



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



KARLOS DIOGO DE MELO CHALEGRE

DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA DO VETOR *Culex*
quinquefasciatus AO BIOLARVICIDA *Bacillus sphaericus*

RECIFE
2008

KARLOS DIOGO DE MELO CHALEGRE

**Diagnóstico da resistência do vetor *Culex quinquefasciatus*
ao 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.

Orientadores: Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

**RECIFE
2008**

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

C436d Chalegre, Karlos Diogo de Melo.

Diagnóstico da resistência do vetor *Culex quinquefasciatus* ao biolarvicida *Bacillus sphaericus* / Karlos Diogo de Melo Chalegre. — Recife: K. D. M. Chalegre, 2008.

108 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

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

1. Controle Biológico de Vetores. 2. Toxinas Bacterianas. 3. *Culex*. 4. Receptores da Superfície Celular. 5. Resistência a Inseticidas. 6. Frequência do Gene. I. Lobo, Maria Helena Neves. II. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de. III. Título.

CDU 614.449

KARLOS DIOGO DE MELO CHALEGRE

**Diagnóstico da resistência do vetor *Culex quinquefasciatus* ao
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.

Aprovada em: 19/03/2008

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM
(orientador)

Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Nilma Cintra Leal
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM

*Dedico este trabalho a todos que contribuíram, direta
ou indiretamente, para sua conclusão.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha família, Karla, Kildaire, Klarissa, Lewiston, papai e em especial a minha mãe, companheira de longa jornada.

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

À MSc. Tatiany Romão que foi muito mais que apenas uma colega de laboratório e sim uma co-orientadora e amiga.

Ao Dr. Osvaldo Pompílio e à Dra. Teresa Magalhães pelo auxílio e colaboração na análise das seqüências.

À Dra. Cássia Docena do NPT/CPqAM pela sua contribuição na etapa do seqüenciamento de genes realizada neste estudo.

Ao Dr. Eduardo Henrique pela contribuição para o estabelecimento do fluxograma de PCR alelo-específica.

À mestranda Liliane Amorim pela contribuição na análise de Peixinhos, além de sua amizade.

À equipe do Serviço de Referência em Culicídeos Vetores pela avaliação da susceptibilidade das populações, nas pessoas da Dra. Cláudia Fontes de Oliveira e pelas biólogas Rosineide de Arruda Barros e Daniela Anastácio Bandeira.

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

A todos que fazem parte do Depto. de Entomologia, incluindo as equipes do laboratório e insetário, pela ajuda nos experimentos, atenção, risadas e pelo bom cafezinho com rosquinha de banana e canela.

Aos meus amigos, tanto do Aggeu como do mundo afora, que me ajudaram muito a esquecer um pouco da ciência nos finais de semana, com sua companhia e amizade.

Em especial a Danilo, Lili, Iêda, Lígia, Taty, Lisa, Emídio, Stro, Priscila, Thiers, Vladimir e Bruno.

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

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios da ciência, e ainda que tivesse toda a fé, sem amor, nada seria”

ICo 13:2

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.

RESUMO

A eficácia e seletividade do *Bacillus sphaericus* (Bsp) para larvas do vetor *Culex quinquefasciatus* é devida à ligação específica da toxina binária (Bin), principal proteína inseticida do Bsp, a um receptor presente no epitélio intestinal das larvas, a α -glicosidase Cqm1. Um mecanismo de resistência descrito para este culicídeo é devido a uma deleção de 19 nucleotídeos (d19) no gene *cqm1* (*cqm1-d19*) que, em homozigose, impede a expressão do receptor no epitélio. O objetivo deste trabalho foi determinar a frequência do alelo *cqm1-d19* em populações naturais de *Cx. quinquefasciatus*, não tratadas e tratadas com o Bsp, além de avaliar polimorfismos no gene *cqm1*. Uma análise *in vivo* da susceptibilidade ao Bsp em larvas de *Cx. quinquefasciatus* mostrou que as populações não tratadas de Varadouro, Peixinhos e Fazenda Nova apresentaram valores de razão de resistência (RR) de 1,3 a 4,0 vezes, enquanto que para a população tratada de Água Fria a RR variou de 2,7 a 8,6 vezes, em relação à população susceptível usada como controle. Os valores de RR inferiores a 10 indicaram que não houve alteração significativa na susceptibilidade. Os alelos *cqm1* e *cqm1-d19* foram identificados através de método diagnóstico de PCR utilizando *primers* que flanqueiam a d19 e as amostras das populações analisadas variaram entre 162 e 353 larvas. O alelo *cqm1-d19* foi detectado pela primeira vez em populações naturais e sua frequência em áreas não tratadas da Região Metropolitana do Recife (RMR) foi de $1,16 \times 10^{-2}$ em Varadouro e de $7,8 \times 10^{-3}$ em Peixinhos. Na população de Fazenda Nova, isolada geograficamente da RMR, o alelo não foi detectado. Em Água Fria, tratada com o Bsp desde 2003, as frequências foram bem mais elevadas em relação às populações não tratadas: 6,94 e $5,55 \times 10^{-2}$ após 13 e 24 tratamentos, respectivamente. Em paralelo à detecção do alelo foi feita a avaliação da frequência de expressão da α -glicosidase Cqm1, através de ensaios enzimáticos *in gel*, e os resultados corroboraram aqueles de frequência alélica em todas as populações. A partir da análise de polimorfismos no gene *cqm1* em 15 indivíduos de Água Fria, foram identificados 13 alelos, baseados em 13 alterações na sequência de aminoácidos, a maioria na região C-terminal. Dentre os alelos identificados, dois ocorreram em maior frequência e os demais foram variações destes principais. Os resultados deste estudo mostraram que a frequência do alelo *cqm1-d19* é alta em populações naturais, e mais elevada naquelas que estão sob pressão de seleção, além de demonstrarem que o gene *cqm1* é altamente polimórfico. As abordagens moleculares utilizadas neste estudo são mais sensíveis que os bioensaios, visto que foi possível detectar indivíduos heterozigotos e homozigotos resistentes, e são adequadas para avaliar a susceptibilidade de populações de *Cx. quinquefasciatus* ao Bsp. Estes dados reforçam a adoção de medidas visando o uso sustentável do biolarvicida Bsp em programas de controle de vetores.

Palavras-chave: Controle biológico de vetores, toxinas bacterianas, *Culex*, receptores da superfície celular, resistência a inseticidas, frequência alélica.

CHALEGRE, K. D. M. **Resistance diagnostic of the vector *Culex quinquefasciatus* to the bioinsecticide *Bacillus sphaericus***. 2008. Dissertation (Master of Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

ABSTRACT

The effectiveness of the *Bacillus sphaericus* (Bsp) to *Culex quinquefasciatus* larvae is due to the specific binding of the binary toxin (Bin), its major insecticidal protein, to a membrane-bound receptor in larvae midgut, the Cqm1 α -glucosidase. A resistance mechanism to the Bin toxin is based in a 19-nucleotide deletion (d19) in the *cqm1* gene (*cqm1-d19*), which prevents the expression of the receptor in the epithelium and leads to larval refractoriness, when this allele is expressed in homozygosis. The aim of this work was to determine the *cqm1-d19* frequency in untreated and treated field populations of *Culex quinquefasciatus*, and to analyze the polymorphism of the *cqm1* gene. The evaluation of larvae susceptibility to Bsp showed that the untreated populations of Varadouro, Peixinhos and Fazenda Nova exhibited resistance ratios (RR) between 1.3 and 4-fold, while the treated population of Água Fria showed RR values between 2.7 and 8.6-fold, compared to a susceptible colony used as a control. RR values less than 10-fold indicated no significant alteration at the susceptibility. A diagnostic method of PCR, using primers flanking the d19, was applied to identify the *cqm1* and *cqm1-d19* alleles in samples ranging from 162 to 353 larvae, from each population analyzed. The *cqm1-d19* allele was detected for the first time in field populations and its frequency in the untreated populations of Varadouro and Peixinhos located in the metropolitan area of Recife, were $1,16 \times 10^{-2}$ and $7,8 \times 10^{-3}$, respectively. In Fazenda Nova, geographically isolated from Recife, this allele was not found. The *cqm1-d19* frequencies in the treated population of Água Fria, $6,94 \times 10^{-2}$ and $5,55 \times 10^{-2}$ after 13 and 24 cycles of treatments respectively, were higher than those from the untreated areas. *In gel* α -glucosidase assays were performed to evaluate the Cqm1 expression, in parallel to the allele detection, and the results obtained were in agreement with the allelic frequency observed in all populations. Polymorphism analysis in the *cqm1* gene in 15 individuals from Água Fria showed the occurrence of 13 alleles based on 13 alterations of the amino acids sequence, most of them were located in the C-terminus. Among the alleles found, two occurred in higher frequency and the remaining alleles were variations from the major ones. The results showed that *cqm1-d19* allele was present in a high frequency in field populations, especially in Água Fria which is under selection with Bsp, besides, this study also indicated that the *cqm1* gene is very polymorphic. The molecular approaches described in this work are more sensitive compared to bioassays, since it was possible to detect heterozygote and resistant homozygote larvae, being suitable for monitoring resistance in *Cx. quinquefasciatus* populations. These data reinforce the adoption of strategies for the sustainable use of Bsp based larvicides in vector control programs.

Key words: Pest biological control, bacterial toxins, *Culex*, cell surface receptors, insecticide resistance, allelic frequency.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Ciclo biológico do *Culex quinquefasciatus* Após a postura dos ovos em forma de jangada, as larvas eclodem e passam por quatro estádios, com média de 24 h cada, transformam-se em pupas, formas que não se alimentam e, após 48 h, ocorre a emergência do adulto. 17
- Figura 2** – Visão longitudinal em micrografia eletrônica do *Bacillus sphaericus*, em fase de esporulação. 22
- Figura 3** – Análise das α -glicosidases presentes em larvas de *Culex quinquefasciatus* sensíveis (S) e resistentes (R) ao *Bacillus sphaericus*. 27
- Figura 4** – Populações de *Culex quinquefasciatus* utilizadas neste trabalho e as respectivas análises realizadas em relação ao monitoramento da susceptibilidade ao *Bacillus sphaericus* (Bsp). 41
- Figura 5** – Fluxograma para realização das etapas do protocolo de PCR específica para detecção dos alelos *cqm1* e *cqm1-d19*. 45
- Figura 6** – Representação esquemática de gene *cqm1* com a localização dos seis *primers* internos (setas 1-6) utilizados para o seqüenciamento deste gene. 50
- Quadro 1** – Seqüências dos *primers* internos utilizados para o sequenciamento do gene *cqm1*. 50
- Figura 7** – Separação eletroforética dos fragmentos amplificados por PCR a partir do gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus*, em gel de agarose a 2,5%. 55
- Figura 8** – Detecção de α -glicosidases (EC 3.2.1.20) em homogenados individuais de larvas de *Culex quinquefasciatus*. 56
- Figura 9** – Seqüências de fragmentos amplificados por PCR específica a partir dos alelos *cqm1* e *cqm1-d19* de larvas de *Culex quinquefasciatus* da população de Água Fria. 62
- Figura 10** – Alinhamento da seqüência de aminoácidos do receptor Cqm1 da toxina binária do *Bacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus* com seqüências de maltases ortólogas. 64
- Quadro 2** – Análise dos resíduos polimórficos identificados ao longo da seqüência de 580 aminoácidos do receptor Cqm1 da toxina binária do *Bacillus sphaericus* a partir do estudo de 15 larvas de *Culex quinquefasciatus* da área de Água Fria. 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Colônias de <i>Culex</i> sp. selecionadas sob condições de laboratório (Lab) ou populações de campo expostas ao tratamento com o <i>Bacillus sphaericus</i> ...	31
Tabela 2 – Estimativas de frequências de alelos de resistência (<i>r</i>) às toxinas do biolarvicida <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) em diferentes espécies de insetos...	36
Tabela 3 – Atividade do <i>Bacillus sphaericus</i> 2362 (pó padrão SPH88) para larvas jovens de 4º estágio de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia de laboratório...	53
Tabela 4 – Detecção dos alelos <i>cqm1</i> e <i>cqm1-d19</i> , através de PCR específica, e avaliação da expressão do receptor Cqm1 em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> ...	59
Tabela 5 – Detecção dos alelos <i>cqm1</i> e <i>cqm1-d19</i> , através de PCR específica e avaliação da expressão do receptor Cqm1 em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> ...	59
Tabela 6 – Frequências genotípicas observadas (O) e esperadas (E) para os alelos <i>cqm1</i> e <i>cqm1-d19</i> em amostras de larvas de populações de <i>Culex</i> ...	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bin – Toxina binária do Bsp

Bsp – *Bacillus sphaericus*

Bt – *Bacillus thuringiensis*

Bti – *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis*

cDNA – DNA complementar ao mRNA

CL₅₀ e **CL₉₀** – Concentrações letais de inseticidas para 50 e 90% dos insetos expostos

CPqAM – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

CqRL1/2362 – Colônia de laboratório de *Culex quinquefasciatus* resistente ao Bsp 2362

CqSF – Colônia de laboratório de *Culex quinquefasciatus* susceptível ao Bsp 2362

CVA – Centro de Vigilância Ambiental

DDT – Dicloro Difenil Tricloroetano

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – desoxirribonucleotídeos trifosfato

EC – Código da enzima dado pela *Enzyme Commission*

FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

GPI – Glicosil-fosfatidilinositol

MIV – Manejo Integrado de Vetores

pb – pares de base

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PM – Peso molecular

RMR – Região Metropolitana do Recife

RNA – Ácido ribonucléico

RR – Razão de Resistência

SDS-PAGE – Dodecil sulfato de sódio-Eletroforese em gel de poliacrilamida

UV – Ultravioleta

VNO – Vírus do Oeste do Nilo

SUMÁRIO

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 <i>Culex quinquefasciatus</i>	16
2.1.1 Biologia e ecologia	16
2.1.2 Importância na saúde pública	18
2.2 Controle de insetos vetores	19
2.3 Manejo Integrado de Vetores	20
2.4 Bactérias entomopatógenas	21
2.5 <i>Bacillus sphaericus</i>	21
2.5.1 Toxinas inseticidas	23
2.5.2 Modo de ação da toxina Bin	25
2.5.3 Receptor da toxina Bin	26
2.6 Resistência à toxina Bin	27
2.6.1 Mecanismos e base molecular	28
2.6.2 Manejo da resistência	29
2.7 Frequência de alelos <i>r</i> que conferem resistência	32
2.7.1 Resistência a inseticidas químicos	32
2.7.2 Resistência às toxinas do <i>Bacillus thuringiensis</i>	33
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 Amostras de <i>Culex quinquefasciatus</i>	42
7.1.1 Colônias de laboratório	42
7.1.2 Populações naturais	43
7.2 Bioensaios	44
7.3 PCR específica para detecção dos alelos <i>cqm1</i> e <i>cqm1-d19</i>	44
7.3.1 Extração do DNA de larvas	45

7.3.2 Reação de PCR	46
7.3.3 Detecção do alelo <i>cqm1-d19</i> em populações naturais	47
7.4 Ensaio de α-glicosidase <i>in gel</i> para detecção do receptor Cqm1	48
7.5 Seqüenciamento do gene <i>cqm1</i>	49
7.5.1 Purificação dos produtos de PCR e clonagem do gene	49
7.5.2 Seqüenciamento e análise do gene	49
8 RESULTADOS	51
8.1 Avaliação da susceptibilidade <i>in vivo</i> das populações	51
8.2 Ferramentas moleculares para avaliação da susceptibilidade ao Bsp	54
8.2.1 Detecção dos alelos <i>cqm1</i> e <i>cqm1-d19</i>	54
8.2.2 Avaliação da expressão da α -glicosidase Cqm1	55
8.3 Freqüência do alelo <i>cqm1-d19</i> e da expressão do receptor Cqm1 em populações naturais	56
8.3.1 Populações de campo não tratadas	56
8.3.2 População tratada de Água Fria	57
8.3.3 Identidade dos fragmentos amplificados por PCR	61
8.4 Análise do polimorfismo do gene <i>cqm1</i>	63
9 DISCUSSÃO	67
10 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICES	87
Apêndice A – Artigo 1	87
Apêndice B – Artigo 2	100
Apêndice C – Participação em cursos, congressos e resumos publicados	108

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Algumas espécies dos gêneros *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* e *Mansonia* podem ser importantes vetores de patógenos humanos responsáveis por enfermidades como malária, febre amarela, encefalite, dengue e filariose. Estas doenças atingem um número significativo de pessoas em diversos países da Ásia, África e Américas. O *Culex quinquefasciatus* é responsável pela transmissão da *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose Bancroftiana no Brasil, além de ser um potencial vetor para o Vírus do Oeste do Nilo (VNO), que já causou várias epidemias nos Estados Unidos e, recentemente, foi encontrado na Colômbia e Argentina. É importante ressaltar que há uma grande dificuldade do controle populacional destes mosquitos devido a suas características biológicas como curto ciclo de vida, alta capacidade reprodutiva e de adaptação ao ambiente.

O controle de mosquitos através do uso de inseticidas químicos tem apresentado problemas devido ao seu modo de ação não específico, além da possibilidade de rápida seleção de resistência de insetos a estes compostos. Por estas razões, a procura por agentes mais seletivos aumentou e, com isso, a adoção de métodos de controle biológico cresceu. Dentre os organismos de controle biológico, as bactérias entomopatógenas do gênero *Bacillus* como o *Bacillus sphaericus* e o *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis* vêm sendo produzidas comercialmente e empregadas há mais de duas décadas. Estas bactérias são altamente seletivas para espécies de culicídeos e simulídeos. O *B. sphaericus* é particularmente eficiente para o controle de larvas de *Cx. quinquefasciatus* e produtos comerciais à base desta bactéria estão disponíveis no Brasil. O principal fator tóxico do *B. sphaericus* para larvas de *Cx. quinquefasciatus* é a toxina binária (Bin) contida em um cristal protéico produzido durante a fase de esporulação da bactéria. Após a ingestão deste cristal pelas larvas, ocorre a sua solubilização em pH intestinal alcalino e a protoxina liberada no lúmen é clivada por serina-proteases para atingir a forma de toxina ativa. A toxina Bin ativa interage com receptores específicos presentes na membrana apical das células do epitélio intestinal das larvas, principalmente nas regiões do ceco gástrico e intestino posterior. O receptor para a toxina Bin em *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*, denominado Cpm1 e Cqm1, respectivamente, é uma α -glicosidase de 60 kDa, ligada à membrana apical do epitélio intestinal através de uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI).

A seleção de resistência em populações de *Cx. quinquefasciatus* é uma desvantagem com relação ao uso do *B. sphaericus* e ocorre pois a ação deste biolarvicida depende da

interação de apenas uma toxina com um único sítio alvo que é o receptor Cqm1. Colônias mantidas em laboratório ou populações de campo, sob forte pressão de seleção, podem atingir altos níveis de resistência. A maior parte das populações estudadas quanto ao mecanismo de resistência, apresenta uma falha na etapa de ligação da toxina Bin ao receptor devido à ausência do Cqm1 no epitélio intestinal, ou à presença desta proteína sob uma forma alterada não funcional. Quatro alelos de resistência (*r*) do gene que codifica o receptor Cqm1 ou Cpm1 foram identificados em três colônias de *Culex*, uma de campo e duas de laboratório, que tiveram a base molecular da resistência estudada. Larvas da colônia CqRL1/2362, uma das colônias de referência analisadas neste trabalho, apresentam uma deleção de 19 nucleotídeos no gene *cqm1* (alelo *cqm1-d19*), que gera um códon de parada prematuro para a tradução e leva à síntese de uma proteína desprovida da âncora GPI, portanto, sem capacidade de interação com a toxina Bin.

Um dos fatores determinantes no processo da seleção de resistência é a frequência inicial dos alelos *r* e o seu modo de herança em populações naturais expostas ao tratamento com biolarvicidas. Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos em relação à frequência inicial destes alelos em populações de campo de espécies lepidópteros expostas a tratamentos com o biolarvicida *B. thuringiensis* (Bt) ou às plantas geneticamente modificadas que expressam toxinas do Bt. A maioria dos resultados de frequência alélica é estimada através de ensaios de susceptibilidade *in vivo* de progênies obtidas a partir de insetos coletados no campo. Visto que são escassos os estudos de caracterização de alelos *r* para agentes de controle biológico, é essencial um maior conhecimento da resistência e de suas bases moleculares para se obter resultados mais consistentes, a partir de métodos de detecção direta destes alelos.

A caracterização de um alelo de resistência ao *B. sphaericus* (*cqm1-d19*) em larvas de *Cx. quinquefasciatus* na colônia CqRL1/2362, mantida no insetário do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, abriu novas perspectivas para o desenvolvimento de uma ferramenta molecular para a avaliação da frequência deste alelo em populações naturais submetidas ou não ao tratamento com o biolarvicida.

A Região Metropolitana do Recife possui áreas endêmicas para a filariose e o controle do vetor *Cx. quinquefasciatus*, dentro do programa de erradicação da doença, vem sendo conduzido há alguns anos pela Secretaria de Saúde da cidade. Em virtude do risco de seleção de resistência que pode ocorrer em populações tratadas com o *B. sphaericus*, o desenvolvimento de ferramentas para detectar alelos *r* já caracterizados, como o *cqm1-d19*, é importante para determinar a sua frequência em populações de vetores sujeitas à exposição a este biolarvicida. A detecção desta frequência em populações naturais não tratadas é

necessária para avaliar comparativamente, com populações sob tratamento, o risco de seleção de resistência além de estabelecer, pela primeira vez, uma ferramenta molecular para a detecção de um alelo de resistência em larvas de culicídeos a biolarvicidas por PCR. A investigação de polimorfismos do gene *cqm1*, através da análise de seqüências, outro aspecto analisado neste trabalho, é fundamental para o conhecimento de bases moleculares que possam estar relacionadas ao mecanismo de resistência. O monitoramento da susceptibilidade para a avaliação do risco de seleção de resistência, através de métodos tradicionais e ferramentas moleculares, é importante para estabelecer estratégias para o controle de vetores e manejo da resistência.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Culex quinquefasciatus*

O *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 é um inseto da ordem Diptera, pertencente à família Culicidae, também conhecido como muriçoca ou pernilongo. Esta espécie apresenta distribuição cosmopolita, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É um mosquito amplamente encontrado no Brasil, devido às características climáticas, além de fatores como o crescimento populacional desordenado e a falta de saneamento básico que afetam a maioria das áreas urbanas do país (CONSOLI, 1994).

2.1.1 Biologia e ecologia

O *Cx. quinquefasciatus* tem um ciclo biológico curto, compreendendo as seguintes fases: ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (Figura 1). Os adultos têm hábito noturno e endofílico, as fêmeas são hematófagas e necessitam fazer o repasto sanguíneo para realizar a postura dos ovos. Estes mosquitos atacam uma grande variedade de animais, sobretudo o homem, pois são antropofílicos. Cerca de 48 h após o repasto sanguíneo, as fêmeas depositam seus ovos agrupados em forma de “jangadas” na lâmina d’água, que eclodirão dando origem às larvas do 1º estádio (L_1), entre 24 e 48 h após a oviposição. As larvas L_1 sofrem mudas sucessivas e passam por mais três estádios (L_2 , L_3 e L_4), cada um com duração média de 24 h, até atingir a fase de pupa. É importante ressaltar que as larvas são filtradoras e se alimentam ativamente de matéria orgânica disponível no ambiente aquático. As pupas têm forma de vírgula e ficam paradas junto à superfície da água, embora apresentem mobilidade nesta fase. Esta etapa do desenvolvimento tem duração entre 24 e 48 h e os indivíduos não se alimentam neste período. Após a fase de pupa, ocorre a emergência dos adultos dando início à fase alada. Os adultos passam por um período de repouso para a esclerotinização da cutícula e, em seguida, realizam a cópula e a busca por alimento. A longevidade dos adultos é de um a dois meses, período em que a fêmea pode realizar entre 4 e 5 oviposições.

Seus criadouros preferenciais são depósitos artificiais com águas estagnadas e ricas em matéria orgânica, sobretudo dejetos animais e humanos. As fêmeas põem seus ovos, preferencialmente, em fossas e valas. No entanto, outros criadouros podem ser colonizados, tais como bebedouros de animais, poços e caixas d'água (CONSOLI, 1994). É comum observar a abundância de larvas em um único criadouro, pois sabe-se que as fêmeas produzem um feromônio de oviposição, depositado no pólo apical dos ovos, que atrai outras fêmeas para fazerem a oviposição em criadouros já colonizados. Quando em alta concentração, este feromônio tem efeito repelente, que poderia ser percebido pela fêmea como um local não apropriado para oviposição com possível competição por recursos (BARBOSA et al., 2007).

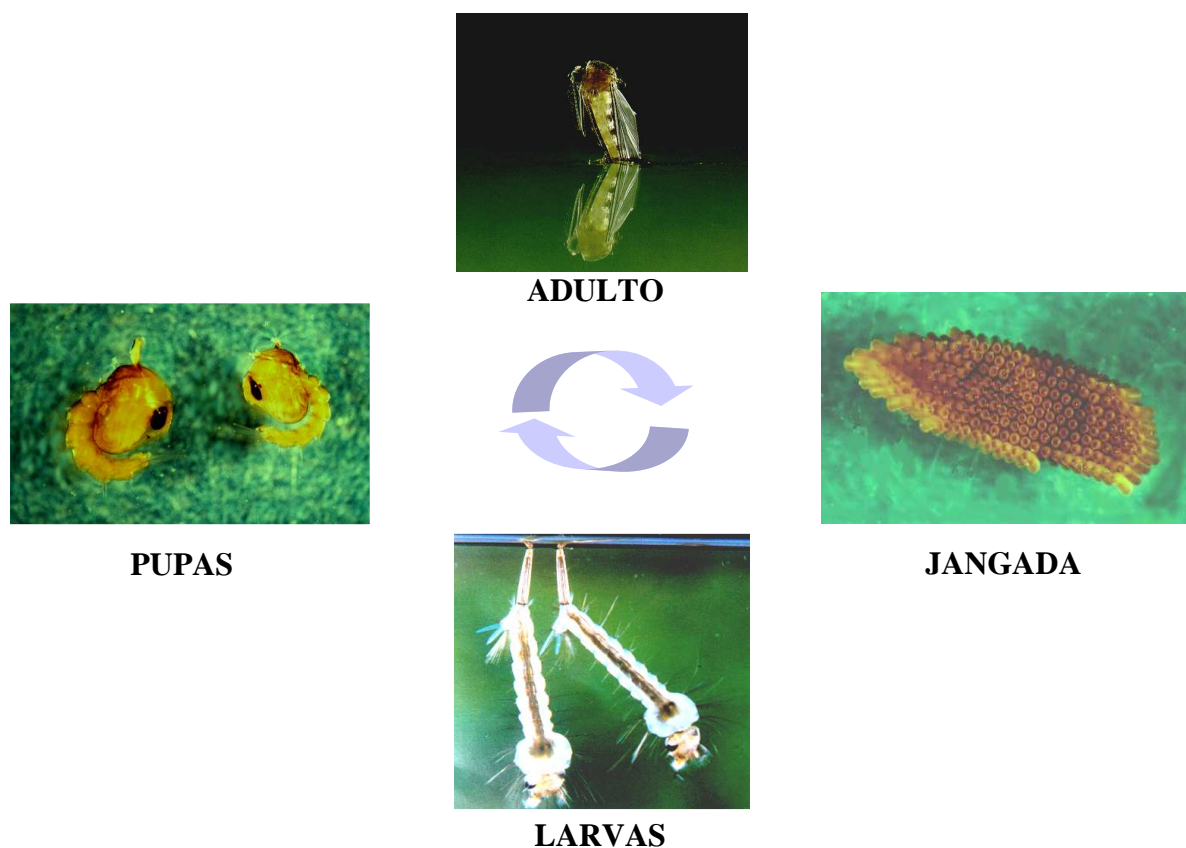


Figura 1 - Ciclo biológico do *Culex quinquefasciatus*. Após a postura dos ovos em forma de jangada, as larvas eclodem e passam por quatro estádios, com média de 24 h cada, transformam-se em pupas, formas que não se alimentam e, após 48 h, ocorre a emergência do adulto.

Fonte: Barbosa (2007).

2.1.2 Importância na saúde pública

Espécies dos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* e *Mansonia* podem ser importantes vetores de patógenos causadores de doenças como a filariose linfática, malária, dengue, febre amarela e outras arboviroses, que atingem um número significativo de pessoas em países da Ásia, África e Américas. O *Cx. quinquefasciatus* é o principal vetor do nemátodo *Wuchereria bancrofti*, causador da filariose linfática no Brasil. Esta parasitose tem grande importância na saúde pública, pois é endêmica em várias regiões tropicais e, estima-se que há mais de 1,3 bilhão de pessoas, aproximadamente 19% da população mundial, vivendo em áreas sob o risco de contrair a infecção em 83 países e territórios e, cerca de 120 milhões de indivíduos parasitados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). Destes, 90% são portadores da *W. bancrofti* e 10% de espécies de filárias de menor ocorrência.

Os vermes adultos de *W. bancrofti* alojam-se nos linfonodos e vasos linfáticos do indivíduo infectado, e as microfilárias (formas embrionárias) são encontradas no sangue periférico, possuindo uma periodicidade noturna com um pico entre 23:00 e 01:00 h. Este pico coincide com o horário preferencial de hematofagia do *Cx. quinquefasciatus*, na maioria das regiões endêmicas. As fêmeas ingerem as microfilárias no momento do repasto sanguíneo, e estas migram do tubo digestivo para as glândulas salivares, onde atingem o estágio larval infectante (larvas L₃). O quadro clínico da filariose pode ser assintomático, agudo ou crônico. As manifestações agudas podem ser linfangite, linfadenite, febre e mal-estar e as crônicas podem ser linfedema, hidrocele, quilúria e elefantíase, podendo esta última, ser agravada por infecções bacterianas ou fúngicas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006).

No Brasil, em um levantamento realizado na década de 50, foram encontrados casos autóctones da doença em 11 cidades brasileiras (ROCHA; FONTES, 1998). Hoje, após uma campanha de profilaxia com base no tratamento do doente e controle do vetor, a parasitose apresenta distribuição urbana e focal, sendo detectada no grande Recife (PE) e Maceió (AL). No Recife, os índices de prevalência variam entre as microregiões de 0,6% até 14,9%, sendo a média da cidade de 6,5% (MACIEL et al., 1996). Dados estimados em diferentes localidades de vários países, indicam que o número de picadas infectivas requerido para produzir um caso de microfilaremia é elevada e varia de 269 (em Machui, Tanzânia) a 67.568 (em Koro, Guji) (SOUTHGATE, 1992). A manutenção da transmissão em uma área é, conseqüentemente, um

indicador de péssima qualidade ambiental, devido à alta densidade populacional do vetor aliada à ausência de medidas de proteção individual (REGIS et al., 1996).

A transmissão de outros patógenos causadores de arboviroses também pode ser atribuída ao *Culex*, destacando-se o Vírus do Oeste do Nilo (VNO). A febre do Nilo foi originada na África, e as aves são os hospedeiros e reservatórios naturais. A doença pode acometer o homem, o cavalo e outras espécies. Pode causar desde febre, dor de cabeça e mialgias até encefalite severa e meningite. Desde 1999 ocorrem epidemias da doença nos EUA e, até o presente momento, já foram registrados mais de 19 mil casos de infectados com mais de 750 óbitos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006). Recentemente, o vírus passou a circular no Caribe e já foi isolado na Colômbia e em cavalos mortos na Argentina (BERROCAL et al., 2006; MORALES et al., 2006). O Brasil tem um plano de vigilância para detectar a introdução do VNO no país, visto que o *Cx. quinquefasciatus*, potencial vetor, é abundante, além de um contingente considerável de aves migratórias que ocorre no país ser originário de rotas das Américas e de países vizinhos, onde ocorre a circulação do vírus (LUNA et al., 2003).

Além de seu papel como vetor de agentes etiológicos causadores de doenças ao homem o *Cx. quinquefasciatus* causa problemas secundários de saúde em inúmeras áreas urbanizadas do Brasil, pois gera um forte incômodo, causado pelas picadas, sons emitidos e alergias contribuindo para a diminuição da qualidade de vida da população.

2.2 Controle de insetos vetores

A descoberta de substâncias de síntese química com poder inseticida possibilitou grandes avanços no controle destes insetos, a partir do início da década de 40, quando o composto Dicloro Difênil Tricloroetano (DDT) foi descoberto. Os métodos de controle até então empregados, como o uso de componentes inorgânicos e extratos vegetais, foram rapidamente substituídos devido à rápida ação e eficiência do DDT. Atualmente, inseticidas químicos, das classes dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides têm sido utilizados em várias regiões do mundo para o controle de mosquitos.

