDAIN HMFEDEQ--- --FRDEPVSG WQQ-PGEYDS LDHIYTKDIP DVYNVVYNWR DQMDKYSAEK
gi | 159792926 | gb | ABW98683.1 | _Agm3    FTKKQADLNY RNPAVVEEMT KMLSFWLEKG VDGFRLDAIN HMFEDAQ--- --LRDEPP-G WGA-PGTYDE LDHIYTKDNP DTYNVVYGWR QLCDDFGRRM
gi | 157126497 | ref | XP_001660909_Aam1    FTKKQPDLNY RNPAVLEEMT KMLFFWLDRG VDGFRLDAIN HMFEDEP--- --LRDEPPSG WSD-PGKYDS LDHIYTKDVE DVYKVVYDWR DLMDTYSKEN

gi | 84621561 | gb | ABC59609.1 | _Cqm1    --GRTIILMT EAYSSIEGTM LYYESADRKR QGAHMPFNFQ LIYDFKKEQN AVGLKSSDW WMNMP--AR HTPSWVAGSH DHSRVASRVG LDRVDQVMTL
gi | 15667644 | gb | AAL05443.1 | _Cpm1    --GRTIILMT EAYSSIEGTM LYYESADRKR QGAHMPFNFQ LIYDFKKEQN AVGLKSSDW WMNMP--AR HTPSWVAGSH DHSRVASRVG LDRVDQVMTL
gi | 159792926 | gb | ABW98683.1 | _Agm3    --NKTIIILMT EAYASINMT LYYEDATGTR QGAHMPFNFQ LIYDFRHDQN AIGLKSSDF WLNHMP--AR HTASWVAGSH DHSRVGSRVG LEHVDQVLTL
gi | 157126497 | ref | XP_001660909_Aam1    --GRTIILMT EAYSSIEGTM LYYENANRTR QGAHMPFNFQ LIYDFKDIQN AVGLKSSDW WMNHMP--AR HTPSWVSGSH DHERFASRVG ENRVEQMMTL

gi | 84621561 | gb | ABC59609.1 | _Cqm1    LHTLPGTSIT YYGEEVAMOD F----- ----KEA QQFDNRDPNR TPMOWDSSTS AGFSTNTNTW LRVHPDYARY NVDVMQ-KNP QSTFHHFQHL
gi | 15667644 | gb | AAL05443.1 | _Cpm1    MHTLPGTSIT YYGEEVAMOD F----- ----KEA QQFDNRDPNR TPMOWDSSTS AGFSTNTNTW LRVHPDYARY NVDVMQ-KNP QSTFHHFQHL
gi | 159792926 | gb | ABW98683.1 | _Agm3    LHTLPGTSIT YYGEEIGMLD F----- ----KDA QLYDNRDPNR TPMOWDSSTS AGFSTNRTW LRLHPDYPTR NVAMQE-AAE KSTLKHFRTL
gi | 157126497 | ref | XP_001660909_Aam1    LHTLPGTSIT YYGEEIGMLD Y----- ----KEA QTYDGRDPNR TPMOWDGTTS AGFSTNATW LKVHPDYASL NVDLQQ-NAE KSFHHFRAL

gi | 84621561 | gb | ABC59609.1 | _Cqm1    TKLRRHRTMQ SCEYVHKTVG TKVYALLRREL RGEDSFLTVL NMAGAEDTVD LGDFVN-LPQ KMRVEVAQPN SKSKACNEVD IGKLTLGPYD SVVLRATVSS
gi | 15667644 | gb | AAL05443.1 | _Cpm1    TKLRGHRTMQ SCEYVHKTVG TKVYALLRREL RGEDSFLTVL NMAGAEDTVD LGDFVN-LPQ KMRVEVAQPN SKSKACNEVD ISKLTLGPYD SVVLRATVSS
gi | 159792926 | gb | ABW98683.1 | _Agm3    TALRRHPTLV HGEFKHRTVG PDVYAFSRREL HGEDTLVTVL NMATSSRTVD LGDFVN-LPA RLTVEIAQPM SNYKACDEVD IHQVTLLQHD SVVLRAVVSG
gi | 157126497 | ref | XP_001660909_Aam1    TSLRRHETMQ NGEFLHRTVG THVYALLRREL QGRDSFLTVL NVADKQYDAD LGDFVN-LPE KMTVQVAQSN STLKACDVVE ISKVTLGPYD SIVLRA--SS

gi | 84621561 | gb | ABC59609.1 | _Cqm1    AAAINLSIGL LLAIMARYIF V
gi | 15667644 | gb | AAL05443.1 | _Cpm1    AAAINLSIGL LLAIMARYIF V
gi | 159792926 | gb | ABW98683.1 | _Agm3    ASVRLSLIV ALLAAVEHLF -
gi | 157126497 | ref | XP_001660909_Aam1    AAAIQLSLSV VIALIVKYFL V

```

Figura 5. Alinhamento múltiplo no programa Clustal W da sequência de aminoácidos do receptor da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* em *Culex quinquefasciatus* com sequências de proteínas ortólogas de outros dípteros.

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

Nota: Estas sequências são de *Culex pipiens* (Cpm1), *Aedes aegypti* (Aam1) e *Anopheles gambiae* (Agm3). Os aminoácidos idênticos estão marcados em preto e os similares estão mostrados em cinza. Quando necessário foram inseridos gaps para permitir um melhor alinhamento.

2.5.4 Resistência de *Culex* à toxina Bin

O estudo da resistência de *Culex* ao Bsp mostrou que a falha na ligação da toxina ao *microvilli* intestinal das larvas é o principal mecanismo envolvido, reforçando a importância desta etapa no modo de ação do biolarvicida (NIELSEN-LEROUX et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004). Quatro alelos dos genes *cpm1* e *cqm1* que conferem resistência ao Bsp, descritos em estudos prévios, levam à produção de receptores não funcionais. Três destes alelos levam à produção de proteínas truncadas e desprovidas de âncora GPI e, portanto, incapazes de interagir com a toxina por não estarem disponíveis no epitélio intestinal (DARBOUX et al., 2002, 2007; ROMÃO et al., 2006). Um quarto alelo codifica uma proteína ligada à membrana por uma âncora GPI, no entanto, esta é incapaz de ligar-se à toxina, possivelmente devido a alterações no sítio de ligação à toxina ou modificações na estrutura protéica (DARBOUX et al., 2007). A caracterização destes alelos de resistência demonstrou que algumas mutações podem levar à produção de proteínas que não possuem habilidade de ligar-se à toxina Bin. É possível que a refratariedade do *Ae. aegypti* ao Bsp possa estar relacionada à diferença na sequência primária de aminoácidos da proteína Aam1 ou diferenças estruturais da proteína, visto que não ocorre ligação da toxina ao epitélio intestinal das larvas deste inseto.

2.5.5 α -glicosidases ortólogas ao receptor Cqm1 em *Aedes aegypti*

A análise de sequências no GenBank mostrou que um gene com alta homologia àquele que codifica o receptor da toxina Bin em *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus* e *An. gambiae* está presente em *Ae. aegypti* (ROMÃO et al., 2006). A similaridade de 83% entre as sequências das moléculas Aam1 e Cqm1, considerada bastante elevada, motivou a investigação dos mecanismos moleculares que determinam a refratariedade do *Ae. aegypti* ao Bsp. Além do gene *aam1* também foram detectados outros genes (XP_001656785; XP_001649784), com similaridades de 67 e 76% ao gene *cqm1*, respectivamente, e que codificam maltases parálogas em *Ae. aegypti*. A ausência de ligação da toxina Bin ao *microvilli* intestinal de *Ae. aegypti* pode resultar da ausência de expressão do gene *aam1* nos insetos, da expressão desse gene em outra fase do desenvolvimento que não a fase de larvas, da expressão em níveis

indetectáveis, da produção de uma proteína desprovida de âncora GPI e, portanto, expressa sob a forma solúvel, ou ainda de diferenças estruturais nas proteínas que sejam críticas para o seu reconhecimento e ligação com a toxina Bin. Uma outra possibilidade é que a proteína Aam1 seja expressa nas larvas de *Ae. aegypti*, porém não possua a capacidade de interagir com a toxina Bin, devido a diferenças na sequência primária de aminoácidos ou de alterações na conformação da proteína Aam1 que impediriam a interação.

3 JUSTIFICATIVA

O *Aedes aegypti* é o principal vetor do vírus da dengue, doença de grande relevância para a saúde pública que se tornou alvo de várias campanhas de controle no país. Essa espécie pode ainda ser um importante vetor do vírus da febre amarela no ciclo urbano da doença. Devido às dificuldades enfrentadas no controle de vetores, a implementação de métodos de controle biológico é de grande importância para minimizar os problemas gerados pelo uso de inseticidas químicos. O Bsp é um importante componente de formulações comerciais de biolarvicidas e, embora as larvas de *Ae. aegypti* sejam refratárias à toxina Bin, dados prévios da nossa equipe demonstram que esta espécie possui um gene que codifica uma molécula (Aam1) ortóloga ao receptor Cqm1 de *C. quinquefasciatus*. Este achado demonstra que a análise comparativa das α -glicosidases Aam1 e Cqm1 de *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, espécies refratária e susceptível, respectivamente, constituem um modelo ímpar para a compreensão do modo de ação da toxina Bin, e os conhecimentos obtidos poderão dar subsídios para o desenvolvimento de estratégias moleculares para o aperfeiçoamento da toxina Bin.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Qual a base molecular do mecanismo que determina o *status* de refratariedade do *Aedes aegypti* ao biolarvicida *Bacillus sphaericus*?

5 HIPÓTESE

A ausência de transcrição do gene *aam1* ou da expressão da proteína Aam1 na fase larvar, bem como a expressão de uma proteína contendo modificações estruturais em relação à proteína Cqm1, podem determinar a refratariedade do *Aedes aegypti* ao *Bacillus sphaericus*.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

Identificar os fatores que determinam a refratariedade das larvas de *Aedes aegypti* ao *Bacillus sphaericus*, a fim de gerar conhecimentos para a compreensão do modo de ação deste biolarvicida.

6.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a expressão da proteína Aam1 nas fases de larva e adulto de *Ae. aegypti*, em relação à expressão da proteína Cqm1 de *C. quinquefasciatus*;
- b) Comparar o perfil de α -glicosidases expressas em larvas e adultos de *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*;
- c) Avaliar se proteínas nativas do *microvilli* intestinal de *Ae. aegypti* têm a capacidade de ligar-se à toxina Bin;
- d) Produzir proteínas Aam1 e Cqm1 recombinantes e avaliar a sua capacidade de ligação à toxina Bin.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Procedimentos experimentais

Na primeira etapa dos procedimentos, larvas e adultos de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* foram utilizados na preparação de amostras protéicas que foram submetidas à imunodeteccção, com anticorpo anti-Cqm1, e à avaliação do perfil de α -glicosidases. Em um segundo momento, o gene *aam1* foi clonado e a expressão da proteína recombinante foi feita em *Escherichia coli* e em um lisado de reticulócitos de coelho, utilizando o gene *cqm1* como padrão. As proteínas nativas e recombinantes foram submetidas a ensaios de funcionalidade para verificar a sua capacidade de interação com a toxina Bin (Figura 6).

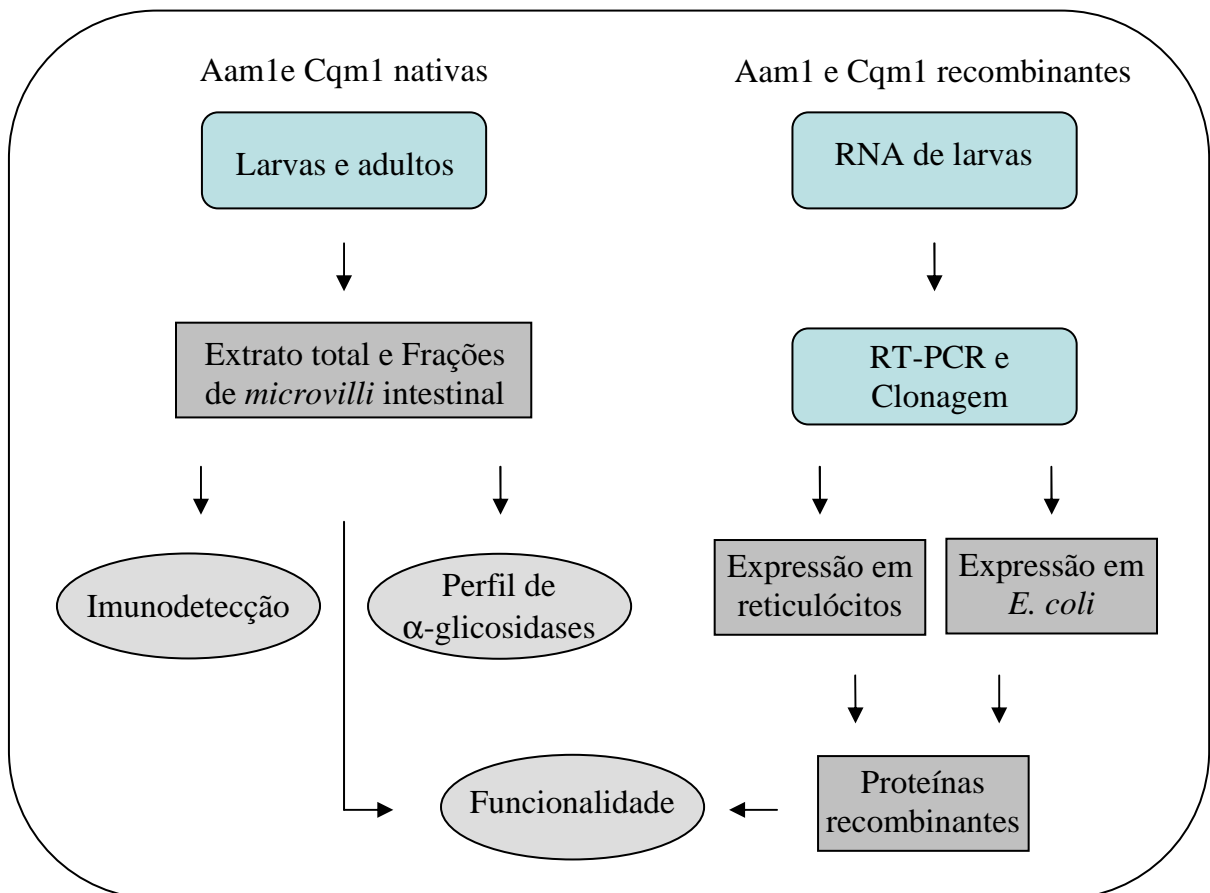


Figura 6. Principais etapas dos procedimentos experimentais para a avaliação das α -glicosidases Aam1 de *Aedes aegypti* e Cqm1 de *Culex quinquefasciatus* sob as formas nativa e recombinante.

Fonte: Elaborado pelo autor.

7.2 Colônias de insetos

Foram utilizadas amostras de larvas e adultos de *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, das colônias RecL e CqSF, respectivamente, mantidas no insetário do Departamento de Entomologia do CPqAM, sob as seguintes condições: temperatura de 26 ± 1 °C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12:12h (claro:escuro). As larvas foram mantidas em água declorada e alimentadas com ração para gatos. Os adultos foram alimentados com solução de sacarose a 10% e as fêmeas também fizeram o repasto sanguíneo em aves (*Gallus gallus*). As amostras de larvas de *An. gambiae* da linhagem G3, utilizadas neste estudo, são provenientes do Centro de Produção e Infecção de Anofelinos (CEPIA) do Instituto Pasteur (Paris), e foram gentilmente cedidos pela Dra. Cathérine Bourgouin e Dra. Isabelle Thiery.

7.3 Análise da expressão da proteína Aam1 nativa

A finalidade desta etapa foi investigar a expressão da proteína Aam1 em amostras de *Ae. aegypti*, utilizando a proteína Cqm1 de *C. quinquefasciatus* como padrão. Diferentes amostras biológicas foram utilizadas para avaliação da expressão destas proteínas através de imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1 e do perfil de α -glicosidases *in gel*.

7.3.1 Preparação de proteínas nativas

Para a análise das proteínas nativas foram obtidas amostras de extrato total de proteínas de larvas e adultos, preparações ricas em *microvilli* intestinal de larvas (BBMF) e preparações de proteínas de BBMF solubilizadas (extrato-CHAPS).