Os principais problemas relacionados ao uso dos inseticidas químicos são a seleção de insetos resistentes e o seu modo de ação não específico que afeta os organismos não alvo. A não seletividade destes inseticidas, visto que eles eliminam tanto os insetos nocivos como

seus predadores naturais, provoca efeitos diretos no equilíbrio destas populações. Além disso, a presença de resíduos de inseticidas nos alimentos e problemas ambientais decorridos da persistência dos produtos no solo e na água, bem como sua acumulação na cadeia alimentar foram identificados. O DDT, da classe dos organoclorados que apresenta alta toxicidade e persiste na cadeia alimentar, foi amplamente utilizado no Brasil, mas devido a todos os fatores adversos decorrentes do seu uso, teve sua aplicação proibida em vários países. Outro aspecto que tem provocado sérias limitações ao uso dos inseticidas químicos é a seleção de resistência observada entre populações de insetos. No início da década de 80, já havia o registro de 84 espécies de culicídeos resistentes, e o fator agravante é que muitas espécies apresentavam resistência simultânea ou cruzada a vários inseticidas químicos de diferentes categorias (GEORGHIU; LAGUNES-TEJEDA, 1991). A resistência ocorre devido ao uso indiscriminado dos inseticidas, sendo recomendado a racionalização do seu emprego, sobretudo devido ao fato que a maioria dos compostos disponíveis possui um modo de ação não seletivo, facilitando assim, a seleção de indivíduos resistentes nas populações tratadas. Devido ao impacto negativo do uso dos inseticidas químicos ao meio ambiente e à saúde humana, cresceu a busca por novas estratégias ambientalmente seguras para o controle de insetos.

2.3 Manejo Integrado de Vetores

O conceito do Manejo Integrado de Vetores (MIV) surgiu como resultado de uma mudança de paradigma após o uso intensivo de inseticidas químicos nas décadas de 1940-60. Em outras palavras, o MIV é definido como uma combinação racional de diversos métodos de controle disponíveis objetivando manter a população de vetores em níveis aceitáveis e da maneira mais efetiva, econômica e segura, incluindo componentes biológicos, químicos, físicos e ambientais, visando interferir o mínimo possível no ecossistema. No MIV, várias ações são empregadas na tentativa de englobar todas as causas do problema. No âmbito do controle de mosquitos, estas ações podem incluir a melhoria da rede de esgoto e distribuição de água, eliminação física de criadouros, uso de barreiras físicas nas habitações, medidas de proteção individual, uso de larvicidas específicos em criadouros que não podem ser eliminados, além da conscientização e participação da comunidade. Dentre estas ações, o uso

de biolarvicidas apresenta vantagens, como a especificidade para o inseto alvo e segurança para o meio ambiente.

2.4 Bactérias entomopatógenas

Os agentes de controle biológico podem ser predadores, patógenos, parasitas, competidores ou toxinas produzidas por microrganismos. Diversos organismos têm sido investigados como agentes potenciais para o controle de dípteros, tais como fungos, bactérias, protozoários e nematóides. Do ponto de vista aplicado, as bactérias do gênero *Bacillus* são consideradas os agentes mais promissores devido à eficácia de suas toxinas, facilidade de produção em larga escala, de armazenamento, transporte e aplicação.

Duas espécies de bactérias entomopatógenas se destacam no controle biológico dos insetos vetores, o *Bacillus sphaericus* (Bsp) e o *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti). Estes microrganismos estão sendo comercializados há mais de uma década pois produzem proteínas inseticidas que, ao serem ingeridas, são letais para as larvas dos mosquitos devido a sua ação no trato digestivo. O Bti tem atividade decrescente para os gêneros *Aedes*, *Simulium*, *Culex* e *Mansonia*. Já o Bsp, tem uma especificidade maior para espécies dos gêneros *Culex* e *Anopheles* e menor para os gêneros *Aedes* e *Mansonia*. *Ae. aegypti*, espécie de grande importância na transmissão do vírus da dengue, é altamente susceptível ao Bti, porém é refratária ao Bsp. Por outro lado, o Bsp apresenta uma grande vantagem em relação ao Bti, que é a ótima persistência em criadouros ricos em matéria orgânica, típicos de larvas de *Culex*, além de seus esporos sofrerem reciclagem nos cadáveres das larvas, o que pode ampliar seu período de persistência nos criadouros (NICOLAS; DARRIET; HOUGARD, 1987; SKOVMAND; BAUDUIN, 1997).

2.5 *Bacillus sphaericus*

O Bsp merece destaque como agente de controle de larvas de *Cx. quinquefasciatus*. Descoberto por Neide (1904), é uma bactéria Gram-positiva, saprófita e esporulante, geralmente encontrado em solos e ambientes aquáticos. Durante a fase de esporulação são

produzidos esporos arredondados, localizados na região terminal em um esporângio em forma de raquete, além de inclusões ou cristais protéicos (Figura 2).

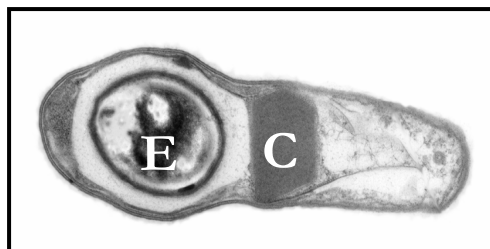


Figura 2 - Visão longitudinal em micrografia eletrônica do *Bacillus sphaericus*, em fase de esporulação.

Nota: E, esporo; C, cristal protéico.

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

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

O Bsp é particularmente tóxico para larvas de *Cx. quinquefasciatus* e produtos comerciais à base desta bactéria estão disponíveis, inclusive no Brasil. A eficácia do uso do Bsp para o controle de vetores já foi comprovada em vários países (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1993; THIÉRY et al., 1996). Uma das experiências mais representativas da viabilidade operacional do Bsp foi realizada no Brasil, onde este agente foi empregado para o controle de *Cx. quinquefasciatus* em bairros do Recife, endêmicos para a filariose e que apresentavam uma alta densidade populacional do vetor (REGIS et al., 1995; SILVA-FILHA et al., 2001). Atualmente, o Programa de Controle da Filariose vem sendo

conduzido pela Prefeitura da Cidade do Recife, devido à existência de áreas endêmicas na cidade. Neste programa, foi estabelecido um subprograma para o controle do vetor, através de medidas integradas, e uma delas é o tratamento de criadouros de *Culex* com larvicidas à base do Bsp. O programa teve início em duas áreas endêmicas, Água Fria e Alto Santa Terezinha, com cerca de 15.000 habitantes cada, em março de 2003. No momento, as ações estão sendo ampliadas para outros bairros da cidade (SILVA-FILHA et al., 2008).

2.5.1 Toxinas inseticidas

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

Vários estudos mostraram que a alta atividade inseticida é observada, exclusivamente, naquelas cepas do Bsp produtoras de cristal durante a fase de esporulação. Por esta razão, apesar das toxinas Mtx terem um importante potencial larvicida, observa-se que a atividade inseticida de culturas esporuladas do Bsp é devida ao cristal que contém a toxina Bin, visto que as toxinas Mtx sofrem intensa degradação durante o crescimento bacteriano. Quando ingerido pelas larvas, o cristal é solubilizado em pH intestinal alcalino liberando a protoxina Bin que é clivada por serina-proteases, para atingir a forma de toxina ativa (BAUMANN et al., 1985; DAVIDSON et al., 1987; BROADWELL; BAUMANN, 1987). A protoxina é formada por dois polipeptídeos de 42 e 51 kDa (BAUMANN; BROADWELL; BAUMANN,

1988), denominados BinA e BinB, respectivamente. Estes polipeptídeos são produzidos de forma equimolar e, após a ativação proteolítica, são clivados em fragmentos de 39 e 43 kDa, respectivamente.

Os componentes BinA e BinB agem em sinergia e, por esta razão, ela é considerada uma toxina binária (Bin) (NICOLAS et al., 1993). Experimentos para determinar a atividade *in vivo* dos dois componentes obtidos isoladamente através de cepas recombinantes, mostraram que BinA individualmente é tóxico para larvas de *Cx. pipiens*, embora seja requerido em altas concentrações, enquanto BinB isolado não é tóxico (NICOLAS et al., 1993). Posteriormente, estudos *in vitro* mostraram que o componente BinB é responsável por reconhecer e se ligar a receptores específicos presentes na membrana apical do epitélio intestinal das larvas, enquanto BinA não tem capacidade de ligação e sua função está relacionada à toxicidade (CHARLES et al., 1997). Com base na avaliação das seqüências do gene da toxina Bin (*btx*) em diversas cepas do Bsp, quatro tipos de toxina foram classificados e divididos em duas linhagens, segundo algumas diferenças observadas entre as seqüências de aminoácidos (PRIEST et al., 1997). Uma linhagem que contém os tipos Bin1 e Bin2, mais tóxicos para larvas de *Anopheles* e *Culex*, inclui cepas como a IAB59, 2362 e 1593. A segunda linhagem inclui os tipos Bin3 e Bin4, das cepas 2297 e LP1-G, respectivamente. A cepa LP1-G que contém o tipo Bin4 é a única que apresenta baixa toxicidade dentre as cepas produtoras de toxina Bin. Quando comparadas as seqüências de aminoácidos dos quatro tipos de toxina Bin, a Bin4 possui seis diferenças e uma delas ocorre no resíduo 93 que é uma serina, enquanto uma leucina está presente nos outros três tipos (PRIEST et al., 1997). Yuan et al. (2001) mostraram que esta alteração da Bin4 é responsável pela diminuição da toxicidade da cepa LP1-G e sugerem que essa posição deve ser um elemento chave na formação do complexo BinA-BinB responsável pela toxicidade do Bsp.

Recentemente, foi descoberto que o Bsp cepa IAB59 produz duas outras toxinas até então desconhecidas. Os estudos desta cepa foram motivados pelo fato de larvas de *Cx. quinquefasciatus* resistentes às cepas do Bsp 2362 e C3-41, que produzem apenas a toxina Bin, são susceptíveis à cepa IAB59, indicando que esta cepa deveria produzir outro fator tóxico além da toxina Bin (PEI et al., 2002). Foram identificadas duas toxinas da família Cry na cepa IAB59, a Cry48Aa e Cry49Aa de 135 e 53 kDa, respectivamente, que agem em sinergia (JONES et al., 2007). A presença destas duas toxinas pode explicar porque esta cepa supera a resistência voltada para esta toxina. As toxinas Cry48Aa e Cry49Aa apresentam alta toxicidade para *Cx. quinquefasciatus* quando administradas de forma purificada e em concentração equimolar. Porém, a contribuição destes fatores para a toxicidade da cepa

IAB59 nativa não é evidente devido ao baixo nível de acumulação da Cry48Aa no Bsp, que impede a proporção de 1:1 requerida para a ação destas toxinas (JONES et al., 2007). O modo de ação destas duas toxinas é único, pois uma nova interação parece ser requerida entre a subunidade Cry48Aa, que é uma toxina Cry de três domínios, que diferentemente das outras toxinas Cry desta família necessita de uma proteína acessória que é a Cry49Aa, que possui homologia com a toxina Bin do Bsp (JONES et al., 2007).

2.5.2 Modo de ação da toxina Bin

O Bsp apresenta um espectro de ação restrito para larvas de mosquitos (LACEY et al., 1988, DAVIDSON; YOSTEN, 1990; GROVES; MEISCH, 1996). Espécies do complexo *Culex*, como *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. pipiens*, são as mais sensíveis. As etapas iniciais do modo de ação, tais como a necessidade de ingestão do cristal, aliado a um pH intestinal alcalino (≈ 10) e à proteólise enzimática são, sem dúvida, aspectos seletivos da toxicidade do Bsp. Porém, a etapa determinante do modo de ação da toxina Bin é o reconhecimento e ligação a receptores específicos presentes na superfície das microvilosidades intestinais. A presença dos receptores já foi demonstrada em larvas de *Cx pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Anopheles gambiae* e *An. stephensi*, através de ensaios de ligação *in vitro* entre a toxina radiomarcada e microvilosidades intestinais (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA et al., 1995, 1997). Larvas de *Ae. aegypti* são capazes de processar o cristal, no entanto são refratárias ao Bsp, pois não possuem receptores específicos para a toxina Bin no epitélio intestinal (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). É importante ressaltar que a atividade *in vivo* do Bsp é diretamente correlacionada com a afinidade de ligação observada entre a toxina Bin e o receptor (SILVA-FILHA et al., 1997). Ainda não foram elucidadas as etapas que sucedem a ligação da toxina ao receptor, porém a partir de 15 minutos após a ingestão do cristal protéico, podem ser observadas alterações nas células epiteliais do intestino das larvas, como destruição das microvilosidades, vacuolização citoplasmática, intumescimento das mitocôndrias e alterações do retículo endoplasmático rugoso, com subsequente morte das mesmas (CHARLES, 1987; DE MELO et al., 2008; SINGH; GILL, 1988). Estudos recentes mostraram que a toxina Bin, especificamente o componente BinA teria capacidade de formar poros em sistema de membrana artificial como lipossomas (SCHWARTZ et al., 2001). Também foi possível registrar a imunolocalização da toxina Bin

no interior das células epiteliais de larvas de *Culex* tratadas com uma dose letal, sugerindo uma possível internalização da toxina (SILVA-FILHA; PEIXOTO, 2003).

2.5.3 Receptor da toxina Bin

O receptor da toxina Bin presente no mesêntero de *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*, principais espécies-alvo do Bsp, foi caracterizado e é uma α -glicosidase (EC 3.2.1.20) de 60 kDa, com 580 aminoácidos, ligada à membrana apical do epitélio intestinal, através de uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (DARBOUX et al., 2001; PAUCHET et al., 2005; ROMÃO et al., 2006; SILVA-FILHA et al., 1999). O receptor nestas espécies citadas acima foram denominados Cpm1 e Cqm1, em referência à “*Cx. pipiens* ou *Cx. quinquefasciatus*, maltase 1”, respectivamente. O gene que codifica o receptor nestas espécies possui aproximadamente 1870 nucleotídeos. A seqüência completa do gene *cqm1*, obtida de uma colônia de *C. quinquefasciatus* sensível ao Bsp, inclui uma região 5’ não traduzida de 32 pares de bases (pb), uma região codificante de 1743 pb, um primeiro íntron de 50 pb e outro que foi previsto mas não identificado. Além disso, o gene apresenta uma região 3’ não traduzida com tamanho variando entre 54 e 76 pb, o que pode estar associado à presença de dois sítios de poliadenilação. A seqüência completa do gene *cqm1* está disponível no GenBank sob o número de acesso DQ333335 (ROMÃO et al., 2006). A distribuição dos receptores no mesêntero é regional e ocorre principalmente no ceco gástrico e o intestino posterior na maioria das espécies de *Culex* susceptíveis (CHARLES et al., 1996). As seqüências do cDNA de *cpm1* e *cqm1* possuem 1871 e 1851 pares de base, respectivamente, com uma região codificante de 1743 pb, e estão depositadas no GeneBank sob os números de acesso AF222024 e DQ333335 (DARBOUX et al., 2001; ROMÃO et al., 2006). A seqüência de aminoácidos do receptor Cqm1 compartilha uma identidade de 97% em relação ao Cpm1 e de 78%, 70% e 65% com maltases ortólogas de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *Drosophila melanogaster*, respectivamente (ROMÃO et al., 2006). Recentemente, uma proteína ortóloga aos receptores Cpm1 e Cqm1 foi encontrada em *An. gambiae* e denominada Agm3. A seqüência de aminoácidos do Agm3 apresenta alta homologia com as seqüências do Cqm1 e Cpm1, principalmente na região N-terminal, onde possivelmente está localizado o sítio de ligação à toxina Bin (OPOTA et al., 2008; ROMÃO et al., 2006). O reconhecimento e a ligação da toxina Bin ao receptor são considerados etapas chave na ação do Bsp em larvas de mosquitos (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; NIELSEN-LEROUX et al., 1995).

O perfil de α -glicosidases um extrato total de larvas de *Cx. quinquefasciatus* susceptíveis, detectado através de um ensaio enzimático *in gel*, é composto por cinco bandas de clivagem correspondentes às proteínas com atividade α -glicosidase (Figura 3, S). Larvas da colônia CqRL1/2362, cuja resistência consiste na ausência da α -glicosidase Cqm1 no *microvilli* intestinal, diferem em apenas uma banda, correspondente ao receptor Cqm1 (Figura 3, R) (ROMÃO et al., 2006). Outros dados relativos à resistência, devido à ausência do receptor Cqm1 no epitélio intestinal de larvas, são descritos no item 2.6.

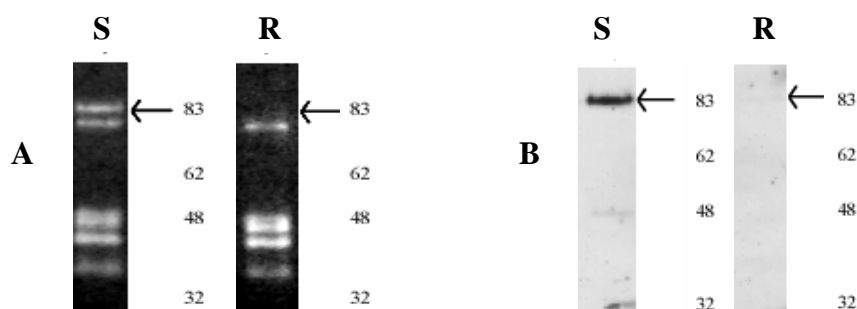


Figura 3 - Perfil das α -glicosidases presentes em larvas de *Culex quinquefasciatus* sensíveis (S) e resistentes (R) ao *Bacillus sphaericus*.

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

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

2.6 Resistência à toxina Bin

Populações de larvas de *Culex* podem apresentar resistência ao Bsp após serem submetidas à forte pressão de seleção, sob condições de laboratório (AMORIM et al., 2007; GEORGHIU et al., 1992; PEI et al., 2002; RODCHAROEN; MULLA, 1994; WIRTH et al., 2000) ou de campo (MULLA et al., 2003; RAO et al., 1995; SILVA-FILHA et al., 1995; SINÈGRE et al., 1994; YUAN; ZHANG; LIU, 2000) (Tabela 1). Estes resultados apontam para a necessidade de racionalizar o uso do Bsp, a fim de evitar a seleção de populações resistentes.

A primeira população resistente obtida sob condições de laboratório, GEO, foi submetida à forte pressão de seleção e atingiu um nível de resistência da ordem de 100.000 vezes, em relação à colônia susceptível (GEORGHIU et al., 1992; WIRTH et al., 2000). Em

outro estudo realizado em laboratório, foram selecionadas duas colônias de *Cx. quinquefasciatus*, no Brasil e na China, que atingiram um alto nível de resistência (>100.000) (PEI et al., 2002). Também foi demonstrado que é possível selecionar a resistência ao Bsp cepa IAB59, sob condições de laboratório, embora esta seleção tenha ocorrido de forma mais lenta em relação ao Bsp 2362, o nível de resistência chegou a mais de 40.000 vezes (AMORIM et al., 2007). Em campo, já foram detectadas populações com níveis de resistência variáveis na França (CHEVILLON et al., 2001; SINÈGRE et al., 1994), Índia (RAO et al., 1995), China (YUAN et al., 2000), Tunísia (NIELSEN-LEROUX et al., 2002) e na Tailândia (MULLA et al., 2003). O processo de seleção da resistência em populações de campo é modulado por diversos fatores que incluem o *background* genético da população, tal como a frequência inicial de alelos *r*, bem como fatores ecológicos e ambientais.

2.6.1 Mecanismos e base molecular da resistência

A investigação de algumas populações mostrou que o mecanismo de resistência detectado com maior frequência está relacionado a uma falha na etapa de ligação da toxina Bin aos receptores (Tabela 1), destacando o papel desta molécula no modo de ação do Bsp (NIELSEN-LEROUX et al., 1995, 1997; OLIVEIRA et al., 2004). Possivelmente existem outros fatores envolvidos, pois já foram detectadas populações altamente resistentes ao Bsp, tais como a SPHAE e a TUNIS (Tabela 1), que possuem receptores funcionais no epitélio, porém estes mecanismos ainda não foram elucidados (NIELSEN-LEROUX et al., 1995, 1997, 2002).

A base molecular da resistência foi estudada em duas colônias selecionadas sob condições de laboratório, GEO (EUA) e CqRL1/2362 (Brasil), e em uma população natural denominada BP (França). As três colônias são altamente resistentes ao Bsp e exibem um mecanismo de falha de ligação da toxina ao receptor (DARBOUX et al., 2007; NIELSEN-LEROUX et al., 1995, 2002; OLIVEIRA et al., 2004; PEI et al., 2002; WIRTH et al., 2000). No caso da colônia GEO de *Cx. pipiens*, uma transição, adenina/timina, na posição 1706 do gene *cpm1* (alelo *cpm1_{GEO}*) gera um códon de terminação de tradução prematuro levando à produção de uma proteína de 568 aminoácidos secretada no lúmen intestinal e desprovida de âncora GPI (DARBOUX et al., 2002). Por esta razão, não há receptores ligados ao epitélio intestinal e, conseqüentemente, a toxina Bin não apresenta ação inseticida.

Na colônia CqRL1/2362 de *Cx. quinquefasciatus*, o gene *cqml* apresentou uma deleção de 19 nucleotídeos (d19) na posição 1257-1275 (alelo *cqml-d19*), que causa uma mudança na fase de leitura, gerando um códon de terminação de tradução prematuro (ROMÃO et al., 2006). Neste caso, a exemplo da colônia GEO, a proteína produzida seria solúvel, impedindo a ação da toxina Bin pois não há receptores disponíveis no epitélio. Não foi possível detectar a proteína truncada de 452 aminoácidos que seria codificada pelo alelo *cqml-d19* a partir de ensaios de imunodeteção, indicando que esta proteína possivelmente não é expressa nas larvas da colônia CqRL1/2362.

No caso da colônia BP da França, ocorrem dois eventos no gene *cpml* que levam à resistência ao Bsp em larvas de *Cx. pipiens*. Os dois alelos foram denominados *cpml_{BP}* e *cpml_{BP-del}*. O alelo *cpml_{BP}* possui uma mutação sem sentido (Gln396Stop) que leva à formação de um códon de terminação prematuro, tal como ocorre nas colônias GEO e CqRL1/2362, ocasionando a síntese de uma proteína truncada com 395 aminoácidos, sem a âncora GPI. O outro alelo *r* identificado foi o *cpml_{BP-del}*, originado por uma inserção de um elemento transponível ou transposon no éxon 2. Esta inserção leva a um novo evento no processamento do RNA mensageiro, e uma deleção de 198 pb ocorre no éxon 2. Esta deleção não muda a fase de leitura e, se o RNAm fosse traduzido, seria produzida uma proteína de 514 aminoácidos e ligada ao epitélio intestinal, pois reteria a seqüência da âncora GPI na porção C-terminal. Entretanto, por razões desconhecidas, a proteína codificada por este alelo é incapaz de se ligar à toxina Bin, e uma das possibilidades é que a deleção de 198 pb afete o sítio de ligação do receptor ou cause mudanças na conformação da molécula (DARBOUX et al., 2007).

2.6.2 Manejo da resistência

A maioria das estratégias de manejo tem sido desenvolvida a partir de modelos que assumem que a frequência inicial de alelos *r* em uma dada população é baixa e a herança desta característica é recessiva, como ocorre em larvas de *Culex* resistentes ao Bsp (AMORIM et al., 2007; NIELSEN-LEROUX et al., 1997, 2002; OLIVEIRA et al., 2004; WIRTH et al., 2000). Nielsen-LeRoux et al. (2001) demonstraram que ocorre resistência cruzada entre várias cepas do Bsp de alta toxicidade (2362, 1593 e C3-41), pois estas cepas produzem unicamente a toxina Bin como fator tóxico (AQUINO-DE-MURO; PRIEST, 1994;

PRIEST et al., 1997). As pequenas diferenças na seqüência de aminoácidos das toxinas Bin do Bsp das cepas acima não são importantes na estrutura e função do complexo toxina-receptor e, conseqüentemente, da atividade larvicida. No entanto, larvas altamente resistentes às cepas 2362, 1593 e C3-41 do Bsp apresentaram susceptibilidade à cepa IAB59, pois esta cepa possui um outro fator tóxico, além da toxina Bin, as toxinas Cry48Aa e Cry49Aa que são capazes de eliminar os indivíduos resistentes (JONES et al., 2007; NIELSEN-LEROUX et al., 2001; PEI et al., 2002).

No caso de ocorrer a seleção de resistência em uma população exposta ao biolarvicida, é possível interromper e reverter este processo através da introdução de um novo agente de controle em sistema de rotação, com modo de ação distinto do Bsp, como o Bti com a capacidade de eliminar os indivíduos resistentes (MULLA et al., 2003; SILVA-FILHA; REGIS, 1997). Também se admite, devido à herança recessiva do alelo *r*, que indivíduos resistentes homozigotos podem acasalar com susceptíveis homozigotos, presentes na população, devido a refúgios não tratados ou provenientes de migração, dando origem a heterozigotos que podem ser eliminados pela ação do Bsp ou outro agente de controle. Além da rotação de agentes com princípios inseticidas diferentes, outra estratégia utilizada para evitar a seleção da resistência ao Bsp é o uso de misturas do Bsp e Bti, que reduziria o risco de seleção por ser um conjunto mais complexo de toxinas inseticidas (MULLA et al., 2003). A avaliação do sucesso dessas estratégias dependerá do monitoramento da resistência ao longo dos programas de controle de vetores. Este monitoramento pode ser realizado a partir de ensaios de susceptibilidade *in vivo*, ensaios bioquímicos para avaliar a expressão de moléculas alvo de inseticidas e análise da freqüência de alelos de resistência antes e durante o tratamento. É importante ressaltar que o ensaio de susceptibilidade *in vivo* de larvas, método mais utilizado, não fornece informações seguras quanto à seleção de resistência em estágios iniciais, pois falham em detectar indivíduos heterozigotos para os alelos *r*. Por estas razões, medidas de monitoramento baseadas no estudo da freqüência de alelos *r*, a partir de ferramentas moleculares, são mais informativas quanto ao estado real de susceptibilidade de uma população.

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

Colônia ou população	País	Origem	Razão de resistência ³	Ligação toxina-receptor	Alelo <i>r</i>	Forma de herança ⁴	Referência
GEO ¹	EUA	Lab	>100.000	Não	<i>cpm1_{GEO}</i>	R/A	Nielsen-LeRoux et al. (1995)
CqRL1/2362 ²	Brasil	Lab	>100.000	Não	<i>cqm1-d19</i>	R/A	Oliveira et al. (2004)
CqRL2/IAB59 ²	Brasil	Lab	≈40.000	Não	<i>cqm1-d19</i>	R/A	Amorim et al. (2007)
RLCq1/C3-41 ¹	China	Lab	>100.000	Não	ND	R/A	Oliveira et al. (2004)
Kochi ¹	Índia	Campo	≈150	ND	ND	ND	Rao et al. (1995)
Coque ¹	Brasil	Campo	≈10	Sim	ND	ND	Silva-Filha et al. (1995)
SPHAE ²	França	Campo	>20.000	Sim	ND	R/S	Nielsen-LeRoux et al. (1997)
RFCq1 ¹	China	Campo	>20.000	ND	ND	ND	Yuan et al. (2000)
TUNIS ²	Tunísia	Campo	≈750	Sim	ND	R/S	Nielsen-LeRoux et al. (2002)
BP ²	França	Campo	>5.000	Não	<i>cpm1_{BP}</i> <i>cpm1_{BP}-del</i>	R/S	Nielsen-LeRoux et al. (2002)
Wat Pikul ¹	Tailândia	Campo	>125.000	ND	ND	ND	Mulla et al. (2003)

¹*Cx. quinquefasciatus*.²*Cx. pipiens*.³Razão entre a concentração letal do *B. sphaericus* para 50% (LC₅₀) das larvas em 48h da colônia avaliada e a LC₅₀ observada para uma colônia susceptível usada como referência no estudo.⁴R/A: Recessiva autossômica; R/S: Recessiva ligada ao sexo.

ND: não determinado.

2.7 Freqüência de alelos *r* que conferem resistência

A caracterização do mecanismo de resistência e de suas bases genéticas é fundamental para o desenvolvimento de ferramentas moleculares para detectar e monitorar genes associados à resistência. Sabe-se que um dos fatores determinantes para a evolução do processo de seleção é a freqüência inicial dos alelos que conferem a resistência em populações naturais, bem como seu modo de herança.

2.7.1 Resistência a inseticidas químicos

Ferramentas moleculares têm sido desenvolvidas e aplicadas para o monitoramento da resistência de espécies de insetos como o hemíptero *Myzus persicae*, *Cx. quinquefasciatus* e *An. gambiae* aos piretróides e ao DDT (ANSTEAD et al., 2004; STUMP et al., 2004; XU et al., 2006). A resistência nestes insetos pode ser ocasionada por uma redução na sensibilidade do sítio alvo destas moléculas, a proteína do canal de sódio no sistema nervoso. Este mecanismo, denominado “knockdown resistance” (*kdr*), foi identificado primeiramente no díptero *Musca domestica* e ocorre por uma substituição de uma leucina por uma fenilalanina Leu1014Fen (*kdr*), ou de uma metionina para uma treonina Met918Thr (*super-kdr*), devido às mutações no gene do canal de sódio (WILLIAMSON et al., 1996). A Met918Thr ocorre unicamente em insetos que já possuem a Leu1014Fen, e aumenta consideravelmente seu nível de resistência e, por este motivo, o fenótipo é denominado *super-kdr* (JAMROZ et al., 1998; WILLIAMSON et al., 1996). A partir da caracterização destas e de outras mutações em moléculas alvo de inseticidas químicos em várias espécies, é possível desenvolver testes diagnósticos através de PCR alelo-específica para avaliar o *status* de resistência e freqüência alélica em populações destes insetos.

2.7.2 Resistência às toxinas do *Bacillus thuringiensis*

Partindo para o campo dos biolarvicidas microbianos, estimar a frequência inicial dos genes de resistência a proteínas inseticidas tem sido uma tarefa mais complicada. Alguns aspectos como o uso de bioensaios de susceptibilidade, que são falhos em determinar alelos *r* em uma frequência muito baixa, bem como o escasso conhecimento na caracterização destes alelos, impedem uma avaliação mais acurada da resistência. No entanto, alguns métodos foram aplicados na determinação da frequência do alelo *r* em espécies de insetos-praga coletadas antes ou após o plantio de cultivares transgênicas que expressam toxinas Cry do entomopatógeno *B. thuringiensis* (Bt) (GÉNISSEL et al., 2003; GOULD et al., 1997; TABASHNIK et al., 2000; WENES et al., 2006). O método mais utilizado para avaliar esta frequência, denominado “F₂ screen”, foi proposto por Andow e Alstad (1998). O estudo da frequência do alelo *r* é feito a partir de uma estimativa e, se for considerado por exemplo que a frequência inicial de um indivíduo resistente é de 10⁻⁴, a avaliação de 10³ a 10⁴ indivíduos teria uma probabilidade de 95% de detectar um ou mais indivíduos resistentes. O método “F₂ screen” consiste em (1) coletar fêmeas de campo acasaladas; (2) manter a progênie F₁ de cada fêmea separada e acasalar os adultos desta progênie entre si; (3) coletar os ovos obtidos dos acasalamentos da F₁ de cada linhagem e submeter os neonatos da geração F₂ à avaliação da susceptibilidade; (4) fazer inferências quanto à frequência do alelo *r* a partir da análise estatística dos dados obtidos. Entretanto, é difícil estimar a frequência de alelos de resistência recessivos a partir de bioensaios que só detectam homozigotos resistentes, pois sua frequência é proporcional ao quadrado da frequência do alelo *r*, ou seja, se esta frequência for muito baixa, a amostra de indivíduos a ser analisada será muito grande.

Gould et al. (1997) realizaram uma avaliação para estimar a frequência do alelo *r* em populações de campo do lepidóptero praga do algodão *Heliothis virescens*, conhecido como lagarta-das-maçãs, em áreas onde o algodão Bt não havia sido comercializado. Após os bioensaios de 1.025 larvas da geração F₂, concluíram que 3 foram heterozigotos para o principal alelo de resistência e a frequência na população foi de 1,5 x 10⁻³. Em populações de campo de *Pectinophora gossypiella*, outro lepidóptero praga do algodão, coletadas no estado americano do Arizona, foi estimada uma frequência bastante elevada de 0,16 para o alelo *r* no ano de 1997 e, nos anos de 1998 e 1999, essa frequência caiu para 7 x 10⁻³ e 0, respectivamente. Devido à plantação do algodão Bt ocorrer em grande escala no Arizona

desde 1995, esperava-se um aumento desta frequência ocasionado por uma possível pressão de seleção, porém isto não foi detectado (TABASHNIK et al., 2000).

Um estudo realizado em populações de outro lepidóptero praga, a broca do colmo de milho, *Ostrinia nubilalis*, coletadas na França e nos Estados Unidos demonstrou que a frequência do alelo *r* foi inferior a 9,2 e $4,23 \times 10^{-4}$, respectivamente (BOURGUET et al., 2003). Estes dados diferem das altas frequências iniciais encontradas para *H. virescens* (GOULD et al., 1997) e *P. gossypiella* (TABASHNIK et al., 2000), levando à conclusão que estes alelos são raros naquelas áreas onde *O. nubilalis* é a principal praga do milho (BOURGUET et al., 2003).

Génissel et al. (2003) estimaram a frequência do alelo *r* em *Chrysomela tremulae*, um coleóptero praga do álamo (*Populus deltoides*, *P. trichocarpa* e *P. nigra*) árvore das florestas boreais, em áreas da França. Transgênicos Bt desta árvore têm sido produzidos, mas ainda não foram utilizados na agricultura francesa. Este estudo avaliou a frequência nas populações de insetos de campo, de 1999 a 2001, antes de seu contato com a toxina Cry3A produzida pelo álamo Bt. As frequências obtidas foram de $1,7 \times 10^{-2}$ em 1999, e 6,6 e $3,6 \times 10^{-3}$ em 2000 e 2001, respectivamente. Quando as amostras foram agrupadas, a estimativa global da frequência do alelo *r* para esta população foi de $3,7 \times 10^{-3}$. Em outra amostra de insetos coletados a 500 km do local da população anterior, a frequência inicial do alelo *r* foi estimada em $1,13 \times 10^{-2}$, estatisticamente similar àquela encontrada na população analisada por Génissel et al. (2003) (WENES et al., 2006). Outro estudo, realizado com o lepidóptero *Sesamia nonagrioides*, praga do milho, apontou que frequência de alelos de resistência à toxina Cry1Ab, em populações da Espanha e Grécia, foi de $8,6 \times 10^{-3}$ e $9,7 \times 10^{-3}$, respectivamente (ANDREADIS et al., 2007).

Todos os trabalhos realizados anteriormente foram baseados no uso da técnica de *F₂ screen*, ou seja, na avaliação da susceptibilidade *in vivo* da progênie de insetos coletados em campo para detecção de homozigotos e a estimativa de heterozigotos. Até o momento, apenas dois trabalhos relataram o uso de uma ferramenta molecular para avaliar a frequência de um alelo de resistência a um biolarvicida em populações naturais. Tabashnik et al. (2006) analisaram por PCR alelo-específica mais de 5.500 larvas de *P. gossypiella* coletadas de campos de algodão nos Estados Unidos e não detectaram nenhum dos três alelos de resistência já caracterizados para a toxina Cry1Ac, e a frequência estimada foi de $3,0 \times 10^{-4}$. Gahan et al. (2007), também através de uma abordagem baseada na PCR, investigaram *H. virescens*, para a presença de um alelo que codifica a caderina, receptor para a toxina Cry1A, que apresenta a inserção de um retrotransposon associado à resistência. Após os testes de PCR

em uma amostra de 7.000 indivíduos, o alelo de resistência não foi detectado e a frequência estimada foi de $7,0 \times 10^{-5}$.

Os dados sobre as frequências dos alelos de resistência a toxinas do Bt descritos nesta seção, além de outros encontrados na literatura foram reunidos na Tabela 2. Como pode ser observado, a predição de que a frequência de alelos *r* seria maior em populações sob pressão de seleção, em relação àquelas que não foram expostas ao agente de controle, bem como que alelos de resistência são raros, têm que ser reexaminados.

Tabela 2 – Estimativas de frequências de alelos de resistência (*r*) às toxinas do biolarvicida *Bacillus thuringiensis* (Bt) em diferentes espécies de insetos pragas, realizadas através de análise de F₂ *screen* ou por PCR alelo-específica.

Inseto	Cultivar Bt	País	Método	Frequência do alelo <i>r</i>	Referência
<i>Heliothis virescens</i>	Algodão	EUA	F ₂ <i>screen</i>	1,5 x 10 ⁻³	Gould et al. (1997)
<i>Pectinophora gossypiella</i>	Algodão	EUA	F ₂ <i>screen</i>	0,16; 0,07 e 0	Tabashnik et al. (2000)
<i>Scirpophaga incertulas</i>	Arroz	Filipinas	F ₂ <i>screen</i>	3,6 x 10 ⁻³	Bentur et al. (2000)
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Milho	EUA	F ₂ <i>screen</i>	3,9 x 10 ⁻³	Andow et al. (2000)
<i>Helicoverpa zea</i>	Algodão	EUA	F ₂ <i>screen</i>	3,9 e 4,3 x 10 ⁻⁴	Burd et al. (2003)
<i>O. nubilalis</i>	Milho	França	F ₂ <i>screen</i>	< 9,2 x 10 ⁻⁴	Bourguet et al. (2003)
<i>O. nubilalis</i>	Milho	EUA	F ₂ <i>screen</i>	4,23 x 10 ⁻⁴	Bourguet et al. (2003)
<i>Chrysomela tremulae</i>	Álamo	França	F ₂ <i>screen</i>	3,7 x 10 ⁻³	Génissel et al. (2003)
<i>C. tremulae</i>	Álamo	França	F ₂ <i>screen</i>	1,13 x 10 ⁻²	Wenes et al. (2006)
<i>Sesamia nonagrioides</i>	Milho	Espanha	F ₂ <i>screen</i>	8,6 x 10 ⁻³	Andreadis et al. (2007)
<i>S. nonagrioides</i>	Milho	Grécia	F ₂ <i>screen</i>	9,7 x 10 ⁻³	Andreadis et al. (2007)
<i>P. gossypiella</i>	Algodão	EUA	PCR	3,0 x 10 ⁻⁴	Tabashnik et al. (2006)
<i>H. virescens</i>	Algodão	EUA	PCR	7,0 x 10 ⁻⁵	Gahan et al. (2007)

3 JUSTIFICATIVA

O Bsp tem uma importância fundamental no âmbito do controle de vetores, pois está sendo atualmente utilizado no Programa de Controle do *Cx. quinquefasciatus* em áreas endêmicas da filariose na cidade do Recife, além de outras áreas no país. Em virtude da possibilidade de seleção da resistência em populações naturais tratadas com este biolarvicida, o desenvolvimento de ferramentas para detectar alelos de resistência já caracterizados, como o *cqm1-d19*, é importante para determinar a sua frequência através do monitoramento de populações de vetores antes e durante o tratamento. Além disso, a investigação de possíveis polimorfismos na sequência do gene *cqm1* é fundamental para o conhecimento de bases moleculares da resistência. O monitoramento da susceptibilidade e avaliação do risco de seleção de resistência, através de métodos tradicionais e ferramentas moleculares, são avanços importantes para estabelecer estratégias adequadas para o controle de vetores.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Qual é a frequência inicial do alelo *cqm1-d19*, que confere a resistência de *Cx. quinquefasciatus* ao biolarvicida *B. sphaericus*, em populações naturais não tratadas e tratadas com este agente?

5 HIPÓTESE

O alelo *cqm1-d19*, responsável pela resistência do *Cx. quinquefasciatus* ao biolarvicida *B. sphaericus*, identificado em uma colônia selecionada sob condições de laboratório, está presente em populações naturais de *Cx. quinquefasciatus* e sua frequência é maior em populações expostas ao tratamento com este agente.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

Desenvolver ferramentas moleculares para o diagnóstico da resistência do vetor *Culex quinquefasciatus* ao *Bacillus sphaericus* (Bsp), que possam contribuir para o uso racional deste biolarvicida em programas de controle de vetores.

6.2 Objetivos específicos

- a) Desenvolver um método específico de PCR para detectar o alelo de resistência *cqm1-d19* em larvas de *Cx. quinquefasciatus*.
- b) Estabelecer a frequência do alelo *cqm1-d19* em populações de *Cx. quinquefasciatus* naturais não tratadas e tratadas com o Bsp, e comparar o risco de seleção de resistência.
- c) Determinar a frequência de expressão do receptor Cqm1 em amostras das populações naturais e correlacionar com a respectiva frequência genotípica.
- d) Analisar o polimorfismo da sequência no gene *cqm1* em larvas de uma área tratada com o Bsp para avaliar mutações potencialmente associadas à resistência.

7 MATERIAL E MÉTODOS

Nas seções seguintes estão descritos os procedimentos experimentais relativos aos principais aspectos analisados neste trabalho: bioensaios para avaliar susceptibilidade de larvas de *Cx. quinquefasciatus* ao Bsp, método de PCR para detecção específica dos alelos *cqm1* e *cqm1-d19* em colônias de laboratório e populações naturais, ensaios bioquímicos para expressão da α -glicosidase Cqm1 e análise de polimorfismos de seqüências do gene *cqm1*. Todas as etapas foram realizadas nas dependências do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ). O esquema abaixo apresenta as populações selecionadas para avaliação da susceptibilidade ao Bsp e a realização das respectivas análises (Figura 4).

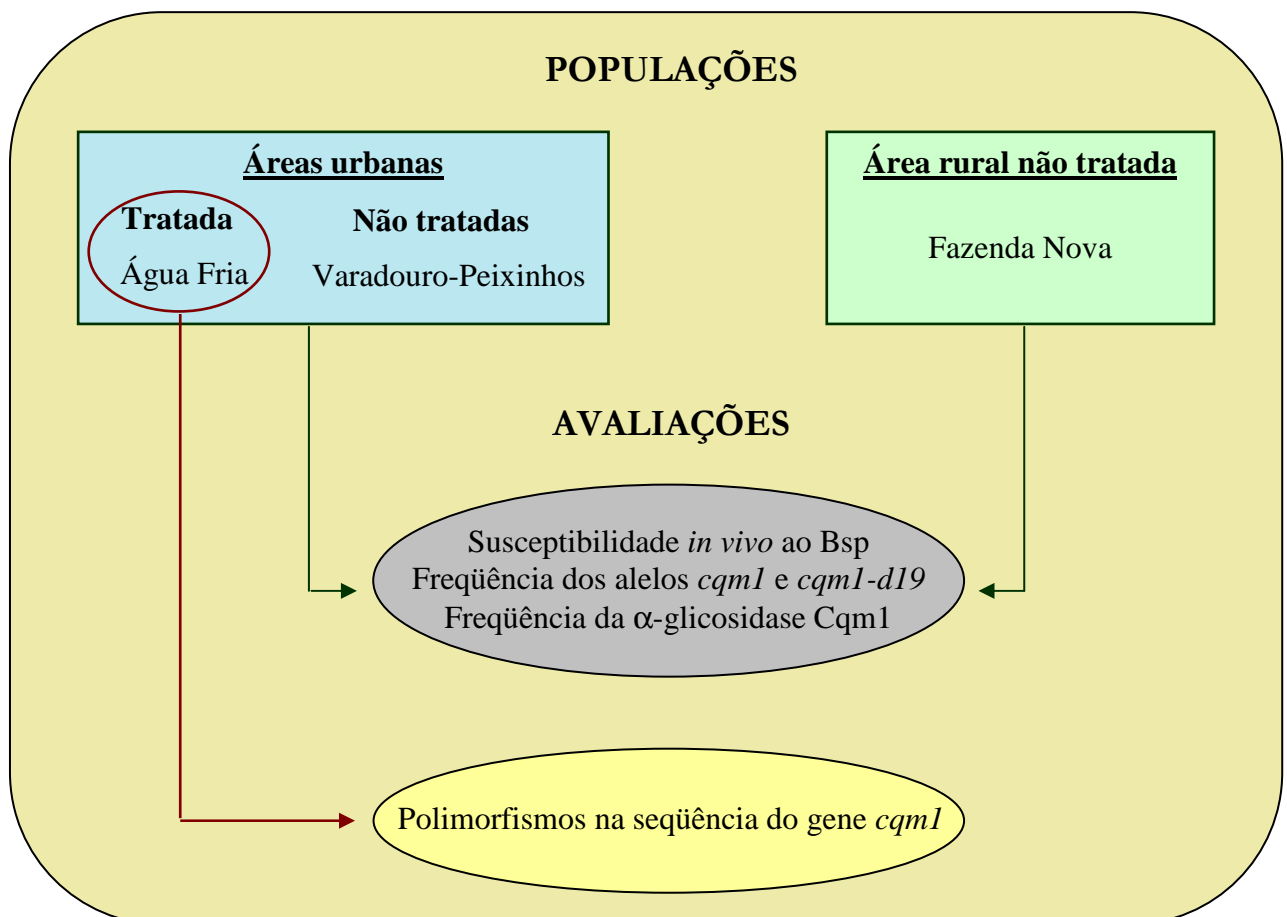


Figura 4 – Populações de *Culex quinquefasciatus* utilizadas neste trabalho e as respectivas análises realizadas em relação ao monitoramento da susceptibilidade ao *Bacillus sphaericus* (Bsp).

7.1 Amostras de *Culex quinquefasciatus*

Neste trabalho foram utilizadas amostras de larvas de duas colônias de *Cx. quinquefasciatus* mantidas em laboratório, sendo uma susceptível e outra resistente ao Bsp, como referências para o desenvolvimento da PCR para detecção específica do alelo *cqm1-d19*, bem como para a avaliação *in gel* da expressão da α -glicosidase Cqm1. Larvas das populações naturais foram analisadas quanto à frequência do alelo *cqm1-d19* e da expressão do receptor Cqm1. Dentre as quatro populações naturais analisadas, uma foi coletada em uma área exposta a tratamentos com o Bsp, no âmbito do Programa de Controle de Vetores realizado pela Prefeitura do Recife, e três foram provenientes de áreas não tratadas.

7.1.1 Colônias de laboratório

No insetário do Departamento de Entomologia do CPqAM são mantidas duas colônias de *Cx. quinquefasciatus* de referência em relação à susceptibilidade ao Bsp:

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

CqRL1/2362. Colônia que apresenta um alto nível de resistência (>100.000) ao Bsp 2362 obtida através de pressão de seleção em laboratório (PEI et al., 2002). O mecanismo de resistência caracterizado nesta colônia é a ausência do receptor Cqm1 no epitélio intestinal e sua base molecular é uma deleção de 19 nucleotídeos no gene *cqm1* (OLIVEIRA et al., 2004; ROMÃO et al., 2006)

Estas colônias são mantidas no insetário sob as seguintes condições: temperatura de 26 ± 1 °C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo 12:12 h (dia/noite). Os adultos são alimentados em solução de sacarose a 10% e o repasto sanguíneo das fêmeas é feito em *Gallus* sp. As larvas são mantidas em água mineral e alimentadas com ração para gatos autoclavada (Whiskas®).

7.1.2 Populações naturais

População tratada (T). A população T foi proveniente do bairro de Água Fria na cidade de Recife, que é uma área endêmica para a filariose e apresentou uma prevalência de 6,5% em um inquérito epidemiológico prévio (MACIEL et al., 1996). Desde 2003, esta área tem sido alvo do Programa de Controle da Filariose realizado pelo Centro de Vigilância Ambiental (CVA) da Secretaria de Saúde do Recife. Este programa inclui o tratamento da população humana com a droga antiparasitária dietilcarbamazina (DEC) e aplicação de medidas para a redução da densidade populacional do *Cx. quinquefasciatus*. Dentre as ações adotadas para o controle do vetor, o tratamento de criadouros de *Cx. quinquefasciatus* desta área com o Bsp (Vectolex G®, Sumitomo Chemical) vem sendo realizado desde março de 2003, sob responsabilidade do subprograma de Controle do Vetor da Filariose. Cerca de três mil criadouros, na sua maioria fossas sépticas, foram mapeados em uma área de 1,14 km². Os tratamentos com o Bsp (3-5 g/m²) são realizados bimensalmente em todos os criadouros que apresentam condições operacionais para serem tratados (SILVA-FILHA et al., 2008). A avaliação da susceptibilidade *in vivo* desta população foi feita a partir de amostras de larvas coletadas em maio/2005, março/06, setembro/06 e abril/07, após 13, 18, 21 e 24 tratamentos com o Bsp, respectivamente. Foram avaliadas a frequência do alelo *cqm1-d19* e a expressão do receptor Cqm1 em dois momentos, maio/2005 e abril/2007. As amostras foram coletadas pela equipe de campo da FUNASA através da instalação de ovitrampas em domicílios localizados em diversas ruas da área de estudo, segundo metodologia de Barbosa et al. (2007).

Populações não tratadas (NT). Estas populações foram selecionadas de acordo com o critério de ausência de tratamento com o Bsp, informado pelo CVA da Secretaria de Saúde do Recife. As amostras de duas áreas da Região Metropolitana do Recife, Varadouro e Peixinhos, foram coletadas segundo metodologia de Barbosa et al. (2007). A terceira população NT foi proveniente da cidade de Fazenda Nova, localizada no município de Brejo de Madre de Deus, na região agreste do Estado de Pernambuco a cerca de 180 km de Recife. Neste caso, amostras heterogêneas, compostas de ovos, larvas e pupas foram coletadas diretamente em criadouros de *Cx. quinquefasciatus* localizados em uma propriedade rural.

O material biológico coletado previamente das populações T e NT foi mantido no insetário sob as condições descritas no item 7.1.1 até a obtenção de lavas da geração F₁ ou F₂ para realização dos bioensaios. Larvas de 4º estágio foram armazenadas a -70 °C para posterior análise da frequência do alelo *cqm1-d19* e da expressão do receptor Cqm1.

7.2 Bioensaios

Os bioensaios, para avaliar a susceptibilidade *in vivo* das larvas das populações estudadas, foram realizados no âmbito do Serviço Nacional de Referência em Controle de Culicídeos Vetores, do Depto. de Entomologia do CPqAM/FIOCRUZ.

O método consiste em submeter larvas jovens do 4º estágio a uma série de concentrações de uma suspensão do pó padrão SPH88 (Instituto Pasteur, França) composto de cristais e esporos liofilizados do Bsp cepa 2362 por 48 horas, de acordo com protocolo da Organização Mundial de Saúde (1985). Vinte larvas foram colocadas em recipientes contendo 100 mL de água contendo diferentes concentrações da suspensão bacteriana e três replicatas foram realizadas para cada uma das seis concentrações testadas. Um grupo controle não tratado, formado por três replicatas, foi testado em cada experimento e o bioensaio para avaliação de cada população foi repetido pelo menos três vezes. As concentrações letais do Bsp para 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) das larvas, após 48 h, foram estabelecidas através da análise de próbites usando o programa SPSS 10.0 para Windows (SILVA-FILHA et al., 2008).

7.3 PCR específica para detecção dos alelos *cqm1* e *cqm1-d19*

Nesta etapa foi estabelecido um método específico de PCR para avaliação da frequência do alelo *cqm1-d19* em amostras de larvas utilizando como referência indivíduos das colônias mantidas no insetário e, posteriormente, em amostras das populações naturais. Para evitar problemas de contaminação com ácidos nucleicos e subsequente amplificação de fragmentos gênicos não específicos, os procedimentos de extração de DNA, reação de PCR e separação eletroforética foram realizados em ambientes distintos, segundo procedimentos padronizados através de um fluxograma (Figura 5).

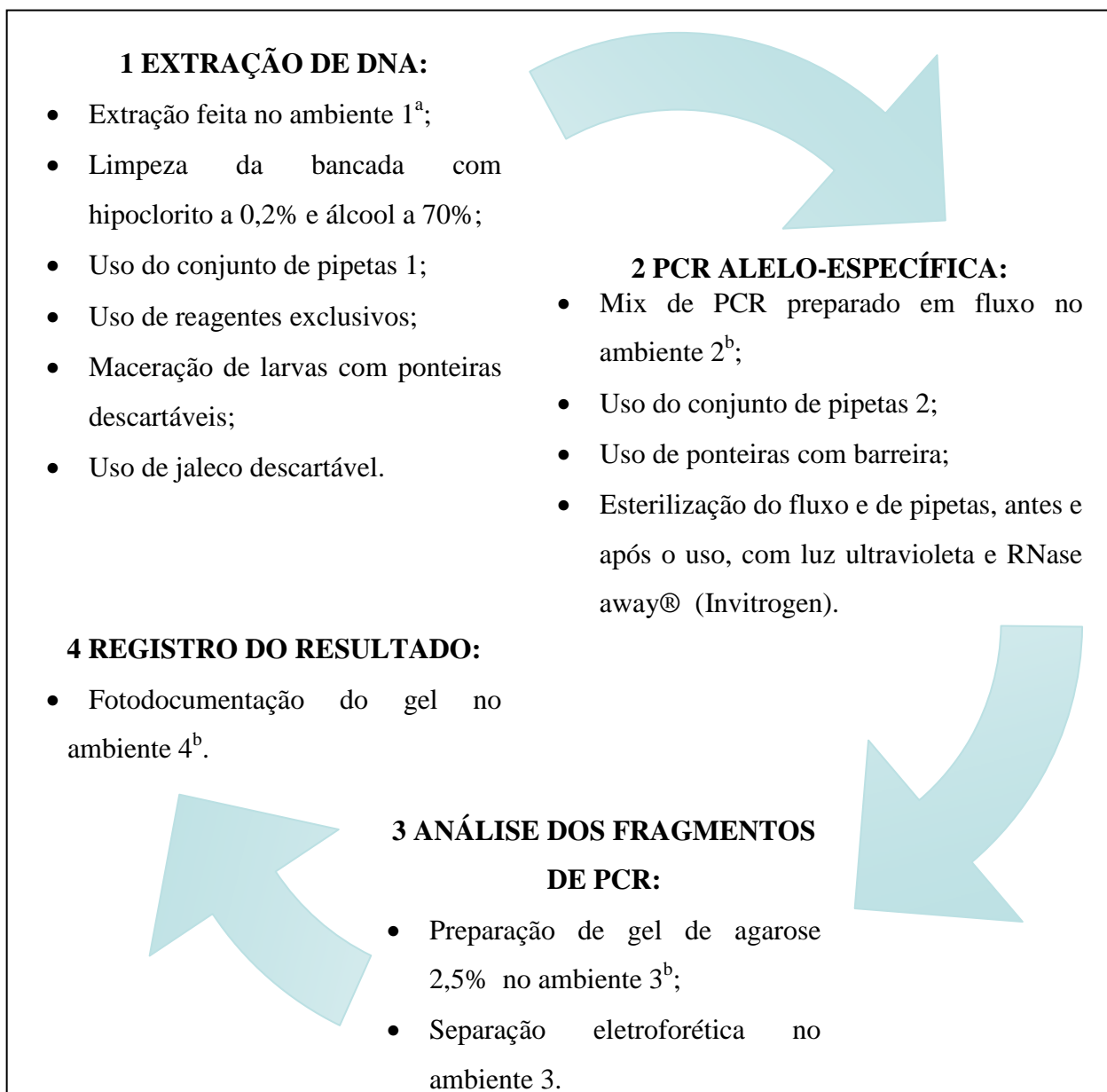


Figura 5 - Fluxograma para realização das etapas do protocolo de PCR específica para detecção dos alelos *cqm1* e *cqm1-d19*.

Nota: ^aAmbiente localizado no Núcleo de Plataforma Tecnológica do CPqAM; ^bambientes 2, 3 e 4 localizados no laboratório do Departamento de Entomologia – CPqAM.

7.3.1 Extração do DNA de larvas

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com Ayres et al. (2002). Larvas do 4º estágio das amostras sob estudo foram maceradas individualmente em 400 µl de tampão de lise (NaCl 0.4 M, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 2 mM, pH 8,0), 7 µl de solução de proteinase K (10 mg/ml) e 72 µl de SDS a 10%. Cada amostra foi incubada a 65 °C, por 16 h.

Após a adição de 420 µl de NaCl 5 M à suspensão, a amostra foi homogeneizada por 1 min, seguida de centrifugação a 10.000 g por 20 min. O DNA foi precipitado do sobrenadante após a adição de igual volume de isopropanol, em seguida incubado a -20 °C por 1 hora e centrifugado a 10.000 g por 20 min. O sedimento foi lavado com etanol a 70%, seco e recuperado em 100 µl de tampão estéril TE® (Invitrogen) composto de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.

7.3.2 Reação de PCR

Primeiramente, a PCR alelo-específica foi estabelecida a partir de amostras do DNA extraído individualmente de larvas suscetíveis e resistentes respectivamente das colônias de referência mantidas no insetário, CqSF e CqRL1/2362. A hipótese era detectar indivíduos sensíveis e homozigotos para o alelo *cqml* na colônia CqSF, ao passo que larvas resistentes da colônia CqRL1/2362 foram usadas para caracterização do alelo *cqml-d19* em homozigose. Larvas da progênie F1 resultantes do cruzamento dos indivíduos das colônias acima foram analisadas, a fim de caracterizar indivíduos heterozigotos que portariam ambos os alelos.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 0,2 mM de cada dNTP, 1,6 µM de cada *primer* específico descrito abaixo, 2,0 U de Platinum *Taq* DNA Polimerase® (Invitrogen) em tampão fornecido pelo fabricante (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,4 mM), além de 100 ng do DNA molde extraído individualmente das larvas. Cada amostra foi amplificada em um termociclador BIOMETRA® programado para uma etapa de desnaturação a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 50 seg, 55 °C por 50 seg e 72 °C por 120 seg, e uma etapa final de 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% em tampão de corrida TBE (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM pH 8,0), corado com brometo de etídeo e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta (UV).

Para a amplificação de um fragmento a partir do alelo *cqml* ou *cqml-d19*, foi utilizada a associação dos *primers* específicos, contendo sítios de restrição, 5'-CGAGAATTCATGCAGGACTTCAAAGAG-3' e 5'-GCACTGCAGGGAAGTGGTGAAGGTAC-3'. Estes *primers* foram desenhados para anelar em regiões do gene *cqml* que flanqueiam a deleção de 19 nucleotídeos na posição

1257-1275, segundo a sequência deste gene (ROMÃO et al., 2006). O tamanho esperado do fragmento amplificado a partir do DNA molde de indivíduos que apresentarem o alelo *cqm1* foi de aproximadamente 190 pares de bases (pb), e de 171 pb para o alelo *cqm1-d19*. Nesta etapa, alguns fragmentos gênicos obtidos foram seqüenciados para a confirmação de sua identidade, conforme método descrito no item 7.5.2.

7.3.3 Detecção do alelo *cqm1-d19* em populações naturais

Após o desenvolvimento da metodologia para detecção específica do alelo *cqm1-d19* em larvas de colônias cujo genótipo era conhecido, a segunda etapa foi avaliar a frequência deste alelo em amostras de populações naturais coletadas em uma área tratada e em três não tratadas com o Bsp. A análise foi realizada a partir do DNA extraído individualmente das larvas do 3º ou 4º estágio de acordo com a metodologia descrita no item 7.2.1. Nas reações de PCR, o controle positivo utilizado foi o DNA de larvas resistentes que apresentaram o alelo *cqm1-d19* em homozigose, e os negativos foram uma amostra com o DNA do *Ae. aegypti*, a partir do qual não é possível a amplificação deste fragmento gênico e uma amostra sem conter DNA molde. Alguns fragmentos gênicos correspondentes à amplificação a partir dos alelos *cqm1* e *cqm1-d19* também foram seqüenciados para confirmar a identidade dos mesmos, segundo metodologia descrita no item 7.5.2.

A partir dos dados obtidos na análise dos genótipos das larvas das populações naturais, as frequências observadas e esperadas foram calculadas e o teste qui quadrado (χ^2) foi aplicado para avaliar se as populações estavam em equilíbrio para o gene *cqm1*. A fórmula utilizada para o teste χ^2 foi:

$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e]$$

Sendo *o* e *e* as frequências observada e esperada para cada genótipo. Os valores de χ^2 encontrados para cada população foram comparados ao χ^2 tabelado, de 3,841, com significância de 5%. Valores iguais ou acima de 3,841 indicam que a hipótese de equilíbrio entre as frequências observadas e esperadas deve ser rejeitada. O equilíbrio populacional, ou seja, uma distribuição equilibrada dos genótipos após cada geração, leva em conta vários

fatores, dentre eles, o fluxo gênico e a pressão de seleção são os pontos mais relacionados ao modelo estudado.

7.4 Ensaios de α -glicosidase *in gel* para detecção do receptor Cqm1

O receptor Cqm1 da toxina binária é uma α -glicosidase (E.C. 3.2.1.20) cuja presença em amostras de larvas pode ser avaliada através de ensaios de atividade enzimática *in gel* (ROMÃO et al., 2006). A primeira etapa desta análise foi testar grupos de amostras conhecidas de larvas das colônias CqSF e CqRL1/2362 a fim de confirmar que os indivíduos susceptíveis expressam a α -glicosidase Cqm1, enquanto que esta proteína não é detectada em larvas resistentes. Na segunda etapa, larvas das populações naturais foram analisadas a fim de correlacionar a frequência dos genótipos e expressão positiva ou negativa da α -glicosidase Cqm1.

As larvas foram maceradas individualmente em 5 μ l de tampão PBS (NaH_2PO_4 2,1 mM, Na_2HPO_4 14 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) e solubilizadas em 5 μ l de tampão de amostra de Laemmli (1970), sem conter o agente redutor 2-betamercaptoetanol e sem aquecimento. A separação eletroforética das amostras foi realizada em SDS-PAGE a 8% (acrilamida/bisacrilamida 30%, Tris-HCl 1,5 M; pH 8,8; Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8; SDS 20%), a 20 mA de corrente e a 4 °C. Após a separação, os géis foram incubados em solução aquosa de Triton X a 2,5% por 13 minutos a temperatura ambiente e esta etapa foi repetida 2 vezes. As lavagens com o Triton têm a função de remover o excesso do Tris das amostras, pois este composto é um inibidor de atividade α -glicosidase. Em seguida, os géis foram incubados em tampão citrato-fosfato 100 mM pH 6,5 contendo 2 mM do substrato 4-metil-umbeliferil- α -D glicopiranosídeo (M9766, Sigma), durante 20 min a 37 °C, sob leve agitação. Os géis foram visualizados em um transiluminador de UV. Através deste ensaio, seria possível distinguir larvas com fenótipo sensível ou resistente, pois a banda de clivagem correspondente à α -glicosidase Cqm1 pode ser claramente discriminada.

7.5 Seqüenciamento do gene *cqm1*

O objetivo desta etapa foi avaliar o polimorfismo no gene *cqm1* através de análises de seqüências de larvas da população tratada de Água Fria. Foram analisados 15 indivíduos coletados em maio de 2005, após 13 tratamentos com o Bsp. Destes indivíduos, 10 foram agrupados para a extração do DNA e cinco foram submetidos à extração individual.

7.5.1 Purificação dos produtos de PCR e clonagem do gene

Após a extração do DNA total das larvas e amplificação do gene *cqm1* com *primers* específicos (5'-CGAGAATTCTCTCCGAGCAAGATGCGA-3' e 5'-GCACTGCAGATTACGCCTGTATCAGCC-3'), conforme descritos nos itens 7.3.1 e 7.3.2, os fragmentos amplificados, correspondentes ao gene *cqm1*, foram submetidos à purificação com o Kit GFX DNA and Gel Band Purification® (GE Healthcare). Os *primers* permitiram a amplificação total do gene *cqm1* e foram desenhados a partir da seqüência descrita em Romão et al. (2006) e depositada no GeneBank sob o número de acesso DQ333335. O vetor plasmidial de clonagem utilizado foi o pGEM-T Easy® (Promega). A combinação vetor plasmidial/fragmento de PCR foi tratada com T4 DNA ligase® (Promega) a 3 U/μl. Após a etapa de ligação, o DNA plasmidial foi empregado na transformação de bactérias eletrocompetentes (*Escherichia coli* cepa DH10B). Algumas colônias foram selecionadas para realização de mini preparações de DNA plasmidial. Após o crescimento de uma colônia em meio Luria-Bertani por 16 horas a 37 °C, as células foram submetidas à extração de DNA plasmidial por lise alcalina, segundo adaptação do método de Birnboim e Doly (1979). Em seguida, as mini preparações foram quantificadas e encaminhadas para o seqüenciamento automático no Núcleo de Plataforma Tecnológica do CPqAM.

7.5.2 Seqüenciamento e análise do gene

Um total de 46 clones foi seqüenciado, 16 correspondentes aos cinco indivíduos avaliados separadamente e 30 ao *pool* de DNA extraído de 10 indivíduos. Para a quantificação

das amostras, alíquotas de DNA plasmidial linearizado foram comparadas em gel de agarose 1% com quantidades definidas de marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen). Para cada reação de seqüenciamento foram utilizados cerca de 40 ng de DNA plasmidial e 1 µl de cada *primer* a 3,2 µM. Para a reação do seqüenciamento, foram empregados oito *primers* a fim de obter a seqüência completa do gene *cqm1* (Figura 6). Seis *primers* internos para o gene *cqm1* foram utilizados, além dos *primers* específicos para o plasmídeo pGEM®-T Easy, (M13 *forward* e M13 *reverse*) (Quadro 1). A associação destes oito *primers* permitiu amplificar fragmentos de aproximadamente 500 pb, cujas seqüências foram agrupadas para obtenção da seqüência completa do gene *cqm1*. Os eletroferogramas das reações foram analisados através do programa SeqMan (DNASTAR). Após a análise e refinamento manual das seqüências, como o descarte de alguns polimorfismos que foram decorrentes de erro de PCR durante a amplificação dos fragmentos, os alinhamentos e a análise de possíveis polimorfismos entre as seqüências dos indivíduos foram realizados através do programa MegaAlign e BioEdit.

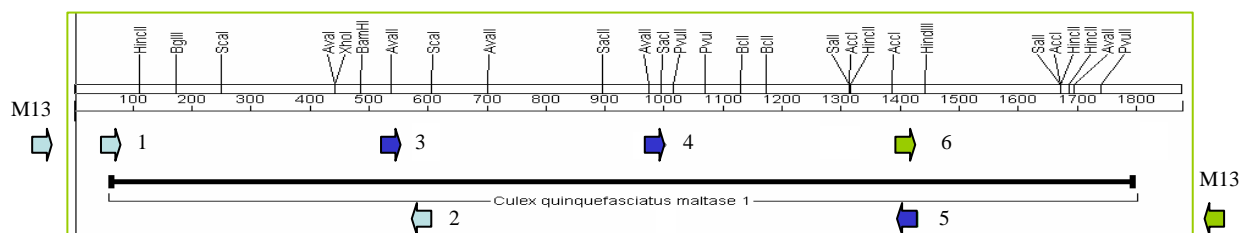


Figura 6 – Representação esquemática do gene *cqm1* e a localização dos seis *primers* internos (setas 1-6) utilizados para o seqüenciamento deste gene.