7.3.1.1 Extrato total de larvas e adultos

Para a obtenção do extrato total de proteínas, larvas do 1º ao 4º estágio e adultos de *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus* foram macerados em 10 µl de tampão PBS/Azida (NaH₂PO₄ 2.1 mM, Na₂HPO₄ 14 mM, NaCl 150 mM, NaN₃ 0.02%, pH 7.4), contendo 10 mM de fluoreto de fenilmetanilsulfonil (PMSF, Sigma) como inibidor de proteases. As amostras foram centrifugadas a 1.500 g, durante 2 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado imediatamente nos ensaios de imunodeteccção e de atividade enzimática. A concentração de proteínas das amostras foi mensurada segundo o método de Bradford, utilizando uma curva de albumina sérica bovina (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976).

7.3.1.2 Frações ricas em microvilli intestinal (BBMF) de larvas

As preparações de BBMF foram obtidas a partir de larvas do 4º estágio de *Ae. aegypti*, *An. gambiae* e *C. quinquefasciatus* armazenadas a – 80 °C, segundo Silva-Filha et al. (1997). Esta técnica baseia-se no isolamento de membranas apicais através da precipitação seletiva das frações intestinais utilizando cátions divalentes (Mg⁺⁺), seguida de centrifugação diferencial. A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o item anterior e a qualidade das amostras de BBMF foi avaliada através da determinação do enriquecimento da enzima α-glicosidase (E.C. 3.2.1.20), comparando amostras de 10 µg de proteínas do extrato total de larvas, obtido no início do processo, com amostras da fração de microvilosidades, obtida ao final da preparação. As amostras foram incubadas em um volume final de 1 ml do tampão citrato de sódio-fosfato 100 mM, pH 6.5, contendo 2 mM do substrato p-nitrofenil-α-D-glicopiranosídeo (Sigma) a 37 °C, durante 30 minutos. A atividade α-glicosidase das preparações foi avaliada através da variação da absorbância a 405 nm, registrada por espectrofotometria.

7.3.1.3 Frações de proteínas de BBMF solubilizadas (extratos-CHAPS)

Nesta etapa, foram obtidas frações de proteínas do *microvilli* intestinal das larvas, solubilizadas com detergente CHAPS, segundo Silva-Filha et al. (1999). As amostras de BBMF foram centrifugadas a 100.000 g, a 4 °C, durante 14 minutos e o sedimento foi incubado com o tampão TBSEA (Tris 19 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5) contendo o detergente CHAPS na concentração final de 1%, sob agitação lenta, durante 1 hora a 4 °C. Após a solubilização as preparações foram centrifugadas a 100.000 g, 4 °C, durante 14 minutos. O sobrenadante (extrato-CHAPS) foi coletado e armazenado a – 70 °C até a sua utilização. A dosagem de proteínas para avaliar o rendimento da solubilização dos extratos e a atividade α -glicosidase, para mostrar o enriquecimento das preparações em proteínas de membranas apicais, antes e após a solubilização, foi feita conforme descrito no item 7.3.1.2.

7.3.2 Ensaio de imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1

O objetivo desta etapa foi demonstrar, através de imunodeteção com o anticorpo anti-Cqm1, se as proteínas Aam1 e Agm3 são expressas em *Ae. aegypti* e *An. gambiae*, respectivamente, seja no extrato de proteínas totais do inseto, seja em preparações de BBMF. As amostras foram submetidas à separação eletroforética SDS-PAGE a 10% e as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose ECL® (GE Healthcare) que foi submetida à imunodeteção (*Western-blot*). A membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5% em tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.2 %, pH 7,4) por 1 h à temperatura ambiente (TA) e, em seguida, foi incubada com o anticorpo primário anti-Cqm1 (1:100) produzido em coelhos, durante 16 h a 4 °C, seguido de uma incubação com um anticorpo anti IgG de coelho (1:10.000) conjugado à peroxidase (Amersham). Entre cada uma das incubações foram realizadas lavagens da membrana com o tampão TBS-T e a imunodeteção foi realizada por quimioluminescência, utilizando o sistema de detecção ECL® (GE Healthcare). O anticorpo anti-Cqm1 reconhece de forma específica o receptor Cqm1 em extratos totais e *microvilli* intestinal de larvas de *C. quinquefasciatus* (ROMÃO et

al., 2006). Ensaios preliminares demonstraram que este anticorpo é capaz de reconhecer maltases ortólogas de outros dípteros. O anticorpo policlonal foi produzido no Laboratório de Entomologia do CPqAM e submetido ao procedimento de imunoadsorção (MINSHAL; STANDARD, 2004), com a finalidade de melhorar a sua especificidade.

7.3.3 Perfil de α -glicosidases em gel

Os ensaios de atividade enzimática em gel permitem a visualização do perfil α -glicosidases produzidas nas fases pré-imaginal e adulta dos insetos. O perfil de *C. quinquefasciatus*, previamente descrito em Romão et al. (2006), apresenta quatro bandas catalíticas reprodutíveis, dentre elas, a α -glicosidase Cqm1, que migra com peso molecular aparente de 83 kDa, sob condições semi-desnaturantes. A partir dessa análise, foi possível estabelecer um padrão comparativo das amostras de *Ae. aegypti* e *An. gambiae* e *C. quinquefasciatus*. Nesses ensaios, foram utilizadas amostras de extrato total e BBMF solubilizadas em tampão de Laemmli 2X (LAEMMLI, 1970), sem o agente redutor 2-mercaptoetanol e sem aquecimento. As amostras protéicas (15 μ g) foram submetidas a SDS-PAGE 8% a 4 °C e, após a migração eletroforética, o gel foi equilibrado três vezes em uma solução aquosa de Triton X-100 a 2.5 % por 10 minutos, à TA. Em seguida, o gel foi incubado em tampão citrato de sódio-fostato 100 mM pH 6.5 contendo 2 mM do substrato 4-metilumbeliferil α -D-glicosídeo (SIGMA), por 20 minutos a uma temperatura de 37 °C, sob agitação leve. A visualização do perfil de bandas catalíticas das α -glicosidases foi feita em transiluminador de luz ultravioleta (UV).

7.4 Clonagem e expressão das maltases Aam1 e Cqm1

As proteínas Aam1 e Cqm1 foram produzidas sob a forma recombinante para investigar a sua capacidade de ligação à toxina Bin. Para tal, os genes *aam1* e *cqm1* foram amplificados e clonados em vetores plasmidiais de expressão. Os clones obtidos foram submetidos, quando necessário, a reações de mutagênese sítio-dirigida na sua sequência para

otimização do nível de expressão protéica. As proteínas recombinantes Aam1 e Cqm1 foram produzidas através de dois sistemas: um procarioto, utilizando células de *E. coli*, e outro eucarioto, que utiliza reticulócitos de coelho para a tradução protéica.

7.4.1 Extração de RNA, RT-PCR e PCR do gene *aam1*

Para a obtenção do RNA necessário à produção do cDNA do gene *aam1* foi utilizado um *pool* de 40 larvas ou adultos de *Ae. aegypti* e a extração do RNA total foi realizada segundo Romão et al. (2006). O RNA total obtido foi purificado com fenol-clorofórmio e quantificado por espectrofotometria a 260 e 280 nm. As reações de transcrição reversa (RT-PCR), para a obtenção do cDNA, foram realizadas utilizando o *primer* oligo DT₂₀ (Invitrogen), que possui a capacidade de anelar à cauda poli-A de todos os mRNAs expressos presentes na amostra de RNA total extraído. Para cada reação foram utilizados 13 µg do RNA total obtido, 7,5 U de transcriptase reversa AMV® (GIBCO) e 2 µM do *primer* Oligo DT₂₀, além de cada um dos rNTPs, durante 1 h a 37 °C, segundo informações do fabricante.

A partir do cDNA obtido na etapa anterior, as reações de PCR foram realizadas segundo Romão et al. (2006), utilizando *primers* específicos para o gene *aam1* (NENE et al. 2007) disponível no GenBank. As amostras foram amplificadas em um termociclador BIOMETRA® programado para as seguintes condições: uma etapa de desnaturação a 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 50 seg, 55 °C por 50 seg, 72 °C por 120 seg e uma etapa final de 72 °C por 10 min. As amostras amplificadas foram analisadas em eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 8.9 mM, EDTA 2 mM) 0.5X, corado com brometo de etídeo e visualizado em um transiluminador de luz UV.

7.4.2 Clonagem e sequenciamento do gene *aam1*

Os produtos de amplificação do gene *aam1*, obtidos nas reações de PCR foram purificados com o kit GFX DNA and Gel Band Purification® (GE Healthcare). Em seguida, os fragmentos foram inseridos no vetor plasmidial pGEM®-T Easy (Promega), segundo as

instruções do fabricante. Os plasmídeos recombinantes obtidos foram utilizados na transformação de células de *E. coli* cepa DH10B eletrocompetentes, segundo as instruções do fabricante. Após o crescimento bacteriano, foram feitas preparações de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina, de acordo com Ausbel et al. (1992), para a obtenção dos clones de interesse. As preparações de DNA plasmidial foram digeridas com as endonucleases de restrição *Pst* I e *Hind* III a 37 °C e os fragmentos liberados foram purificados e subclonados nos vetores plasmidiais de expressão pRSETc[®] (Novagen) e pGEM3zf+[®] (Promega), para a expressão protéica em *E. coli* ou em lisado de reticulócitos de coelho, respectivamente. Os plasmídeos contendo o fragmento dos genes *aam1* e *cqm1* foram enviados para sequenciamento automático no ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM. Os “contigs” foram montados no programa SeqMan (DNASar), a partir dos eletroferogramas obtidos nas reações de sequenciamento e as sequências foram editadas no programa EditSeq (DNASar). A identidade dos fragmentos foi confirmada pela comparação das seqüências obtidas com aquelas disponíveis no GenBank, através da ferramenta BLASTp do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). As construções plasmidiais contendo o gene *cqm1* utilizadas neste estudo, foram obtidas previamente (ROMÃO et al., 2006).

7.4.3 Expressão e purificação de proteínas em *Escherichia coli*

Os plasmídeos pRSETc contendo os genes *aam1* ou *cqm1* foram utilizados para a transformação de células competentes de *E. coli* cepa BL21 *star*, a fim de obter a expressão das respectivas proteínas. Após a transformação, as células foram plaqueadas em meio de cultura Luria-Bertani (LB) suplementado com ampicilina (100 µg/ml). Uma colônia da placa foi selecionada para a sua propagação em meio LB líquido e a expressão das proteínas foi induzida pela adição de isopropiltiogalactosídeo (IPTG), segundo Romão et al. (2006). Alíquotas da cultura, antes e após a indução com o IPTG, foram centrifugadas a 5.000 g por 10 min a 4° C e o sedimento foi solubilizado em tampão de Laemmli 2X (LAEMMLI, 1970). Para a avaliação da expressão das proteínas, as amostras foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE a 10% e o gel foi corado com azul de Coomassie.

Para a obtenção das proteínas recombinantes sob a forma solúvel e posterior utilização em ensaios de ligação, o sedimento obtido das culturas contendo as células foi dissolvido em tampão PBS (NaH₂PO₄ 2.1 mM, Na₂HPO₄ 14 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4), e as células foram lisadas em um sonicador (*Ultrasonic Homogenizer* – Cole Parmer[®]), através de 6 pulsos de 30 s, um intervalo de 1 minuto entre os pulsos e com uma amplitude de 50. Após a lise, a amostra foi acrescida de Triton X-100 a 1% e centrifugada a 5.000 g por 10 min a 4° C. O sobrenadante obtido foi utilizado na purificação protéica, através de cromatografia de afinidade, utilizando a resina de agarose Ni-NTA[®] (Qiagen), que possui afinidade pela cauda de poli-histidinas presentes na extremidade N-terminal das proteínas recombinantes. A eluição da proteína recombinante ligada à resina foi feita com tampão de lavagem (Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol a 10%, pH 6.0) contendo concentrações crescentes de imidazol (0.02 a 1 M), conforme Romão et al. (2006). Amostras de cada eluato foram submetidas a SDS-PAGE a 10% para avaliar a qualidade da purificação, conforme descrito anteriormente. A capacidade de ligação das proteínas Aam1 e Cqm1, obtidas nessa etapa, à toxina Bin foi avaliada através dos ensaios de afinidade descritos no item 7.5.

7.4.4 Mutagênese sítio-dirigida

O procedimento de mutagênese sítio-dirigida foi realizado para promover um aumento no nível de expressão das proteínas Aam1 e Cqm1 recombinantes, produzidas em reticulócitos de coelho. Foram inseridas mutações na seqüência de Kozak dos genes *aam1* e *cqm1* para torná-la mais próxima da seqüência consenso. Esta seqüência consiste de seis nucleotídeos localizados antes do códon ATG de iniciação da tradução, e do primeiro nucleotídeo localizado imediatamente após este códon na seqüência do gene, sendo responsável pelo melhor reconhecimento do promotor pelo ribossomo durante a tradução. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo do Kit de mutagênese sítio-dirigida QuikChange[®] (Stratagene), segundo instruções do fabricante. Os fragmentos gênicos contidos no vetor plasmidial pGEM3Zf+, obtidos na etapa anterior, foram submetidos à amplificação com a enzima *Pfu* turbo DNA polimerase, utilizando *primers* de mutagênese específicos para a região de interesse. Após a amplificação, a eficácia do procedimento foi avaliada através de análise de seqüências conforme descrito no item 7.4.2. Os plasmídeos

contendo as mutações foram utilizados para a expressão das proteínas recombinantes mutagenizadas por transcrição e tradução *in vitro* em lisado de reticulócitos de coelho.

7.4.5 Transcrição e tradução *in vitro*

A reação de transcrição *in vitro* para a produção do mRNA das proteínas Aam1 e Cqm1, foi realizada a partir dos respectivos genes contidos no vetor pGEM3Zf+. O DNA plasmidial foi digerido com a enzima de restrição *Hind* III e o DNA linearizado foi utilizado como molde para a produção do mRNA. A reação foi realizada utilizando a enzima T7 RNA polimerase (Promega), rNTPs (100 mM), tampão de transcrição (Tris-HCl 200mM, MgCl₂ 30mM, espermidina 10mM, NaCl 50mM) e o nucleotídeo 7-metilguanossina (CAP 10 mM), que confere maior estabilidade ao mRNA na célula. A incubação foi feita em um termociclador BIOMETRA[®], durante 90 minutos a 37 °C e os mRNAs obtidos foram submetidos à extração com fenol-clorofórmio e analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, e visualizado em um transiluminador de luz UV.

Os mRNAs obtidos foram utilizados no procedimento de tradução *in vitro*, em um sistema que utiliza um lisado de reticulócitos de coelho (*Rabbit Reticulocyte Lysate*[®], Promega), na presença de todos os aminoácidos, exceto a metionina, T7 RNA polimerase e metionina marcada com ³⁵S que permite a detecção das proteínas traduzidas por autoradiografia. Foram utilizados nas reações 2,5 µl do lisado de reticulócitos, 2 µl de metionina marcada com ³⁵S, 2 µl de um *pool* aminoácidos livre de metionina e 10 µl do mRNA diluído 1:10 em água tratada com dimetil pirocarbonato (DEPC). A reação foi realizada em um termociclador BIOMETRA[®] a uma temperatura de 30 °C, durante 90 minutos. Após a tradução, uma alíquota de 5 µl de cada amostra foi acrescida de tampão de amostra de Laemmli 2X (LAEMMLI, 1970) e submetida a eletroforese SDS-PAGE a 10%. Após a migração, o gel foi corado com azul de Comassie e submetido a um processo de secagem a 65 °C durante 1 h. Para a visualização das proteínas, um filme autoradiográfico Hiperfilm[®] (Amershan) foi exposto ao gel durante 12 h à TA e, em seguida, revelado para a detecção das proteínas marcadas com ³⁵S.

7.5 Ensaios de ligação com a toxina Bin

A finalidade desta etapa foi investigar se as proteínas Aam1 e Cqm1 nativas presentes em extratos-CHAPS, ou as respectivas proteínas recombinantes, têm capacidade de ligar-se à toxina Bin. Os ensaios consistem na incubação das proteínas em questão com a toxina Bin ou a subunidade BinB da toxina, imobilizadas em um suporte sólido e em seguida as amostras são submetidas à imunodeteção. Dois sistemas de ensaios de afinidade foram usados para avaliar a interação, conforme descrito a seguir.