Nota: Além dos *primers* internos, mais dois foram utilizados, M13 *forward* (M13F) e M13 *reverse* (M13R), que são específicos para o plasmídeo pGEM-T Easy® (Promega). As seqüências dos *primers* internos estão descritas no Quadro 1.

<i>Primer</i> *	Seqüência
1	5'-CGAGAATTCTCTCCGAGCAAGATGCGA-3'
2	5'-ACTCCCCTCTCGCTGTATTA-3'
3	5'-AGGGGGTGGTCCGCCGAATAAT-3'
4	5'-CGCCAGGGAGCTCACATGCCGTT-3'
5	5'-GCACTGCAGGGAAGTGGTGGAAAGGTAC-3'
6	5'-ATGCAGAAGAATCCACAAAG-3'

Quadro 1 – Seqüências dos *primers* internos utilizados para o seqüenciamento do gene *cqm1*.

*Localização do anelamento dos *primers* que estão na Figura 6 na seqüência do gene *cqm1*.

8 RESULTADOS

Os resultados foram agrupados em três blocos. O primeiro consiste da avaliação da susceptibilidade *in vivo* das populações de *Cx. quinquefasciatus* ao Bsp. No segundo bloco estão apresentados os dados da análise da frequência do alelo *cqm1-d19* através da PCR alelo-específica, bem como da expressão do receptor Cqm1 através de ensaios enzimáticos *in gel*, por população. No terceiro e último bloco, estão descritos os polimorfismos da sequência do gene *cqm1* provenientes de indivíduos da população de Água Fria, exposta ao tratamento com o Bsp.

8.1 Avaliação da susceptibilidade *in vivo* das populações

Os bioensaios foram realizados para avaliar a susceptibilidade *in vivo* das populações de *Cx. quinquefasciatus* ao Bsp. Amostras de larvas de Água Fria foram investigadas primeiramente após 13 tratamentos (maio/2005) com o Bsp e mostraram uma concentração letal para 50% das larvas (CL₅₀) de 0,008 mg/l, 2,7 vezes maior em relação à colônia de referência CqSF (Tabela 3). Nas três análises subsequentes realizadas após 18, 21 e 24 tratamentos os valores de CL₅₀ foram de 0,022, 0,014 e 0,026 mg/l, sendo esta última a maior alteração observada na susceptibilidade, 8,6 vezes em relação à CqSF (Tabela 3). Os valores de razão de resistência (RR) observados em Água Fria podem estar relacionados a um estágio inicial de seleção de resistência ou apenas a variações naturais na susceptibilidade ao Bsp. Diferentemente dos valores obtidos a partir da CL₅₀, as RR em relação às CL₉₀ foram semelhantes aos da colônia de referência CqSF, próximas a 1, e não indicam alteração de susceptibilidade das larvas (Tabela 3).

A susceptibilidade das populações de campo não tratadas foi similar à colônia de laboratório CqSF. As CL₅₀ das larvas foram de 0,004, 0,012 e 0,011 mg/l para Varadouro, Peixinhos e Fazenda Nova, respectivamente (Tabela 3). A maior alteração encontrada foi na CL₅₀ de Peixinhos, cuja RR foi cerca de quatro vezes em relação à colônia de referência CqSF. Os valores de RR encontrados nestas populações foram menores aos encontrados para a população de Água Fria, entretanto todos foram inferiores a 10, e não denotam alterações significativas na susceptibilidade. Em relação à CL₉₀, observa-se que as populações não

tratadas não mostraram nenhuma alteração, visto que os valores de RR foram menores ou próximos a 1 ao longo das avaliações realizadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Atividade do *Bacillus sphaericus* 2362 (pó padrão SPH88) para larvas jovens de 4º estágio de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia de laboratório (CqSF) e de populações de campo tratada (Água Fria – AF) e não tratadas com o *B. sphaericus* (Varadouro – VAR; Peixinhos – PEIX; Fazenda Nova - FN).

Amostras	Período	Nº tratamentos	Nº ensaios	Nº larvas (Intervalo de confiança 95%)	CL ₅₀ ^a (Intervalo de confiança 95%)	RR ^c (Intervalo de confiança 95%)	CL ₉₀ ^b (Intervalo de confiança 95%)	RR
CqSF	-	0	6	2.580	0,003 (0,002-0,004)	1	0,038 (0,021-0,114)	1
	Maio/05	13	3	960	0,008 (0,004-0,013)	2,7	0,020 (0,015-0,036)	0,5
AF	Março/06	18	3	1.020	0,022 (0,019-0,027)	7,3	0,044 (0,038-0,054)	1,2
	Setembro/06	21	3	1.320	0,014 (0,009-0,020)	4,7	0,035 (0,027-0,054)	0,9
	Abril/07	24	3	1.140	0,026 (0,015-0,030)	8,6	0,044 (0,035-0,067)	1,2
VAR	Janeiro/06	0	3	1.020	0,004 (0,003-0,005)	1,3	0,028 (0,021-0,060)	0,7
PEIX	Agosto/07	0	3	1.020	0,012 (0,009-0,017)	4,0	0,025 (0,020-0,036)	0,6
FN	Junho/07	0	3	1.080	0,011 (0,005-0,028)	3,7	0,022 (0,015-0,072)	0,6

^{a,b} Concentração letal (mg/l) para 50% (CL₅₀) ou 90% (CL₉₀) das larvas tratadas após 48 h.

^c RR: Razão de resistência entre a CL para cada população de campo analisada e àquela para a colônia CqSF.

8.2 Ferramentas moleculares para avaliação da susceptibilidade ao Bsp

O primeiro resultado deste estudo foi o estabelecimento e a padronização de um método específico de PCR para a detecção dos alelos *cqm1* e *cqm1-d19*, a partir de amostras individuais de larvas de *Cx. quinquefasciatus*. Após as primeiras análises, um protocolo foi estabelecido para padronizar os procedimentos experimentais visando reduzir o risco de contaminação, desde a etapa da extração do DNA até a obtenção e visualização dos fragmentos gênicos amplificados. Os ensaios para a avaliação de atividade enzimática α -glicosidase *in gel* também foram padronizados a partir de amostras individuais de larvas, a fim de relacionar a frequência da expressão do receptor Cqm1 com as frequências dos alelos *cqm1* e *cqm1-d19*.

8.2.1 Detecção dos alelos *cqm1* e *cqm1-d19*

Esta etapa foi realizada a partir do uso de larvas susceptíveis e resistentes ao Bsp provenientes das colônias de referência CqSF e CqRL1/2362, respectivamente. A aplicação da PCR alelo-específica mostrou que a partir do DNA genômico de larvas sensíveis e resistentes foram amplificados fragmentos de tamanhos diferentes, como esperado. As larvas da colônia CqSF apresentaram o alelo *cqm1* em homozigose e o tamanho dos fragmentos amplificados foi de 190 pb (Figura 7, S), enquanto as larvas da colônia CqRL1/2362 apresentaram fragmentos de 171 pb amplificados a partir do alelo *cqm1-d19* em homozigose (Figura 7, R). Os indivíduos heterozigotos foram caracterizados por apresentarem os dois fragmentos amplificados a partir dos alelos *cqm1* e *cqm1-d19* (Figura 7, *). Os fragmentos foram seqüenciados e a identidade dos mesmos foi confirmada. Os resultados obtidos em amostras de larvas conhecidas das colônias de referência mostraram que este método é eficaz para identificar o alelo de resistência *cqm1-d19* e determinar sua frequência em populações naturais.

8.2.2 Avaliação da expressão da α -glicosidase Cqm1

Foram realizados ensaios qualitativos *in gel* para avaliar a expressão do receptor Cqm1 em amostras individuais de larvas das colônias de referência CqSF e CqRL1/2362. O perfil das larvas susceptíveis mostrou cinco bandas catalíticas, dentre elas a α -glicosidase Cqm1 que migra com peso aparente de 83 kDa, nas condições semi-desnaturantes em que o gel foi realizado (Figura 8, S). Larvas resistentes ao Bsp que portam o alelo *cqm1-d19* em homozigose apresentaram um perfil de α -glicosidases similar ao de larvas sensíveis, exceto pela ausência da banda catalítica correspondente ao receptor Cqm1 (Figura 8, R). A discriminação entre larvas sensíveis e resistentes, pela ausência do receptor Cqm1, mostrou que esta ferramenta pode ser usada para o monitoramento da resistência de larvas de *Culex* ao Bsp, relacionada à ausência da expressão do sítio alvo da toxina.

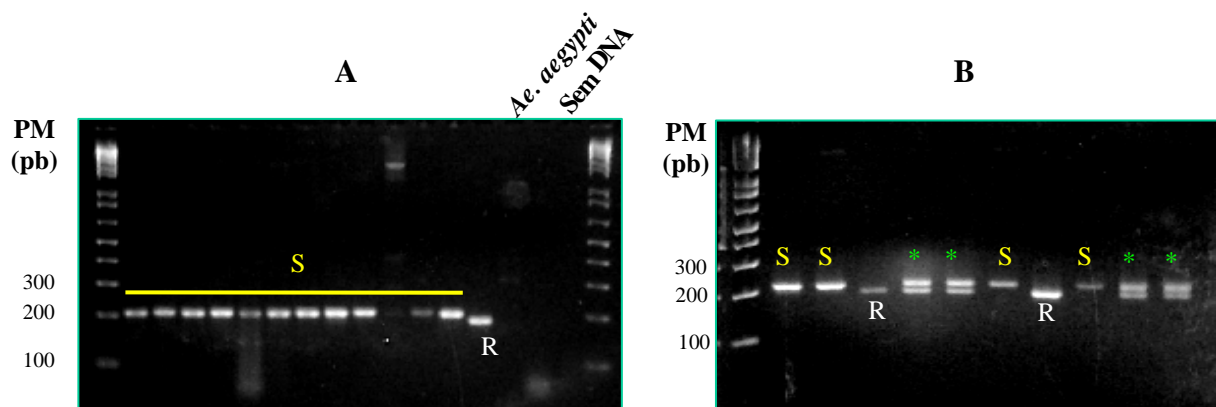


Figura 7 – Separação eletroforética de fragmentos amplificados por PCR a partir do gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus*, em gel de agarose a 2,5%.

Nota: **A**: Fragmentos de 190 e 171 pb foram amplificados a partir do alelo *cqm1* e *cqm1-d19* em larvas susceptíveis da colônia CqSF (S) e larvas resistentes (R) ao *Bacillus sphaericus* da colônia CqRL1/2362, respectivamente. **B**: Indivíduos susceptíveis homozigotos (S), resistentes homozigotos (R) e heterozigotos (*) que apresentaram ambos os fragmentos de 190 e 171 pb. Os controles negativos da reação foram uma amostra com o DNA de *Aedes aegypti* e outra sem DNA molde. **PM**: peso molecular em pares de bases (pb). Os géis foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta.

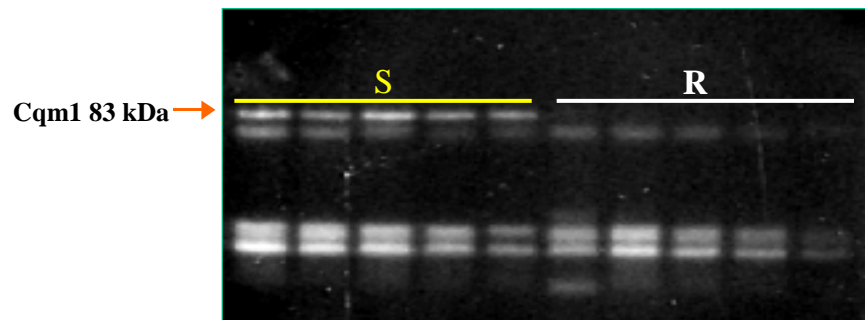


Figura 8 – Detecção de α -glicosidases (EC 3.2.1.20) em homogenizados individuais de larvas de *Culex quinquefasciatus*.

Nota : As amostras foram submetidas a um SDS-PAGE a 8% sob condições semidesnaturantes e, após lavagens com triton 2,5% e incubação com o substrato a 37 °C por 20 min, os géis foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta. A banda catalítica correspondente à α -glicosidase Cqm1 de 83 kDa é exclusiva de larvas susceptíveis da colônia CqSF (S), em larvas resistentes ao *Bacillus sphaericus* da colônia CqRL1/2362 (R) esta banda não foi detectada.

8.3 Frequência do alelo *cqm1-d19* e da expressão do receptor Cqm1 em populações naturais

A padronização da técnica de PCR e dos ensaios bioquímicos *in gel* foram realizados e estas ferramentas aplicadas para determinar a frequência do alelo *cqm1-d19* e da expressão do receptor Cqm1 em amostras de larvas de populações naturais.

8.3.1 Populações de campo não tratadas

Nesta seção, foram agrupados os dados das três populações de campo não tratadas analisadas neste trabalho. A amostra da população de Varadouro, localizada na RMR, constituída de 259 indivíduos submetidos à PCR alelo-específica mostrou a presença de quatro larvas heterozigotas e um homozigota para o alelo *cqm1-d19* e a frequência deste alelo foi de $1,16 \times 10^{-2}$ (Tabela 4). O ensaio bioquímico mostrou que dentre 222 larvas avaliadas três delas não expressaram o receptor Cqm1 (Tabela 4). Este resultado reporta pela primeira vez a detecção de um alelo de resistência, neste caso o *cqm1-d19*, em uma população de *Cx. quinquefasciatus* não tratada com o Bsp. Dentre as três populações de campo não tratadas, Varadouro foi a que apresentou a frequência mais alta do alelo *cqm1-d19*.

A segunda população não tratada da RMR foi proveniente do bairro de Peixinhos. Foram analisados 192 indivíduos a partir da PCR diagnóstico e três foram heterozigotos para o alelo *cqm1-d19*. Nenhum indivíduo homozigoto resistente foi identificado nesta população (Tabela 4). A frequência observada do alelo de resistência foi de $7,81 \times 10^{-3}$. Em relação à expressão do receptor Cqm1, os 208 indivíduos analisados apresentaram a expressão desta molécula (Tabela 4).

A terceira população não tratada, Fazenda Nova, é caracterizada pelo seu isolamento geográfico das demais populações da Região Metropolitana. Além disso, em toda a região onde está localizada não há histórico de utilização de biolarvicidas. Foram avaliadas 265 larvas por PCR específica e o alelo de resistência para o Bsp *cqm1-d19* não foi detectado em nenhum indivíduo (Tabela 4). A avaliação do fenótipo de 297 larvas desta população corroborou os dados de frequência genotípica, pois a totalidade dos indivíduos expressou a α -glicosidase Cqm1 (Tabela 4).

A análise das frequências genotípicas observada e esperada, entre as três populações não tratadas, mostrou que Varadouro é a única que não está em equilíbrio, visto que o número de indivíduos heterozigotos observados está muito abaixo do esperado, em função da detecção de um indivíduo homozigoto resistente (Tabela 6).

8.3.2 População tratada de Água Fria

Um total de 515 larvas desta população foi analisado, em dois momentos do programa de controle de vetores realizado nesta área, para avaliar a frequência do alelo *cqm1-d19* através da PCR alelo-específica. Para avaliação da expressão do receptor Cqm1, um total de 399 larvas foi analisado nos dois períodos.

No primeiro momento da análise, correspondente a maio de 2005 após 13 tratamentos com o Bsp, foram detectados 37 indivíduos heterozigotos e 6 homozigotos para o alelo *cqm1-d19* de um total de 353 larvas analisadas, sendo a frequência do alelo de resistência de $6,94 \times 10^{-2}$ (Tabela 5). Dentre 237 larvas analisadas para avaliar a expressão do receptor Cqm1, duas não exibiram esta molécula (Tabela 5), confirmando a presença de indivíduos com o fenótipo resistente nesta população.

No segundo momento analisado, em abril de 2007 após 24 tratamentos com o Bsp, a frequência do alelo *cqm1-d19* foi semelhante àquela encontrada no primeiro ano de avaliação.

De um total de 162 indivíduos analisados, 16 foram heterozigotos e um apresentou o alelo de resistência em homozigose, e a frequência do alelo *cqm1-d19* foi de $5,55 \times 10^{-2}$. Uma larva resistente foi detectada dentre 162 indivíduos analisados para expressão do receptor Cqm1 (Tabela 5). As frequências encontradas para esta população foram muito mais elevadas em relação às populações não tratadas.

A análise das frequências genotípicas observada e esperada dos alelos *cqm1* e *cqm1-d19* mostrou que não há equilíbrio populacional para o gene *cqm1* no período de maio de 2005, visto que o número de homozigotos recessivos é bem maior que o esperado, enquanto que na segunda avaliação, em abril de 2007, a comparação das frequências mostrou que a população está em equilíbrio para este gene, apesar da pressão de seleção (Tabela 6).

Tabela 4 - Detecção dos alelos *cqm1* e *cqm1-d19*, através de PCR específica, e avaliação da expressão do receptor Cqm1 em larvas de *Culex quinquefasciatus* das populações de campo de Varadouro, Peixinhos e Fazenda Nova, que não foram expostas ao biolarvicida *Bacillus sphaericus*.

População	Genótipo				Frequência <i>cqm1-d19</i>	Fenótipo Cqm1		
	N	<i>cqm1/cqm1</i>	<i>cqm1/cqm1-d19</i>	<i>cqm1-d19/cqm1-d19</i>		N	Positivo	Negativo
Varadouro	259	254	4	1	$1,16 \times 10^{-2}$	222	219	3
Peixinhos	192	189	3	0	$7,81 \times 10^{-3}$	208	208	0
Fazenda Nova	265	265	0	0	0	297	297	0

Tabela 5 - Detecção dos alelos *cqm1* e *cqm1-d19*, através de PCR específica e avaliação da expressão do receptor Cqm1 em larvas de *Culex quinquefasciatus* da população de Água Fria tratada com o biolarvicida *Bacillus sphaericus* desde março de 2003. As avaliações foram feitas após 13 (maio/2005) e 24 (abril/2007) tratamentos.

Período	Genótipo				Frequência <i>cqm1-d19</i>	Fenótipo Cqm1		
	N	<i>cqm1/cqm1</i>	<i>cqm1/cqm1-d19</i>	<i>cqm1-d19/cqm1-d19</i>		N	Positivo	Negativo
Maio/2005	353	310	37	6	$6,94 \times 10^{-2}$	237	235	2
Abril/2007	162	145	16	1	$5,55 \times 10^{-2}$	162	161	1

Tabela 6 – Frequências genotípicas observadas (O) e esperadas (E) para os alelos *cqm1* e *cqm1-d19* em amostras de larvas de populações de *Culex quinquefasciatus* não tratadas^a e tratadas^b com o biolarvicida *Bacillus sphaericus*.

População	<i>cqm1/cqm1</i>		<i>cqm1/cqm1-d19</i>		<i>cqm1-d19/cqm1-d19</i>		Teste χ^2 *
	O	E	O	E	O	E	
Varadouro ^a	254	235,70	4	22,70	1	0,55	17,18
Peixinhos ^a	189	189,01	3	2,97	0	0,01	0,01
Fazenda Nova ^a	265	265,00	0	0,00	0	0,00	0,00
Água Fria – Maio/2005 ^b	310	305,96	37	45,35	6	1,68	12,68
Água Fria – Abril/2007 ^b	145	144,67	16	16,83	1	0,49	0,57

*Os valores observados para cada população são comparados ao χ^2 tabelado (3,841) com significância de 5%. Valores iguais ou acima de 6,635 rejeitam a hipótese nula, ou seja, que as frequências genotípicas O e E estão em equilíbrio. O número de graus de liberdade foi 1, referente ao número de classes observadas, duas neste caso, menos 1.

8.3.3 Identidade dos fragmentos amplificados por PCR

Para confirmar que os fragmentos amplificados a partir das amostras selecionadas da população de Água Fria correspondiam ao gene *cqm1* e não à contaminação com material exógeno, amostras de alguns indivíduos foram selecionadas para o seqüenciamento de seus respectivos fragmentos. Na Figura 9, pode-se verificar o alinhamento das seqüências destes fragmentos com o trecho correspondente no gene *cqm1* proveniente do DNA genômico de *Cx. quinquefasciatus* depositado no GenBank.

Seis indivíduos coletados nos dois momentos da análise em Água Fria foram selecionados. Destes, dois foram heterozigotos e quatro homozigotos para o alelo *cqm1-d19*. Todos os fragmentos seqüenciados tiveram sua identidade confirmada em relação ao gene *cqm1* (Figura 9). A seqüência 1 correspondente ao fragmento de 190 pb, amplificado a partir do alelo *cqm1*, foi oriunda dos indivíduos heterozigotos. As seqüências 2 e 3 correspondentes aos fragmentos de 171 pb, amplificados a partir do alelo *cqm1-d19*, foram provenientes dos dois indivíduos heterozigotos e dos quatro homozigotos resistentes, respectivamente. As seqüências foram idênticas, exceto por quatro alterações encontradas na seqüência 1 (Figura 9).

```

      10              20              30
1  A T G C A G G A C T T C A A A G A G G C T C A G C A G T T C DNA C. quinquefasciatus
1  A T G C A G G A C T T C A A A G A G G C T C A G C A G T T C Seqüência 1
1  A T G C A G G A C T T C A A A G A G G C T C A G C A G T T C Seqüência 2
1  A T G C A G G A C T T C A A A G A G G C T C A G C A G T T C Seqüência 3

      40              50              60
31 G A C A A C C G A G A T C C G A A C C G G A C G C C G A T G DNA C. quinquefasciatus
31 G A C A A C C G A G A T C C G A A C C G G A C G C C G A T G Seqüência 1
31 G A C A A C C G A G A - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - Seqüência 2
31 G A C A A C C G A G A - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - Seqüência 3

      70              80              90
61 C A G T G G G A C T C G T C G A C C A G T G C C G G G T T C DNA C. quinquefasciatus
61 C A G T G G G A C T C G T C G A C C A G T G C C G G G T T C Seqüência 1
42 C T G T G G G A C T C G T C G A C C A G T G C C G G G T T C Seqüência 2
42 C T G T G G G A C T C G T C G A C C A G T G C C G G G T T C Seqüência 3

      100             110             120
91 A G T A C C A A C A C C A A C A C C T G G C T C C G A G T T DNA C. quinquefasciatus
91 A G T A C C A A C A C C A A C A C C T G G C T C C G A G T T Seqüência 1
72 A G T A C C A A C A C C A A C A C C T G G C T C C G A G T T Seqüência 2
72 A G T A C C A A C A C C A A C A C C T G G C T C C G A G T T Seqüência 3

      130             140             150
121 C A T C C G G A C T A C G C T C G G T A C A A C G T A G A C DNA C. quinquefasciatus
121 C A T C C G G A C T A T G C T C G G T A C A A C G T A G A C Seqüência 1
102 C A T C C G G A C T A C G C T C G G T A C A A C G T A G A C Seqüência 2
102 C A T C C G G A C T A C G C T C G G T A C A A C G T A G A C Seqüência 3

      160             170             180
151 G T G A T G C A G A A G A A T C C A C A A A G T A C C T T C DNA C. quinquefasciatus
151 G T G A T G C A A A A G A A T T C A C A A A G T A C C T T C Seqüência 1
132 G T G A T G C A G A A G A A T C C A C A A A G T A C C T T C Seqüência 2
132 G T G A T G C A G A A G A A T C C A C A A A G T A C C T T C Seqüência 3

      190
181 C A C C A C T T C C DNA C. quinquefasciatus
181 C A C C A C T T C C Seqüência 1
162 C A C C A C T T C C Seqüência 2
162 C A C C A C T T C C Seqüência 3

```

Figura 9 – Seqüências de fragmentos amplificados por PCR específica a partir dos alelos *cqm1* e *cqm1-d19* de larvas de *Culex quinquefasciatus* da população de Água Fria.

Nota: Seqüência 1: fragmento de 190 pares de base amplificado a partir do alelo *cqm1* de um indivíduo heterozigoto. Seqüências 2 e 3: fragmentos de 171 pb amplificados a partir do alelo *cqm1-d19* de um indivíduo heterozigoto e um homozigoto resistente, respectivamente. O DNA de *Cx. quinquefasciatus* corresponde a um trecho de 190 pb da seqüência de referência *cqm1* depositada no GeneBank, número de acesso DQ333335. Quatro variações da seqüência 1 estão destacadas em negrito. A deleção de 19 nucleotídeos está tracejada e em negrito.

8.4 Análise do polimorfismo do gene *cqm1*

Foi possível obter a seqüência completa do gene *cqm1*, dos 15 indivíduos de Água Fria analisados neste trabalho, a partir da combinação de seis *primers* internos e de dois específicos para o plasmídeo pGEM-T Easy®. Treze alterações foram identificadas ao longo da seqüência de aminoácidos, nos resíduos 3, 8, 15, 141, 178, 246, 430, 439, 450, 466, 529, 541, 556 (Figura 10). A maioria destas variações ocorreu em regiões menos conservadas, exceto duas que foram em resíduos mais conservados, Pro246Ser e Tre430Ser (Figura 10). Todas as alterações de aminoácidos decorreram de mutações pontuais, exceto o resíduo Tre178Gln no qual uma inversão nas duas primeiras bases AC ↔ CA, determina uma treonina ou glutamina, respectivamente. Três alterações nos resíduos 141, 178 e 430 geram aminoácidos similares, ou seja, pertencentes à mesma classe, enquanto as outras dez levam à mudança na classe do aminoácido (Quadro 2).

O Quadro 2 contém todos os alelos identificados e, após a análise das seqüências e dos 13 resíduos polimórficos dos 15 indivíduos, dois alelos foram considerados predominantes. O alelo 1 caracteriza-se por uma dupla deleção (AT) no segundo íntron, enquanto o alelo 2 é caracterizado pela ausência desta deleção, além de um perfil de aminoácidos nos 13 resíduos polimórficos diferente do alelo 1 em todas as posições (Quadro 2). O segundo íntron, que havia sido previsto a partir da análise de seqüências do gene *cqm1* em ROMÃO et al. (2006), pôde ser confirmado neste trabalho e foi de 55 ou 57 pb. Os outros 11 alelos apresentaram variações entre as 13 posições, no entanto não foram totalmente idênticos ao alelo 1, 2 ou ao gene *cqm1* descrito anteriormente. Este, por sua vez, foi mais semelhante ao alelo 1 (Quadro 2). Outro dado interessante foi relacionado a um indivíduo que apresentou um terceiro alelo, a variante 9 (Tabela 8), além dos alelos 1 e 2, indicando que pode existir mais de um loco para o gene *cqm1*. Analisando os 13 resíduos na seqüência do gene *cpm1* de *Cx. pipiens*, que não contém a dupla deleção no 2º íntron (OPOTA et al., 2008) observou-se que este gene foi mais semelhante ao alelo 2 (Quadro 2).

Continuação

<i>Ae. aegypti</i> 3	307	RLYGKGD--R	KGAQIPFNFE	VLSNIYKDS	AKDFYTYVMR	FYEALP--QG	QFANWVILGNH	DNKRVASRLG	VARADLYNIA
<i>An. gambiae</i> 2	285	KYYGNET--V	PGAQIPFNFE	FITDLSKDS	AQDFLNTINY	WLDHMPPMDS	VVFNWVILGNH	DQHRVASRFG	EDMIDSMNMI
<i>An. gambiae</i> 3	304	RLFGNEV--S	EGAHIPFNFE	VLSNTFKDTT	GQQFYDNIKR	WLDVVP--EN	RFSNWWILGNH	DNKRVSRLG	VARADLYQIA
S T									
<i>Culex quinquefasciatus</i>	378	LHTLPCTSIT	YEGEEVAMOD	F-----	-----KEA	QQFDNRDPNR	TPMQWDSSTIS	AGFSTNTNTW	LRVHPDYARY
<i>Cx. pipiens</i>	378	MHTLPCTSIT	YEGEEVAMOD	F-----	-----KEA	QQFDNRDPNR	TPMQWDSSTIS	AGFSTNTNTW	LRVHPDYARY
<i>Anopheles gambiae</i> 1	387	LHTLPCTSIT	YEGEEIGMLD	F-----	-----KDA	QLYDNRDPNR	TPMQWDSSTIS	AGFSTNRTTW	LRLHPDYPTR
<i>Aedes aegypti</i> 1	382	LHTLPCTSIT	YEGEEIGMLD	Y-----	-----KEA	QTYDGRDPNR	TPMQWDGTTIS	AGFSTNATTW	LKVHPDYASL
<i>Ae. aegypti</i> 2	387	ILSLPGAVT	YQEEIGMTD	VHISWEETKD	PAACNAGEGL	YAEKSRDPCR	TPFQWDDSTL	AGFTNGSTTW	LPVGPDYRSV
<i>Ae. aegypti</i> 3	383	LNTLPCTIAVT	YNGDELAEMD	VYISWEDTVD	PAACNSNPRD	FMQYSRDPVR	APFQWDDSVS	AGFSSNPKTTW	LPVSPNYKQN
<i>An. gambiae</i> 2	363	MLSLPGVAVT	YNGEEIGMDD	VWISYNDTVD	PAACNAGPDR	YQYTRDPER	TPFQWDDSKN	AGFSTANHTW	LPVSPNYTLV
<i>An. gambiae</i> 3	380	LNVLPGVAVT	YNGDELAEMD	VFISWKDTID	PAACNSNPKD	YLLYSRDPVR	TPFQWDDSVS	AGFSTNRTTW	LPVASNYKTL
S Y									
<i>Culex quinquefasciatus</i>	442	NVDVMO-KNP	OSTFHFFQHL	TKLRRHRTMQ	SCEYVHKTVG	TKVYALLREL	RGEDSFLTIVL	NMAGAEDTVD	LGDFVN-LPQ
<i>Cx. pipiens</i>	442	NVDVMO-KNP	OSTFHFFQHL	TKLRRHRTMQ	SCEYVHKTVG	TKVYALLREL	RGEDSFLTIVL	NMAGAEDTVD	LGDFVN-LPQ
<i>Anopheles gambiae</i> 1	451	NVAMQE-AAE	KSTLKHFRIL	TALRRHPTLV	HGEFKHRTVG	PDVYAFSREL	HGEDTLVIVL	NMATSSRTVD	LGDFVN-LPE
<i>Aedes aegypti</i> 1	446	NVDLQQ-NAE	KSHFHFRAL	TSLRRHETMQ	NGDFLHRTVG	THVYALLREL	QGRDSFLTIVL	NVADKQYDAD	LGDFVN-LPE
<i>Ae. aegypti</i> 2	467	NVKIEN-GLE	KSHLKVKYKAM	MRLRESKTFQ	HGSVKARAVK	DNVFAIVREL	QNYNTYITLV	NLGSSIEVID	GIALASHLPS
<i>Ae. aegypti</i> 3	463	NYKIQK-SAP	RSHVKIFKSL	VRLRKQRTLR	EGTFEIKLVD	ENLLVYKREL	ADVSTIVVIL	NFHKSARTVN	LSEAFGLLEL
<i>An. gambiae</i> 2	443	NVEKQLVEYE	HSHLHVYRSI	VRMK-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>An. gambiae</i> 3	460	NYKAQK-AAP	RSHVKIEKAL	VRLRKQRTRR	N-----	-----	-----	-----	-----
K S M									
<i>Culex quinquefasciatus</i>	520	KMRVEVAQPN	SKSKAGNEVD	IGKLTLPYD	SVVLRATVSS	AAAINLSIGL	LLAIMARYIF	V	
<i>Cx. pipiens</i>	520	KMRVEVAQPN	SKSKAGNEVD	ISKLTLPYD	SVVLRATVSS	AAAINLSIGL	LLAIMARYIF	V	
<i>Anopheles gambiae</i> 1	529	RLTVEIAQPM	SNYKAGDEVD	IHQVTLQHD	SVVLRVVVSG	ASVVRLSLIV	ALLAAVEHLF	-	
<i>Aedes aegypti</i> 1	524	KMTVQVAQSN	STLKAGDVVE	ISKVTLGPYD	SIVLRA--SS	AAAIQLSLSV	VIALIVKYFL	V	
<i>Ae. aegypti</i> 2	546	KLRFVVGVN	SHHIRGGAVA	TNDILLPHE	SFVLRVAVSP	VDRLQESICE	TWLEQ-----	-	
<i>Ae. aegypti</i> 3	542	EFELITSSLQ	TNYIDGTVVD	RDQIVLPADA	ATVLEGNIKN	GV-----	-----	-	
<i>An. gambiae</i> 2	466	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	
<i>An. gambiae</i> 3	489	-----	-----DGNVAG	RR-----	-----	-----	-----	-	

Figura 10 – Alinhamento da sequência de aminoácidos do receptor Cqm1 da toxina binária do *Bacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus* com seqüências de maltases ortólogas.

Nota: Aminoácidos idênticos em mais de 60% das seqüências são destacados em preto, enquanto aminoácidos definidos como similares em mais de 60% das seqüências são realçados em cinza claro. As seqüências mostradas, depositadas no GenBank, são de *Culex quinquefasciatus* (número de acesso ABC59609.1), *Cx. pipiens* (número de acesso AAL05443.1), *Anopheles gambiae* 1; 2 e 3 (números de acesso ABW98683.1; XP_320159.3; XP_320155.3) e *Ae. aegypti* 1; 2 e 3 (números de acesso XP_001660909.; XP_001656785 e XP_001649784.). Foram identificados 13 resíduos polimórficos (em vermelho) nas seqüências de 15 indivíduos de *Cx. quinquefasciatus* da área de Água Fria e a substituição correspondente está em negrito acima do resíduo.

Alelos*	Resíduo da seqüência de aminoácidos													Deleção dupla no 2º íntron ^a
	3	8	15	141 ^d	178 ^d	246	430 ^d	439	450	466	529	541	556	
1	Pro	Gly	Met	Ala	Thr	Ser	Thr	Thr	Pro	His	Lys	Gly	Met	Sim
2	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Pro	Ser	Ala	Ser	Tyr	Asn	Ser	Thr	Não
V1	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Pro	Ser	Ala	Ser	Tyr	Asn	Gly	Thr	Não
V2	Thr	Ser	Thr	Ala	Gln	Pro	Ser	Ala	Ser	Tyr	Asn	Ser	Thr	Não
V3	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Ser	Ser	Ala	Ser	Tyr	Asn	Ser	Thr	Não
V4	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Pro	Thr	Thr	Pro	Tyr	Asn	Ser	Thr	Não
V5	Pro	Gly	Thr	Ala	Gln	Pro	Ser	Ala	Ser	Tyr	Asn	Ser	Thr	Não
V6	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Pro	Thr	Thr	Pro	His	Lys	Ser	Thr	Sim
V7	Pro	Gly	Thr	Val	Gln	Pro	Thr	Ala	Pro	His	Asn	Gly	Thr	Sim
V8	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Pro	Ser	Thr	Pro	His	Lys	Gly	Met	Sim
V9	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Pro	Thr	Thr	Pro	His	Lys	Gly	Met	Sim
V10	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Ser	Thr	Thr	Pro	His	Lys	Gly	Met	Sim
V11	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Ser	Thr	Thr	Pro	His	Lys	Gly	Met	Sim
<i>cqm1</i> ^b	Pro	Ser	Met	Ala	Thr	Ser	Thr	Ala	Pro	His	Asn	Gly	Thr	-
<i>cpm1</i> ^c	Pro	Ser	Thr	Ala	Ala	Pro	Thr	Ala	Pro	His	Asn	Ser	Thr	Não

Quadro 2 – Análise dos resíduos polimórficos identificados ao longo da seqüência de 580 aminoácidos do receptor Cqm1 da toxina binária do *Bacillus sphaericus* a partir do estudo de 15 larvas de *Culex quinquefasciatus* da área de Água Fria.

Nota: *Os alelos 1 e 2 foram predominantes entre as seqüências e os outros 11 foram resultantes de variações destes dois (V1-V11). ^aOs alelos 1 e 2 foram associados à presença ou não de uma dupla deleção no 2º íntron. ^bResíduos obtidos a partir da seqüência de aminoácidos depositada no GenBank sob o número de acesso ABC59609.1. ^cResíduos obtidos a partir da seqüência de aminoácidos depositada no GenBank sob o número de acesso AAL05443.1. ^dAminoácidos pertencentes a mesma classe.

9 DISCUSSÃO

O surgimento de populações de *Culex* resistentes ao *Bacillus sphaericus* é uma desvantagem em relação ao seu uso visto que sua ação depende da interação de apenas uma toxina, a Bin, com um sítio alvo, o receptor Cqm1. Estratégias para o manejo da resistência são essenciais para o sucesso dos programas de controle de insetos e a maioria destas é baseada em modelos que assumem uma baixa frequência inicial de alelos de resistência em uma dada população. Até o momento, a avaliação da susceptibilidade *in vivo* das populações de campo através de bioensaios é a ferramenta mais utilizada para avaliar o risco de seleção de resistência (GÉNISSEL et al., 2003; GOULD et al., 1997; SILVA-FILHA et al., 2008; TABASHNIK et al., 2000; WENES et al., 2006).

A primeira etapa deste trabalho consistiu em avaliar a susceptibilidade das populações de *Cx. quinquefasciatus* naturais, não tratadas e tratadas com o Bsp, a partir das concentrações letais deste biolarvicida para 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) das larvas, determinadas através de bioensaios. No caso específico de larvas de culicídeos, a avaliação da mortalidade é obtida a partir da resposta de *pools*, portanto não há avaliação individual de larvas para a resistência. A susceptibilidade das quatro populações analisadas não mostrou alteração significativa em relação à colônia de referência susceptível CqSF. Os valores da razão de resistência (RR), a partir da análise das CL₅₀, para as populações não tratadas de Varadouro, Peixinhos e Fazenda Nova foram iguais ou inferiores a 4,0. Os valores de RR obtidos a partir dos dados das CL₉₀ para estas populações foram perto de 1,0. Para a população tratada de Água Fria, os valores de RR para a CL₅₀ foram entre 2,7 e 8,6 após períodos variáveis entre 13 e 24 exposições ao Bsp. Estas alterações podem ser consideradas apenas variações naturais da susceptibilidade entre as populações ou também sugerir que um início do processo de seleção de resistência está ocorrendo em Água Fria, devido à exposição contínua ao Bsp (SILVA-FILHA et al., 2008). Assim como para as populações naturais não tratadas, os valores de RR em relação à CL₉₀ nos quatro momentos analisados em Água Fria foram cerca de 1,0. Este resultado indica que não estaria ocorrendo seleção de resistência na população, pois a presença de indivíduos resistentes na amostra deveria provocar o aumento da CL₉₀ do Bsp.

Um estudo realizado para avaliar a dominância da resistência às toxinas do Bt em duas espécies de lepidópteros apontou que concentrações baixas das toxinas favorecem a sobrevivência de indivíduos heterozigotos, enquanto altas doses matam tanto os indivíduos susceptíveis homozigotos quanto os heterozigotos (TABASHNIK et al., 2004). Esta hipótese

poderia explicar as alterações observadas na RR a partir da análise das CL_{50} das populações avaliadas neste trabalho. O aumento da CL_{50} pode estar correlacionado à sobrevivência de indivíduos heterozigotos submetidos a concentrações mais baixas do Bsp, utilizadas nos ensaios de toxicidade, o que não deve ter ocorrido quando a concentração utilizada do biolarvicida foi maior. Os dados obtidos a partir da frequência genotípica dos alelos *cqml* e *cqml-19*, comparados aos bioensaios, corroboram este achado, como será discutido posteriormente.

Valores de RR similares aos encontrados neste trabalho também foram identificados em uma população de *Cx. quinquefasciatus* que vem sendo tratada com o Bsp desde 2003 no rio Pinheiros, São Paulo. Os níveis de RR a partir análise das CL_{50} foram de 4,3 e 5,0 após 18 e 30 tratamentos, respectivamente (SILVA-FILHA et al., 2008). Uma avaliação da linha de base da susceptibilidade a partir da análise das CL_{50} e CL_{95} em populações de *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus* da Califórnia e do Chipre, antes da aplicação dos biolarvicidas Bsp e Bti, mostrou variações de 3 a 12 vezes na susceptibilidade ao Bti e em torno de cinco vezes para o Bsp (WIRTH et al., 2001). Outro estudo foi realizado em duas áreas metropolitanas de Nova Iorque, Siracusa e Albânia. A primeira área tem registro de uso do Bsp e Bti e mostrou uma RR de 3,1 e 33 vezes, respectivamente para estes biolarvicidas, enquanto em Albânia, onde há o registro da aplicação do Bti apenas, o valor de RR foi de 5 para este agente e houve uma redução de 1,7 vez para o Bsp (PAUL et al., 2005). As alterações encontradas na susceptibilidade do Bti neste estudo, por exemplo, provavelmente estão ligadas a variações naturais entre as populações, visto que este biolarvicida tem sido empregado por mais de duas décadas em outras áreas e nenhum registro de resistência foi feito até o momento (BECKER et al., 2003). Apesar dos dados sobre este tema serem escassos, eles indicam que a linha de base da susceptibilidade das populações aos biolarvicidas Bsp e Bti pode apresentar variações.

A detecção de diferentes níveis da susceptibilidade das populações alvo ao Bsp é importante, pois pode indicar que estas variações ocorrem naturalmente e por diversos motivos. Por esta razão, valores de RR menores que 10 obtidos a partir das CL_{50} não garantem, necessariamente, que está ocorrendo seleção da resistência na população e, assim, não devem ser considerados *per se* como indicadores deste processo (SILVA-FILHA et al., 2008). Uma alternativa para superar a limitação da interpretação dos dados de bioensaios obtidos através da resposta de dose-mortalidade de *pools* de larvas, além de possibilitar a detecção de indivíduos homozigotos resistentes, é a avaliação através de bioensaios diagnósticos individuais. Estes consistem em submeter larvas de *Cx. quinquefasciatus* do 4º estágio, individualmente, a uma única concentração alta do Bsp para, a partir da avaliação de

um grande número de larvas, possibilitar a identificação de indivíduos sobreviventes à dose diagnóstica, que potencialmente seriam homozigotos para a resistência. Esta abordagem vem sendo desenvolvida atualmente em nosso laboratório com a finalidade de obter informações mais precisas sobre a presença de indivíduos resistentes em amostras submetidas a bioensaios.

Além da avaliação da susceptibilidade de larvas do Bsp através de ensaios *in vivo*, a análise do receptor Cqm1 e do gene que o codifica é fundamental visto que o principal mecanismo de resistência ao Bsp em larvas de *Culex* é devido a uma falha na etapa de ligação da toxina Bin à α -glicosidase Cqm1 (NIELSEN-LEROUX et al., 1997, 2002; OLIVEIRA et al., 2004). Sabe-se que um dos fatores determinantes no processo da seleção de resistência é a frequência inicial de alelos *r*, bem como seu modo de herança em populações naturais expostas ao tratamento com o biolarvicida. Um exemplo deste aspecto foi demonstrado no estudo realizado por Mcgauhey e Beeman (1988), que mantiveram em laboratório cinco colônias do lepidóptero *Plodia interpunctella*, originadas de diferentes amostras de campo, sob forte pressão de seleção com o Bt. Após 40 gerações, a resistência em uma das colônias aumentou 250 vezes, enquanto este número foi de 15 vezes em outra linhagem, indicando que diferenças nas frequências iniciais de alelos *r* nestas populações seria a causa das variações de RR observadas.

Até o momento, quatro alelos do gene *cqm1* ou *cpm1* foram identificados portando mutações que levam à resistência de larvas de *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus* ao Bsp (DARBOUX et al., 2002, 2007; ROMÃO et al., 2006). No caso da colônia de laboratório resistente CqRL1/2362, utilizada como referência neste trabalho, uma deleção de 19 nucleotídeos foi identificada no gene *cqm1*. O alelo *cqm1-d19* está associado à ausência da α -glicosidase Cqm1 ligada ao epitélio intestinal das larvas, que pode ser identificada a partir de um ensaio enzimático simples. O perfil das larvas resistentes é semelhante ao de larvas sensíveis, exceto pela ausência da banda catalítica correspondente ao receptor Cqm1 (ROMÃO et al., 2006). O diagnóstico da resistência por PCR alelo-específica, que pode discriminar indivíduos heterozigotos, tem sido considerado como o método mais viável para detectar alelos de *r* a uma baixa frequência. Esta abordagem requer que os genes conferindo resistência sejam conhecidos e que alelos de indivíduos susceptíveis e resistentes possam ser distinguidos por variações na sequência de DNA (GAHAN et al., 2007). São várias as vantagens desta técnica em relação aos ensaios de susceptibilidade *in vivo* e a principal é a detecção de indivíduos heterozigotos em uma amostra, o que não pode ser obtido através de um bioensaio quando o modo de herança dos alelos *r* é recessivo. A partir da caracterização do alelo *cqm1-d19* na colônia CqRL1/2362, a segunda parte deste trabalho foi a padronização

das técnicas de PCR e dos ensaios enzimáticos *in gel* em larvas cujos genótipos e fenótipos eram conhecidos para o gene *cqm1*. Em seguida, amostras de larvas das populações naturais tratadas e não tratadas com o Bsp foram avaliadas com relação à frequência deste alelo, bem como para verificação da expressão do receptor Cqm1.

Os resultados obtidos a partir de testes com larvas das colônias de laboratório mostraram que o método da PCR alelo-específica é eficaz para a detecção do *cqm1-d19*. Este é facilmente discriminado do alelo *cqm1* em um gel de agarose, permitindo o diagnóstico de todos os genótipos possíveis. Os ensaios enzimáticos *in gel* corroboraram os testes de PCR e apresentam a vantagem de possibilitar a detecção de larvas resistentes, devido à ausência da α -glicosidase Cqm1, independente do alelo *r* relacionado. No caso da PCR alelo-específica, o estabelecimento de métodos para detecção dos outros alelos *r* descritos na literatura se faz necessário, visto que pode ocorrer mais de um evento de mutação no gene *cqm1* em populações naturais (DARBOUX et al., 2002, 2007; ROMÃO et al., 2006).

Até o momento, nenhum trabalho na literatura avaliou a frequência de um alelo de resistência a biolarvicidas em populações naturais de mosquitos. A maioria dos trabalhos é relacionada ao risco de seleção de resistência de insetos pragas às toxinas do Bt expressas em plantas transgênicas (plantas Bt) (GÉNISSEL et al., 2003; GOULD et al., 1997; TABASHNIK et al., 2000; WENES et al., 2006). No entanto, o método usado “F₂ screen”, baseado na avaliação da susceptibilidade *in vivo* de insetos em plantas Bt, pode subestimar a presença de alelos *r* devido a falsos negativos, ou por falhar em detectar os verdadeiros alelos que não podem ser identificados por este método (ZHAO et al., 2002). Até o momento, apenas dois trabalhos para detecção de alelos de resistência aos biolarvicidas foram realizados a partir do uso de ferramentas moleculares, como a PCR (GAHAN et al., 2007; TABASHNIK et al., 2006). Nestes casos, a detecção é precisa, pois um alelo *r*, conhecido e caracterizado, pode ser identificado de forma direta em populações naturais.

Neste estudo, foi identificado pela primeira vez, através da técnica de PCR, um alelo de resistência, previamente caracterizado em uma colônia de laboratório, em populações de *Cx. quinquefasciatus* de campo. O alelo *cqm1-d19* foi detectado em duas populações naturais não tratadas, Varadouro e Peixinhos, em uma frequência de $1,16 \times 10^{-2}$ e $7,81 \times 10^{-3}$ respectivamente. Nenhuma larva da população de Fazenda Nova apresentou o alelo *cqm1-d19* dentre 265 indivíduos analisados. Modelos genéticos têm assumido frequências iniciais de alelos de resistência no intervalo de 10^{-2} a 10^{-6} , baseados em suposições sobre o balanço entre mutação e seleção (ROUSH; MCKENZIE, 1986). As frequências do alelo *cqm1-d19* encontradas nas populações naturais não tratadas analisadas neste trabalho são altas,

considerando que são da ordem de 10^{-2} a 10^{-3} , e mostram que o monitoramento da resistência é parte fundamental de um programa de controle. Porém, é preciso levar em consideração que uma possível explicação para a alta frequência do alelo *cqm1-d19* em Varadouro e Peixinhos é a sua localização na RMR, onde vários bairros têm sido alvos de tratamentos com o Bsp desde 1990 (REGIS et al., 1995, 2000; SILVA-FILHA et al., 2001, 2008). A área tratada no bairro de Água Fria está localizada a aproximadamente cinco e três quilômetros dos bairros de Varadouro e Peixinhos, respectivamente. Este fato pode indicar a existência de um fluxo de material biológico, ovos e/ou larvas do mosquito, e conseqüentemente fluxo gênico, bem como a possibilidade de uma exposição prévia ao biolarvicida nestas populações. Estas hipóteses explicariam a maior frequência do alelo *cqm1-d19* nestas áreas, reforçando a adoção de uma análise prévia ao uso do Bsp. Por outro lado, a população de Fazenda Nova está isolada geograficamente desta região, 180 Km, e isso poderia explicar a não detecção do alelo *cqm1-d19* na amostra estudada. A análise nesta população será ampliada para confirmar se a frequência deste alelo, em uma área sem histórico de utilização com o Bsp, realmente seria menor em relação às populações da RMR.

Em relação à população de Água Fria, as frequências do alelo *cqm1-d19* após 13 e 24 tratamentos com o Bsp de $6,94 \times 10^{-2}$ e $5,55 \times 10^{-2}$, respectivamente, foram claramente superior às áreas não tratadas. No entanto, esta alta frequência do alelo não pôde ser associada às RR detectadas nos bioensaios, visto que as alterações observadas foram discretas. Este dado é importante, pois confirma a alta sensibilidade da PCR alelo-específica, e reforça a sua aplicação como método para avaliar a seleção da resistência em populações naturais. Os dados obtidos indicam que o alelo *cqm1-d19* está sob pressão de seleção na população de Água Fria, correlacionada ao tratamento com o Bsp por um longo período. As frequências do alelo *cqm1-d19* encontradas neste trabalho nas populações tratadas e não tratadas foram semelhantes a algumas obtidas a partir de análises de F_2 *screen*, para alelos *r* das toxinas Cry do Bt em populações de lepidópteros, na ordem de 10^{-2} a 10^{-3} (GÉNISSEL et al., 2003; GOULD et al., 1997; TABASHNIK et al., 2000; WENES et al., 2006). Nos dois estudos que aplicaram a PCR específica para detecção de alelos *r* em plantas Bt nas espécies de *P. gossypiella* e *H. virescens*, as frequências foram bem inferiores, na ordem de 10^{-4} a 10^{-5} (GAHAN et al., 2007; TABASHNIK et al., 2006).

Os dados de expressão do receptor Cqm1 obtidos através de ensaios enzimáticos corroboraram aqueles obtidos das frequências genótípicas, porém algumas inconsistências entre o genótipo e fenótipo de um mesmo indivíduo podem ocorrer. Deve-se lembrar que quatro eventos de mutação foram descritos para o gene *cqm1* (DARBOUX et al., 2002, 2007;

ROMÃO et al., 2006) e a PCR utilizada neste trabalho é para detecção de apenas um destes alelos. Portanto, existe a possibilidade de alguns indivíduos não apresentarem a banda catalítica correspondente ao receptor *Cqm1* e seus genótipos não discriminarem diferenças entre os alelos susceptível e resistente, pois o mecanismo que gera a ausência do *Cqm1* pode ser conferido por um alelo distinto do *cqm1-d19*. Adicionalmente, seria possível ocorrer a detecção de indivíduos resistentes que expressam o receptor *Cqm1* e o mecanismo de resistência não estar relacionado à ausência desta molécula no epitélio intestinal, como observado nas colônias SPHAE e TUNIS (NIELSEN-LEROUX et al., 1997, 2002).

A comparação das frequências genótípicas observadas e esperadas, utilizando o teste χ^2 , mostrou que a população de campo não tratada de Varadouro não estava em equilíbrio para o gene *cqm1*, devido ao baixo número de heterozigotos encontrados na amostra avaliada, mas se faz necessário uma análise de um número maior de indivíduos para confirmar ou não este resultado. Para a população de Água Fria, após 13 tratamentos, a amostra analisada não apresentou equilíbrio por causa do número alto de indivíduos homozigotos resistentes detectados, provavelmente por causa da forte pressão de seleção exercida no gene *cqm1*. Já na amostra analisada após 24 tratamentos (abril/07), há um equilíbrio populacional, apesar da alta frequência do alelo *cqm1-d19*. Uma possível explicação para tal fato foi o surgimento de problemas operacionais no tratamento desde o final de 2006, que poderia ter resultado em uma menor pressão de seleção neste período (DA SILVA, comunicação pessoal)¹. Além disso, outros agentes podem ter contribuído para a mudança nas frequências genótípicas, tais como o tamanho populacional, taxas de migração e mutação, seleção, existência de refúgios não tratados, entre outros.

Dada à existência de diferentes mutações no gene *cqm1* e *cpm1* que conferem resistência, a análise de seqüências do gene *cqm1* foi realizada na tentativa de identificar outros polimorfismos relacionados a este aspecto. A partir das análises de seqüências de 15 indivíduos de *Cx. quinquefasciatus* da população tratada de Água Fria (maio/07), foi caracterizada a ocorrência de dois alelos principais com base na substituição de 13 resíduos, um correlacionado à existência de uma dupla deleção no 2º íntron, e o outro à ausência desta deleção. Outros 11 alelos cujos polimorfismos são variações dos alelos 1 e 2, ocorrem em menor frequência na população. Romão et al. (2006) identificaram 16 substituições de aminoácidos entre as α -glicosidasas *Cqm1* e *Cpm1* das espécies de *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. pipiens*. Considerando que foram analisadas apenas larvas de *Cx. quinquefasciatus* de

¹Sinara Batista da Silva. Reunião de avaliação do Programa de Controle de Vetores da cidade do Recife, 2007.

uma mesma população, os dados deste trabalho mostram que o gene *cqm1* é altamente polimórfico. Outro ponto a ser destacado, mas que precisa ser confirmado, foi a identificação de três alelos distintos obtidos de um mesmo indivíduo o que sugere a presença de um segundo loco para o gene *cqm1*. Apesar das alterações que foram observadas nas seqüências analisadas não levarem à resistência das larvas por mecanismos já conhecidos, é importante ressaltar que sete das 13 mudanças de aminoácidos ocorreram na parte C-terminal da molécula, entre as posições 430 e 556, região onde foram descritos os pontos de mutação que levam à resistência via perda da âncora GPI (DARBOUX et al., 2002, 2007; ROMÃO et al., 2006). Algumas destas alterações poderiam levar à perda de funcionalidade da molécula a partir de mudanças estruturais no Cqm1, porém a presença de pelo menos cinco isoformas de α -glicosidases com funções sobrepostas compensaria alguma perda da atividade enzimática desta molécula, sem custos biológicos para o inseto (ROMÃO et al., 2006).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a maior sensibilidade da abordagem molecular sobre os bioensaios para avaliar o risco de seleção de resistência. De acordo com os dados dos ensaios de susceptibilidade de larvas de *Cx. quinquefasciatus* ao Bsp observando-se as RR, nenhuma das quatro populações analisadas apresentaria alterações na susceptibilidade *in vivo* que indicassem indiscutivelmente a seleção da resistência. A partir destes ensaios não foi possível detectar os indivíduos heterozigotos presentes nas amostras de larvas, sobretudo aquelas sob forte pressão de seleção como em Água Fria, que por sua vez foram identificados pela PCR alelo-específica. Este método foi preciso em revelar o estado real de seleção dos alelos *cqm1* e *cqm1-d19* nas populações analisadas. No caso da população de Água Fria, que vem sendo tratada desde 2003, a frequência do alelo *cqm1-d19* foi muito superior comparada às áreas não tratadas corroborando a hipótese do efeito da pressão de seleção sobre a população, devido aos tratamentos com o Bsp realizados nesta área. Não houve nenhuma análise prévia quanto ao *background* genético da resistência nesta população e a exposição prolongada ao biolarvicida, sem o uso de estratégias de manejo da resistência, como a aplicação de outro agente capaz de eliminar os indivíduos com genótipo resistente ao Bsp, explicam a frequência elevada do alelo *cqm1-d19*.

A premissa adotada pelos programas de controle que assume que a frequência inicial de alelos *r* é baixa não foi confirmada nas populações de Varadouro e Peixinhos. Estes dados, juntamente com outros obtidos a partir de estudos com plantas Bt, mostram que esta hipótese nem sempre é válida, devendo ser revisada para cada modelo e avaliada a partir de ferramentas que possam detectar diretamente alelos *r*. Portanto, as estratégias de manejo da resistência devem ser aperfeiçoadas e o uso de ferramentas moleculares para detecção direta

de alelos de *r* é um aspecto importante, sobretudo em modelos que esta característica é herdada de forma recessiva, devido à limitação do método de avaliação da susceptibilidade *in vivo* adotada na maioria dos casos.

Os resultados deste trabalho reforçam a adoção do Manejo Integrado de Vetores (MIV) que preconiza a aplicação de métodos para a redução da densidade de mosquitos que incluem soluções definitivas, sobretudo para a eliminação de criadouros reais e potenciais. Além disso, de acordo com o perfil de susceptibilidade das populações, que pode ser avaliado a partir da frequência inicial de alelos *r*, o uso de larvicidas específicos, em escala limitada, é outro ponto importante do MIV. Como foi possível avaliar a partir dos dados de frequência alélica deste trabalho, o uso do Bsp em rotação com o Bti é necessário, visando eliminar os indivíduos com genótipo resistente para o Bsp, em face da ausência de resistência cruzada com este agente (MULLA et al., 2003; SILVA-FILHA; REGIS, 1997). O monitoramento da resistência através de ferramentas precisas para detecção de alelos *r* em baixas frequências antes e durante o tratamento com o biolarvicida é essencial para o uso sustentável do agente de controle. A produção de biolarvicidas contendo como princípio ativo combinações de diferentes toxinas é outra abordagem interessante para evitar ou retardar o surgimento da resistência e que está em fase de desenvolvimento de modo similar ao que ocorre em cultivares mais recentes de Bt que expressam duas toxinas (ZHAO et al., 2003). Por fim, a conscientização e participação das comunidades envolvidas em programas de controle bem como incentivo dos setores públicos e privados são essenciais para que, juntamente com as outras ações, possam promover o êxito de programas de controle de mosquitos vetores.

10 CONCLUSÕES

- O alelo *cqm1-d19* foi detectado em duas populações naturais não tratadas da Região Metropolitana do Recife em uma frequência elevada.
- Na população de Fazenda Nova, o alelo não foi identificado sugerindo que em áreas sem nenhum histórico de utilização do Bsp a frequência do alelo é mais baixa.
- Na população de Água Fria, área tratada com o Bsp, a frequência do alelo *cqm1-d19* foi 5,0 e 8,0 vezes mais elevada, em relação às populações não tratadas de Varadouro e Peixinhos, respectivamente, devido à pressão de seleção naquela área.
- A PCR específica para detecção do alelo *cqm1-d19* é uma ferramenta mais sensível, comparada aos bioensaios, para identificar indivíduos heterozigotos e homozigotos resistentes ao Bsp.
- O gene *cqm1* é altamente polimórfico principalmente na região C-terminal do receptor Cqm1, na qual foram encontradas mutações relacionadas à resistência previamente.
- A adoção do uso do Bsp associado a outro agente de controle, como o Bti, é essencial para a sustentabilidade do programa de controle de vetores.
- O monitoramento da susceptibilidade ao Bsp em populações de *Cx. quinquefasciatus* deve ser realizado, quando possível, a partir de ferramentas moleculares associadas aos bioensaios.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, L. B. et al. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure. **Biol. Control**, San Diego, v. 42, n. 2, p. 155-160, 2007.
- ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N. F₂ screen for rare resistance alleles. **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 9, p. 572-578, 1998.
- ANDOW, D. A. et al. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in an Iowa population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 93, n. 1, p. 26-30, 2000.
- ANDREADIS, S. S. et al. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in Greek and Spanish population of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 100, n. 1, p. 195-201, 2007.
- ANSTEAD, J. A. et al. High-throughput detection of knockdown resistance in *Myzus persicae* using allelic discriminating quantitative PCR. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 871-877, 2004.
- AQUINO-DE-MURO, M.; PRIEST, F. G. A colony hybridization procedure for the identification of mosquitocidal strains of *Bacillus sphaericus* on isolation plates. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 63, p. 310-313, 1994.
- AYRES, C. F. J. et al. Genetic diversity in brazilian populations of *Aedes albopictus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 6, p. 871-875, 2002.
- BARBOSA, R. M. R. Aperfeiçoamento e avaliação de armadilha de oviposição BR-OVT para *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae). 2007. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2007, 160 p.
- BARBOSA, R. M. et al. Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 4, p. 523-529, 2007.
- BAUMANN, L.; BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 170, p. 2045-2050, 1988.

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

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

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

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

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

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

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **West Nile Virus**. Atlanta, 2006. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/niosh/topics/westnile/>>. Acesso em: 8 mar. 2007.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DE MELO, J. V. et al. Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. **Micron**, Oxford, 2008.
Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/09684328>>. Acesso em: 20 mar. 2008.

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

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

GEORGHIU, G. P. et al. Characterisation of resistance of *Culex quinquefasciatus* to the insecticidal toxins of *Bacillus sphaericus* (strain 2362). In: MOSQUITO CONTROL RESEARCH, 1992, Berkeley. **Annals**. Berkeley: University of California, 1992. p. 34-35.

GEORGHIU, G. P.; LAGUNES-TEJEDA, A. The occurrence of resistance to pesticides in arthropodes. **Food Nutr. Agric.**, Roma, p. 318, 1991.

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

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

JAMROZ, R. C. et al. Role of the *kdr* and super-*kdr* sodium channel mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 1031-1037, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

_____. **Lymphatic filariasis: the disease and its epidemiology**. Geneva, 2006. Disponível em: <http://www.who.int/lymphatic_filariasis/epidemiology/en/>. Acesso em: 26 dez. 2007.

_____. **Report on the workshop on the large scale-use of *Bacillus sphaericus* to control *Culex quinquefasciatus* in urban environments**. Maroua, 1993.

OPOTA, O. et al. Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, 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*. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 79, p. 135-136, 2002.

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

PAUL, A. et al. Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, Fresno, v. 21, n. 3, p. 305-309, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

ROMÃO, T. P. A. 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.

ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Ann. Rev. Entomol.**, Palo Alto, v. 32, p. 361-380, 1986.

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

SILVA-FILHA, M. H. N. L.; CHARLES, J.-F.; NIELSEN-LEROUX, C. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp mosquito larvae. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 247, p. 754-761, 1997.

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

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

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

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

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

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

SINÈGRE, G. et al. First field occurrence of *Culex pipiens* resistance to *Bacillus sphaericus* in southern France. In: EUROPEAN MEETING OF THE SOCIETY OF VECTOR ECOLOGY, 8., 1994, Barcelona. **Abstracts**. Barcelona: Society of Vector Ecology, 1994, p. 17.

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

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

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

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

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

STUMP, A. D. et al. Dynamics of the pyrethroid knockdown resistance allele in western Kenyan populations of *Anopheles gambiae* in response to insecticide-treated bed net trials. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 70, n. 6, p. 591-596, 2004.

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

_____. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 97, n. 24, p. 2980-12984, 2000.

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

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

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

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

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

- WEI, S.; CAI, Q.; YUAN, Z. Mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* induces stronger delayed effects than binary toxin on *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 43, n. 4, p. 726-730, 2006.
- WEISER, J. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. **Zent. bl. Mikrobiol.**, Jena, v. 139, p. 57-60, 1984.
- WICKREMESINGHE, R. S. B.; MENDIS, C. L. *Bacillus sphaericus* spore from Sri Lanka demonstrating rapid larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus*. **Mosq. News**, New York, v. 40, p. 387-389, 1980.
- WILLIAMSON, M. S. et al. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 252, n. 1-2, p. 51-60, 1996.
- WIRTH, M. C. et al. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 37, p. 534-540, 2000.
- _____. Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 73, n. 19, p. 6066-6071, 2007.
- WIRTH, M. C.; FERRARI, J. A.; GEORGHIOU, G. P. Baseline susceptibility to bacterial insecticides in populations of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from the Mediterranean Island of Cyprus. **J. Econ. Entomol.**, College Park, v. 94, n. 4, p. 920-928, 2001.
- YUAN, Z. M.; ZHANG, Y. M.; LIU, E. Y. High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. **Biocontrol Sci. Technol.**, Abingdon, v. 10, p. 43-51, 2000.
- YUAN, Z. M. et al. Identification and molecular structural prediction analysis of a toxicity determinant in the *Bacillus sphaericus* crystal larvicidal toxin. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 268, n. 9, 2751-2760, 2001.
- XU, Q. et al. *Kdr* allelic variation in pyrethroid resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* (S.). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 345, n. 2, p. 774-780, 2006.

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

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

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

APÊNDICES

Apêndice A – Artigo 1



A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its α -glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*

Tatiany Patrícia Romão¹, Karlos Diogo de Melo Chalegre¹, Shana Key¹, Constância Flávia Junqueira Ayres¹, Cláudia Maria Fontes de Oliveira¹, Osvaldo Pompílio de-Melo-Neto² and Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha¹

¹ Department of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz, Recife-PE, Brazil

² Department of Microbiology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz, Recife-PE, Brazil

Keywords

Bacillus sphaericus; binding site; *Culex quinquefasciatus*; α -glucosidase; resistance

Correspondence

M. H. N. L. Silva-Filha, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Avenue Moraes Rêgo s/n Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil 50670-420
Tel: +55 81 21012553
Fax: +55 81 34532449
E-mail: mhneves@cpqem.fiocruz.br

Note

Nucleotide sequence data has been submitted to the GenBank database under the accession number DQ333335.