7.5.1. Ensaios de afinidade

Os ensaios de afinidade possuem a finalidade de avaliar a capacidade de ligação específica das proteínas nativas ou recombinantes à toxina Bin, imobilizada covalentemente em microesferas CNBr-activated SepharoseTM 4B (Amersham). A toxina Bin utilizada nestes ensaios é recombinante e foi produzida em culturas de *B. thuringiensis* cepa 4Q-82 transformada com o plamídeo pGSP10, contendo o gene que codifica a toxina Bin. A toxina foi produzida sob a forma ativa e armazenada a 4 °C, segundo Nielsen-LeRoux e Charles (1992). Os ensaios de afinidade foram conduzidos segundo Silva-Filha et al. (1999), a partir da incubação entre a toxina Bin imobilizada sobre a resina de sefarose, esferas-Bin (30 µl), e os extratos-CHAPS (20 µg de proteínas) ou as proteínas recombinantes (5 µg), em um volume final de 100 µl em tampão PBS/Azida 0.02%, pH 7.4, durante 2 h à TA. As incubações foram feitas na ausência ou na presença de um excesso de toxina Bin livre (40 µg), utilizada como competidor. Após a incubação, as esferas-Bin foram recuperadas por centrifugação a 20.000 g, 4 °C, por 15 minutos, solubilizadas em tampão de Laemmli 2X (LAEMMLI, 1970) e submetidas a SDS-PAGE 10%. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, que foi submetida à imunodeteção, conforme descrito no item 7.3.2.

7.5.2 Ensaios de *pull-down*

Os ensaios de afinidade do tipo “*pull-down*” possuem a finalidade de avaliar a capacidade de ligação específica das proteínas nativas ou recombinantes à subunidade BinB imobilizada em resina glutationa sefarose 4B[®] (GS) (Amersham), e foram realizados segundo Dhalia et al. (2005). A subunidade BinB recombinante foi produzida, fusionada à proteína glutationa S-transferase, em células de *E. coli*, conforme o item 7.4.4, para posterior imobilização na resina GS. Para a realização do ensaio, 10 µl da toxina BinB imobilizada sobre a resina GS (Bin-GS) foi incubada com os extratos-CHAPS (20 µg de proteínas) ou com as proteínas recombinantes (5 µg) a 4 °C, durante 2 h, sob agitação, em um volume final de 200 µl de tampão BB3 (KCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 50 mM, NP40 0,2%, glicerol 5%). Para avaliar a especificidade da ligação, os extratos-CHAPS ou as proteínas recombinantes foram incubados com a proteína glutationa S-transferase (GST), imobilizada sobre a resina (GST-GS). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 1.500 g, durante 2 min a 4 °C. O sedimento de resina obtido foi solubilizado com tampão Laemmli 2X (LAEMMLI, 1970) e as amostras foram submetidas à migração em SDS-PAGE 10%. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, que foi submetida à imunodeteção, conforme descrito no item 7.3.2. As proteínas recombinantes *LmEIF4A1* e *LmEIFG3*, oriundas de *Leishmania* e cedidas pelo Departamento de Microbiologia do CPqAM, foram utilizadas como controle positivo de ligação nos ensaios (DHALLIA, et al., 2005).

7.6 Influência da conformação protéica na capacidade de ligação à toxina Bin

O objetivo desta etapa foi avaliar se o tratamento das proteínas nativas com aquecimento e adição do agente redutor β-mercaptoetanol poderiam afetar a estrutura protéica e influenciar na ligação à toxina Bin. Os extratos-CHAPS obtidos na etapa 7.3.1.3 foram submetidos ao tratamento desnaturante utilizando aquecimento a 100 °C e adição de tampão Laemmli sem corante e glicerol, além de variações de temperatura. As amostras foram submetidas aos seguintes tratamentos: aquecimento de 45, 65 e 100 °C durante cinco minutos ou tratamento com tampão de Laemmli 2X e aquecimento a 100 °C. Após o tratamento, as

amostras foram avaliadas quanto à capacidade de ligação à toxina Bin, através de ensaios de *pull down* conforme descrito no item 7.5.2.

8 RESULTADOS

8.1 Avaliação de proteínas nativas

Na primeira etapa do trabalho a expressão das proteínas Aam1 e Cqm1 nativas, em extrato total de larvas e adultos e amostras de BBMF de *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, foi analisada através de imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1 e do perfil de α -glicosidases nas amostras. Em seguida, foi feita a avaliação da capacidade de interação das proteínas de BBMF com a toxina Bin, através de ensaios de afinidade.

8.1.1 Imunodeteção de proteínas com anticorpo anti-Cqm1

A avaliação da expressão da proteína Aam1 em *Ae. aegypti* foi feita através de imunodeteção com o anticorpo anti-Cqm1 em extratos totais de larvas e adultos. Foi possível observar uma banda de cerca de 70 kDa, que é expressa em todos os estágios larvais (Figura 7A, seta longa), bem como em adultos, embora a sua intensidade nestas amostras tenha sido considerada mais reduzida (Figura 7A, seta curta). Em amostras de *C. quinquefasciatus*, utilizadas como referência, foi observada uma banda com cerca de 60 kDa em todos os estádios larvais, que correspondente ao receptor Cqm1 (Figura 7B, seta longa). Em adultos foi possível visualizar uma banda similar, mas com tamanho discretamente superior a 60 kDa (Figura 7B, seta curta). Devido à complexidade de proteínas presentes em extratos totais, o anticorpo anti-Cqm1, embora imunoabsorvido, apresentou um padrão de reconhecimento inespecífico de outras proteínas ou de formas degradadas das proteínas sob estudo. Os dados indicam que as maltases Aam1 e Cqm1 são expressas em todas as fases do ciclo de vida de *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, respectivamente.

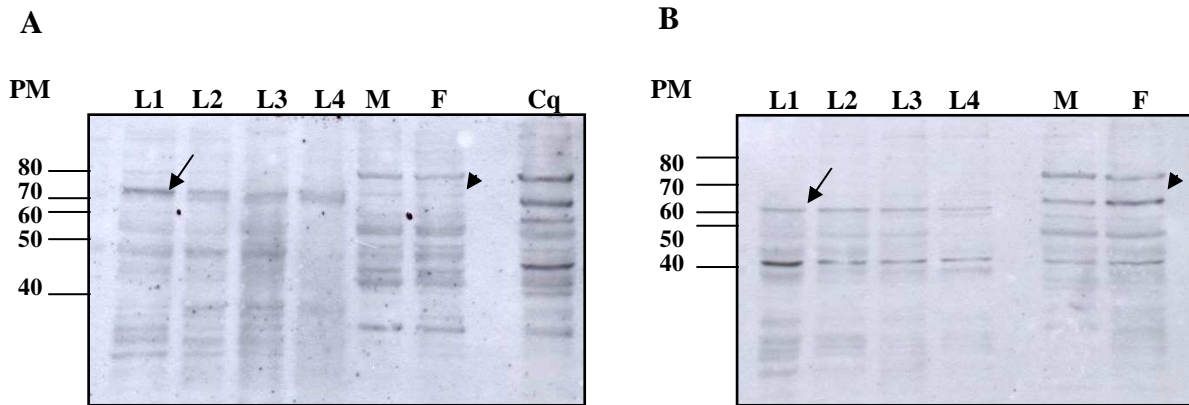


Figura 7. Perfil de imunodeteção de α -glicosidases em extratos totais de larvas e adultos de *Aedes aegypti* (A) e *Culex quinquefasciatus* (B) com anticorpo anti-Cqm1.
Nota: **L1, L2, L3 e L4.** Quatro estádios larvais. **M.** Adulto macho. **F.** Adulto fêmea. **Cq.** Extrato total adulto de *Culex quinquefasciatus*. **PM.** Peso molecular em kDa.

A detecção imunológica das α -glicosidases presentes em preparações de BBMF de *Ae. aegypti* mostrou a expressão de uma molécula semelhante ao receptor Cqm1 no *microvilli* intestinal de larvas, com alta especificidade (Figura 8A, Ae). Esta molécula apresenta massa molecular discretamente superior e é expressa em níveis semelhantes à molécula Cqm1, detectada em amostras de BBMF de *Culex* (Figura 8A). Em amostras de *An. gambiae* o anticorpo anti-Cqm1 também reconheceu uma molécula de massa molecular similar porém, em comparação com amostras de *C. quinquefasciatus* ou de *Ae. aegypti*, a sua expressão foi considerada bastante reduzida, em vista da concentração de proteínas necessária para a sua detecção (25 μ g) (Figura 8B, Ag). Os dados obtidos nesta análise pelo anticorpo anti-Cqm1, revela que a maltase ortóloga ao receptor Cqm1 de *Culex* é expressa no *microvilli* intestinal das larvas de *Ae. aegypti* em quantidade equivalente à observada em *Culex*, enquanto que em *An. gambiae*, que é uma espécie suscetível ao Bsp, a intensidade da molécula reconhecida pelo antiCqm1 foi menor. A imunodeteção também confirma que a proteína detectada em BBMF de *Ae. aegypti* possui um peso molecular superior à α -glicosidase Cqm1, e corrobora os dados obtidos em amostras de extratos totais.

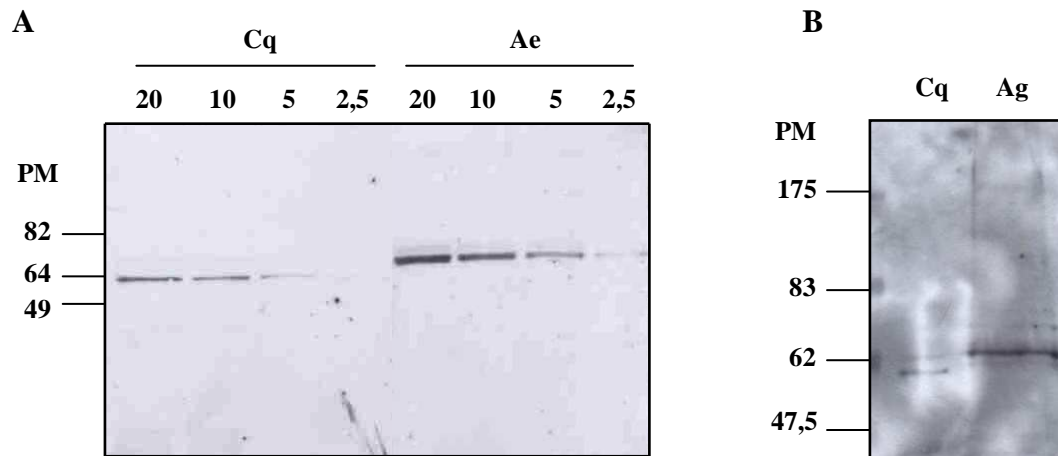


Figura 8. Imunodeteção de proteínas do *microvili* intestinal de larvas com o anticorpo anti-Cqm1.

Nota: **A.** Curva decrescente de amostras de proteínas (20 - 2,5 µg) de *Culex quinquefasciatus* (Cq) e *Aedes aegypti* (Ae). **B.** Amostras de proteínas de *C. quinquefasciatus* (Cq, 2,5 µg) e *Anopheles gambiae* (Ag, 25 µg).

PM. Peso molecular em kDa.

8.1.2 Perfil de α -glicosidases

Os ensaios enzimáticos em gel apresentam o perfil de α -glicosidases expressas durante o desenvolvimento dos insetos. Dados prévios mostraram que o perfil de larvas de quarto estágio de *C. quinquefasciatus* é composto por quatro bandas de clivagem e a α -glicosidase Cqm1 migra com tamanho aparente de 83 kDa, em eletroforese sob condições semi-desnaturantes (ROMÃO et al., 2006). Os resultados obtidos neste estudo revelaram que o padrão de α -glicosidases é similar em amostras dos quatro estádios larvais de *C. quinquefasciatus* (Figura 9A, seta). Para os adultos o perfil também é composto por quatro bandas catalíticas, no entanto, o padrão de migração difere daquele observado nas amostras de larvas (Figura 9A, M e F). Por outro lado, o perfil em extratos totais de larvas de *Ae. aegypti* é composto por duas bandas catalíticas, uma delas com tamanho semelhante ao receptor Cqm1 (Figura 9B, seta). Na análise de adultos de *Ae. aegypti*, verificou-se que o padrão difere daquele observado nas larvas e, apesar de possuir intensidade reduzida, foram visualizadas três e duas bandas para machos e fêmeas, respectivamente (Figura 9B, M e F).

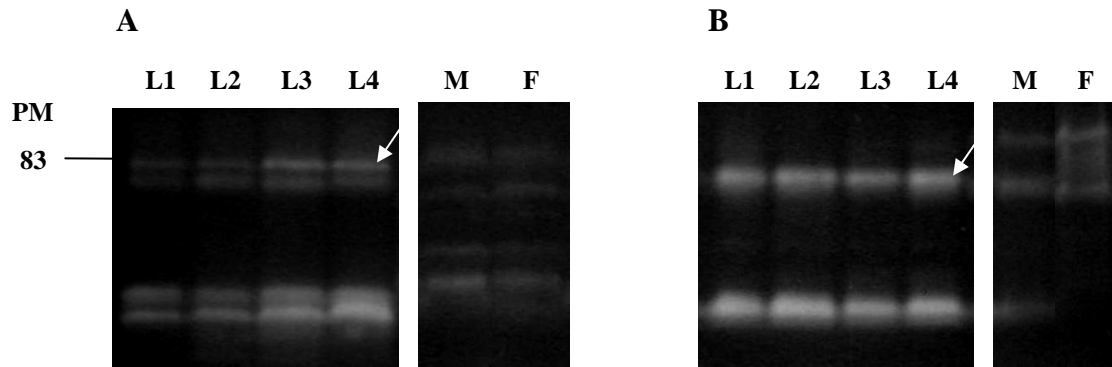


Figura 9. Perfil da atividade α -glicosidase em gel de amostras de extrato total de larvas e adultos de *Culex quinquefasciatus* (A) e *Aedes aegypti* (B).

Nota: **L1, L2, L3 e L4.** Quatro estádios larvais. **M.** Adulto macho. **F.** Adulto fêmea. **PM.** Peso molecular em kDa.

O perfil de α -glicosidases em amostras de BBMF foi mais elucidativo e, em *Ae. aegypti*, foram detectadas quatro bandas catalíticas, diferente do observado em extrato total de larvas, e uma delas apresenta tamanho semelhante à proteína Cqm1 de *Culex* (Figura 10A, painel à esquerda, seta). Após a detecção enzimática, o gel foi submetido à detecção imunológica e verificou-se que anticorpo anti-Cqm1 reconhece uma α -glicosidase com peso molecular discretamente inferior à Cqm1 nas amostras de BBMF de *Ae. Aegypti*, o que pode estar relacionado às condições semidesnaturantes de migração (Figura 10A, painel à direita, seta). Em amostras de BBMF de *An. gambiae*, uma molécula com tamanho similar à Cqm1 foi identificada, no entanto, não foi possível confirmar a sua similaridade com a Cqm1, devido às dificuldades encontradas na imunodeteção desta molécula (Figura 10B, seta). Estes resultados demonstram que uma α -glicosidase ortóloga ao receptor Cqm1, possivelmente a Aam1, é expressa sob a forma de proteína de membrana e migra com peso molecular discretamente inferior à α -glicosidase Cqm1.

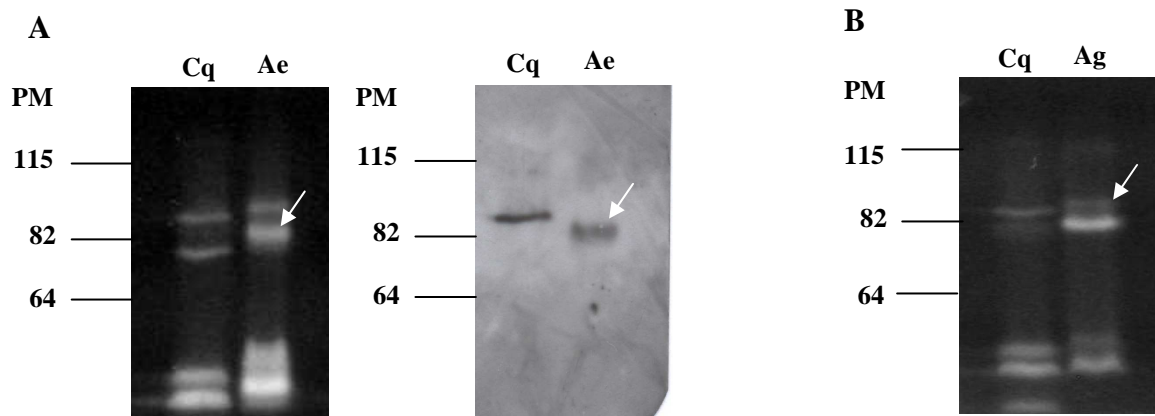


Figura 10. Perfil da atividade α -glicosidase em gel de frações de *microvili* intestinal de larvas de culicídeos. Nota: **A.** Amostras de *C. quinquefasciatus* (Cq) e *Aedes aegypti* (Ae) (esquerda). As proteínas do gel A foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetidas á imunodeteccção com anticorpo anti-Cqm1 (direita). **B.** Amostras de *C. quinquefasciatus* (Cq) e *An. gambiae* (Ag). **PM.** Peso molecular em kDa.