(Received 15 December 2005, revised 27 January 2006, accepted 13 February 2006)

doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05177.x

The entomopathogen *Bacillus sphaericus* is an important tool for the vector control of *Culex* sp., and its effectiveness has been validated in field trials. The appearance of resistance to this bacterium, however, remains a threat to its use, and attempts have been made to understand the resistance mechanisms. Previous work showed that the resistance to *B. sphaericus* in a *Culex quinquefasciatus* colony is associated with the absence of the \approx 60-kDa binary toxin receptor in larvae midgut microvilli. Here, the gene encoding the *C. quinquefasciatus* toxin receptor, Cqm1, was cloned and sequenced from a susceptible colony. The deduced amino-acid sequence confirmed its identity as an α -glucosidase, and analysis of the corresponding gene sequence from resistant larvae implicated a 19-nucleotide deletion as the basis for resistance. This deletion changes the ORF and originates a premature stop codon, which prevents the synthesis of the full-length Cqm1. Expression of the truncated protein, however, was not detected when whole larvae extracts were probed with antibodies raised against an N-terminal 45-kDa recombinant fragment of Cqm1. It seems that the premature stop codon directs the mutated *cqm1* to the nonsense-mediated decay pathway of mRNA degradation. In-gel assays confirmed that a single α -glucosidase protein is missing from the resistant colony. Further *in vitro* affinity assays showed that the recombinant fragment binds to the toxin, and mapped the binding site to the N-terminus of the receptor.

Culex quinquefasciatus has an important role in the spread of diseases world wide, and, in Brazil, this species is the major vector of lymphatic filariasis which remains an endemic disease in some urban areas. The status of *Culex* sp. as a disease vector has greatly increased in recent years *vis a vis* the spread of the West Nile virus in the Americas. Adequate strategies of vector control are essential to interrupt disease transmission, and the search for effective control agents has shown that the use of bacterial larvicides is an alternative for overcoming

the negative effects of synthetic insecticides commonly used in mosquito control programs. *Bacillus sphaericus* is the most successful biological larvicide commercially available to control *Culex*. Field trials have proved its effectiveness for reducing population density in areas where *Culex* is a source of nuisance or vector of diseases [1–3]. The most important *B. sphaericus* features are its selective spectrum of action, extended persistence in the breeding sites and the facilities for its large-scale production, storage and spraying.

Abbreviations

BBMF, brush border membrane fraction; Bin, binary; GPI, glycosylphosphatidylinositol; NMD, nonsense-mediated decay.

Attempts to select *Culex* colonies under strong selection pressure with *B. sphaericus* strains 2362 and C3-41 demonstrated the potential for development of larvae resistance, under laboratory conditions [4–6]. The occurrence of resistance among field *Culex* populations submitted to intensive *B. sphaericus* treatment has also been recorded [7–11]. The heterogeneous levels of resistance attained by selected populations reported in those studies are due to multiple factors that might modulate the evolution of resistance, such as initial gene frequency, selection pressure, treatment strategy and population dynamics. Nevertheless, data clearly indicate the need to fully elucidate the mode of action of *B. sphaericus* and the molecular basis of resistance.

The major toxic factor accounting for the insecticidal activity of *B. sphaericus*-based biolarvicides is the protein crystal produced during sporulation [12,13]. The crystal contains the binary (Bin) protoxin, composed of two polypeptides of 42 kDa (BinA) and 51 kDa (BinB) which act in synergy [14–16]. When ingested by larvae, the crystal is solubilized at the alkaline pH of the midgut and the protoxin is released into its lumen. Gut proteinases convert the BinA and BinB subunits into toxic fragments of 39 and 43 kDa, respectively [17–19]. The Bin toxin binds specifically to a single class of receptors in the apical membrane of midgut epithelium, through the BinB subunit, and the BinA subunit is related to toxic effects to the cells after binding [20,21]. The major cytological effects observed in the gut epithelium of *Culex* larvae after *B. sphaericus* ingestion are disruption of microvilli, vacuolization, alteration in mitochondria, and damage to muscular and neural tissues [22,23]. The post-binding events are not completely elucidated, but there is evidence that the Bin toxin acts on the epithelial cell by forming pores in the membrane [24,25].

Binding of the Bin toxin to receptors from the midgut brush border membrane fraction (BBMF) is a requirement for *in vivo* toxicity, as it has been demonstrated that Bin toxin shows high affinity and saturable binding to the BBMF of susceptible species from the genera *Culex* and *Anopheles*. *Aedes aegypti*, a naturally refractory species, does not show a similar BBMF-binding profile [26–28]. The receptor in *Culex pipiens* larvae, Cpml, has been characterized as a 60-kDa α -glucosidase attached to the apical membrane of midgut epithelium by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor [29,30]. Among *Culex*-resistant colonies already investigated, the most common resistance mechanism is the failure of the Bin toxin to bind to receptors from larvae BBMF [11,28,31–33]. The first report concerning the molecular basis of *B. sphaericus* resistance was described for the *C. pipiens* GEO colony, which was

selected under laboratory conditions and displayed a high level of resistance to the strain 2362 [5]. This resistance was related to a failure of Bin toxin to bind to midgut receptors [32], and a single nucleotide mutation in the receptor gene sequence was identified as being the basis for the resistance [34].

In order to overcome the selection of resistance to *B. sphaericus* among treated populations, develop tools to monitor larvae susceptibility and improve *B. sphaericus* activity, it is essential to understand the full range of potential resistance mechanisms available in susceptible species. The major goal of this work was to investigate the molecular basis for the high level resistance to *B. sphaericus* strain 2362, developed by a *C. quinquefasciatus* laboratory colony.

Results

Identification of proteins in larvae BBMF that bind specifically to Bin toxin

As an initial approach to identify the molecular basis for the resistance of CqRL1/2362 larvae to the Bin toxin, we performed an assay aimed at identifying proteins differentially expressed in the midgut microvilli from CqSF-susceptible and CqRL1/2362-resistant larvae, which might specifically bind to the Bin toxin. Briefly, this assay consisted of solubilizing proteins present in midgut BBMF with CHAPS, followed by incubation with Bin toxin immobilized on Sepharose beads (Bin-beads). Proteins that specifically bound to the Bin-beads were visualized through immunodetection.

The yield of larval midgut BBMF preparation solubilized with CHAPS (CHAPS-extract) was assessed before use in the affinity assay. BBMF from CqSF and CqRL1/2362 colonies showed a similar enrichment of leucine aminopeptidase (α -aminoacyl-peptide hydrolase, EC 3.4.11.1) and α -glucosidase (α -D-glucoside glucosylhydrolase, EC 3.2.1.20) activities, about fourfold and threefold, respectively. CHAPS-extract from each colony was incubated with the Bin-beads, either in the absence or presence of an excess of free soluble Bin toxin. Proteins remaining bound to the beads after two washes in NaCl/P_i buffer were analyzed by immunoblotting (Fig. 1). Several proteins bound nonspecifically to the beads, from both CqSF and CqRL1/2362 extracts, which could be detected by the anti-BBMF sera. Binding of these proteins was not affected by the presence/absence of free toxin as competitor. A single \approx 60-kDa protein band, present in extracts from the CqSF colony, bound specifically to the Bin-beads (Fig. 1, CqSF -). The specificity was demonstrated by

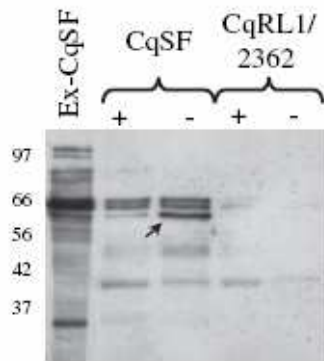


Fig. 1. Immunoblotting of midgut microvilli proteins from *C. quinquefasciatus* larvae bound to immobilized *B. sphaericus* binary (Bin) toxin. CHAPS-solubilized midgut microvilli extracts from CqSF and CqRL1/2362 larvae were incubated with immobilized Bin toxin, in the presence (+) or absence (-) of an excess of the free toxin. After incubation the Bin-beads were rinsed, and the bound proteins eluted in SDS/PAGE sample buffer. These proteins were then subjected to SDS/PAGE (10% gel), transferred to ECL® membrane and incubated with an antiserum raised against total midgut microvilli proteins. Ex-CqSF, CHAPS-extracts from CqSF before incubation with Bin-beads. The arrow indicates the 60-kDa receptor. On the left, molecular mass markers are shown in kDa.

a strong reduction of the affinity-bound protein when incubation was performed in the presence of an excess of free Bin toxin (Fig. 1, CqSF +). No similar protein from the resistant CHAPS-extract bound to the immobilized Bin toxin (Fig. 1, CqRL1/2362 -). This result is compatible with the \approx 60-kDa protein being the receptor for the Bin toxin in the CqSF larvae and its absence from the CqRL1/2362 extracts probably being involved in the resistance mechanism.

Amplification of the gene encoding the putative Bin toxin receptor and detection of its mRNA through RT-PCR

The results from Fig. 1 are consistent with the resistance mechanism in the *C. quinquefasciatus* CqRL1/2362 colony targeting the 60-kDa α -glucosidase receptor previously characterized from *C. pipiens* and encoded by the *cpm1* gene [30]. To clone the *cpm1* ortholog from *C. quinquefasciatus* (hereafter called *cqm1* for *Culex quinquefasciatus* maltase 1) and identify any differences in its sequence from CqSF and CqRL1/2362 individuals, two sets of DNA fragments (using the primer pairs 1-3 and 2-7), containing most of the protein coding sequence, were amplified by PCR using total genomic DNA obtained from the two colonies (Fig. 2A). Subsequent sequencing yielded the near full-length sequences for the gene from both

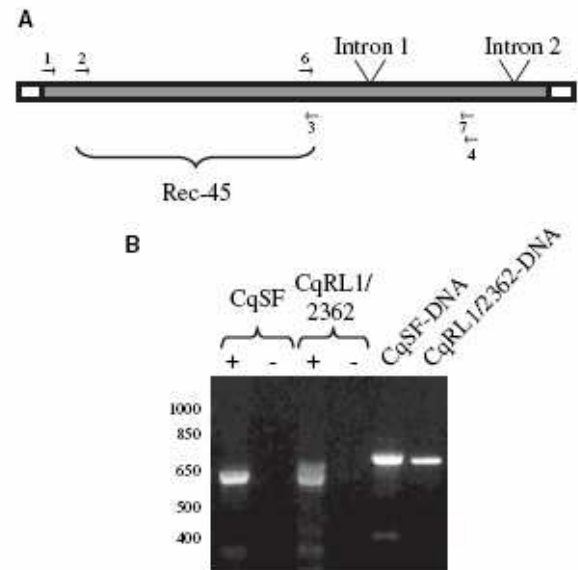


Fig. 2. Detection of the *cqm1* mRNA in larvae from *C. quinquefasciatus* CqSF and CqRL1/2362 colonies through RT-PCR. (A) Scheme of the full-length *cqm1* gene showing the relative position of the various primers used for PCR and RT-PCR. Highlighted is the fragment used to produce the recombinant Rec-45 protein, as well as the position of the two introns conserved in the *An. gambiae* and *D. melanogaster* orthologs. (B) Detection of the *cqm1* receptor mRNA in *C. quinquefasciatus* samples extracted from CqSF and CqRL1/2362 fresh larvae. Purified mRNA and primer 4 were used in parallel reverse transcription reactions carried out in the presence (+) or absence (-) of the reverse transcriptase enzyme. These were followed by PCRs with the primer pair 6-7. As positive control, genomic DNA from both sets of larvae were used in the same PCRs. On the left, molecular mass markers are shown in bp.

colonies (see below). Two other combinations of primers (2-3 and 6-7) were also used to assay the expression of *cqm1* in both larvae samples. The primer pair 2-3 generated identical PCR fragments of \approx 900 bp through both PCR and RT-PCR reactions with samples from the two susceptible and resistant colonies (not shown). In contrast, amplification using the primer association 6-7 yielded bands of slightly different sizes from the genomic DNA (\approx 670 bp) and cDNA (\approx 620 bp) samples (Fig. 2B). This difference is compatible with the presence of an intron, within the region encompassed by these primers, predicted due to its presence in genomic sequences coding for putative α -glucosidase orthologs from both *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. The difference in sizes of the fragment was useful to confirm the mRNA origin of the shorter band. Again, no differences were seen between fragments generated using mRNA derived

T. P. Romão et al.

Culex resistance to *Bacillus sphaericus*

from either of the two colonies. Overall these results show the presence of the receptor gene, and confirm the expression of its mRNA in both susceptible and resistant larvae.

Sequencing of *cqm1* and mapping mutations associated with resistance to Bin-toxin

The final complete sequence from the *cqm1* cDNA for the two susceptible CqSF and resistant CqRL1/2362 colonies was successfully obtained through the cloning and sequencing of a combination of various genomic PCR fragments (Fig. 2), as well as fragments generated through 5' and 3' RACE using purified mRNA. For every selected PCR fragment used, at least two clones were sequenced to confirm its accuracy. Except for the very 5' end of the sequence derived from the resistant colony, which comprises only the 5' untranslated region (UTR) and was not obtained because of failure of the 5' RACE, identical groups of fragments were sequenced from both sets of individuals. The complete *cqm1* sequence obtained from the CqSF colony includes 32 bp of the 5' UTR, an ORF 1743 bp long, a 50-bp intron (not shown) and the 3' UTR (Fig. 3). The intron was identified by comparing the RACE cDNA sequences with those derived from the genomic PCR fragments. Its presence confirms the results obtained from genomic PCR and mRNA RT-PCR performed with primers 6–7 as shown in Fig. 2. The 3' UTR was found to vary from 54 to 76 bp. This might be associated with the occurrence of two possible polyadenylation signals, a consensus AATAAA and a variant AATTAG (Fig. 3, in boldface). In the various RACE 3' ends sequenced, four different polyadenylation sites were found (Fig. 3, arrows).

To identify mutations associated with the Bin-toxin resistance phenotype, the resulting *cqm1* sequences from the CqSF and CqRL1/2362 colonies were compared and a 19-nucleotide segment was found to be absent from the sequence derived from the resistant colony (Fig. 3, boxed). This deletion, comprising nucleotides 1257–1275 from the CqSF *cqm1* gene, is accompanied by single-nucleotide substitutions immediately upstream and downstream of the deleted segment. It changes the reading frame for the 28 succeeding amino acids and originates a premature stop codon in position 1362. The resulting coding sequence encodes a truncated 437-amino acid long polypeptide. Another single-nucleotide replacement, G to C at position 155, was also found in the sequence derived from the resistant colony, but it does not lead to the substitution of the encoded amino acid (a proline). These findings implicate the 19-nucleotide

deletion in the resistance mechanism to the Bin toxin in the *C. quinquefasciatus* colony.

Sequence alignment comparing Cqm1 orthologs from related organisms

The *cqm1* sequence encodes a protein of 580 amino acids. Within the ORF, a total of 84 nucleotide differences were found between the CqSF sequence and that of the *C. pipiens cpm1* cDNA, with a total of 16 amino-acid substitutions in the deduced protein (Fig. 4). Overall, Cqm1 and Cpm1 share an identity of 97% at the amino acid level. To identify conserved elements present in orthologs from related dipteran, a protein sequence alignment was performed comparing both Cqm1 and Cpm1 with the nearest homologs identified within the databases generated by the *An. gambiae* and *D. melanogaster* genomes. A partial fragment obtained from a putative *Ae. aegypti* ortholog (251 amino acids from the C-terminal region) was also included in the alignment (Fig. 4). Overall, the alignment indicates a strong degree of conservation between the dipteran maltases orthologs, with the *Ae. aegypti*, *An. gambiae* and *D. melanogaster* proteins displaying identities of 70%, 78% and 65%, respectively, to Cqm1.

Investigation of the Bin toxin binding properties of a 45-kDa recombinant fragment of Cqm1

To further characterize the interaction between the Bin toxin and its Cqm1 receptor, expression of the PCR fragment generated by the primer association 2–3 was attempted in *Escherichia coli* after its cloning in the plasmid vector pRSETC. This fragment encodes a polypeptide encompassing amino acids 32–320 of the full-length Cqm1 sequence and contains three of the four conserved blocks of amino acids described for α -glucosidases [35]. The recombinant His-tagged protein (Rec-45) was then expressed. It migrates in gel as a stable 45-kDa protein (Fig. 5A, left panel). Both PCR fragments derived from the CqSF and CqRL1/2362 genomic DNA were used to generate Rec-45, which was subsequently purified by affinity chromatography and used for the production of rabbit polyclonal serum. The Rec-45 antibodies recognized specifically the recombinant protein as well as a 60-kDa protein from a sample of CqSF CHAPS-extract (Fig. 5A, right panel).

The availability of the Rec-45 recombinant protein led us to investigate its potential to bind the Bin-beads, despite its lack of most of the wild-type protein's C-terminal half and its first 31 amino acids. Affinity

Culex resistance to *Bacillus sphaericus*

T. P. Romão *et al.*

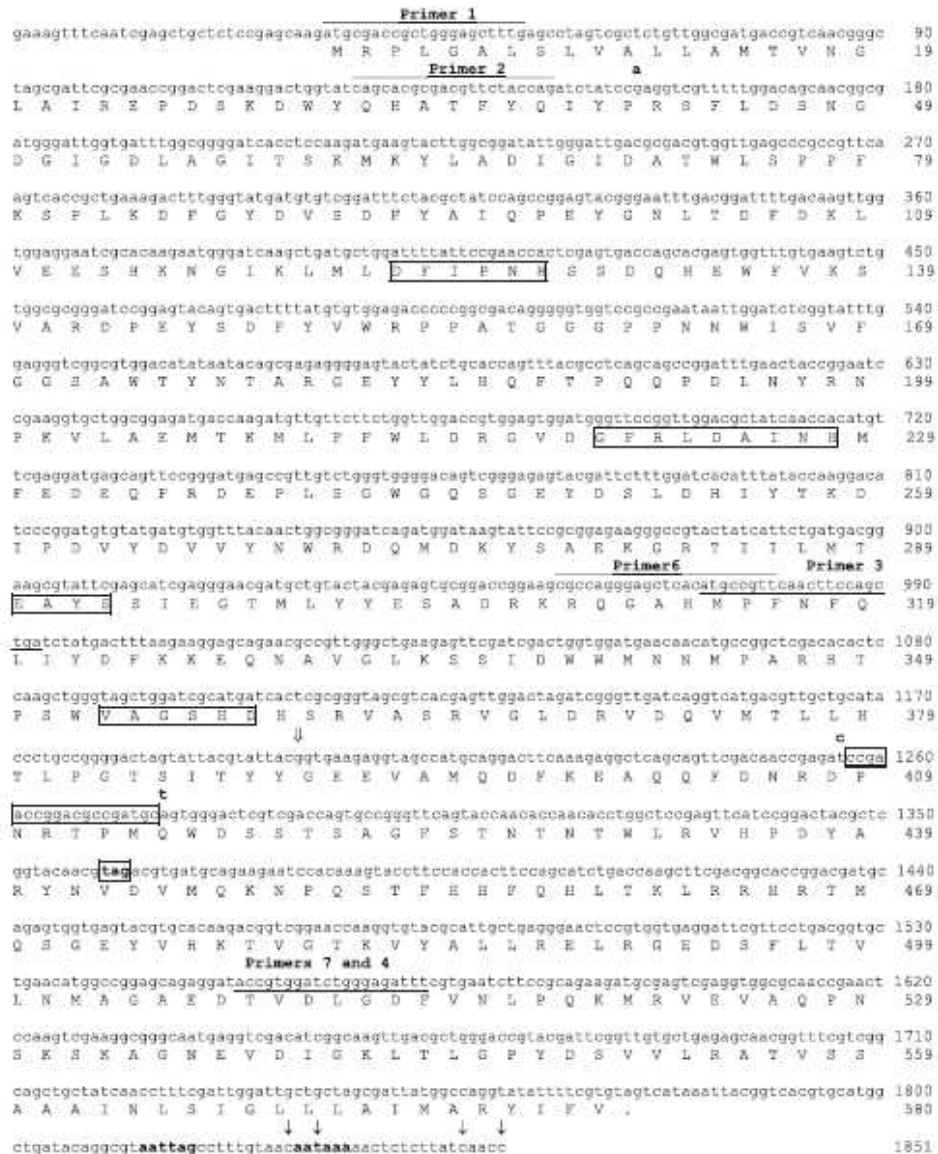


Fig. 3. Nucleotide and deduced amino-acid sequence of the *B. sphaericus* binary toxin receptor gene, *cqm1*, from *C. quinquefasciatus* larvae. The full-length sequences obtained for both Bin toxin susceptible and resistant colonies were derived from sequencing of the PCR fragments generated with the primer sets 1–3 and 2–7 (see Fig. 2) and the RACE fragments obtained using primers 3 (for the 5' end) and 6 (3' end). Numbers on the right indicate the nucleotides (above) and amino acids (below). Oligonucleotides used in the PCR reactions are overlined (5' primers) or underlined (3' primers). The four conserved blocks of amino acids typical of α -glucosidases [35] are boxed. The location of the identified intron, 50 nucleotides long and conserved in *An. gambiae* and *D. melanogaster* ortholog sequences, is indicated by a double arrow in position 1199. The 19-nucleotide deletion found in the gene sequence of resistant larvae from CqRL1/2362 colony is boxed. The location of the subsequent translation stop codon is boxed in bold. The two nucleotide substitutions flanking the deletion, as well as the G to A substitution in the resistant colony in position 155, are shown in bold on top of the sequence. The two polyadenylation signals are in bold and the various poly(A) addition sites are indicated by arrows. The full-length *cqm1* cDNA sequence from the CqSF colony has been deposited in GenBank under the accession number DQ333335. At least two different plasmid clones from each fragment were used in the sequencing. Most of the sequences were obtained from both strands of the DNA clones. Exceptions were the sequences from the 5' and 3' ends of the cDNA. These were obtained from the sequencing of one strand of multiple DNA clones, which yielded identical results.

T. P. Romão *et al.*

Culex resistance to *Bacillus sphaericus*

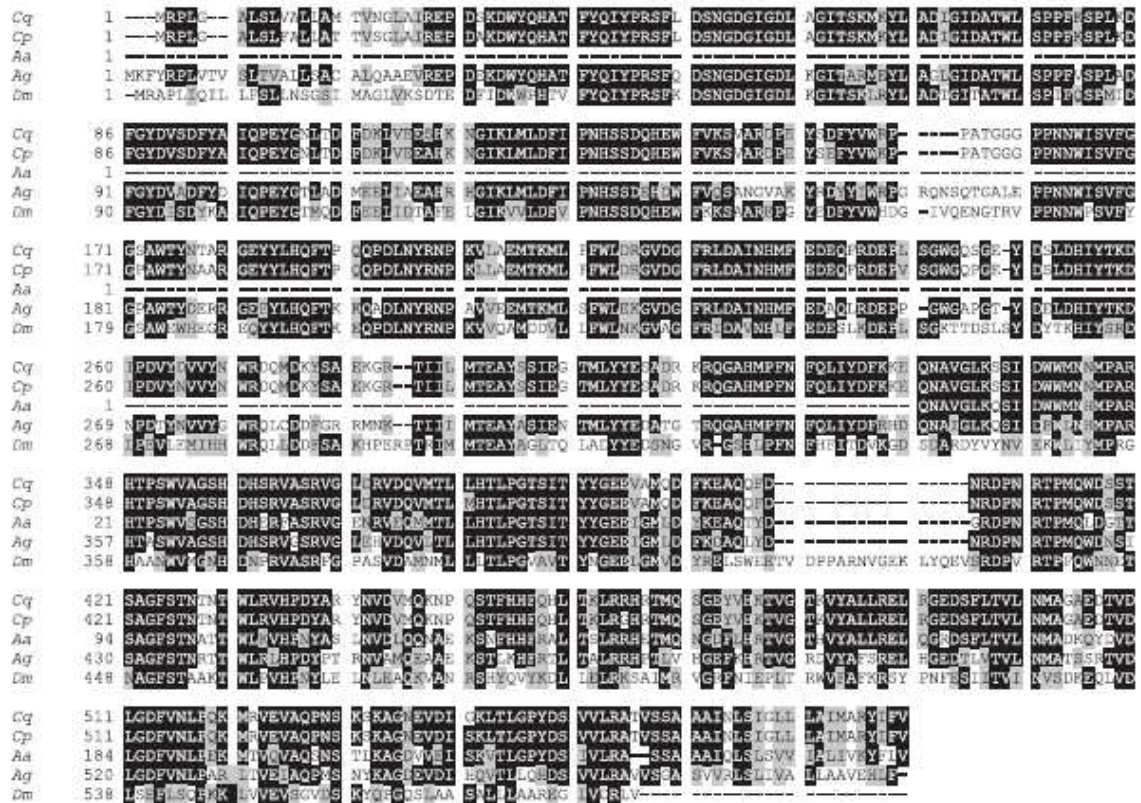


Fig. 4. Sequence comparison of the Cpm1 and Cqm1 *B. sphaericus* Bin toxin receptors from *Culex* sp. with ortholog sequences from selected dipterans. CLUSTALW alignment of Cqm1/Cpm1 with orthologs identified within the genome sequences of related insects. Amino acids identical in more than 60% of the sequences are highlighted in dark gray, whereas amino acids defined as similar, based on the BLOSUM 62 Matrix, on more than 60% of the sequences, are shown in pale gray. When necessary, spaces were inserted in the various sequences (dashed) to allow better alignment. The sequences shown are from *C. pipiens* (Cp; GenBank accession number AF222024), *Ae. aegypti* (Ae; TIGR *Ae. aegypti* Gene Index EST ID TC44701), *An. gambiae* (Ag; accession number EAA14808) and *D. melanogaster* (Dm; accession number AAF531.28.2).

assays between Rec-45 and Bin-beads showed that this protein was functional, indicating that the Bin toxin binding site is located in the N-terminal half of Cqm1 (Fig. 5B, Rec-45S -). The specificity of the binding is demonstrated by the absence of the band corresponding to 45 kDa, when incubation was performed in the presence of an excess of free Bin toxin (Fig. 5B, Rec-45S +). Furthermore, the Rec-45 antibody recognized, in assays performed with CqSF CHAPS-extracts and Bin-beads, the native 60-kDa receptor (Fig. 5B, Ex-CqSF), and confirmed its identity as Cqm1. Identical results were obtained when recombinant Rec-45 derived from either CqSF or CqRL1/2362 DNA was used (Fig. 5B, Rec-45), demonstrating that resistance is not related to modifications in the Bin toxin binding site. These results therefore confirm the identity of the Bin toxin receptor as the Cqm1 α -glucosidase and map

the Bin toxin binding site to the N-terminal region in the recombinant Rec-45.

Expression analysis of the Cqm1 receptor in whole larvae extract

So far the results shown are consistent with the 19-nucleotide deletion detected in the *cqm1* gene from the CqRL1/2362 larvae being directly associated with the resistance to the Bin toxin. To fully understand the resistance mechanism, the expression of Cqm1 in the midgut of CqSF and CqRL1/2362 larvae was investigated through its immunodetection in samples of BBMF and whole larvae extract, using the antibody to Rec-45. As expected, the antibody recognized the native Cqm1 \approx 60-kDa receptor not only in the BBMF from CqSF larvae, but also in the whole larvae crude

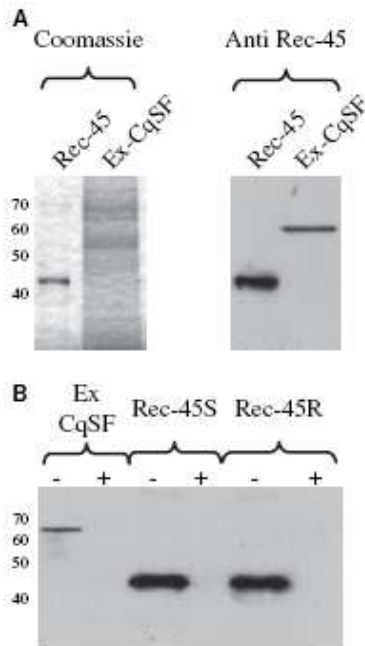


Fig. 5. Analysis of the 45-kDa recombinant fragment (Rec-45) of Cqm1. (A) Specificity of the antibody produced against the recombinant protein: Purified Rec-45 and CHAPS-solubilized midgut microvilli proteins from CqSF larvae (Ex-CqSF) were subjected to SDS/PAGE (10% gel) and visualized with Coomassie blue (left panel), or subjected to immunoblotting with the antiserum against Rec-45 (right panel). (B) Immunoblotting of *C. quinquefasciatus* proteins after affinity binding with immobilized Bin toxin, in the absence (-) or presence (+) of an excess of free Bin toxin. Ex-CqSF and recombinant Rec-45 proteins from the CqSF susceptible (Rec-45S) and CqRL1/2362 resistant (Rec-45R) colonies were incubated with Bin-beads as described in Fig. 1. Specifically bound proteins were analyzed by immunoblotting using the antiserum raised against Rec-45. On the left, molecular mass markers are shown in kDa.

extract, showing it to be an effective tool for detecting the receptor directly in complex biological samples (Fig. 6, *Culex* CqSF). The signal detected in the BBMF sample was significantly stronger than that of the whole larvae, reflecting the enrichment of this fraction with the midgut membrane-bound proteins. The immunodetection failed to recognize either the full-length protein or the truncated 437-amino acid long (≈ 50 kDa) polypeptide encoded by the modified *cqm1* gene in similar samples from resistant larvae (Fig. 6, *Culex* CqRL1/2362). Interestingly, in the refractory species *Ae. aegypti*, the protein was detected in neither BBMF nor the whole larvae crude extract (Fig. 6, *Aedes*), although we cannot rule out a failure of the antibody to recognize its ortholog from other insect

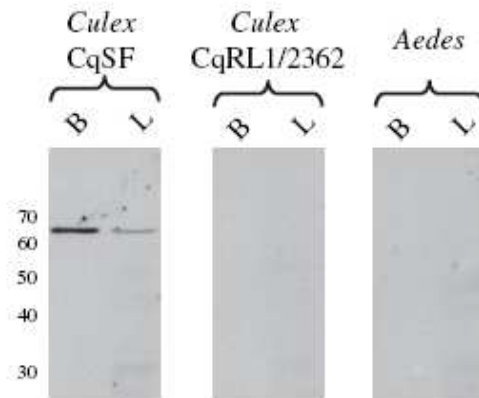


Fig. 6. Expression analysis of Cqm1 in midgut microvilli and whole larvae from susceptible (CqSF) and resistant *C. quinquefasciatus* (CqRL1/2362), as well as the refractory species *Ae. aegypti*. Immunoblotting was carried out using the anti Rec-45 serum. Samples were larvae midgut microvilli proteins (B) and whole larvae crude extract (L). On the left, molecular mass markers are shown in kDa.

species. These results are consistent with the lack of production of the Cqm1 receptor in the CqRL1/2362 larvae being the major reason behind its resistance to the Bin toxin.

In-gel α -glucosidase detection assay

The lack of expression of the Cqm1 α -glucosidase in the CqRL1/2362 larvae prompted an investigation of the total set of α -glucosidases expressed in the insect midgut. These enzymes were detected using an *in-gel* α -glucosidase assay with whole larvae crude extracts and BBMF proteins from susceptible and resistant larvae. Five bands corresponding to α -glucosidase activity were present in the BBMF from susceptible CqSF, whereas only four bands were observed in the respective resistant CqRL1/2362 sample. The same band is also absent from samples of whole larvae (Fig. 7A). The missing α -glucosidase migrates in a semidenaturing SDS/polyacrylamide gel as a protein of ≈ 80 kDa, and immunoblotting of this gel with anti-(Rec-45) serum demonstrates that it is Cqm1 (Fig. 7B). This assay confirms that a lack of expression of a unique α -glucosidase protein is associated with the resistance mechanism.

Discussion

This investigation of the molecular basis of *C. quinquefasciatus* resistance to *B. sphaericus* indicates that extensive modification of the gene encoding the binary

T. P. Romão et al.

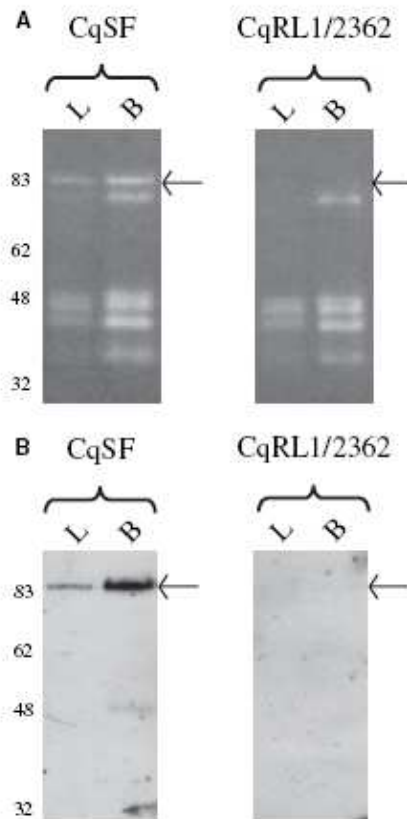
Culex resistance to *Bacillus sphaericus*

Fig. 7. Analysis of total α -glucosidases present in *B. sphaericus* susceptible (CqSF) and resistant (CqRL1/2362) *C. quinquefasciatus* larvae. (A) In gel α -glucosidase assays were performed with whole crude extracts (L) and midgut microvilli proteins (B) from CqSF and CqRL1/2362 larvae. Bands indicating cleavage of the substrate were visualized with a UV transilluminator. (B) Immunoblotting of the samples shown in (A) with Rec-45 antiserum. The relevant band is indicated by arrows. On the left, molecular mass markers are shown in kDa.

toxin receptor is involved in the resistance mechanism. *In vitro* affinity binding assays first showed the resistance to *B. sphaericus* displayed by the CqRL1/2362 colony to be associated with the lack of a 60-kDa Bin toxin receptor in samples of solubilized midgut microvilli. This result agrees with previous quantitative assays indicating a loss of Bin toxin binding to BBMF from resistant CqRL1/2362 larvae [28]. The functional receptor was confirmed from the susceptible CqSF colony as being Cqm1, the 60-kDa α -glucosidase ortholog to the *C. pipiens* receptor Cpm1 previously described [29,30]. Comparison of the *cqm1* gene sequences obtained from the two *C. quinquefasciatus* colonies, CqSF and CqRL1/2362, showed that the molecular basis of resistance relies on a 19-nucleotide deletion

which modifies the reading frame and leads to the formation of a premature stop codon. The resulting mRNA codes for a truncated 437-residue polypeptide which lacks a substantial segment of its C-terminus, corresponding to more than a quarter of the original protein, including the GPI anchor. This truncated protein does not fulfill the requirement for a membrane-bound protein to act as a Bin toxin receptor, as demonstrated in other studies [25–27,29,34].