8.1.3 Interação de proteínas nativas com a toxina Bin

A análise precedente revelou que em BBMF de *Ae. aegypti* há uma proteína reconhecida pelo anticorpo anti-Cqm1, expressa em quantidade semelhante ao receptor Cqm1. Esse achado apontou a necessidade de avaliar a capacidade de ligação desta proteína à toxina Bin, através de ensaios de afinidade. Nos ensaios de afinidade observou-se que a proteína Cqm1 nativa, presente nos extratos-CHAPS de *Culex*, ligou-se à toxina Bin imobilizada em resina de sefarose e foi visualizada uma banda com cerca de 60 kDa, quando a incubação foi feita na ausência de competidor (Figura 11A, Cq -). A especificidade da ligação foi determinada pela ausência de interação em amostras que continham um excesso de toxina Bin, utilizada como competidor na incubação (Figura 11A, Cq +). Por outro lado, o extrato-CHAPS contendo a proteína Aam1 nativa quando incubado tanto na ausência quanto na presença do competidor, não foi capaz de se ligar à toxina Bin (Figura 11A, Ae -). Apesar da sua similaridade com a proteína Cqm1 e abundância nas amostras de BBMF, a proteína Aam1 não tem habilidade de ligar-se à toxina Bin.

A avaliação da interação de proteínas com a toxina Bin foi ainda realizada através de ensaios de afinidade (*pull down*), nos quais a subunidade BinB foi imobilizada em resina de glutaciona sefarose (GS). Neste ensaio, a proteína Cqm1 também foi capaz de se ligar à toxina Bin (Figura 11B, Cq 2) e a ligação foi específica, pois a banda de 60 kDa não foi observada

quando o extrato foi incubado com a glutathiona S-transferase (GST) imobilizada na resina GS, ao invés da subunidade BinB (Figura 11B, Cq 1). Quando o ensaio foi realizado entre o extrato-CHAPS de *Ae. aegypti* e a subunidade BinB da toxina, não foi visualizada nenhuma banda correspondente à interação (Figura 11B, Ae 2), de forma semelhante ao ensaio anterior.

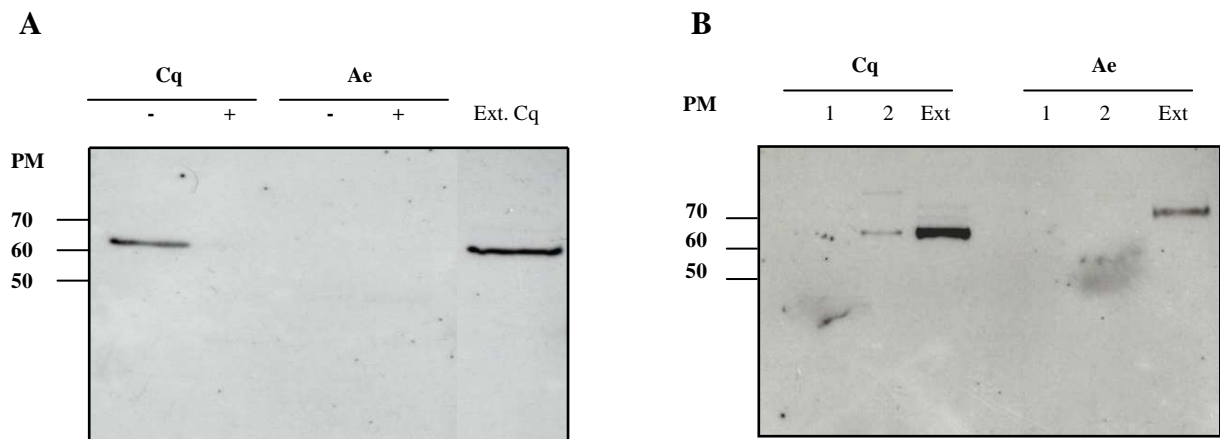


Figura 11. Ensaio de afinidade entre os extratos de proteínas de *microvili* intestinal solubilizadas de *Culex quinquefasciatus* (Cq) e *Aedes aegypti* (Ae) e a toxina Bin do *Bacillus sphaericus*, imobilizada em suporte sólido, seguido de imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1.

Nota: **A.** Ensaio entre os extratos e a resina Bin-sefarose na presença (+) e na ausência (-) da toxina Bin livre, usada como competidor. **B.** Ensaio entre os extratos e a resina Bin-GS (*pull down*). **1.** Incubação com glutathiona S-transferase. **2.** Incubação com o componente BinB da toxina Bin. **Ext.** Amostras de 10 µg de proteínas de extratos-CHAPS, sem incubação.

8.2 Avaliação de proteínas recombinantes

Na segunda etapa do trabalho, as proteínas Aam1 e Cqm1 foram produzidas sob a forma recombinante em *E. coli* e em lisado de reticulócitos de coelho, para avaliar a sua capacidade de ligação à toxina Bin através de ensaios de afinidade.

8.2.1 Clonagem do gene *aam1*

Os dados das etapas anteriores apontaram que, embora presente no *microvilli* intestinal das larvas de *Ae. aegypti*, a proteína Aam1 não é capaz de ligar-se à toxina Bin, o que levou à obtenção de proteínas recombinantes para uma melhor avaliação destas moléculas. Após a realização das reações de RT-PCR, foi obtido o cDNA do gene *aam1* e as reações de PCR a partir deste levaram à amplificação de um fragmento gênico com tamanho aproximado de 1.800 pares de bases (pb) (Figura 12, *aam1*). Após a clonagem do fragmento no vetor pGEM[®]T- easy e digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição utilizadas na clonagem, foi obtido um fragmento gênico com tamanho correspondente ao fragmento amplificado por PCR (dados não apresentados). Os plasmídeos contendo o gene *cqm1* foram cedidos por Romão et al. (2006) e utilizados como padrão. A análise de seqüências confirmou a identidade do fragmento, que se tratava do gene *aam1* de interesse. Nesta etapa também foram desenhados *primers* para duas α -glicosidases parálogas à Aam1, presentes em *Ae. aegypti*. Foi possível detectar a presença do mRNA que codifica tais α -glicosidases através de reações de RT-PCR, que revelaram que tais proteínas são expressas somente na fase adulta dos insetos (Figura 12, P1 e P2). Estas proteínas possuem expressão estágio-específica, pois não estão presentes nas larvas, ao contrário do que ocorre com a maltase Aam1, expressa em todas as fases do ciclo de desenvolvimento (dados não apresentados).

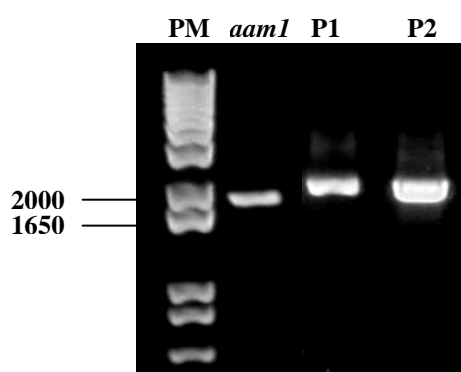


Figura 12. Separação eletroforética dos fragmentos de genes que codificam a proteína Aam1 e suas respectivas proteínas parálogas, amplificados nas reações de RT-PCR, a partir do mRNA de *Aedes aegypti*. Nota: *aam1*. cDNA que codifica a proteína Aam1. **P1**. cDNA que codifica a proteína paróloga 1. **P2**. cDNA que codifica a proteína paróloga 2. **PM**. Marcador de peso molecular em pares de bases. Gel de agarose a 1% visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta.

8.2.2 Expressão das proteínas Aam1 e Cqm1 recombinantes em *E. coli*

Para a produção das proteínas recombinantes em *E. coli* foram utilizados os fragmentos gênicos clonados no vetor pRSETc[®], que codificam proteínas truncadas de 45 kDa, que correspondem à porção N-terminal das proteínas Aam1 e Cqm1. As proteínas recombinantes foram obtidas em quantidades suficientes para a utilização nos ensaios de ligação e foram produzidas fusionadas a uma cauda de poli-histidinas, para purificação por cromatografia de afinidade, utilizando-se a resina de níquel Ni-NTA[®] agarose (Qiagen). As proteínas Cqm1 e Aam1 produzidas obtidas migraram com peso molecular aproximado de 45 kDa em SDS-PAGE (dados não apresentados).

8.2.3 Avaliação das proteínas Aam1 e Cqm1 produzidas em *E. coli*

A proteína Cqm1 recombinante produzida nesse sistema de expressão foi capaz de se ligar às esferas-Bin na ausência de competidor e a ligação foi visualizada pela presença de uma banda de 45 kDa após a imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1 (Figura 13, Cq -). Quando a incubação foi feita na presença de toxina Bin livre, utilizada como competidor, a intensidade da banda foi fortemente reduzida (Figura 13, Cq +). A avaliação da proteína Aam1 recombinante mostrou uma ligação com as esferas-Bin, de forma similar à interação observada para a Cqm1 (Figura 13, Ae -). No entanto, a especificidade da ligação das proteínas Aam1 e Cqm1 recombinantes à toxina Bin não foi comprovada, pois quando utilizada a proteína recombinante *LmEIF4A1* de *Leishmania*, observou-se que a mesma também ligou-se à toxina Bin (dados não apresentados). Por essa razão a interação destas proteínas recombinantes foi considerada de natureza inespecífica.

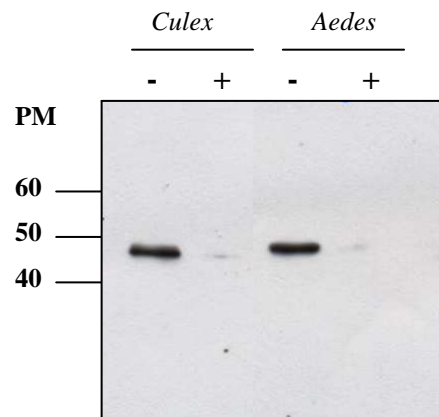


Figura 13. Ensaio de afinidade entre as proteínas recombinantes Aam1 de *Aedes aegypti* e Cqm1 de *Culex quinquefasciatus* e a toxina Bin do *Bacillus sphaericus*, imobilizada em resina de sefarose, seguido de imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1.

Nota: Ensaio realizado na presença (+) e na ausência (-) da toxina Bin livre usada como competidor. **PM.** Peso molecular em kDa.

8.2.4 Expressão das proteínas Aam1 e Cqm1 em lisado de reticulócitos de coelho

A transcrição e tradução em lisado de reticulócitos de coelho foi realizada a partir dos genes *aam1* e *cqm1*, que tiveram as suas sequências de “Kozak” modificadas através de mutagênese sítio-dirigida, com a finalidade de melhorar a expressão das proteínas nesse sistema. No processo de transcrição *in vitro*, os mRNAs produzidos a partir dos genes *aam1* e *cqm1* foram obtidos em quantidades consideráveis e com sua integridade mantida para a produção das proteínas recombinantes radiomarcadas com S³⁵. No procedimento de tradução *in vitro* as proteínas recombinantes Aam1-³⁵S e Cqm1-³⁵S foram produzidas e analisadas em SDS-PAGE. A proteína Cqm1-³⁵S migrou com peso molecular aproximado de 65 kDa, enquanto que a ortóloga Aam1-³⁵S apresentou um peso molecular aparente próximo de 70 kDa (Figura 14).

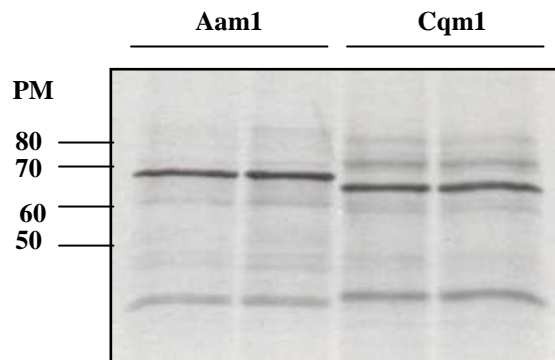


Figura 14. Separação eletroforética em SDS-PAGE 10% de proteínas Aam1-³⁵S e Cqm1-³⁵S de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, respectivamente, produzidas através de tradução *in vitro* em reticulócitos de coelho e visualizadas por autoradiografia.

Nota: **PM.** Marcador de peso molecular em kDa.

8.2.5 Avaliação das proteínas Aam1 e Cqm1 produzidas em lisado de reticulócitos de coelho

Nesta etapa, foi utilizado um sistema de expressão eucarioto para a produção das proteínas Aam1 e Cqm1. As proteínas recombinantes-S³⁵ foram submetidas a ensaios de *pull down* para avaliação da capacidade de interação com a toxina Bin. As proteínas Aam1-³⁵S e Cqm1-³⁵S foram incubadas com a subunidade BinB da toxina imobilizada na resina GS, ou com a proteína GST imobilizada nesta resina, que foi utilizada como controle negativo do ensaio. Nas incubações entre as proteínas Aam1-³⁵S e Cqm1-³⁵S e a subunidade BinB imobilizada, a ligação não foi observada (Figura 15, Aam1, 2 e Cqm1, 2) e nenhuma banda foi visualizada na autoradiografia. A proteína *LmEIFG3*-³⁵S de *Leishmania*, obtida sob as mesmas condições e utilizada como controle positivo do ensaio, foi capaz de ligar-se à proteína *LmEIF4A1* imobilizada na resina, o que foi demonstrado pela presença de uma banda com tamanho de 70 kDa (Figura 15, G3, 3). Nesse caso, a interação observada foi específica, pois quando a proteína G3 foi incubada com a GST imobilizada sobre a resina, não ocorreu ligação (Figura 15, G3, 1). A ausência de ligação das proteínas Aam1 e Cqm1 à toxina Bin sugere que o sistema de expressão utilizado não seja capaz de realizar os processamentos pós-traducionais necessários à funcionalidade destas proteínas.

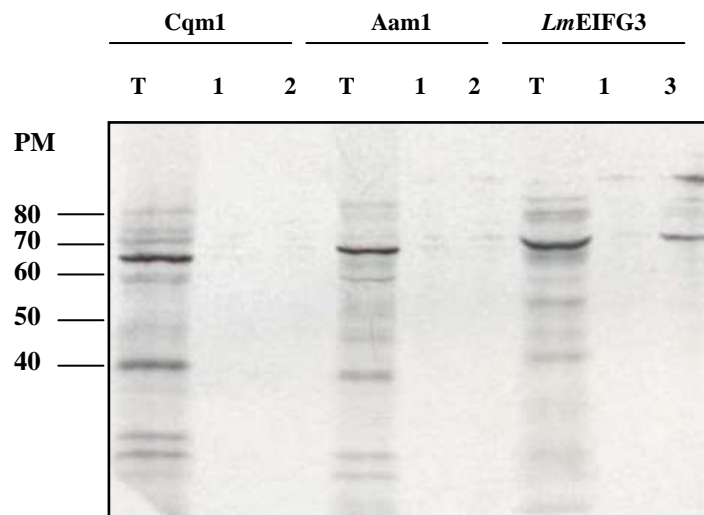


Figura 15. Ensaio de pull down entre as proteínas Cqm1-S³⁵ e Aam1-S³⁵ e a subunidade BinB da toxina e entre as proteínas LmEIFG3-S³⁵ e LmEIF4A1 de *Leishmania* sp., visualizados por autoradiografia. Nota: T. Proteínas ³⁵S traduzidas sem incubação. 1. Proteína incubada com glutatona S-transferase. 2. Proteína incubada com a subunidade BinB da toxina. 3. Proteína incubada com a proteína LmEIF4A1 de *Leishmania*. PM. Peso molecular em kDa.