The lack of the GPI anchor *per se* would explain the resistance mechanism to *B. sphaericus* in the CqRL1/2362 colony as has been shown for the *C. pipiens* GEO colony, where lack of this anchor and the receptor's last 11 amino acids was sufficient to release it from the apical membrane of the midgut epithelium and prevent binding of the Bin toxin [34]. In the CqRL1/2362 colony studied here, absence of the receptor protein in the BBMF of CqRL1/2362 larvae was predicted as the truncated protein lacks the GPI anchor required for its localization in the midgut microvilli. Its absence from whole larvae extract, on the other hand, indicates that it is either not being synthesized or it is not stable enough to accumulate in levels sufficient to be detected by the immunoblotting approach. It is important to remark that total α -glucosidase activity detected in BBMF samples from both *C. quinquefasciatus* colonies was similar despite the absence of the Cqm1 α -glucosidase from the BBMF of CqRL1/2362 larvae. Such observation leads to the conclusion that Cqm1 is a minor component of this enzymatic group. On the other hand, it has been shown that resistance was related to negative effects in the biological fitness of CqRL1/2362 larvae, under laboratory conditions [36]. It remains to be seen whether the Cqm1 enzyme has any relevant role, which cannot be replaced by other α -glucosidases, or whether it is nonessential and an easy target for the selection of resistance in field populations.

At this stage, it is not possible to completely rule out mutations in the *cqm1* gene outside the transcribed region as being responsible for the lack of expression of the Cqm1 receptor in the resistant larvae. However, the RT-PCR results, confirming that the gene is transcribed, and the position of the deletion within the coding sequence are more compatible with a post-translation mechanism affecting protein expression. In fact, it is likely that the new stop codon generated by the 19-nucleotide deletion would be recognized by the ubiquitous nonsense-mediated decay (NMD) pathway of mRNA degradation [37–39] and direct the *cqm1* mRNA to rapid removal. This hypothesis is not at odds with the RT-PCR results as it would detect even residual levels of the mRNA or even degradation products. The NMD pathway promotes the degrada-

tion of aberrant transcripts containing premature translation termination codons, potentially coding for nonfunctional or shortened protein products. As a survival mechanism, NMD has already been reported in many eukaryotic organisms [40], and in mammals it requires that the premature translation termination codon be positioned before the last intron of the gene, indicated in the mature mRNA by the exon junction complex [41,42], although this requirement does not apply in *Drosophila* [43,44].

The recombinant protein corresponding to a 45-kDa N-terminal fragment of the Cqml receptor (Rec-45), obtained in this work, specifically bound to the Bin toxin. The functionality of the recombinant protein demonstrates that the binding site of the Bin toxin is located in this part of the receptor. To date, no information is available on the binding motif for the Bin toxin, and this is the first evidence mapping its location to the receptor's N-terminal half. Attention should be drawn to the recent findings on the interaction of *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxins active against insects and invertebrates which indicate, at least in certain cases, the important role of glycolipids as receptors for the crystal toxin [45–47]. For the interaction of the *B. sphaericus* Bin toxin to its α -glucosidase receptor, we show that the recombinant Rec-45, expressed in *E. coli*, displays the same *in vitro* binding properties to the Bin toxin as the solubilized native receptor from the CHAPS-extract. It is very unlikely that post-translational modifications, such as glycolysation, present in the eukaryotic cells would be retained in the prokaryotic expression system. On the basis of these observations, glycolysation might not be essential for the Bin toxin-receptor binding, although it may still be required to increase the affinity of the toxin for the receptor and/or be necessary for the toxin to mediate all its functions *in vivo*.

The data presented in this work and in Darboux *et al.* [34] indicate that the occurrence of polymorphic *cqml/cpml* α -glucosidase genes, containing any sets of mutations that prevent the synthesis of the mature or membrane-bound protein, instead of mutations affecting the toxin-binding site, seems to be the major cause of resistance to *B. sphaericus*. Monitoring the frequency of such mutations in the receptor gene among *Culex* larvae populations is extremely important as a tool for resistance management. On the other hand, the evidence of ortholog proteins to Cqml in nontarget species of the Bin toxin such as *Ae. aegypti* support the need for studies to identify the Bin toxin-binding motif and to determine the requirements for this specific α -glucosidase molecule to play the role of receptor. This is essential to elucidate the toxin's mode of action and to allow the development of approaches for

improving its activity against species that potentially possess related membrane-bound α -glucosidases.

Experimental procedures

Insect colonies

Two *C. quinquefasciatus* colonies were used in this work: CqSF, a susceptible colony, and CqRL1/2362, a colony highly resistant to *B. sphaericus* strain 2362. CqSF was established from egg rafts collected in mosquito breeding sites in the Coque district of Recife, Brazil. This colony has been maintained for more than 10 years in the insectarium of the Department of Entomology/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. The CqRL1/2362 colony was derived from CqSF and, after continuous laboratory selection pressure with *B. sphaericus* strain 2362, it showed a resistance ratio close to 162 000-fold [6]. Larvae from both colonies were reared in dechlorinated tap water and fed with cat biscuits. The adults were fed on 10% sucrose solution and the females with chicken blood. All larvae and adults were maintained at 26–28 °C, 70% humidity, and a photoperiod of 12 h light/12 h darkness.

Midgut brush border membrane proteins

Midgut BBMFs were prepared from whole fourth-instar larvae, at –70 °C, using a protocol based on selective bivalent cation precipitations and differential centrifugations, as previously described [27]. BBMFs were stored at –70 °C. Protein contents were determined by the Bio-Rad protein assay using BSA as standard. The activities of BBMF enzymatic markers, leucine aminopeptidase and α -glucosidase, were assayed as previously described [29]. BBMFs (2.5 mg mL⁻¹) were solubilized in chilled sodium phosphate buffered saline with 0.02% NaN₃ (NaCl/P_i/Az), pH 7.5, supplemented with 1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, and 1% CHAPS. The samples were incubated for 1 h in ice, with gentle agitation, and centrifuged at 100 000 g for 30 min, at 2 °C. The supernatants containing BBMF soluble proteins (CHAPS-extract) were stored at –70 °C until required. Whole larvae crude extracts were prepared freshly before each experiment using five fourth-instar larvae in 100 μ L NaCl/P_i buffer, pH 7.4 containing 10 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, with a 25–75- μ m-clearance Dounce tissue homogenizer (40 strokes) from Wheaton (Millville, NJ, USA). These samples were centrifuged at 1000 g for 5 min, at 4 °C. The supernatant was recovered and kept on ice until use.

B. sphaericus toxin

Binary (Bin) crystal toxin was purified from *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* strain 4Q2-81 (*Cry minus*), transformed

T. P. Romão *et al.**Culex* resistance to *Bacillus sphaericus*

with the plasmid pGSP10-containing genes for the BinA and BinB subunits from *B. sphaericus* 1593 [48]. The spore/crystal culture recovery and the *in vitro* processing of the crystal to attain the active form of Bin toxin were performed as described [26]. The activated Bin toxin was stored in NaCl/P_i/Az at 4 °C until required. Bin toxin was covalently coupled to CNBr-activated Sepharose 4B beads® (Bin-beads) according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Bin-beads were equilibrated and stored in NaCl/P_i/Az at 4 °C until required.

Affinity assays, SDS/PAGE and immunoblotting

CHAPS-extracts (30 µg protein) from susceptible and resistant larvae were incubated with Bin-beads (20 µL) in NaCl/P_i/Az/0.01%BSA, in a final volume of 100 µL. Incubations were performed in the absence or presence of an excess of free Bin toxin (60 µg) used as a competitor. After overnight incubation at room temperature, Bin-beads were recovered by centrifugation and washed twice with NaCl/P_i/Az. Proteins specifically bound to the Bin-beads were solubilized in electrophoresis sample buffer, boiled for 5 min and submitted to an SDS/10% acryl-bisacrylamide gel. Proteins on the gel were transferred to ECL® membranes (Amersham Biosciences), in a Trans-Blot® semidry apparatus from Bio-Rad (Hercules, CA, USA) for 1 h with 1 mA cm⁻² membrane. Membranes were blocked overnight in 50 mM Tris/HCl/150 mM NaCl/0.1% Tween 20, pH 7.6, containing 5% nonfat dry milk, then incubated with antiserum against BBMF proteins [29] or an antiserum against a receptor recombinant protein, Rec-45. Membrane proteins were visualized by the ECL® procedure (Amersham Biosciences).

Amplification and cloning methods

Fourth-instar larvae total DNA from CqSF and CqRL1/2362 colonies was extracted and purified as previously described [49]. For the various PCRs, six specific oligonucleotides were designed based on the previously published *cpml* cDNA sequence [30]. Three 5' oligonucleotides (primer 1, GCACTGCAGATGCGACCGCTGGGAGCTTTG; 2, CGACTGCAGCAGCACGCGACGTTCTACCAG; primer 6, CGCCAGGGAGCTCACATGCCGTT), and three 3' oligonucleotides (primer 3, GAAAAGCTTCAGCTGGAA GTTGAACGGCAT; primer 4, AACAAGCTTCACGAA ATCTCCCAGGTCCAC; primer 7, AACAAGCTTGA AATCTCCCAGGTCCACGGT) were used. To facilitate cloning of the amplified fragments, primers 1 and 2 included restriction sites (underlined) for the enzyme *Pst*I at their 5' end, and primers 3, 4 and 7 included sites for *Hind*III. PCRs were carried out in a 25-µL final volume containing 0.2 µM each dNTP, 2.5 U Platinum *Taq* DNA Polymerase® from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), 5 µL DNA and 1.6 µM each primer. Each sample was amplified using a BIOMETRA® thermocycler under the following conditions:

denaturing at 94 °C for 3 min, then 35 cycles (94 °C for 50 s, 55 °C for 50 s, 72 °C for 120 s) followed by a final step at 72 °C for 10 min. Amplification products were analyzed in 0.8% agarose electrophoresis gel. Sets of PCRs were carried out using the primer associations 1–3, 2–3 and 2–7 and genomic DNA from both CqSF and CqRL1/2362. The resulting fragments were then digested with the *Pst*I and *Hind*III restriction enzymes and cloned into the same sites of the plasmid vectors pGEM3zf+ from Promega (Madison, WI, USA), for the fragments generated from the primer associations 1–3 and 2–7, and pRSETC (Invitrogen), for the primer association 2–3. All cloned fragments were sequenced, and the pRSETC construct was used for the expression of the Rec-45 recombinant protein fused to an N-terminal His tag.

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted from a pool of 40 fourth-instar larvae from CqSF and CqRL1/2362 colonies using Trizol and chloroform solution in diethyl pyrocarbonate-treated water. The sample was precipitated with propan-2-ol, washed with 70% ethanol, centrifuged and resuspended in diethyl pyrocarbonate-treated water. The poly(A)-rich RNA was purified using the Oligotex mRNA Purification Kit® (Qiagen, Venlo, the Netherlands). Reverse transcription was performed at 37 °C, for 1 h with 50 µg total RNA or 250 ng mRNA, 7.5 U reverse transcriptase AMV® from Gibco (Gaithersburg, MD, USA) and 2 µM primer 4. PCRs were performed as described in the section above, using 5 µL of the cDNA as template and the primer associations 2–3 and 6–7.

Cloning of the *cpml* cDNA 5' and 3' ends

RACE was performed with GeneRacer® Kit from Invitrogen, according to manufacturer's instruction using 250 ng purified mRNA extracted from pools of CqSF and CqRL1/2362 whole larvae. To clone the 5' end, the cDNA product from the first stage of the RACE reaction was first amplified with the GeneRacer 5' Primer and the cDNA-specific primer 7 (see previous section) followed by a second nested PCR using the GeneRacer 5'-Nested Primer and primer 3. Likewise, for the 3' end, the cDNA was first amplified with the gene-specific primer 2 and the GeneRacer 3' Primer followed by a nested reaction using primer 6 and the GeneRacer 3'-Nested Primer. All PCRs were performed as described previously. The resulting fragments were gel purified, cloned into the TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing from Invitrogen, and the cloned inserts sequenced to generate the final sequences for the 5' and 3' ends of the cDNA.

DNA sequence analysis

The various plasmid samples containing the relevant RACE/PCR fragments were purified with the Plasmid Max

Kit® from Qiagen and submitted to automatic sequencing. Alignment and assembly of the resulting nucleotide/amino-acid sequences were performed with the DNASTAR software package. BLAST searches were carried out to identify possible Cpm1 and Cqm1 orthologs within the *An. gambiae* and *D. melanogaster* genomic sequences available at the GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Similar searches were also performed with the partial *Ae. aegypti* EST sequences available in October 2005 at the TIGR Gene Index Databases, The Institute for Genomic Research (<http://www.tigr.org/tdb/tgi>). Selected sequences were the nearest matches to the Cpm1 or Cqm1 queries for each of the genomes investigated. The protein sequences were aligned with CLUSTALW (<http://www.cmbi.kun.nl/bioinf/tools/clustalw.shtml>) and, occasionally, manual refinement of the alignments was performed. The nucleotide sequences of the *An. gambiae* and *D. melanogaster* genes/cDNAs were also aligned to identify conserved introns.

Expression of recombinant protein and antibody production

For the expression of the recombinant protein encoded by the PCR product generated from the primer association 2–3, plasmid pRSETC/2–3 was first transformed into *E. coli* BRL cells. The procedure was carried using the PCR product from the susceptible and resistant colonies. Transformed cells were then grown in Luria–Bertani medium, and recombinant protein expression was induced with isopropyl β -D-thiogalactopyranoside. The cells were harvested, washed with NaCl/P_i and lysed by sonication. Protein purification was performed as described [50] with the resin Ni/nitrilotriacetate/agarose® from Qiagen. Recombinant protein was eluted with several washes with 0.5 M imidazole and used for the affinity binding assays and antibody production. For the production of polyclonal serum, about 200 μ g Rec-45 was first separated in a preparative SDS/12.5% polyacrylamide gel. The Rec-45 band was then excised and homogenized with 600 μ L NaCl/P_i plus 200 μ L Freund's adjuvant, followed by injection into rabbits under the following conditions: one injection by subcutaneous route with Freund's complete adjuvant, followed by three injections at 2-week intervals with Freund's incomplete adjuvant. The antiserum obtained was affinity purified as described [51], for improved specificity, before use in the immunoblotting experiments.

In-gel α -glucosidase assay

Samples of fresh whole larvae extract and BBMFs from CqSF and CqRL1/2362 colonies were solubilized in denaturing electrophoresis sample buffer without 2-mercaptoethanol and submitted to SDS/PAGE (8% gel). Gels were incubated three times with a 2.5% aqueous solution of Triton X-100 for 20 min and further incubated with a

substrate buffer containing 100 mM citrate/phosphate, pH 6.5, and 2 mM 4-methylumbelliferyl α -D-glucopyranoside from Sigma (St Louis, MO, USA), for 20 min at 37 °C, with gentle agitation. After visualization under UV, the gels were equilibrated in transfer buffer solution for 30 min at room temperature, transferred to ECL® membranes and submitted to immunodetection, as described above, using the anti-(Rec-45) serum.

Acknowledgements

This work received financial support from CNPq/Brazil (grant no. 471228/2003-6), PAPES/FIOCRUZ (grant no. 0250250202) and FACEPE (grant no. APQ-23CBIO-03/2001-01/01-20). We thank Dr Nicole Pasteur for kindly providing samples of *Culex pipiens* used in the preliminary PCR trials.

References

- Hougard JM, Mbentengam R, Lochouart L, Escaffre H, Darriet F, Barbazan P & Quillevère D (1993) Campaign against *Culex quinquefasciatus* using *Bacillus sphaericus*: results of a pilot project in a large urban area of equatorial Africa. *Bull World Health Organ* **71**, 367–375.
- Kumar A, Sharma VP, Thavaselvam D, Sumodan PK, Kamat RH, Audi SS & Surve BN (1996) Control of *Culex quinquefasciatus* with *Bacillus sphaericus* in Vasco City, Goa. *J Am Mosq Control Assoc* **12**, 409–413.
- Regis L, Oliveira CM, Silva-Filha MH, Silva SB, Maciel A & Furtado AF (2000) Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Olinda Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **94**, 488–492.
- Georghiou GP, Malik JI, Wirth M & Sainato K (1992) Characterization of resistance of *Culex quinquefasciatus* to the insecticidal toxins of *Bacillus sphaericus* (strain 2362). In *University of California, Mosquito Control Research, Annual Report 1992*, pp. 34–35. University of California Press, Berkeley.
- Wirth MC, Georghiou GP, Malik JI & Abro GH (2000) Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. *J Med Entomol* **37**, 534–540.
- Pei G, Oliveira CMF, Yuan Z, Nielsen-LeRoux C, Silva-Filha MH, Yan J & Regis L (2002) A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3003–3009.
- Sinègre G, Babinot M, Quermel JM & Gavon B (1994) First occurrence of *Culex pipiens* resistance to *Bacillus sphaericus* in Southern France. *Proceedings VIIIth European Meeting of Society for Vector Ecology*.

T. P. Romão et al.

Culex resistance to *Bacillus sphaericus*

- 5–8 September 1994 Barcelona, Spain, p. 17. Society for Vector Control, Santa Ana, CA.
- 8 Rao DR, Mani TR, Rajendran R, Joseph AS, Gajana A & Reuben R (1995) Development of a high-level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. *J Am Mosq Control Assoc* **11**, 1–5.
 - 9 Silva-Filha MH, Regis L, Nielsen-LeRoux C & Charles JF (1995) Low level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Econ Entomol* **88**, 525–530.
 - 10 Yuan ZM, Zhang YM, Cai QX & Liu EY (2000) High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3–41 in *Culex quinquefasciatus* from southern China. *Biocontrol Sci Technol* **10**, 41–49.
 - 11 Nielsen-LeRoux C, Pasteur N, Pretre J, Charles JF, Sheikh HB & Chevillon C (2002) High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west Mediterranean countries. *J Med Entomol* **39**, 729–735.
 - 12 Davidson EW & Myers P (1981) Parasporal inclusions in *Bacillus sphaericus*. *FEMS Microbiol Lett* **10**, 261–265.
 - 13 Broadwell AH & Baumann P (1986) Sporulation-associated activation of *Bacillus sphaericus* larvicide. *Appl Environ Microbiol* **52**, 758–764.
 - 14 Berry C & Hindley J (1987) *Bacillus sphaericus* strain-2362: identification and nucleotide sequence of the 41.9 kDa toxin gene. *Nucleic Acids Res* **15**, 5891.
 - 15 Arapinis C, de la Torre F & Szulmajster J (1988) Nucleotide and deduced amino-acid sequence of the *Bacillus sphaericus* 1593 M gene encoding a 51.4-kd polypeptide which acts synergistically with the 42-kd protein for expression of the larvicidal toxin. *Nucleic Acids Res* **16**, 7731.
 - 16 Nicolas L, Nielsen-LeRoux C, Charles JF & Delécluse A (1993) Respective role of the 42- and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett* **106**, 275–280.
 - 17 Broadwell AH & Baumann P (1987) Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. *Appl Environ Microbiol* **53**, 1333–1337.
 - 18 Davidson EW, Bieber AL, Meyer M & Shellabarger C (1987) Enzymatic activation of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxin. *J Invertebr Pathol* **50**, 40–44.
 - 19 Nicolas L, Lecroisey A & Charles JF (1990) Role of the gut proteinases from mosquito larvae in the mechanism of action and the specificity of the *Bacillus sphaericus* toxin. *Can J Microbiol* **36**, 804–807.
 - 20 Charles JF, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Humphreys MJ & Berry C (1997) Binding of the 51- and 42-kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). *FEMS Microbiol Lett* **156**, 153–159.
 - 21 Davidson EW, Oei C, Meyer M, Bieber AL, Hindley J & Berry C (1990) Interaction of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal proteins. *Can J Microbiol* **36**, 870–878.
 - 22 Charles JF (1987) Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **138**, 471–484.
 - 23 Silva-Filha MH & Peixoto CA (2003) Immunocytochemical localization of the *Bacillus sphaericus* binary toxin components in *Culex quinquefasciatus*. *Pestic Biochem Physiol* **77**, 138–146.
 - 24 Schwartz JL, Potvin L, Coux F, Charles JF, Berry C, Humphreys MJ, Jones AF, Bernhart I, Dalla SM & Menestrina G (2001) Permeabilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitocidal binary toxin and its individual components. *J Membr Biol* **184**, 171–183.
 - 25 Pauchet Y, Luton F, Castella C, Charles JF, Romey G & Pauron D (2005) Effects of a mosquitocidal toxin on a mammalian epithelial cell line expressing its target receptor. *Cell Microbiol* **7**, 1335–1344.
 - 26 Nielsen-LeRoux C & Charles JF (1992) Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. *Eur J Biochem* **210**, 585–590.
 - 27 Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C & Charles JF (1997) Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. mosquito larvae. *Eur J Biochem* **247**, 754–761.
 - 28 Oliveira CMF, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Pei G, Yuan Z & Regis L (2004) Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. *J Med Entomol* **41**, 58–64.
 - 29 Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C & Charles JF (1999) Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Insect Biochem Mol Biol* **29**, 711–721.
 - 30 Darboux I, Nielsen-LeRoux C, Charles JF & Pauron D (2001) The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem Mol Biol* **31**, 981–990.
 - 31 Nielsen-LeRoux C, Pasquier F, Charles JF, Sinègre G, Gavon B & Pasteur N (1997) Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) larvae. *J Med Entomol* **34**, 321–327.
 - 32 Nielsen-LeRoux C, Charles JF, Thiery I & Georghiou GP (1995) Resistance in a laboratory population of

- Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. *Eur J Biochem* **228**, 206–210.
- 33 Silva-Filha MH, Oliveira CMF, Regis L, Yuan Z, Rico CM & Nielsen-LeRoux C (2004) Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut receptor binding site: implications for resistance of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) larvae. *FEMS Microbiol Lett* **241**, 185–191.
- 34 Darboux I, Pauchet Y, Castella C, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF & Pauron D (2002) Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 5830–5835.
- 35 Krasikov VV, Karelou DV & Firsov LM (2001) alpha-Glucosidases. *Biochemistry (Mosc)* **66**, 267–281.
- 36 Oliveira CMF, Costa Filho F, Beltran JE, Silva-Filha MH & Regis L (2003) Biological fitness of a *Culex quinquefasciatus* population and its resistance to *Bacillus sphaericus*. *J Am Mosq Control Assoc* **19**, 125–129.
- 37 Gonzalez CI, Bhattacharya A, Wang W & Peltz SW (2001) Nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **274**, 15–25.
- 38 Wagner E & Lykke-Andersen J (2002) mRNA surveillance: the perfect persist. *J Cell Sci* **115**, 3033–3038.
- 39 Wilkinson MF & Shyu AB (2002) RNA surveillance by nuclear scanning? *Nat Cell Biol* **4**, E144–E147.
- 40 Culbertson MR & Leeds PF (2003) Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 207–214.
- 41 Maquat LE (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 89–99.
- 42 Lejeune F & Maquat LE (2005) Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 309–315.
- 43 Gatfield D, Unterholzner L, Ciccarelli FD, Bork P & Izaurralde E (2003) Nonsense-mediated mRNA decay in *Drosophila*: at the intersection of the yeast and mammalian pathways. *EMBO J* **22**, 3960–3970.
- 44 Conti E & Izaurralde E (2005) Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 316–325.
- 45 Crickmore N (2005) Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. *Trends Microbiol* **13**, 347–350.
- 46 Griffiths JS, Haslam SM, Yang TL, Garczynski SF, Mulloy B, Morris H, Cremer PS, Dell A, Adang MJ & Aroian RV (2005) Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science* **307**, 922–925.
- 47 Knight PJ, Carroll J & Ellar DJ (2004) Analysis of glycan structures on the 120 kDa aminopeptidase N of *Manduca sexta* and their interactions with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem Mol Biol* **34**, 101–112.
- 48 Bourgouin C, Delécluse A, de la Torre F & Szulmajster J (1990) Transfer of the toxin protein genes of *Bacillus sphaericus* into *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* and their expression. *Appl Environ Microbiol* **56**, 340–344.
- 49 Ayres CF, Romão TP, Melo-Santos MA & Furtado AF (2002) Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**, 871–875.
- 50 de Melo Neto OP, Standart N & Martins de SC (1995) Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis *in vitro*. *Nucleic Acids Res* **23**, 2198–2205.
- 51 Minshall N & Standart N (2004) The active form of Xp54 RNA helicase in translational repression is an RNA-mediated oligomer. *Nucleic Acids Res* **32**, 1325–1334.

Apêndice B – Artigo 2

Available online at www.sciencedirect.com

Biological Control 44 (2008) 227–234

**Biological
Control**

www.elsevier.com/locate/ybcon

Culex quinquefasciatus field populations subjected to treatment with
Bacillus sphaericus did not display high resistance levels

Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha ^{a,*}, Karlos Diogo de Melo Chalegre ^a,
Daniela Bandeira Anastacio ^a, Cláudia Maria Fontes de Oliveira ^a, Sinara Batista da Silva ^b,
Ridelane Veiga Acioli ^b, Sumire Hibi ^c, Débora Cardoso de Oliveira ^c,
Eunice Santos Martini Parodi ^c, Carlos Alberto Madeira Marques Filho ^c,
André Freire Furtado ^a, Lêda Regis ^a

^a Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz, Av. Moraes Rêgo s/n Cidade Universitária, Recife-PE 50670-420, Brazil

^b Centro de Vigilância Ambiental/Secretaria Municipal da Saúde de Recife, Recife-PE 53220-130, Brazil

^c Gerência do Centro de Controle de Zoonoses/Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo, São Paulo-SP 02031-020, Brazil

Received 7 June 2007; accepted 2 October 2007

Available online 11 October 2007

Abstract

A major challenge for achieving successful mosquito control is that of overcoming insecticide resistance. *Bacillus sphaericus* is one of the most effective biolarvicides used to control *Culex* species and monitoring of larval susceptibility is essential for avoiding the selection for resistance. *Culex quinquefasciatus* populations in two urban areas in Brazil, Água Fria and Pinheiros River, were subjected to *B. sphaericus* treatments over a 3-year period and their susceptibility investigated. Larval samples were submitted to *in vivo* toxicity assays and *in vitro* analysis of the receptor Cqm1, the target site of the binary (Bin) toxin, which is the major insecticidal factor in *B. sphaericus*. Bioassays were performed three times during the Água Fria Program and showed an increase from 3- to 7-fold, while for the Pinheiros River area a 5-fold increase was found at the two latest evaluations. Binding assays using the ¹²⁵I-Bin toxin and midgut microvilli samples from Água Fria and the Pinheiros River revealed that the number of receptors and their binding affinity for the Bin toxin are compatible with the profile of susceptible populations. Data indicated that the field-treated populations showed only a slight decrease in *in vivo* susceptibility and that the toxin receptor was present and functional in larval preparations. Monitoring should be continued to avoid the selection for high levels of resistance and to ensure the sustainability of *B. sphaericus*-based vector control programs.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Vector control; Receptor; Cqm1; α -Glucosidase; Diagnosis**1. Introduction**

Bacillus sphaericus Neide-based larvicides have been used in vector control programs worldwide, owing to their high and selective toxic properties to mosquito larvae (Regis et al., 2001). The binary toxin (Bin), found in crystals produced upon bacterial sporulation, is the major toxic

factor of this entomopathogen and acts as a larvicide by way of the midgut membrane-bound receptors (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992; Charles et al., 1996). The main stages of its action are the ingestion of crystals and their dissolution under alkaline pH, followed by proteolytic cleavage of the protoxin components, BinA (42 kDa) and BinB (51 kDa), into active fragments of 39 and 43 kDa, respectively (Broadwell and Baumann, 1987). These polypeptides act in synergy to cause the death of larvae. BinB is the component responsible for the recognition of and binding to specific receptors, whereas BinA is involved in

* Corresponding author. Fax: +55 81 21012516.

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

producing toxicity in the cells (Nicolas et al., 1993; Charles et al., 1997). The most common cytopathological effects of the Bin toxin already reported are damage to mitochondria and endoplasmic reticula and cytoplasm vacuolization (Charles, 1987; Singh and Gill, 1988). The manner in which Bin toxins act on the cells remains unknown and it is likely that the toxin may form pores in the cell membrane, although the mechanisms according to which this brings about the death of larvae were not elucidated yet (Schwartz et al., 2001; Boonserm et al., 2006).

Most studies on Bin toxin mode of action have been investigated in *Culex* larvae. The target site for the Bin toxin, characterized in *Culex pipiens* Linnaeus and *Cx. quinquefasciatus* Say larvae, named Cpml and Cqml, respectively, is a 60-kDa α -glucosidase molecule attached to the midgut cell membrane by a glycosylphosphatidylinositol anchor (Silva-Filha et al., 1999; Darboux et al., 2001; Pauchet et al., 2005; Romão et al., 2006). The recognition and binding of the Bin toxin to the midgut receptor are considered critical stages in the action of *B. sphaericus* on larvae (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992; Nielsen-LeRoux et al., 1995).

The most important advantages of adopting *B. sphaericus* as a larvicide for mosquito control are the specificity of its mode of action, which means it poses no harm for non-target fauna, and the long persistence enabling it to be used in the field (Regis et al., 2001; Merritt et al., 2005). The effectiveness of *B. sphaericus* larvicides in reducing the population density of *Culex* and *Anopheles*, which has been demonstrated by control programs worldwide, has confirmed the suitability of this entomopathogen for combating culicids, but also suggests that the selection for resistance may occur. Resistance was first detected in *Cx. pipiens* larvae, the most common target species, from isolated breeding sites in the South of France (Sinègre et al., 1994). This was followed by other reports of resistance selected under laboratory conditions or from natural populations that were exposed to *B. sphaericus* spraying, showing that susceptibility surveillance is an important issue to be considered in the case of long-term use (Mulla et al., 2003). The levels of resistance ratio (RR) are variable and figures ranging from a 10-fold alteration in susceptibility to over 100,000-fold, conferring a high level of resistance, have been reported in different situations (Rao et al., 1995; Silva-Filha et al., 1995; Nielsen-LeRoux et al., 1995, 1997, 2002; Pei et al., 2002; Wirth et al., 2000; Yuan et al., 2000).

Selection for resistance is a complex process and depends on a combination of interacting factors, such as the initial frequency of resistance alleles, in addition to ecological and environmental features. Among the mechanisms of resistance already described, the absence of the Bin toxin receptor in midgut microvilli is the most common and is associated with high levels of refractoriness (Nielsen-LeRoux et al., 1995, 2002; Oliveira et al., 2004; Silva-Filha et al., 2004). Mutations in the receptor gene, preventing its expression in the midgut epithelium of larvae, have been

described as the molecular base of resistance in laboratory- and field-selected *Culex* colonies, and have drawn attention to the target site of Bin toxin (Darboux et al., 2002; Romão et al., 2006).

Given the risk of selection for resistance, it is imperative that the larval susceptibility status of populations submitted to *B. sphaericus* treatments be monitored as part of vector control programs. The particularity of this study, compared to other field studies, is that the treated breeding sites are in areas with water flow, which may result in a lower selection pressure and thus a lower risk for resistance. The monitoring of susceptibility can be performed using *in vivo* toxicity assays as well as by way of biochemical analysis of the Bin toxin receptor. The main aims of our study were to evaluate the susceptibility of two *Cx. quinquefasciatus* field populations from urban areas in Brazil that have been subjected to *B. sphaericus* treatment for more than 3 years and to prevent selection for resistance to this biolarvicide.

2. Material and methods

2.1. Study areas

Água Fria (AF) is an urban district of the city of Recife, in the State of Pernambuco, Brazil. It is an endemic area for Bancroftian filariasis with a prevalence of 6% (Maciel et al., 1996), and it has been the target of a Filariasis Control Programme, which Recife City Hall's Department of Health has been running since 2003. The program includes actions such as the treatment of the human population with dietilcarbamazina (DEC), as well as measures to reduce the density of *Cx. quinquefasciatus*, the vector of the filarial worm. Action against the vector has included, among others, the treatment of breeding sites with a *B. sphaericus* strain 2362-based larvicide, Vectolex G[®] (Valent Biosciences, Libertyville, IL, USA). Close to 3000 breeding sites were mapped in a 1.14 km² area, and almost 80% of these were septic tanks. Bimonthly treatments (rate 3–5 g/m²) have been carried out, since March 2003, in those breeding sites that were operationally capable of being treated. Pinheiros (PR) is a river that crosses the metropolitan area of São Paulo-SP, Brazil, and its banks are a major location for mosquito breeding. The area is about 70 m wide, and larvicidal treatment to reduce the population of *Cx. quinquefasciatus* was carried out on 7 m wide section of each bank, along a 22.4 km stretch of the river. The river is divided by a dam into two parts, an upstream and a downstream channel, but the water can flow from one side to the other. Treatment has been going on since July 2003 and the frequency of applications depended on larval infestation. Until July 2006, 30 treatments were carried out, 25 using a *B. sphaericus*-based larvicide (Vectolex G[®], Valent Biosciences) and 5 (from the 24th to the 28th treatment) using a *B. thuringiensis* Berliner subsp. *israelensis* (Bti)-based larvicide (Vectobac G[®], Valent BioSciences). Bti also acts specifically against mosquito larvae and can be used on a

rotational basis or mixed with *B. sphaericus*. Additional treatments have also been carried out on limited sections of the river, when required. Both larvicides were applied using an aeroboat at a rate of 5 g/m² through a device that dispenses the granules on the water surface at a rate of 4 kg/min.