8.2.6 Influência da conformação protéica na capacidade de ligação à toxina Bin

Os resultados obtidos com as proteínas recombinantes produzidas nos dois sistemas de expressão mostraram que a proteína controle Cqm1, que tem capacidade comprovada de interação com a toxina Bin, não apresentou capacidade de ligação. Portanto, a finalidade desta etapa foi avaliar o efeito da desnaturação das proteínas nativas na capacidade de ligação à toxina Bin e a influência que a conformação protéica poderia exercer neste aspecto. Os extratos-CHAPS contendo as proteínas Aam1 (*Ae. aegypti*) e Cqm1 (*C. quinquefasciatus*) nativas ou desnaturadas foram testados em ensaios de afinidade (*pull down*) com a subunidade BinB da toxina. O extrato nativo de *Culex* foi capaz de ligar-se especificamente à toxina Bin e uma banda com cerca de 60 kDa foi visualizada na imunodeteção (Figura 16A, *Culex*, N2). A ligação foi específica, pois a banda não foi observada quando a incubação foi feita com a proteína GST imobilizada à resina (Figura 16A, *Culex*, N1). Por outro lado, após o tratamento deste extrato antes da incubação com a toxina, através de aquecimento a 100 °C e adição de β-mercaptoetanol, o extrato teve a sua capacidade de ligação abolida (Figura 16A, *Culex*, D2). O extrato-CHAPS de *Aedes*, sob as formas nativa ou desnaturada, não foi capaz de ligar-se à

BinB e não foi visualizada nenhuma banda de interação na imunodeteccção (Figura 16A, *Aedes*, N2 e D2). Quando o extrato de *Culex* foi testado após aquecimento a 45 e 100 °C observou-se que a capacidade de ligação foi mantida (Figura 16B, D2, 45 e D2, 100), enquanto que a ligação foi abolida em amostras aquecidas a 65 °C (Figura 16B, D, 65). Entretanto, o resultado positivo da amostra aquecida a 100 °C foi artefactual, visto que a ligação também foi observada no controle negativo utilizando a proteína GST (dados não apresentados). Os dados obtidos demonstram que a ligação da proteína Cqm1 à toxina Bin depende da integridade da sua estrutura protéica.

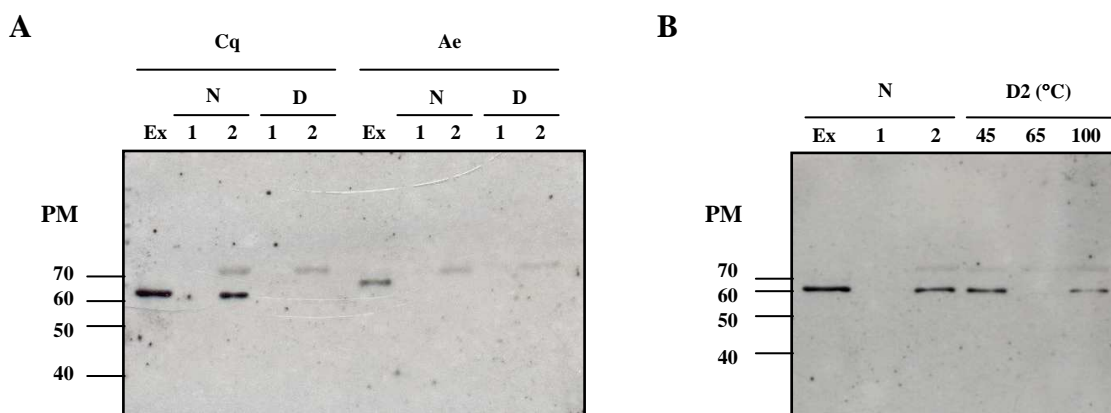


Figura 16. Ensaio de afinidade (*pull down*) entre os extratos-CHAPS de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* nativos (N) ou desnaturados (D) e a subunidade BinB imobilizada em resina glutationa sefarose (GS), seguido de imunodeteccção com anticorpo anti-Cqm1.

Nota: **A.** Ensaio com os extratos nativos (N) ou desnaturados pelo aquecimento a 100 °C e adição de β -Mercaptoetanol (D). **B.** Ensaio com o extratos-CHAPS de *C. quinquefasciatus* nativo (N) ou submetido ao tratamento em diferentes temperaturas (D2). **Ex.** Extrato-CHAPS (5 μ g) sem incubação com a resina. **1.** Extrato incubado com glutathione S-transferase. **2.** Extrato incubado com a subunidade BinB.

9 DISCUSSÃO

O *Ae. aegypti* é um importante alvo de programas de controle de vetores e o larvicida mais utilizado para este fim é o Bti, visto que essa espécie é refratária à toxina Bin do Bsp. Até o presente, pouco se sabe a razão pela qual esta espécie, taxonomicamente tão próxima às espécies do complexo *Culex*, não é susceptível à toxina Bin. No presente estudo, a disponibilidade do genoma do *Ae. aegypti* (NENE, et al., 2007) permitiu a identificação do gene *aam1*, que codifica uma α -glicosidase ortóloga (Aam1) com alta homologia à α -glicosidase Cqm1, que é o receptor da toxina Bin em *C. quinquefasciatus*.

Estudos prévios demonstraram que após a ingestão do cristal do Bsp e processamento no lúmen intestinal de larvas de *Ae. aegypti*, a toxina Bin não reconhece receptores específicos no *microvilli* intestinal (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). Desta forma, partiu-se da hipótese de que essa ausência de ligação poderia ser decorrente da quantidade reduzida ou da ausência de receptores disponíveis, ou ainda que a maltase Aam1 fosse expressa em outra fase do desenvolvimento, que não as larvas de quarto estágio. Para investigar essas hipóteses, a expressão da proteína Aam1 de *Ae. aegypti* foi analisada através de imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1, com grande potencial de detecção específica de proteínas ortólogas. Esta análise demonstrou a presença de uma proteína com massa molecular aparente de 70 kDa nos extratos totais de larvas e adultos de *Ae. aegypti*. Esse achado foi semelhante ao observado em amostras de larvas e adultos de *C. quinquefasciatus*, nas quais foi detectada uma proteína com tamanho aproximado de 60 kDa, o que está de acordo com a caracterização prévia do receptor nesta espécie (ROMÃO et al., 2006). Dados de sequências apontaram que a proteína Cqm1 é constituída de 580 aminoácidos e apresenta massa molecular esperada de 66 kDa, sendo essas características semelhantes às aquelas encontradas na proteína Aam1 (ROMÃO et al., 2006).

A imunodeteção de amostras de *microvilli* intestinal (BBMF) de *Ae. Aegypti*, de fato confirmou a expressão de uma proteína com cerca de 70 kDa em níveis semelhantes ou até superiores ao receptor Cqm1. Esse resultado demonstra a presença de uma α -glicosidase ortóloga à Cqm1 em abundância no *microvilli* intestinal de *Ae. aegypti*, reconhecida pelo anticorpo anti-Cqm1, que potencialmente seria a Aam1, dada a considerável semelhança com a proteína Cqm1, em termos de reconhecimento imunológico e massa molecular. A imunodeteção em amostras de BBMF de *An. gambiae* também demonstrou a presença de

uma proteína reconhecida pelo anti-Cqm1. Esta proteína potencialmente pode se tratar da maltase Agm3 de *An. gambiae*, ortóloga e com 78% de similaridade com a Cqm1, que foi caracterizada recentemente como receptor da toxina Bin nessa espécie (OPOTA, et al. 2008). A maltase de *An. gambiae* apresenta um nível de expressão inferior ao receptor Cqm1 de *Culex*, o que pode estar relacionado à menor susceptibilidade desse vetor à toxina Bin do Bsp, bem como ao fato da ligação da toxina Bin às amostras de BBMF dessa espécie ser menos intensa que em *Culex* (SILVA-FILHA, et al., 1997).

O receptor da toxina Bin em *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus* e *An. gambiae* é uma molécula da família das α -glicosidases, ligada ao epitélio intestinal por uma âncora GPI (DARBOUX et al., 2002; OPOTA et al., 2008; PAUCHET et al., 2005; ROMÃO et al., 2006; SILVA-FILHA et al., 1999). Nos ensaios qualitativos do perfil de α -glicosidases de *Ae. aegypti* foram evidenciadas duas bandas catalíticas em larvas e fêmeas adultas, enquanto que nos machos adultos foram visualizadas três bandas de clivagem. Em *C. quinquefasciatus* o perfil é composto por quatro bandas de clivagem em larvas e adultos, o que está de acordo com Romão et al. (2006), no entanto, existem diferenças em relação ao padrão de migração e à intensidade das bandas entre essas fases do desenvolvimento. Por se tratarem de amostras de proteínas totais, é possível que o perfil de bandas catalíticas nos extratos não tenha sido bem evidenciado, ou que as diferenças observadas entre larvas e adultos em ambas as espécies estejam relacionadas às diferenças existentes entre as dietas dos indivíduos nestas duas fases do ciclo de vida. Alguns estudos demonstraram α -glicosidases estágio-específicas em mosquitos (ZHENG, et al., 1995), sugerindo que o repertório dessas enzimas pode estar relacionado à dieta ingerida (SOUZA-NETO et al., 2007). Neste estudo, foi ainda possível detectar os mRNAs que codificam duas maltases, parálogas à proteína Aam1, e que são expressas exclusivamente na fase adulta de *Ae. aegypti*, indicando que sua expressão é estágio-específica.

O perfil de α -glicosidases obtido a partir de BBMF de larvas de *Ae. aegypti* e *An. gambiae* foi mais elucidativo e mostrou perfil de quatro bandas catalíticas, de forma similar ao padrão detectado nas larvas de *Culex*. Dentre as bandas observadas no perfil enzimático de ambos os culicídeos, duas migram com tamanho próximo ao da proteína Cqm1 e uma delas pode ser a ortóloga do receptor Cqm1 em *Ae. aegypti* e *An. gambiae*. Em *Ae. aegypti*, apenas a proteína ligeiramente menor que a Cqm1 (78 kDa), foi reconhecida pelo anticorpo anti-Cqm1. Esse resultado corrobora os dados de imunodeteção e sugerem que essa proteína seja a maltase Aam1.

Como mencionado anteriormente, a sequência do gene *cqm1* de *C. quinquefasciatus* possui uma região codificadora (ORF) de 1743 nucleotídeos, que dá origem a uma proteína de 580 aminoácidos e massa molecular de aproximada de 66 kDa, de forma similar ao gene *aam1* (ROMÃO, et al., 2006). Os dados da imunodeteção de BBMF com anticorpo anti-Cqm1, associados ao perfil de α -glicosidases sob condições semi-desnaturantes, apontaram informações interessantes sobre essas proteínas. Em SDS-PAGE as proteínas Cqm1 e Aam1 migram com tamanho aproximado de 60 e 70 kDa, respectivamente, enquanto que sob as condições semi-desnaturantes dos ensaios enzimáticos, essas proteínas migram com tamanho aproximado de 82 e 78 kDa, respectivamente. Diante do exposto, fica evidente que existem diferenças estruturais entre as proteínas Aam1 e Cqm1 expressas no *microvilli* intestinal das larvas das respectivas espécies. De fato, os ensaios de afinidade para avaliação da capacidade de ligação com a toxina Bin revelaram que a proteína Aam1, apesar de ser abundante nos extratos de BBMF de *Ae. aegypti*, não apresentou habilidade de ligar-se à toxina, o que está de acordo com os estudos prévios (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992).

Diante dos resultados de que a maltase Aam1 nativa não é capaz de ligar-se à toxina Bin, foram obtidas proteínas Aam1 e Cqm1 recombinantes, em diferentes sistemas de expressão, para avaliação das diferenças que pudessem interferir na ausência de ligação da Aam1 à toxina Bin. As proteínas recombinantes truncadas de 45 kDa, inicialmente obtidas em *E. coli* a partir dos genes *aam1* e *cqm1*, foram capazes de se ligar à toxina Bin, porém a ligação foi de natureza inespecífica, o que indica que as proteínas produzidas neste sistema não são adequadas para a avaliação de funcionalidade. O ensaio de afinidade por si é eficiente, pois quando foi utilizada a proteína Cqm1 nativa, a ligação ocorreu de forma específica.

As proteínas Aam1-³⁵S e Cqm1-³⁵S produzidas em lisado de reticulócitos de coelho apresentaram o tamanho esperado, entretanto, não foram capazes de se ligar à subunidade BinB da toxina Bin nos ensaios de afinidade. A ausência de ligação da proteína Cqm1-³⁵S, que possui capacidade comprovada de interação com toxina Bin, sugere que o sistema de expressão em lisado de reticulócitos, embora eucarioto, não possibilita o processamento adequado das proteínas. É possível que modificações pós traducionais importantes para a conformação protéica não sejam inseridas durante o processamento. A análise das sequências das proteínas Aam1 e Cqm1 revelou a presença de dois sítios passíveis de glicosilação em ambas as proteínas, que indicam a inserção de carboidratos à cadeia polipeptídica. As glicosilações estão entre as mais comuns e mais importantes modificações pós-traducionais

em proteínas de eucariotos e podem influenciar na sua conformação e conferir maior estabilidade térmica (SHENTAL-BECHOR; LEVY, 2008; VARKI, 1993). O sistema de tradução em lisado de reticulócitos de coelho pode conter modificações pós-traducionais, incluindo acetilação, isoprenilação e fosforilação (WALTER; BLOBEL, 1983), entretanto, não é capaz de inserir glicosilações (WIERINGA et al., 2002; ZHOU et al., 2000). A ausência de glicosilações pode ter tido uma implicação na ausência de funcionalidade da proteína Cqm1-³⁵S, que é sabidamente capaz de ligar-se à toxina Bin *in vivo* (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; OLIVEIRA et al., 2004; SILVA-FILHA et al. 1997; SILVA-FILHA et al., 2004, 2008). Estudos anteriores demonstraram que algumas N-glicosilações podem estar implicadas na ligação da toxina Cry1Ac a uma fosfatase alcalina, que funciona como receptor dessa toxina no epitélio intestinal de larvas do lepidóptero *Heliothis virescens* (JURAT-FUENTES; ADANG, 2004). É possível que a ausência de ligação da proteína Aam1 à toxina Bin seja decorrente da ausência de modificações pós-traducionais *in vivo*, ao contrário do que ocorre com a proteína Cqm1 nativa. A análise da sequência da proteína Aam1 revelou que esta molécula possui dois sítios indicativos de N-glicosilação, nas posições 126 e 310, um deles em posição semelhante à observada na proteína Cqm1, que apresenta sítios indicativos de N-glicosilação nas posições 102 e 127, entretanto, o padrão exato de glicosilação destas moléculas não é conhecido.

A avaliação da proteína Cqm1 tratada por aquecimento a 100 °C e pelo agente redutor β-mercaptoetanol, demonstrou que sua capacidade de ligação à toxina Bin foi abolida. O efeito isolado da temperatura na proteína Cqm1 nativa mostrou que sua funcionalidade foi mantida a 45 °C e abolida nas temperaturas de 65 °C e 100 °C. A capacidade de ligação da proteína à toxina, possivelmente foi mantida após o aquecimento a 45 °C por se tratar de uma temperatura branda e que se encontra na faixa de estabilidade térmica da proteína (PONTOH; LOW, 2002). Após o aquecimento a 65 °C a conformação terciária da proteína provavelmente foi destruída e a molécula passou a um estado desnaturado, devido à inativação térmica. Estudos realizados com algumas β-glicosidases mostram que há estabilidade na atividade enzimática em uma faixa de temperatura entre 20 a 50 °C, enquanto que esta é perdida em temperaturas acima de 60 °C (PONTOH; LOW, 2002). As alterações na conformação protéica interferem na capacidade de interação da proteína Cqm1 com a toxina Bin, o que indica que tal interação depende não somente da estrutura primária ou do epítipo de ligação para a toxina, mas também da conformação final da proteína nativa. Conforme mencionado anteriormente, as proteínas Aam1 e Cqm1 apresentam massas moleculares diferentes sob

condições semi-desnaturantes, o que indica que a estrutura protéica pode ser um fator importante para as diferenças em relação à capacidade de ligação à toxina Bin entre essas moléculas.

Os resultados sugerem que a falha na ligação da toxina Bin à proteína Aam1 pode ser ocasionada por alterações estruturais que ocorrem durante a tradução e o processamento protéico. Duas principais hipóteses podem estar relacionadas à ausência de funcionalidade da proteína Aam1. A primeira é que a existência de modificações na sequência primária da proteína, no epítipo de ligação propriamente dito, ou ainda em outras regiões possam interferir na conformação protéica. No caso da proteína Cpm1, por exemplo, foi detectado um alelo de resistência do gene *cpm1* que codifica uma proteína mutante que, embora expressa no *microvilli* intestinal das larvas, não tem a capacidade de interagir com a toxina Bin. A proteína mutante apresenta uma perda de cerca de 60 aminoácidos, que provocou uma alteração no epítipo de ligação ou na sua conformação (DARBOUX et al., 2007).

Embora a homologia entre as proteínas Aam1 e Cqm1 seja alta e o grau de similaridade de 83% entre elas seja considerável (DARBOUX et al., 2001; OPOTA et al., 2007; ROMÃO et al., 2006), os epítopos podem ser regiões compostas de um pequeno número de aminoácidos e modificações discretas podem abolir a funcionalidade da proteína Aam1. Estudos prévios realizados com o receptor das toxinas Cry1A do Bt em lepidópteros, revelaram que o sítio de ligação à toxina consiste em uma pequena sequência de aminoácidos e a alteração de um único aminoácido afetou a interação toxina-receptor (XIE et al., 2005). Uma segunda hipótese é que o processamento protéico pós-traducional não seja adequado e não proporcione a conformação adequada da proteína. Neste estudo, os dados sugerem que modificações pós-traducionais da proteína Cqm1, incluindo as glicosilações, podem estar envolvidas na sua capacidade de ligação com a toxina Bin. No caso da proteína Aam1, apesar da presença de sítios de glicosilação, é possível que durante o processamento, tais modificações não sejam inseridas ou que sejam inseridas de forma diferente daquelas presentes na proteína Cqm1 e, portanto, inadequada.

Diante dos achados, faz-se necessária a utilização de um sistema de expressão protéica em células de insetos, potencialmente capaz de promover o processamento pós-traducional adequado nas proteínas Aam1 e Cqm1, para a avaliação da sua funcionalidade. A partir de um sistema de expressão que produza a proteína Cqm1 funcional, será possível identificar as regiões críticas envolvidas na interação toxina-receptor das proteínas Cqm1 e Aam1, através de mutagênese sítio-dirigida. Os conhecimentos produzidos acerca da base molecular da ação

da toxina Bin são de grande relevância para a compreensão do modo de ação do Bsp e podem servir de subsídios para estratégias de aperfeiçoamento do espectro inseticida deste agente de controle.

10 CONCLUSÕES

- a) Larvas e adultos de *Ae. aegypti* expressam uma α -glicosidase com massa molecular de 70 kDa no *microvilli* intestinal e que potencialmente se trata da proteína Aam1, ortóloga à proteína Cqm1.
- b) A proteína Aam1 está presente em *Ae. aegypti* em quantidades consideráveis e, no entanto, não é capaz de ligar-se à toxina Bin, o que determina o *status* de refratariedade do vetor.
- c) A proteína Aam1 apresenta diferenças estruturais em relação à proteína Cqm1, apesar de seu alto grau de homologia.
- d) O processamento pós-traducional da proteína Cqm1 é essencial para a capacidade de ligação à toxina Bin.
- e) A ausência de ligação da α -glicosidase Aam1 à toxina Bin pode ser ocasionada por diferenças de estrutura protéica em relação à Cqm1 ou por diferenças no processamento pós-traducional.

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**, Londres, v. 7, p. 16, 2006.

AUSBEL, F. M. et al. **Short protocols in molecular biology**, 2. ed. Nova York: Harvard Medical School, 1992, cap. 1, p. 16-17.

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

BAUMANN, P.; 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.

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**, Nova York, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

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

CARNEIRO, C. N. B. et al. Sucrose hydrolases from the midgut of the sugarcane stalk borer *Diatraea saccharalis*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 50, n. 11, p. 1093-1101, 2004.

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

CHARLES, J.-F. Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. **Annales de l'Institut Pasteur/Microbiology**, Paris, v. 138, p. 471-484, 1987.

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

CHARLES, J.-F et al. Binding of the 51 and 42 kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 156, p. 156-159, 1997.

CONSOLI, R.A.G.D.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 20. ed., Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 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**, Amsterdam, v. 131, n. 3, p. 249 – 254, 1995.

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**, Oxford, v. 31, p. 981-990, 2001.

DARBOUX, I. et al. Loss of the membrane anchor of the target receptor is the mechanism of bioinsecticide resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 5830-5835, 2002.

DARBOUX, I. et al. 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.

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 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.

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

ERTHAL, J. R. M.; SILVA, C. P.; SAMUELS, R. I. Digestive enzymes in larvae of the leaf cutting ant, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 53, n. 11, p. 1101-1111, 2007.

FABRICK, J. A.; TABASHINIK, B. E. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac to multiple sites of cadherin in pink bollworm. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 37, p. 97-106, 2007.

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

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

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

GODSEY, M. S. Jr. et al. West Nile virus-infected mosquitoes, Louisiana, 2002. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 11, n. 9, p. 1399-1404, 2005.

GOLDBERG, L. J; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito News**, Nova York, v. 37, n. 3, p. 355-358, 1977.

GÓMEZ, I. et al. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, Nova York, v. 28, p. 69-73, 2007.

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

HUA, G. et al. Molecular cloning of a GPI-anchored aminopeptidase N from *Bombyx mori* midgut: a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin. **Gene**, Amsterdam, v. 214, n. 1-2, p. 177-85, 1998.

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

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

JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. Characterization of a Cry1Ac-receptor Alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. **European Journal of Biochemistry**, Berlim, v. 271, p. 3127-3135, 2004.

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

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**, Londres, v. 130, p. 893-900, 1984.

KELLEN, W. et al. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, Nova York, v. 7, p. 442-448, 1965.

KNIGHT, P. J. K.; KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 11, n. 3, p. 429-436, 1994.

KNIGHT, P. J. K.; KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, n. 30, p. 17765-17770, 1995.

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

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.

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

LEE, Y. W.; ZAIRI, J. Laboratory evaluation of *Bacillus thuringiensis* H-14 against *Aedes aegypti*. **Tropical Biomedicine**, v. 22, n. 1, p. 5-10, 2005.

LEHNINGER, A L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**, 2. ed. New York: Worth Publishers, 1993.

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

MINSHALL, N.; STANDARD, N. The active form of Xp54 RNA helicase in translational repression is an RNA-mediated oligomer. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 32, n. 4, p. 1325-1334, 2004.

MITTAL, P.K. et al. Laboratory and field evaluation of Spherix, a formulation of *Bacillus sphaericus* (B-101) to control breeding of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **Indian Journal of Malariology**, Kanpur, v. 30, n. 21, p. 81-89, 1993.

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

MONDINI, A. et al. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 13, n. 1, p. 176-178, 2007.

MUTEBI, J-P. et al. Yellow fever virus infectivity for bolivian *Aedes aegypti* mosquitoes. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, n. 9, 2004.

NAGAMATSU, Y. et al. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 460, n. 2, p. 385-390, 1999.

NENE, V. et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, Washington, v. 316, n. 5832, p. 1718-1723, 2007.

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

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

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

OCHOA-CAMPUZANO, C. et al. An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova York, v. 362, p. 437-442, 2007.

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, p. 58-64, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Report on the workshop on the large scale-use of *Bacillus sphaericus* to control *Culex quinquefasciatus* in urban environments**. Centre Pasteur Cameroun, Maroua, Cameroun, p. 19-24, 1993.

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

PARTRIDGE, R. M.; BERRY, C. Insecticidal activity of the *Bacillus sphaericus* Mtx1 toxin against *Chironomus riparus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Nova York, v. 79, p. 135-136, 2002.

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

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

PONTOH, J.; LOW, N. H. Purification and characterization of beta-glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 679-690, 2002.

REED, B. J.; CHANDLER, D. S.; SANDEMANA, R. M. Aminopeptidases as potential targets for the control of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **International Journal for Parasitology**, Nova York, v. 29, p. 839-850, 1999.

REGIS, L. et al. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 17, p. 377-80, 2001.

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

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

SCHWARTZ, J.-L. et al. Permeabilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitoicidal binary toxin and its individual components. **The Journal of Membrane Biology**, Nova York, v. 184, p. 171-183, 2001.

SHENTAL-BECHOR, D.; LEVY, Y. Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 24, p. 8256-8261, 2008.

SILVA-FILHA, M. H. N. L.; 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**, Berlim, v. 247, p. 754-761, 1997.

SILVA-FILHA, M. H. N. L. et al. 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**, Oxford, 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*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 77, p. 138-146, 2003.

SILVA-FILHA, M. H. N. L. et al. Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut receptor binding site: implications for resistance of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) larvae. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 241, p. 185-191, 2004.

SILVA-FILHA, M. H. N. L. et al. *Culex quinquefasciatus* populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. **Biological Control**, San Diego, v. 44, p. 227-234, 2008.

SINGER, S. Isolation and development of bacterial pathogens in vectors. In: SINGER, S. **Biological regulation of vectors**, Bethesda: DHEW publication No. (NIH) 77-1180, 1977, p. 3-18.

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

SOPER, F. L. Erradicacion en las Américas de los invasores africanos *Aedes aegypti* y *Anopheles gambiae*. **Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana**, Washington, v. LV, n. 3, ano 4b, 1963.

SOUZA-NETO, J. A. et al. Sugar digestion in mosquitoes: Identification and characterization of three midgut α -glucosidases of the neo-tropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 147 A, p. 993-1000, 2007.

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.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, 1994. v. 109B, p. 1-62.

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

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

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

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 97-130, 1993.

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

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

WEI, S.; CAI, Q.; YUAN, Z. Mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* induces stronger delayed effects than binary toxin on *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **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, 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**, Nova York, v. 40, p. 387-389, 1980.

WIERINGA, R. et al. Characterization of two new structural glycoproteins, GP(3) and GP(4), of equine arteritis virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 76, n. 21, p. 10829-10840, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Defeating dengue: a difficult task ahead**. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 85, n. 10, 2007.

XIE, R. et al. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 9, p. 8416-8425, 2004.

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

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

ZHENG, L. et al. Two genes encoding midgut-specific maltase-like polypeptides from *Anopheles gambiae*. **Experimental Parasitology**, Nova York, v. 81, p. 272-283, 1995.

ZHOU, X. et al. Efficient translocation and processing with *Xenopus* egg extracts of proteins synthesized in rabbit reticulocyte lysate. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, Columbia, v. 36, n. 5, p. 293-298, 2000.

APÊNDICE A – Manuscrito de artigo para submissão

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

For: Comparative biochemistry and physiology. Part B

Section: Biochemistry & molecular biology

Expressão da α -glicosidase Aam1 de *Aedes aegypti* e avaliação da refratariedade ao *B. sphaericus*

Lígia Maria Ferreira¹, Tatiany Patrícia Romão¹, Osvaldo Pompílio de-Melo-Neto², Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha^{1*}

¹Departamento de Entomologia e ²Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife-PE 50670-420, Brasil

***Autor para correspondência**

Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha

Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-420, Brazil

Tel: +55-81-21012553

Fax: +55-81-21012516

E-mail: mhneves@cpqam.fiocruz.br

Running head: *Bacillus sphaericus* binary toxin

28

RESUMO

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

A ação da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* em culicídeos depende da interação com receptores no *microvilli* intestinal das larvas. A α -glicosidase de membrana de 60 kDa (Cqm1), receptor da toxina Bin, confere o *status* de suscetibilidade de *Culex quinquefasciatus*, enquanto que *Ae. aegypti*, é refratário ao Bsp, devido à ausência de receptores no *microvilli*. No entanto, a análise do genoma do *Ae. aegypti*, revelou um gene que codifica a proteína ortóloga Aam1 com 80% de homologia ao receptor Cqm1. O objetivo do estudo foi elucidar a base da refratariedade do *Ae. aegypti*, baseado na investigação da proteína Aam1. Os resultados mostraram que larvas de *Ae. aegypti* expressam uma α -glicosidase de membrana de 70 kDa, reconhecida pelo anticorpo anti-Cqm1, e que se trata potencialmente da proteína Aam1. Esta proteína é expressa no *microvilli* intestinal em níveis superiores à Cqm1, porém, não apresenta capacidade de ligação à toxina Bin. As proteínas Aam1 e Cqm1 recombinantes, produzidas em lisado de reticulócitos de coelho, não foram capazes de ligar-se com a toxina Bin e este dado aponta que o processamento pós-traducional pode ser crítico para a sua funcionalidade. O efeito da desnaturação por temperatura na funcionalidade da proteína Cqm1 nativa também demonstrou que a sua conformação é essencial para a capacidade ligação. Os resultados mostram que, apesar da presença da proteína ortóloga Aam1 no *microvilli* intestinal das larvas, alterações no processamento pós-traducional ou na estrutura da proteína impedem que molécula funcione como receptor da toxina Bin.

Palavras-Chave: Controle biológico de vetores, toxinas bacterianas, *Aedes*

49

INTRODUÇÃO

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

O *Bacillus sphaericus* (Bsp) é um biolarvicida eficaz para o controle de larvas de culicídeos. Seu principal fator tóxico é a toxina Bin, produzida em um cristal protéico, sob a forma de uma protoxina heterodimérica, composta pelos polipeptídeos de 42- e 51- kDa, BinA e BinB, respectivamente (Charles, 1987; Baumann, et al., 1988). Após a ingestão pelas larvas, o cristal é solubilizado em pH alcalino intestinal e a protoxina Bin é liberada no lúmen, onde é clivada por serina-proteases em polipeptídeos de 39- e 43-kDa, que constituem a forma ativa da toxina (Baumann et al., 1985; Broadwell e Baumann, 1987; Nielsen-Leroux e Charles, 1992). A ligação da toxina a receptores específicos no epitélio intestinal é uma etapa crucial no modo de ação do Bsp em espécies susceptíveis tais como *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus*, *An. stephensi* e *An. gambiae*. Em *Ae. aegypti*, uma espécie naturalmente refratária ao Bsp, a ligação da toxina aos receptores do *microvilli* intestinal de larvas não foi detectada (Nielsen-Leroux e Charles, 1992; Silva-Filha et al., 1997). O receptor em *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus* e *An. gambiae* é uma α -glicosidase (E.C. 3.2.1.20) de 60 kDa, ligada à membrana apical do epitélio intestinal através de uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI), denominadas respectivamente, Cpm1, Cqm1 e Agm3 (Silva-Filha et al., 1999; Darboux et al., 2001; Pauchet et al., 2005; Romão et al., 2006; Opota et al., 2007). A análise de sequências no GenBank mostrou que um gene com alta homologia àquele que codifica o receptor da toxina Bin em *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus* e *An. gambiae* estaria presente em *Ae. aegypti* (Romão et al., 2006). A similaridade de 83% entre as seqüências das moléculas Aam1 e Cqm1 é elevada e motivou a investigação dos mecanismos moleculares que determinam a refratariedade do *Ae. aegypti* ao Bsp. A ausência de ligação da toxina aos receptores no *microvilli* intestinal de *Ae. aegypti* pode resultar da ausência de expressão do gene *aam1* nos insetos, da expressão desse gene em outra fase do desenvolvimento, da expressão em níveis reduzidos, da produção de uma proteína desprovida de âncora GPI e,

74 portanto, expressa sob a forma solúvel, ou ainda de diferenças estruturais nas proteínas que
75 sejam críticas para o seu reconhecimento e ligação com a toxina Bin. Uma segunda
76 possibilidade é que a proteína Aam1 seja expressa nas larvas de *Ae. aegypti* e não possua a
77 capacidade de interagir com a toxina Bin, o que pode ser decorrente de diferenças na
78 sequência primária de aminoácidos ou de alterações na conformação da proteína Aam1 que
79 impeçam a interação. A análise comparativa das α -glicosidases Aam1 de *Ae. aegypti* e Cqm1
80 de *C. quinquefasciatus*, espécies refratária e suscetível respectivamente, constitui um modelo
81 ímpar para a compreensão do modo de ação da toxina Bin. Diante do exposto, o principal
82 objetivo deste trabalho foi identificar fatores que estejam envolvidos na refratariedade das
83 larvas de *Ae. aegypti* ao Bsp.