2.2. *Culex quinquefasciatus* samples

Culex quinquefasciatus larvae from the field-treated populations (AF and PR) and from a laboratory colony (CqSF) were used in this study. Egg rafts from AF were collected using the oviposition trap BR-OVT (Barbosa et al., 2007) randomly placed in domiciles from different streets (2 traps/street), whereas egg rafts from PR was collected directly from different sites along the river margins. A sample size varying from 30 to 303 egg rafts was collected per area for each evaluation of larvae susceptibility performed. Larvae derived from egg rafts were reared under laboratory conditions to establish colonies. Fourth instar larvae from the first or second generation obtained were used in the analysis. The susceptible laboratory colony CqSF, maintained for more than 10 years in the insectarium of the Department of Entomology from CPqAM-FIOCRUZ, was used as a reference. Larvae from all colonies were reared in de-chlorinated tap water and fed with cat biscuits. The adults were fed on 10% sucrose solution and females were also fed with chicken blood. Insects were maintained at 26 ± 1 °C, 70% of humidity and a photoperiod of 12:12 h (light:dark).

2.3. Bioassays

Culex quinquefasciatus susceptibility to *B. sphaericus* was analyzed through bioassays using early fourth instar larvae, according to the standard method recommended by World Health Organization (WHO, 1985). Larvae were exposed to serial dilutions of spore-crystal lyophilized standard powder SPH88 (Pasteur Institute, France) for 48 h. Cups held 20 larvae in 100 ml of bacterial suspension in water, and three replicates were performed for the six concentrations tested per bioassay. A control group tested on water only was run in each experiment, and the bioassay was repeated at least three times. The mean lethal concentrations for 50% and 90% (LC₅₀ and LC₉₀, respectively) of exposed larvae were estimated through the probit analysis using the program SPSS 10.0 for Windows.

2.4. Midgut brush border membrane fractions

Midgut brush border membrane fractions (BBMF) were prepared from whole fourth instar larvae, that were stored at -70 °C, as previously described (Silva-Filha et al., 1997). Protein contents were determined by the BioRad[®] protein assay (BioRad, Hercules CA, USA) using bovine serum albumin (BSA), as standard. The activity of BBMF enzymatic markers, leucine aminopeptidase (α -aminoacyl-pep-

tide hydrolase, EC 3.4.11.1) and α -glucosidase (α -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.20) were performed to evaluate the enrichment of BBMF fractions in terms of apical membranes, according to Silva-Filha et al. (1997). BBMF samples were stored at -70 °C until used.

2.5. Immunodetection of Cqml receptor

The expression of the receptor Cqml was analyzed through immunoblotting using fourth instar whole larvae. Crude homogenates were prepared freshly before each experiment using five larvae in final volume in 80 μ l of PBS buffer pH 7.4 with a 25–75- μ m-clearance Dounce tissue homogenizer. Samples were centrifuged at 1000g for 5 min at 4 °C. The supernatant was recovered and kept on ice until used. Twenty microliters of the homogenate from each colony were solubilized in electrophoresis sample buffer, boiled for 5 min and submitted to a 10% acryl-bisacrylamide SDS-PAGE gel. Proteins on gel were transferred to ECL[®] membranes (GE, Healthcare, Little Chalfon, UK) in a Trans-Blot[®] semi-dry apparatus (BioRad) for 1 h with 1 mA/cm² membrane. Membranes were blocked overnight in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6, containing 5% non-fat dry milk, and further incubated with an antiserum raised against a 45-kDa recombinant protein of the receptor Cqml (anti Rec-Cqml). The visualization of membrane proteins was done using the ECL[®] chemiluminescence system (GE, Healthcare). The immunoblotting assay to evaluate the expression of the receptor Cqml in larvae sample from each population analyzed was repeated at least three times.

2.6. *Bacillus sphaericus* toxin

The Bin2 toxin from *B. sphaericus* strain 1593 was purified from crystals isolated from a crystal-minus *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* strain 4Q2-81, transformed with the plasmid pGSP10 containing genes for the BinA and BinB subunits (Bourgouin et al., 1990). Crystals were solubilized by NaOH 50 mM, neutralized and dialyzed against 20 mM sodium phosphate buffer pH 8. Toxin was activated with bovine pancreatic trypsin (enzyme to protein ratio 1:100, w:w) for 1 h at 37 °C, and concentrated by ultrafiltration. The activated Bin2 toxin was radiolabeled with ¹²⁵I, as previously described (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992). The batches of unlabeled and labeled toxins were stored at 4 °C in a 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 containing 150 mM NaCl and 0.02% sodium azide (PBS/Az).

2.7. Saturation binding assays

In vitro saturation assays between the ¹²⁵I-Bin toxin from *B. sphaericus* and BBMF of larvae midgut from *Culex* colonies were performed at room temperature, in a 100 μ l final volume of PBS/Az pH 7.5 buffer, containing 0.1% bovine serum albumin (PBS/Az/BSA). Twenty μ g of BBMF protein was incubated with six increasing concen-

230

M.H.N.L. Silva-Filha / Biological Control 44 (2008) 227–234

trations of ^{125}I -Bin toxin (4–150 nM). Non-specific binding was determined in parallel by incubating an additional set of samples in the presence of an excess (1 μM) of the respective unlabeled toxin. Each experimental point was done in duplicate. Samples were incubated for 16 h and BBMF-bound toxin was separated from the free toxin by centrifugation. Pellets, obtained from each sample containing the BBMF-bound toxin, were rinsed twice with 200 μl aliquots of buffer, added to 3 ml of scintillation cocktail and analyzed in a liquid scintillation counter. Saturation assays were performed at least twice and the binding parameters (K_d , B_{max}) were calculated using the program Prism 3.03 for Windows[®].

3. Results

3.1. *In vivo* toxicity assays

Bioassays were carried out to ascertain the *in vivo* susceptibility of larvae sampled from two *Cx. quinquefasciatus* field populations that had been exposed to a *B. sphaericus*-based larvicide, and the level of selection for resistance to this control agent was evaluated. Larval samples from AF were first investigated after a 25-month period of exposure to *B. sphaericus*, when 13 applications were carried out in the breeding sites from that area. The larvae were susceptible and the LC_{50} of 0.008 mg/l was 2.7-fold higher than that of the CqSF colony (Table 1). The following evaluations, carried out in the third year, after 18 and 21 treatments, showed a LC_{50} of 0.022 and 0.014 mg/l, respectively (Table 1). The resistance ratios, observed throughout continuous *B. sphaericus* exposure, were less than 10-fold compared to the laboratory colony. The RR detected in the first evaluation, less than 5-fold, was not significant to indicate selection of resistance. The RR of 7.3-fold found in the second evaluation was followed by a RR of 4.7-fold and showed that susceptibility returned to an acceptable level. Moreover, larvae from AF did not show any alteration of susceptibility at LC_{90} since the RR values were close to 1 (Table 1). The first evaluation of larval samples from PR, conducted after 18 rounds of applications over a 25-month period, showed a resistance ratio, at LC_{50} , of 4.3-

fold (Table 1). The RR, at LC_{50} , of 5-fold obtained in the second evaluation was similar to that first detected, despite the selection pressure of the additional treatments in the area. As previously observed, the RR at LC_{90} of PR did not show any increase, and the alterations found at LC_{50} which were close to 5-fold could not be reliably related to the development of resistance (Table 1). It is important to notice that, of the 30 treatments, 25 were carried out using *B. sphaericus*, and 5 successive treatments using a Bti-based larvicide.

3.2. *In vitro* analysis of the Cqml receptor

The expression of the target site of the binary toxin, the receptor Cqml, was investigated in *Cx. quinquefasciatus* larvae homogenates. The samples analyzed were collected after a 25-month period corresponding to exposure to 13 and 18 treatments in the AF and PR areas, respectively. The immunoblotting assays showed that the Rec-Cqml antibody specifically recognized the 60-kDa receptor in larvae homogenates from the AF and PR populations (Fig. 1). The receptor was also detected in the homogenate larvae and in BBMF from the CqSF susceptible colony, used as a control for the presence of Cqml. The strongest signal was observed in the BBMF, since this sample is rich in microvilli and Cqml molecules, compared to the homogenate larvae (Fig. 1B). These assays showed the feasibility of detecting the Cqml receptor by way of direct immunodetection in samples, such as crude homogenates. Further assays using individual samples can be performed to evaluate the frequency of larvae that express the receptor.

In vitro saturation assays of the binding between the ^{125}I -Bin toxin and BBMF preparations evaluated the functionality of the receptors present in these samples. BBMF prepared from larvae of three colonies showed a similar level of enrichment of apical cell membranes, according to the leucine aminopeptidase and α -glucosidase activities detected in those samples (data not shown). Increasing concentrations of the ^{125}I -Bin toxin bound specifically and with high affinity to the receptors from the BBMF of AF, PR and CqSF, used as a control (Fig. 2). Specific binding of the ^{125}I -Bin toxin to the BBMF from the three colo-

Table 1

Activity of *Bacillus sphaericus* strain 2362 standard powder (SPH88), against *Culex quinquefasciatus* fourth instar larvae from a susceptible laboratory colony (CqSF) and field-treated populations from Água Fria (AF) and Pinheiros River (PR) in urban areas of Brazil

Colony	No. of treatments	No. of assays	No. of larvae	LC_{50} ^a 95% Fiducial limits	RR ^c	LC_{90} ^b 95% Fiducial limits	RR
CqSF	None	6	2,580	0.003 (0.002–0.004)	1	0.038 (0.021–0.114)	1
AF	13	3	960	0.008 (0.004–0.013)	2.7	0.020 (0.015–0.036)	0.5
	18	3	1,020	0.022 (0.019–0.027)	7.3	0.044 (0.038–0.054)	1.2
	21	3	1,320	0.014 (0.009–0.020)	4.7	0.035 (0.027–0.054)	0.9
PR	18	3	920	0.013 (0.012–0.016)	4.3	0.024 (0.021–0.029)	0.6
	30 ^d	3	1,100	0.015 (0.010–0.021)	5.0	0.037 (0.029–0.056)	1

^{a,b} Lethal concentration (mg/l) for 50% (LC_{50}) or 90% (LC_{90}) of larvae treated after 48 h.

^c RR, resistance ratio between the LC towards a field population and that of the CqSF colony.

^d Five among the 30 treatments, from the 24th to the 28th, were performed using a *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*-based larvicide.

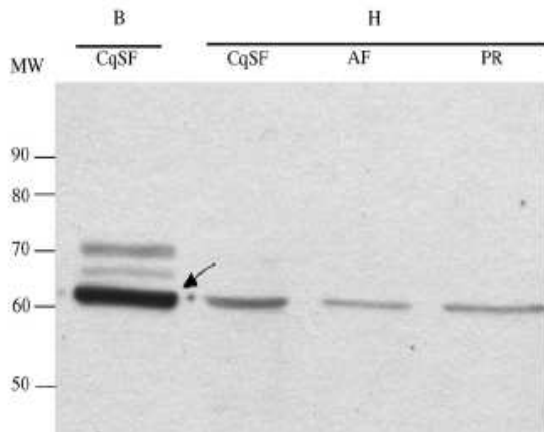


Fig. 1. Immunoblotting for the detection of the Bin-toxin receptor Cqml in samples of *Culex quinquefasciatus* midgut brush border membrane fraction (B) and whole larvae crude homogenate (H) obtained from a laboratory colony (CqSF), and from two field populations, Água Fria (AF) and Pinheiros River (PR). Samples were subjected to a 10% SDS-PAGE, transferred to an ECL[®] membrane and submitted to detection with an antiserum against a Cqml recombinant protein. Arrow indicates the 60-kDa receptor. The molecular weight (MW) in kDa is shown on the left. Assays were performed at least three times.

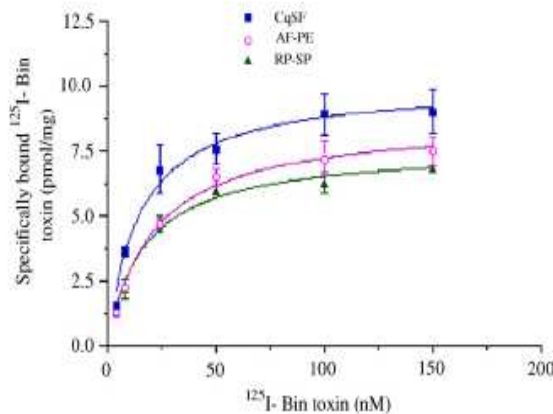


Fig. 2. *In vitro* saturation binding assays between *Bacillus sphaericus* 1593 iodine labeled Binary toxin (¹²⁵I-Bin toxin) and midgut brush border membrane fractions (BBMF) from *Culex quinquefasciatus* fourth instar larvae from a laboratory colony (CqSF), and from the field populations of Água Fria (AF) and Pinheiros River (PR). Twenty micrograms of BBMF were incubated with increasing concentrations (4–150 nM) of ¹²⁵I-Bin toxin for 16 h, at room temperature in PBS/Az/BSA buffer. Specifically bound toxin per mg of BBMF protein is shown. The non-specific binding was recorded from a similar set of incubations carried out in the presence of 1 μM of unlabeled toxin (data not shown). Each value is the mean of at least four replicates.

nies reached a saturation plateau between 50 and 100 nM of ¹²⁵I-Bin added (Fig. 2). Scatchard plotting of ¹²⁵I-Bin toxin specifically bound is consistent with a single class of receptors in the BBMF from all colonies (data not shown). The parameters of toxin binding to BBMF from all the colonies studied were similar. The values of binding site concentration (B_{max}), which estimates the population of receptors available, lay between 7.6 and 10.1 pmol of

Table 2

Saturation binding assays between *Bacillus sphaericus* 1593 Bin labeled (¹²⁵I) toxin and the midgut brush border membrane fraction (BBMF) from *Culex quinquefasciatus* fourth instar larvae from a laboratory colony (CqSF) and from treated field populations from Água Fria (AF) and Pinheiros River (PR), urban areas in Brazil

Colony	No. of assays	B_{max}^a (95% Fiducial limits)	K_d^b (95% Fiducial limits)
CqSF	2	10.1 (8.8–11.4)	14.8 (7.5–22.1)
AF	3	8.7 (7.8–9.6)	16.9 (11.7–22.2)
PR	2	7.6 (7.0–8.3)	20.7 (13.2–28.2)

^a Maximum specific binding in pmol of ¹²⁵I-Bin toxin bound per mg of BBMF protein.

^b Equilibrium dissociation constant in nM.

bound toxin per mg of BBMF protein for the PR and CqSF colonies, respectively (Table 2). The dissociation constant (K_d), which estimates the toxin binding affinity for the BBMF receptors, was in the range of 14.8 to 20.7 nM in the CqSF and PR, respectively (Table 2). The values for the parameters obtained are compatible with a model of high affinity and saturable binding of the Bin toxin to the receptors from all BBMFs analyzed.

4. Discussion

The susceptibility of AF and PR *Cx. quinquefasciatus* populations submitted to *B. sphaericus* treatments for more than 3 years did not show significant alterations. The RR detected for these populations were low; at LC_{50} it was less than 10-fold and at LC_{90} it was close to 1. Such variations of the RR are not likely to have an adverse effect on the control measures, given that high concentrations are commonly used to counteract environmental factors affecting larvicide persistence under field conditions.

Previous data have shown that *Cx. quinquefasciatus* populations subjected to *B. sphaericus* treatment exhibit varying levels of resistance. In the urban areas of Kochi (India) and Recife (Brazil), nearly 35 treatments over a 2-year period, yielded an RR of 150- and 10-fold, respectively (Rao et al., 1995; Silva-Filha et al., 1995). Other studies have reported higher levels of resistance in field populations in France, China and Tunisia (Sinègre et al., 1994; Yuan et al., 2000; Nielsen-LeRoux et al., 2002). In the city of Dongguan, China, a *Cx. quinquefasciatus* population displayed a high resistance ratio of around 20,000-fold, resulting from a selection pressure of 36 treatments per year, over 8 years (Yuan et al., 2000). On the other hand, populations from sites in Thailand's Nonthari Province, displayed a similar level of resistance after being exposed to only five treatments (Su and Mulla, 2004). The evaluation of AF and PR larvae showed that these populations did not show important changes in susceptibility and suggested that the use of *B. sphaericus* in the field does not necessary lead to resistance. There are factors that may have decreased selection pressure in both areas. The extent of the area

and the water flow into the PR, in combination with five rounds of Bti treatment, were certainly important factors. Part of the breeding sites located in households in the AF that could not be treated for operational reasons was also a source of non-treated refuges in the area. Monitoring of exposed populations would be required to establish the evolution of resistance, since this depends on the genetic background of each population, on the spray schedule used and on local environmental conditions.

The low levels of resistance found in AF and PR could be an initial stage in the development of resistance resulting from selection pressure or, alternatively, it could be related to natural variations in population susceptibility. Few data concerning the susceptibility of natural mosquito populations to *B. sphaericus* are available. The baseline susceptibility of *Cx. pipiens* populations to *B. sphaericus* and Bti, in California and Cyprus, which had not been previously exposed to bacterial larvicides, showed variations at LC_{50} of between 3- and 12-fold (Wirth et al., 2001). A screening of *Cx. pipiens* susceptibility to microbial larvicides was carried out in two populations, Syracuse and Albany, in metropolitan parts of New York State. Syracuse, with a record of the use of *B. sphaericus* and Bti, showed an LC_{50} increase of 3.1- and 33-fold, respectively, while Albany, which reported only having used Bti showed a LC_{50} decrease of 1.7-fold for *B. sphaericus* and a 5-fold increase for Bti (Paul et al., 2005). The RR of these populations to Bti, for instance, are likely to be related to natural variations in susceptibility rather than to selection for resistance, as Bti has been used worldwide for more than 20 years with no record of resistance, and trials for selecting resistance in laboratory have proved unsuccessful (Georghiou and Wirth, 1997; Becker et al., 2003). Susceptibility baseline is relevant, since variations can be naturally found in field populations, and slight alterations in the LC_{50} cannot be definitely attributed to resistance.

The alterations in susceptibility found in our study may also be due to an initial process of selection for resistance in the field-treated populations. In the absence of baseline data, a pattern of increasing values of LC_{50} during a control program could be, for instance, a clear indication that resistance selection is under development. The evaluation of AF and PR larvae carried out by our study also did not show a progressive increase in LC_{50} and, at LC_{90} no increase of concentration was detected. Nevertheless, susceptibility monitoring should be kept up, as a way of detecting further increase in resistance levels. The introduction of Bti-based larvicides is recommended to interrupt *B. sphaericus* selection pressure, owing to the lack of cross-resistance to this agent (Silva-Filha et al., 1995; Nielsen-LeRoux et al., 2001; Pei et al., 2002; Yuan et al., 2003).

Our study investigated the functionality of target site of the Bin toxin in *Cx. quinquefasciatus* larvae, with a view to backing up data from bioassays, which is the method most commonly used to evaluate larval susceptibility. The

immunoblotting assay using the antibody Rec-Cqm1, specifically raised against the α -glucosidase Cqm1, allowed for direct detection of the receptor in larvae homogenates from AF and PR. Susceptibility analysis using *in vivo* assays, although essential, is time-consuming, large numbers of larvae are required and resistant individuals are hard to be detected. The development of biochemical assays can be useful to analyze the expression of the receptor in individual larvae samples, since the lack of the receptor Cqm1 in the midgut microvilli points to an important mechanism that is associated to high resistance levels (Nielsen-LeRoux et al., 1995, 1997, 2002; Darboux et al., 2002; Oliveira et al., 2004; Romão et al., 2006).

The presence of functional receptors in midgut BBMF is a requirement for the action of the Bin toxin (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992; Nielsen-LeRoux et al., 1995; Darboux et al., 2002, 2007; Romão et al., 2006). The saturation assays showed that BBMF samples from AF and PR larvae have functional receptors and the binding parameters found, regarding the number of receptors available in BBMF (B_{max}) and the binding affinity to the Bin toxin (K_d), are compatible with the profile of susceptible populations, as previously reported. The values of B_{max} between the Bin toxin and *Culex* larvae BBMF from some susceptible colonies already analyzed, ranged from 5 to 13 pmol of Bin toxin specifically bound per mg of BBMF, while the K_d showed a variation of between 7 and 20 nM (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992; Nielsen-LeRoux et al., 1995, 1997, 2002; Oliveira et al., 2004; Silva-Filha et al., 1995, 2004). Most *Culex* colonies that displayed high *B. sphaericus* resistance are characterized by the absence of specific and saturable binding of the Bin toxin to BBMF, although resistance mechanisms not involving the lack of functional receptors in the midgut were also reported (Nielsen-LeRoux et al., 1995, 1997, 2002; Oliveira et al., 2004; Silva-Filha et al., 2004).

The toxicity and biochemical assays performed in our work determined the susceptibility status of pools of larvae. Nevertheless, these methods are not suitable to detect resistant individuals that can be present at low frequency, since resistance is recessively inherited (Nielsen-LeRoux et al., 2002). Molecular tools for the detection and monitoring of alleles conferring *B. sphaericus* resistance are under investigation and will be performed on samples from field populations in order to estimate the frequency of resistant individuals.

Our study has shown that the exposure of *Cx. quinquefasciatus* populations from the AF and PR urban areas in Brazil to *B. sphaericus* larvicides for more than 3 years did not lead to selection for high levels of resistance. The low level of resistance ratios detected were not associated with alterations in the target site of the Bin toxin since the functionality of the receptor Cqm1 in the samples from field-treated colonies were similar to those of a susceptible colony. Monitoring of *B. sphaericus* susceptibility throughout vector control programs is necessary to ensure the effectiveness of this control agent.

Acknowledgments

We thank the field teams from the Health Departments of Recife-PE and São Paulo-SP cities, Rosângela Maria Rodrigues Barbosa for the technical and logistic support to provide *Cx. quinquefasciatus* biological samples used in this work, and Peter Ratcliffe for the revision of this manuscript. This work received financial support from the CNPq/Brazil Grants Nos. 475647/2004-1 and 471911/2006-2.

References

- Barbosa, R.M.R., Souto, A., Eiras, A.E., Regis, L., 2007. Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 523–529.
- Boonserm, P., Moonsom, S., Boonchoy, C., Promdonkoy, B., Parthasarathy, K., Torres, J., 2006. Association of the components of the binary toxin from *Bacillus sphaericus* in solution and with model lipid bilayers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342, 1273–1278.
- Becker, N., Zgomba, M., Petric, C., Dahl, C., Boase, C., Lane, J., Kaiser, A., 2003. *Mosquitoes and Their Control*, first Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.
- Bourgouin, C., Delécluse, A., de la Torre, F., Szulmajster, J., 1990. Transfer of the toxin protein genes of *Bacillus sphaericus* into *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and their expression. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 340–344.
- Broadwell, A.H., Baumann, P., 1987. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 1333–1337.
- Charles, J.F., 1987. Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiology* 138, 471–484.
- Charles, J.F., Nielsen-LeRoux, C., Delécluse, A., 1996. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annual Review of Entomology* 41, 389–410.
- Charles, J.F., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Humphreys, M.J., Berry, C., 1997. Binding of the 51 and 42 kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp.. *FEMS Microbiology Letters* 156, 156–159.
- Darboux, I., Charles, J.F., Pauchet, Y., Warot, S., Pauron, D., 2007. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cellular Microbiology* 9, 2022–2029.
- Darboux, I., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Pauron, D., 2001. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 981–990.
- Darboux, I., Pauchet, Y., Castella, C., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Pauron, D., 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 5830–5835.
- Georghiou, G.P., Wirth, M.C., 1997. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1095–1101.
- Maciel, A., Rocha, A., Medeiros, Z., Carvalho, A.B., Regis, L., Souza, W., Lapa, T., Furtado, A., 1996. Epidemiological study of Bancroftian filariasis in Recife, Northeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91, 449–455.
- Merritt, R.W., Lessard, J.L., Wessell, K.J., Hernandez, O., Berg, M.B., Wallace, J.R., Novak, J.A., Ryan, J., Merritt, B.W., 2005. Lack of effects of *Bacillus sphaericus* (VectoLex®) on nontarget organisms in a mosquito-control program in Southeastern Wisconsin: a 3-year study. *Journal of the American Mosquito Control Association* 21, 201–212.
- Mulla, M.S., Thavara, U., Thawatsin, A., Chomposri, J., Su, T., 2003. Emergence of resistance and resistance management in field populations of tropical *Culex quinquefasciatus* to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 19, 39–46.
- Nicolas, L., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Delécluse, A., 1993. Respective role of the 42- and 51-kDa component of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters* 106, 275–280.
- Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush border membranes from mosquito larvae. *European Journal of Biochemistry* 210, 585–590.
- Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Thiery, I., Georghiou, G.P., 1995. Resistance in a laboratory population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. *European Journal of Biochemistry* 228, 206–210.
- Nielsen-LeRoux, C., Pasquier, F., Charles, J.F., Sinègre, G., Gaven, B., Pasteur, N., 1997. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) larvae. *Journal of Medical Entomology* 34, 321–327.
- Nielsen-LeRoux, C., Pasteur, N., Pretre, J., Charles, J.F., Sheikh, H.B., Chevillon, C., 2002. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of West-Mediterranean Countries. *Journal of Medical Entomology* 39, 729–735.
- Nielsen-LeRoux, C., Rao, D.R., Murphy, J.R., Carron, A., Mari, T.R., Hamon, S., Mulla, M.S., 2001. Various levels of cross-resistance to *Bacillus sphaericus* strains in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) colonies resistant to *B. sphaericus* strain 2362. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5049–5054.
- Oliveira, C.M., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Pei, G., Yuan, Z., Regis, L., 2004. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. *Journal of Medical Entomology* 41, 58–64.
- Pauchet, Y., Luton, F., Castella, C., Charles, J.F., Romey, G., Pauron, D., 2005. Effects of a mosquitoicidal toxin on a mammalian epithelial cell line expressing its target receptor. *Cellular Microbiology* 7, 1335–1344.
- Paul, A., Harrington, L.C., Zhang, L., Scott, J.G., 2005. Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *Journal of the American Mosquito Control Association* 21, 305–309.
- Pei, G., Oliveira, C.M., Yuan, Z., Nielsen-LeRoux, C., Silva-Filha, M.H., Yan, J., Regis, L., 2002. A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3003–3009.
- Rao, D.R., Mani, T.R., Rajendran, R., Joseph, A.S., Gajanana, A., Reuben, R., 1995. Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. *Journal of the American Mosquito Control Association* 11, 1–5.
- Regis, L., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 2001. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends in Parasitology* 8, 377–380.
- Romão, T.P., de Melo Chalegre, K.D., Key, S., Ayres, C.F., Oliveira, C.M.F., de-Melo-Neto, O.P., Silva-Filha, M.H., 2006. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its α -glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS Journal* 273, 1556–1568.
- Schwartz, J.L., Potvin, L., Coux, F., Charles, J.F., Berry, C., Humphreys, M.J., Jones, A.F., Bernhart, I., Dalla, S.M., Menestrina, G., 2001. Permeabilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitoicidal binary toxin and its individual components. *Journal of Membrane Biology* 184, 171–183.

- Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 1997. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. mosquito larvae. *European Journal of Biochemistry* 247, 754–761.
- Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.-F., 1999. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* binary toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 711–721.
- Silva-Filha, M.H.N.L., Oliveira, C.M.F., Regis, L., Yuan, Z., Rico, C.M., Nielsen-LeRoux, C., 2004. Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut receptor binding site: implications for resistance of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) larvae. *FEMS Microbiology Letters* 241, 185–191.
- Silva-Filha, M.H., Regis, L., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.-F., 1995. Low-level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology* 88, 525–530.
- Sinègre, G., Babinot, M., Quermel, J.M., Gavon, B., 1994. First occurrence of *Culex pipiens* resistance to *Bacillus sphaericus* in Southern France. In: Proceedings, VIIIth European Meeting of Society for Vector Ecology, 5–8 September 1994 Barcelona, Spain. Society for Vector Control, Santa Ana, CA, p. 17.
- Singh, G.J.P., Gill, S.S., 1988. An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 52, 237–247.
- Su, T., Mulla, M.S., 2004. Documentation of high-level *Bacillus sphaericus* 2362 resistance in field populations of *Culex quinquefasciatus* breeding in polluted water in Thailand. *Journal of the American Mosquito Control Association* 20, 405–411.
- WHO, 1985. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as microbial larvicide, Washington, 1985. Document TDR/BCV/SPHAERICUS/85.3, pp. 1–24. World Health Organization, Washington.
- Wirth, M.C., Ferrari, J.A., Georghiou, G.P., 2001. Baseline susceptibility to bacterial insecticides in populations of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from the Mediterranean Island of Cyprus. *Journal of Economic Entomology* 94, 920–928.
- Wirth, M.C., Georghiou, G.P., Malik, J.I., Abro, G.H., 2000. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. *Journal of Medical Entomology* 37, 534–540.
- Yuan, Z.M., Pei, G.F., Regis, L., Nielsen-LeRoux, C., Cai, Q.X., 2003. Cross-resistance between strains of *Bacillus sphaericus* but not *B. thuringiensis israelensis* in colonies of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Medical and Veterinary Entomology* 17, 251–256.
- Yuan, Z.M., Zhang, Y.M., Liu, E.Y., 2000. High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. *Biocontrol Science and Technology* 10, 43–51.

Apêndice C – Participação em cursos, congressos e resumos publicados

1. Curso de curta duração em “Vector evolution, ecology and physiology: News approaches to help control.” Centro de Pesquisa René Rachou, CPQRR/FIOCRUZ, Belo Horizonte, 15 a 26 de outubro de 2007.
2. **X Jornada Científica de Pós-graduação**, Rio de Janeiro 2007.
3. **X Simpósio de Controle Biológico - SICONBIOL**, Brasília, 2007.
4. **XXI Congresso Brasileiro de Entomologia**, Recife-PE, 2006.

Resumos publicados

1. CHALEGRE, K. D. M., SILVA-FILHA, M. H. N. L. Frequência de um alelo de resistência ao *Bacillus sphaericus* em uma população natural de *Culex quinquefasciatus* In: X Jornada Científica de Pós-graduação, 2007, Rio de Janeiro. **Resumos da X Jornada Científica de Pós-Graduação**, 2007.
2. CHALEGRE, K. D. M., ROMÃO, T. P. A., BARROS, R. A., OLIVEIRA, C. M. F., de MELO-NETO, O. P., SILVA-FILHA, M. H. N. L. Frequência de um alelo de resistência ao *Bacillus sphaericus* em uma população natural de *Culex quinquefasciatus* In: X Simpósio de Controle Biológico - SICONBIOL, 2007, Brasília. **Anais do X SICONBIOL**, 2007.
3. CHALEGRE, K. D. M., AMORIM, L. B., OLIVEIRA, C. M. F., ROMÃO, T. P. A., de MELO-NETO, O. P., SILVA-FILHA, M. H. N. L. Molecular tools for detection and monitoring of an allele conferring *Bacillus sphaericus* resistance in *Culex quinquefasciatus* In: 40th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2007, Quebec. **Abstracts of the 40th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology**, v.1. p.102–102, 2007.
4. CHALEGRE, K. D. M., ROMÃO, T. P. A., de MELO-NETO, O. P., SILVA-FILHA, M. H. N. L. Molecular tools to detect the resistance of *Culex quinquefasciatus* to the bioinsecticide *Bacillus sphaericus* In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology and the X IUBMB, 2007, Salvador. **Abstracts of the XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology and the X IUBMB**, p. D93 - D93, 2007.
5. CHALEGRE, K. D. M., ROMÃO, T. P. A., FERREIRA, L. M., OLIVEIRA, C. M. F., de MELO-NETO, O. P., SILVA-FILHA, M. H. N. L. Avaliação da expressão do receptor da toxina binária do biolarvicida *Bacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus* (diptera: culicidae) In: XXI Congresso Brasileiro de Entomologia, 2006, Recife-PE. **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Entomologia**, 2006.
6. CHALEGRE, K. D. M., Anastácio, D. B., OLIVEIRA, C. M. F., ROMÃO, T. P. A., Barbosa, R. M. R, REGIS, L. N., de MELO-NETO, O. P., da SILVA, S. B., HIBI, S., SILVA-FILHA, M. H. N. L. Monitoramento da susceptibilidade de populações de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) ao biolarvicida *Bacillus sphaericus* In: XXI Congresso Brasileiro de Entomologia, 2006, Recife-PE. **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Entomologia**, 2006.