84

85

MATERIAL E MÉTODOS

86 2.1 Colônias de insetos

87 Foram utilizadas amostras de larvas e adultos de *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, das
88 colônias RecL e CqSF, respectivamente, mantidas no insetário do Departamento de
89 Entomologia do CpqAM, segundo Chalegre et al. (2009).

90

91 2.2 Extrato total de larvas e adultos

92 O extrato total de proteínas de larvas e adultos foi obtido a partir da maceração de
93 espécimes em 10 μ l de tampão PBS/Azida 0,02%/10 mM PMSF pH 7.4. As amostras foram
94 centrifugadas a 1.500 g, durante 2 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado
95 imediatamente nos ensaios. A dosagem de proteínas das amostras foi mensurada segundo
96 Bradford et al. (1976) utilizando uma curva de albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

97

98

99 2.3 Frações ricas em microvilli intestinal (BBMF) de larvas

100 As preparações de BBMF foram obtidas a partir de larvas do 4^o estágio, segundo
101 Silva-Filha et al. (1997). A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o item anterior
102 e a qualidade das amostras de BBMF foi avaliada através da determinação do enriquecimento
103 da enzima α -glicosidase (E.C. 3.2.1.20), segundo Silva-Filha et al. (1999).

104

105 2.4 Frações de proteínas de BBMF solubilizadas (Extratos-CHAPS)

106 Nesta etapa foram obtidas frações de proteínas do *microvilli* intestinal das larvas,
107 solubilizadas com detergente CHAPS, segundo Silva-Filha et al. (1999). A dosagem de
108 proteínas, para avaliar o rendimento da solubilização dos extratos e a atividade α -glicosidase,
109 para estimar o enriquecimento das preparações em membranas apicais, antes e após a
110 solubilização com CHAPS, foi feita conforme descrito anteriormente.

111

112 2.5 Imunodeteção de proteínas com anticorpo anti *Cqm1*

113 Preparações de BBMF de *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus* (2,5 a 20 μ g) foram
114 submetidas à separação eletroforética SDS-PAGE a 10% e as proteínas do gel foram
115 transferidas para uma membrana de nitrocelulose que foi submetida a imunodeteção
116 utilizando o anticorpo primário anti-Cqm1, segundo Romão et al. (2006).

117

118 2.6 Ensaio de atividade α -glicosidase em gel

119 A análise do perfil de α -glicosidases foi realizada em amostras de BBMF (15 μ g de
120 proteínas) segundo Romão et al. (2006). A visualização do perfil de bandas catalíticas das α -
121 glicosidases foi feita em transiluminador de luz ultravioleta (UV).

122

123

124 2.7 Clonagem e expressão dos genes *aam1* e *cqm1*

125 A extração do RNA para a produção do cDNA do gene *aam1* de *Ae. aegypti* foi feita a
126 partir um *pool* de larvas ou adultos, segundo Romão et al. (2006). O RNA foi purificado e as
127 reações de transcrição reversa (RT-PCR) foram realizadas utilizando o *primer* oligo DT₂₀
128 (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. A partir do cDNA obtido, as reações de PCR
129 foram realizadas, utilizando *primers* específicos para o gene *aam1* (Nene et al. 2007),
130 segundo Romão et al. (2006). O produto de amplificação do gene *aam1* foi purificado com o
131 kit GFX DNA and Gel Band Purification[®] (GE Healthcare) e inserido no vetor plasmidial
132 pGEM[®]-T Easy (Promega), que foi utilizado na transformação de células de *Escherichia coli*
133 cepa DH10B eletrocompetentes, segundo instruções do fabricante. Plasmídeos contendo o
134 gene *cqm1*, previamente clonado por Romão et al. (2006) foram utilizados como controle.
135 Foram feitas preparações de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina, segundo Ausbel
136 (1992), e estas foram digeridas com as enzimas *Pst* I e *Hind* III a 37 °C. Os fragmentos
137 liberados após a digestão foram subclonados no vetor pGEM3zf+[®] (Promega), para a
138 expressão protéica através do sistema de tradução em lisado de reticulócitos de coelho. Os
139 plasmídeos contendo os fragmentos dos genes *aam1* e *cqm1* foram sequenciados no ABI
140 Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os “*contigs*” foram montados no
141 programa SeqMan (DNASTar) e as sequências editadas no programa EditSeq (DNASTar). A
142 identidade dos fragmentos foi confirmada pela comparação das seqüências obtidas com
143 aquelas disponíveis no GenBank, através da ferramenta BLASTn do NCBI
144 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

145 O procedimento de mutagênese sítio-dirigida foi realizado nos fragmentos *aam1* e
146 *cqm1*, contidos no plasmídeo pGEM3Zf+, de acordo com o protocolo do Kit de mutagênese
147 sítio-dirigida QuikChange[®] (Stratagene), para modificar as seqüências de Kozak destes genes.
148 A eficácia do procedimento foi avaliada através de análise de seqüências conforme descrito

149 anteriormente e os plasmídeos contendo as mutações foram utilizados para a expressão das
150 proteínas recombinantes mutagenizadas em lisado de reticulócitos de coelho.

151

152 2.8 Transcrição e tradução *in vitro* em reticulócitos de coelho

153 Os genes *aam1* e *cqm1* submetidos a mutagênese foram utilizados para a produção do
154 mRNA, segundo Romão et al. (2006). Os mRNAs obtidos foram utilizados no procedimento
155 de tradução *in vitro*, utilizando um lisado de reticulócitos de coelho (*Rabbit Reticulocyte*
156 *Lysate*[®], Promega), segundo instruções do fabricante. Após a tradução, uma alíquota de cada
157 amostra foi submetida à eletroforese em SDS-PAGE a 10%, e gel submetido à secagem. Um
158 filme autoradiográfico Hiperfilm[®] (Amershan) foi exposto ao gel durante 12 h à TA e, em
159 seguida, revelado para a detecção das proteínas marcadas com ³⁵S.

160

161 2.9 Ensaios de *pull-down*

162 Os ensaios de *pull down* foram realizados segundo Dhalia et al. (2005). Foram
163 utilizados 10 µl da toxina BinB immobilizada na resina GS (Bin-GS), incubada com os
164 extratos-CHAPS (20 µg de proteínas) ou com as proteínas recombinantes (5 µg). Para avaliar
165 a especificidade da ligação, as respectivas incubações foram feitas com a proteína glutationa
166 S-transferase (GST), immobilizada sobre a resina GS, que serviu como controle negativo. Após
167 a incubação, as amostras foram centrifugadas, 1.500 g, 2 min a 4 °C, e o sedimento foi
168 submetido à eletroforese SDS-PAGE 10%, transferência para membrana de nitrocelulose, e
169 imunodeteção com anticorpo anti Cqm1. As proteínas recombinantes *LmEIF4A1* e *LmEIFG3*
170 de *Leishmania* foram utilizadas como controles nos ensaios, de acordo com as necessidades
171 experimentais. Além da avaliação de proteínas recombinantes, as proteínas nativas Cqm1 e
172 Aam1 de extratos-CHAPS também foram testadas em relação a sua habilidade de ligação com
173 a toxina Bin. Amostras previamente submetidas ao tratamento com temperaturas de 45, 65 e

174 100 °C durante cinco minutos também foram avaliadas. Após o tratamento as amostras foram
175 avaliadas quanto à capacidade de ligação à toxina Bin através dos ensaios de *pull down*
176 conforme descrito anteriormente.

177

178

RESULTADOS

179 3.1 Expressão da proteína Aam1 e capacidade de interação com a toxina Bin

180 A imunodeteção de proteínas de *Ae. aegypti*, utilizando o anticorpo anti-Cqm1,
181 revelou que moléculas semelhantes ao receptor Cqm1 são expressas no *microvilli* intestinal de
182 larvas desses insetos. Nas amostras de BBMF o anticorpo reconheceu com alta especificidade
183 uma proteína de cerca de 70 kDa, em paralelo ao reconhecimento da proteína Cqm1 de cerca
184 de 60 kDa, em amostras de BBMF de *C. quinquefasciatus* (Fig. 1). Esse dado revela que uma
185 proteína ortóloga ao receptor Cqm1 é expressa no *microvilli* intestinal das larvas de *Ae.*
186 *aegypti* em quantidade equivalente àquela vista em *C. quinquefasciatus*. A imunodeteção
187 também confirma que a proteína de *Ae. aegypti* possui um peso molecular superior à α -
188 glicosidase Cqm1.

189 O perfil de α -glicosidases em preparações de BBMF de *Ae. aegypti* é composto por
190 quatro bandas catalíticas e, duas delas, com tamanho semelhante à α -glicosidase Cqm1 (Fig.
191 2, painel à esquerda, Ae, seta). Após a detecção enzimática de α -glicosidases em *Ae. aegypti*,
192 o gel foi submetido à imunodeteção e o anticorpo anti-Cqm1 reconheceu especificamente a
193 α -glicosidase que possui massa molecular discretamente inferior à Cqm1 (Fig. 2, painel à
194 direita, Ae, seta). Este ensaio demonstrou que a massa molecular da Aam1 foi inferior à
195 Cqm1, ao contrário dos dados obtidos em SDS-PAGE, o que sugere a existência de diferenças
196 estruturais entre essas proteínas. Os resultados obtidos nesta análise demonstram a expressão
197 de uma α -glicosidase de membrana de 70 kDa no *microvilli* intestinal de larvas de *Ae.*
198 *aegypti*, que seria potencialmente a proteína Aam1, ortóloga do receptor Cqm1.

199 A capacidade de interação destas proteínas nativas à toxina Bin foi avaliada em
200 ensaios de afinidade. Nestes ensaios a proteína Cqm1 nativa, presente em extratos-CHAPS foi
201 capaz de se ligar à subunidade BinB imobilizada em resina (Fig. 3, Cq 2). A ligação foi
202 específica, pois a banda de 60 kDa não foi observada quando o extrato foi incubado com a
203 glutiona S-transferase (GST) imobilizada sobre a resina GS, amostra usada como controle
204 negativo do ensaio (Fig. 3, Cq 1). Na incubação com o extrato-CHAPS de *Ae. aegypti* não foi
205 observada interação, não sendo visualizada nenhuma proteína com capacidade de ligação à
206 subunidade BinB da toxina ((Fig. 3, Ae 2).

207

208 3.2 Produção de Aam1 e Cqm1 recombinantes e capacidade de interação com a toxina Bin

209 Devido à falha de ligação da proteína Aam1 nativa à toxina, foram obtidas proteínas
210 recombinantes através do processo de transcrição e tradução *in vitro* em lisado de reticulócitos
211 de coelhos. A análise em SDS-PAGE das proteínas obtidas neste sistema de expressão
212 mostrou que Cqm1-³⁵S migrou com massa aproximada de 65 kDa (Fig. 4, Cq), enquanto que
213 a ortóloga Aam1-³⁵S apresentou cerca de 68 kDa (Fig. 4, Ag). A interação das proteínas com
214 a toxina Bin foi testada através dos ensaios de *pull down*, entretanto, as proteínas Aam1-³⁵S e
215 Cqm1-³⁵S não mostraram capacidade de ligação com a subunidade BinB imobilizada e
216 nenhuma banda foi visualizada na autoradiografia (Fig. 5, Aam1 e Cqm1, 2). A proteína
217 Cqm1 nativa possui capacidade comprovada de interagir com a toxina Bin, entretanto, sob
218 forma recombinante obtida neste sistema, tal capacidade foi abolida. Este dado apontou que a
219 investigação de fatores que afetam a conformação da proteína seria relevante para o estudo. A
220 partir deste achado, o efeito da desnaturação na capacidade de ligação das proteínas nativas à
221 toxina Bin e a influência que a conformação protéica poderia exercer neste aspecto foram
222 avaliados. Os extratos-CHAPS contendo a proteína Cqm1 nativa mostrou capacidade de
223 interação com a toxina Bin em ensaios de *pull down* (Fig. 6, N-2) e a ligação foi específica,

224 pois na incubação feita com a proteína GST, utilizada como controle negativo, a banda não foi
225 detectada (Fig. 6, N-1). O tratamento do extratos-CHAPS de *Culex* com o aquecimento
226 mostrou que capacidade de ligação foi mantida em amostras aquecidas a 45 e 100 °C (Fig. 6,
227 D2-45 e D2-100), enquanto que foi reduzida ou abolida em amostras aquecidas a 65 °C (Fig.
228 6, D-65). Entretanto, verificou-se que a ligação do extrato aquecido a 100 °C à toxina foi
229 artefactual, visto que também foi observada no controle negativo utilizando a proteína GST
230 (dados não apresentados). Os dados sugerem que a integridade da conformação da Cqm1 é
231 essencial para a sua habilidade de interação com a toxina Bin visto que, sob estado
232 desnaturado, a proteína perde esta característica.

233

234

DISCUSSÃO

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

Estudos prévios demonstraram que a toxina Bin não reconhece receptores específicos no *microvilli* intestinal larvas de *Ae. aegypti* (Nielsen-Ieroux; Charles, 1992). Desta forma, partiu-se da hipótese de que essa ausência de ligação poderia ser decorrente da quantidade reduzida ou da ausência de receptores disponíveis, ou que a maltase Aam1 fosse expressa em outra fase do desenvolvimento, que não as larvas de quarto estágio. Na análise da expressão em amostras de *microvilli* intestinal (BBMF) de *Ae. aegypti* foi detectada uma α -glicosidase de membrana com cerca de 70 kDa, expressa em níveis aparentemente superiores ao receptor Cqm1. Esse resultado indica que esta proteína potencialmente seria a Aam1, dada a considerável semelhança com a proteína Cqm1, em termos de reconhecimento imunológico, massa molecular e atividade enzimática.

245

246

247

248

O gene *aam1* de *Ae. aegypti*, assim como gene *cqm1* de *C. quinquefasciatus* possui uma região codificadora (ORF) de cerca de 1743 nucleotídeos, que dá origem a uma proteína de 580 aminoácidos e massa molecular esperada de 66 kDa (Romão, et al., 2006). Entretanto os dados de imunodeteção e do perfil de α -glicosidasas das proteínas Aam1 e Cqm1

249 apontaram que estas proteínas podem apresentar diferenças estruturais. Em SDS-PAGE as
250 proteínas Cqm1 e Aam1 apresentam massas de cerca de 60 e 70 kDa, respectivamente,
251 enquanto que sob as condições semi-desnaturantes dos ensaios de enzimáticos, estas proteínas
252 migram com tamanho aparente de 82 e 78 kDa, respectivamente. Esta diferença estrutural
253 poderia ser a razão pela qual a proteína Aam1, apesar de presente em abundância em
254 preparações de BBMF de *Ae. aegypti*, não apresenta capacidade de ligação com a toxina, o
255 que está em acordo com outros estudos que já haviam apontado esta falha de interação
256 (Nielsen-Leroux; Charles, 1992).

257 Proteínas Aam1 e Cqm1 recombinantes foram obtidas no sistema de expressão em
258 lisado de reticulócitos de coelho para avaliar as diferenças que pudessem interferir na
259 ausência de ligação da Aam1 à toxina Bin. Nos ensaios de afinidade as proteínas Aam1-³⁵S e
260 Cqm1-³⁵S não foram capazes de se ligar à subunidade BinB, o que sugere que o sistema de
261 expressão em reticulócitos, embora eucarioto, não possibilita o processamento adequado das
262 proteínas. É possível que modificações pós-traducionais importantes para a conformação
263 protéica não sejam inseridas durante o processamento. A análise do gene *cqm1* mostrou que
264 este contém quatro sítios de glicosilação na sua sequência, que indicam a inserção de
265 carboidratos à cadeia polipeptídica (Darboux et al., 2001; Romão et al., 2006). As
266 glicosilações estão entre as mais comuns e mais importantes modificações pós-traducionais
267 em proteínas de eucariotos e podem influenciar na sua conformação, conferindo maior
268 estabilidade térmica (Varki, 1993, Shental-Bechor; Levy, 2008). O sistema de tradução em
269 lisado de reticulócitos de coelho pode produzir modificações pós-traducionais, incluindo
270 acetilação, isoprenilação e fosforilação (Walter; Blobel, 1983), entretanto, não é capaz de
271 inserir glicosilações (Zhou et al., 2000; Wieringa et al., 2002). A ausência de glicosilações
272 pode ser um aspecto crítico para a funcionalidade da proteína Cqm1-³⁵S, visto que esta
273 proteína é sabidamente capaz de ligar-se à toxina Bin sob a forma nativa (Nielsen-Leroux e

274 Charles, 1992; Oliveira et al., 2004; Silva-Filha et al. 1997, 1999, 2004, 2008; Romão et.,
275 2006). Estudos anteriores demonstraram que N-glicosilações podem estar implicadas na
276 ligação da toxina Cry1Ac a uma fosfatase alcalina que é o receptor dessa toxina no epitélio
277 intestinal de larvas do lepidóptero *Heliothis virescens* (Jurat-Fuentes e Adang, 2004).

278 Outro dado relevante para a funcionalidade das proteínas é que o tratamento à
279 temperatura de 65 °C e 100 °C, aboliu a capacidade de ligação da proteína nativa Cqm1.
280 Nestas temperaturas a conformação terciária da proteína provavelmente foi destruída e a
281 molécula passou a um estado desnaturado. Estudos realizados com algumas β -glicosidases
282 mostram que há estabilidade na atividade enzimática em uma faixa de temperatura entre 20 a
283 50 °C, enquanto que esta é perdida em temperaturas acima de 60 °C (Pontoh e Low, 2002).
284 As alterações na conformação protéica interferem na capacidade de interação da proteína
285 Cqm1 com a toxina Bin, o que indica que tal interação depende não somente da estrutura
286 primária ou do epitopo de ligação para a toxina, mas também da conformação ou dobramento
287 final da proteína nativa. Conforme mencionado anteriormente, as proteínas Aam1 e Cqm1
288 apresentam massas moleculares diferentes sob condições semi-desnaturantes, o que indica que
289 a estrutura protéica pode ser um fator importante para as diferenças entre essas moléculas em
290 relação à sua capacidade de ligação à toxina Bin.

291 Duas principais hipóteses podem estar relacionadas à ausência de funcionalidade da
292 proteína Aam1. A primeira é que existam modificações da estrutura da proteína, no epitopo de
293 ligação propriamente dito, ou ainda em outras regiões que possam interferir na conformação
294 da proteína. Uma segunda hipótese é que o processamento protéico pós-traducional não seja
295 adequado e não proporcione a conformação adequada da proteína. Diante dos achados, faz-se
296 necessária a utilização de um sistema de expressão capaz de promover o processamento pós-
297 traducional das proteínas a serem submetidas à avaliação de funcionalidade e identificação de
298 regiões críticas envolvidas na interação toxina-receptor. Os conhecimentos produzidos acerca

299 da base molecular da ação da toxina Bin são de grande relevância para a compreensão do
300 modo de ação do Bsp e podem servir de subsídios para estratégias de aperfeiçoamento do
301 espectro inseticida deste agente de controle.

302

303

AGRADECIMENTOS

304 O trabalho teve o apoio do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq Brazil,
305 4711911/2006-2).

306

307

REFERÊNCIAS

308 1. Ausbel, F.M. et al. 1992. Short protocols in molecular biology. Harvard Medical
309 School, 2^a Ed. 1-20.

310 2. Baumann, P., Unterman B.M., Baumann, L., Broadwell, A.H., Abbene, S.J.,
311 Bowditch, R.D. 1985. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and
312 evidence for high-molecular-weight precursors. J. Bacteriol. **163**: 738-747.

313 3. Baumann, L., Broadwell, A.H., Baumann, P. 1988. Sequence analysis of the
314 mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9-Kilodalton proteins from *Bacillus*
315 *sphaericus* 2362 and 2297. 1988. J. Bacteriol. **170**: 2045-2050.

316 4. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
317 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**:
318 248-254.

319 5. Broadwell, A. H., Baumann, P. 1987. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results
320 in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. Appl Environ Microbiol. **53**:
321 1333-1337.

- 322 6. Chalegre, K. D., Romão, T.P., Amorim, L. B., Anastacio, D. B., de Barros, R. A., de
323 Oliveira, C. M., Regis, L., de-Melo-Neto, O. P., Silva-Filha, M. H. 2009. Detection of
324 an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex*
325 *quinquefasciatus* populations by molecular screening. *Appl Environ Microbiol.* **75**:
326 1044-1049.
- 327 7. Charles, J.-F. 1987. Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus*
328 *sphaericus* 2297 spore/crystal complex. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* **138**: 471-484.
- 329 8. Darboux, I., C. Nielsen-LeRoux, J.-F. Charles, and D. Pauron. 2001. The receptor of
330 *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut:
331 molecular cloning and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**:981-990.
- 332 9. Darboux, I., J.-F. Charles, Y. Pauchet, S. Warot, and D. Pauron. 2007. Transposon-
333 mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex*
334 *pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cell. Microbiol.* **9**:2022-2029.
- 335 10. Darboux, I., Y. Pauchet, C. Castella, M. H. Silva-Filha, C. Nielsen-LeRoux, J.- F.
336 Charles, and D. Pauron. 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a
337 mechanism of bioinsecticide resistance. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **99**:5830-5835.
- 338 11. Dhalia, R., Reis, C.R., Freire, E.R., Rocha, P.O., Katz, R., Muniz, J.R., Standart, N.,
339 de Melo Neto, O.P. 2005. Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation
340 of multiple eIF4F subunit homologues. Dhalia R, Reis CR, Freire ER, Rocha PO, Katz
341 R, Muniz JR, Standart N, de Melo Neto OP. *Mol. Biochem. Parasitol.* **140**: 23-41.
- 342 12. Jurat-Fuentes, J. L., Adang, M. J. 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor
343 Alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J.*
344 *Biochem.* **271**: 3127-3135.
- 345 13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head
346 of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.

- 347 14. Nene, V. et al. 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector.
348 Science. **316**: 1718-1723.
- 349 15. Nielsen-LeRoux, C., and J.-F. Charles. 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary
350 toxin to specific receptor on brush-border membranes. Eur. J. Biochem. **221**:285-290.
- 351 16. Oliveira, C. M., M. H. Silva-Filha, C. Nielsen-LeRoux, G. Pei, Z. Yuan, and L. Regis.
352 2004. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex*
353 *quinquefasciatus* from China and Brazil (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. **41**:58-
354 64.
- 355 17. Opota, O., Charles, J.F., Warot, S., Pauron, D., Darboux, I. 2008. Identification and
356 characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria
357 vector mosquito, *Anopheles gambiae*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol.
358 Biol. **149**: 419-427.
- 359 18. Pauchet, Y., Luton, F., Castella, C., Charles, J.F., Romey, G., Pauron, D. 2005. Effects
360 of a mosquitocidal toxin on mammalian epithelial cell line expressing its target
361 receptor. Cell. Microbiol. **7**: 1335-1344.
- 362 19. Pontoh, J., Low, N.H. 2002. Purification and characterization of beta-glucosidase from
363 honey bees (*Apis mellifera*). Insect Biochem Mol Biol. **32**: 679-690.
- 364 20. Romão, T. P., K. D. de Melo Chalegre, S. Key, C. F. Ayres, C. M. Fontes de Oliveira,
365 O. P. de-Melo-Neto, and M. H. Silva-Filha. 2006. A second independent resistance
366 mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its α -glucosidase receptor in
367 *Culex quinquefasciatus*. FEBS J. **273**:1556-1568.

- 368 21. Shental-Bechor, D., Levy, Y. 2008. Effect of glycosylation on protein folding: a close
369 look at thermodynamic stabilization. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 105: 8256-8261.
- 370 22. Silva-Filha, M. H., Nielsen-Leroux, C., Charles, J. F. 1997. Binding kinetics of
371 *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of *Anopheles* and
372 *Culex* sp. mosquito larvae. Eur. J. Biochem. **247**: 754-761.
- 373 23. Silva-Filha, M. H., J.-F. Charles, and C. Nielsen-LeRoux. 1999. Identification of the
374 receptor for *Bacillus sphaericus* binary toxin in the brush border membrane of the
375 mosquito *Culex pipiens*. J. Insect Biochem. Mol. Biol. **29**: 711-721.
- 376 24. Silva-Filha, M. H. N. L., C. M. F. Oliveira, L. Regis, Z. Yuan, C. M. Rico, and C.
377 Nielsen-LeRoux. 2004. Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut
378 receptor binding site: implications for resistance of *Culex pipiens* complex (Diptera:
379 Culicidae) larvae. FEMS Microbiol. Lett. **241**:185-191.
- 380 25. Silva-Filha, M. H., K. D. M. Chalegre, D. B. Anastacio, C. M. F. Oliveira, S. B. Silva,
381 R. V. Acioli, S. Hibi, D. C. Oliveira, E. S. M. Parodi, C. A. M. M. Filho, A. F.
382 Furtado, and L. Regis. 2008. *Culex quinquefasciatus* populations subjected to
383 treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. Biol.
384 Control. **44**: 227-234.
- 385 26. Varky, A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct.
386 Glycobiology. **3**: 97-130.
- 387 27. Walter, P., Blobel, G. 1983. Preparation of microsomal membranes for cotranslational
388 protein translocation. Methods Enzymol. **96**: 84-93.
- 389 28. Weijers, M. 2003. Heat-induced denaturation and aggregation of ovalbumin at neutral
390 pH described by irreversible first-order kinetics. Protein Sci. **12**: 2693-2703.

- 391 29. Wieringa, R., de Vries, A.A., Raamsman, M.J., Rottier, P.J. 2002. Characterization of
392 two new structural glycoproteins, GP(3) and GP(4), of equine arteritis virus. *J. Virol.*
393 **76**: 10829-10840.
- 394 30. Xie, R., Zhuang, M., Ross, L.S., Gomez, I., Oltean, D.I., Bravo, A., Soberon, M., Gill,
395 S.S. 2004. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis*
396 *virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.* **280**: 8416-
397 8425.
- 398 31. Zhou, X., Tsuda, S., Bala, N., Arakaki, R. F. 2000. Efficient translocation and
399 processing with *Xenopus* egg extracts of proteins synthesized in rabbit reticulocyte
400 lysate. *In vitro cell. Dev. Biol. – Animal.* . **36**: 293-298.
- 401
- 402
- 403
- 404
- 405
- 406
- 407
- 408
- 409
- 410
- 411
- 412 .
- 413
- 414
- 415

LEGENDAS DE FIGURAS

416

417

418 FIG. 1. Imunodeteção de proteínas do *microvilli* intestinal de larvas de culicídeos com o
419 anticorpo anti-Cqm1. Curva decrescente de amostras de proteínas (20 - 2,5 µg) de *Culex*
420 *quinquefasciatus* (Cq) e *Aedes aegypti* (Ae). **PM.** Peso molecular em kDa.

421

422 FIG. 2. Perfil da atividade α -glicosidase em gel de amostras de *microvilli* intestinal de larvas
423 de *Culex quinquefasciatus* (Cq) e de *Aedes aegypti* (Ae). As proteínas do gel foram
424 transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetidas á imunodeteção com
425 anticorpo anti-Cqm1. **PM.** Peso molecular em kDa.

426

427 FIG. 3. Ensaio de afinidade entre os extratos de proteínas de *microvilli* intestinal solubilizadas
428 de *Culex quinquefasciatus* (Cq) e *Aedes aegypti* (Ae) e a toxina Bin do *B. sphaericus*
429 imobilizada em resina Bin-GS, seguido de imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1. **1.**
430 Incubação com glutathione S-transferase imobilizada na resina. **2.** Incubação com o
431 componente BinB da toxina Bin. **Ext.** Amostras de 10 µg de proteínas de extratos-CHAPS,
432 sem incubação.

433

434 FIG. 4. Separação eletroforética em SDS-PAGE 10% de proteínas Aam1-³⁵S e Cqm1-³⁵S de
435 *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, respectivamente, produzidas através de tradução *in*
436 *vitro* em reticulócitos de coelho e visualizadas por autoradiografia. **PM.** Marcador de peso
437 molecular em kDa.

438

439 FIG. 5. Ensaio de pull down entre as proteínas Cqm1-S³⁵ e Aam1-S³⁵ e a subunidade BinB da
440 toxina e entre as proteínas LmEIFG3-S³⁵ e LmEIF4A1 de *Leishmania* sp., visualizados por

441 autoradiografia. **T.** Proteínas ³⁵S traduzidas sem incubação. **1.** Proteína incubada com
442 glutationa S-transferase. **2.** Proteína incubada com a subunidade BinB da toxina. **3.** Proteína
443 incubada com a proteína *LmEIF4A1* de *Leishmania*. **PM.** Peso molecular em kDa.

444

445 FIG. 6. Ensaio de afinidade (*pull down*) entre os extratos-CHAPS de *Culex*, nativo (N) ou
446 submetido ao tratamento em diferentes temperaturas (D2), e a BinB imobilizada em resina
447 glutationa sefarose (GS), seguido de imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1. **1.** Extrato
448 incubado com glutationa S-transferase. **2.** Extrato incubado com a subunidade BinB. **Ex.**
449 Extrato-CHAPS (5 µg) sem incubação com a resina.

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

FIG. 2

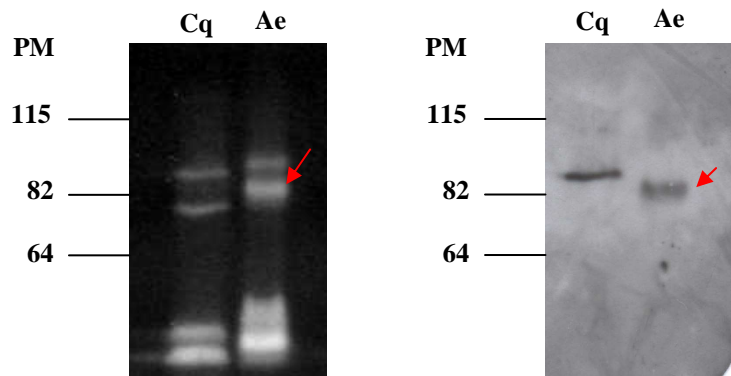


FIG. 3

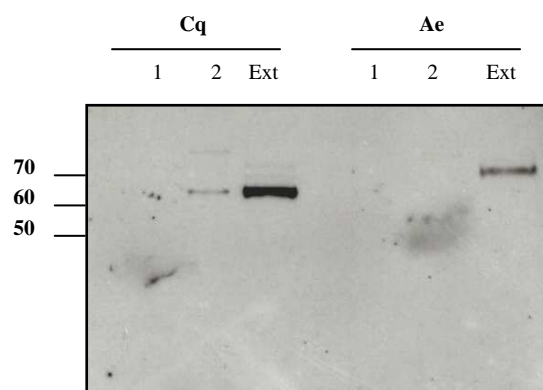


FIG. 4

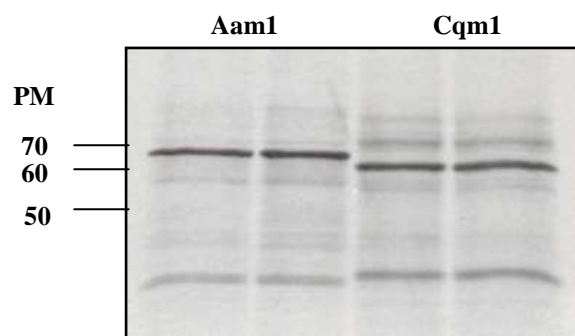


FIG. 5.

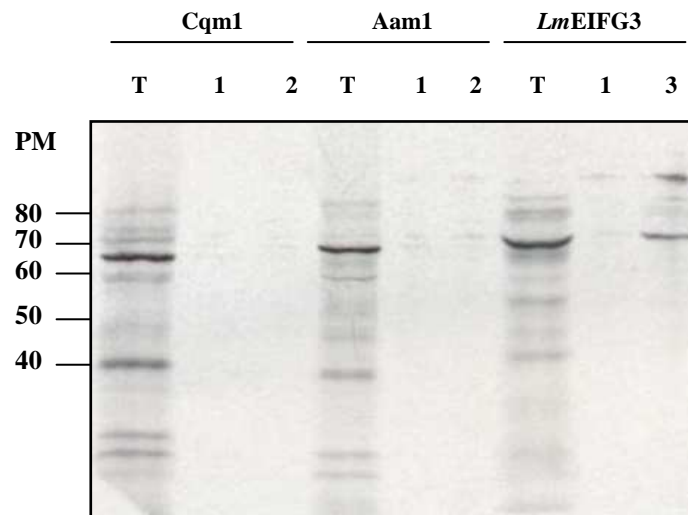


FIG. 6

